

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

---

**Poruchy regulace imunity**  
-  
**alergie a autoimunitní onemocnění**

Disertační práce  
**MUDr. Jana Kayserová**

**Školitelka: Prof. MUDr. Anna Šedivá, D. Sc.**

Postgraduální studium biomedicíny  
Oborová rada: Imunologie

---

**Praha, 2013**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 9.5.2013

MUDr. Jana Kayserová

**Identifikační záznam:**

KAYSEROVÁ, Jana. *Poruchy regulace imunity - alergie a autoimunitní onemocnění. [Disorders in regulation of immunity – allergy and autoimmune diseases]*. Praha, 2013. 67 s., Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav imunologie. Školitel: Šedivá, Anna.

## **Poděkování**

Tato práce je výsledkem spolupráce mých současných a bývalých kolegů z Ústavu imunologie UK 2. LF a FNM. V první řadě děkuji své školitelce Prof. MUDr. Anně Šedivé za podporu, odborné vedení, za zasvěcení do tajů imunologie, za pomoc při psaní manuskriptů, za možnost rozvíjet mé schopnosti a dovednosti. Za výjimečně přátelské pracovní prostředí, podporu v překonávání pracovních i osobních problémů, pomoc při provádění laboratorních pokusů a analýz, za podnětné diskuse ohledně řešené problematiky děkuji celému kolektivu pracovníků Ústavu imunologie – lékařům i výzkumníkům. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i Prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové za podporu, laskavý přístup a předání mnoha vědomostí a zkušeností z oblasti imunologie.

Největší poděkování patří moji rodině, rodičům a bratrovi, za neustálou podporu, pomoc, trpělivost a lásku.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Úvod do problematiky</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Imunitní reakce podílející se na patogenezi alergií</b> .....	<b>6</b>
3.1	Role vrozené imunity - pohlcení a zpracování alergenu .....	7
3.2	Subpopulace T lymfocytů.....	7
3.2.1	Th2 lymfocyty .....	8
3.2.2	Th1 .....	13
3.2.3	Th17 .....	14
3.2.4	T regulační lymfocyty (Tregs) .....	15
3.3	B lymfocyty a imunoglobulin E .....	17
3.3.1	IgE.....	17
3.4	Žírné buňky.....	19
3.5	Basofily.....	20
3.6	Eosinofily.....	20
3.7	Role genů v rozvoji alergické reakce .....	21
<b>4</b>	<b>Imunitní reakce podílející se na patogenezi autoimunitních onemocnění</b> .....	<b>23</b>
4.1	Diabetes mellitus 1. typu .....	23
4.1.1	Rizikové faktory rozvoje T1D.....	24
4.1.2	Buněčné mechanismy v imunopatogenezi T1D.....	26
<b>5</b>	<b>Úloha dendritických buněk v rozvoji imunopatologických reakcí ve vztahu k alergiím a autoimunitním reakcím</b> .....	<b>32</b>
5.1	Biologie dendritických buněk.....	32
5.1.1	Pohlcení a prezentace antigenu .....	32
5.1.2	Maturace a migrace DC.....	33
5.1.3	Interakce dendritických buněk s T lymfocyty.....	40
5.2	Subpopulace DC .....	41
5.2.1	Myeloidní DC (mDC) .....	42
5.2.2	Plasmacytoidní DC (pDC) .....	43
5.3	Role DC v imunopatologických stavech .....	44
5.3.1	Role DC v alergické reakci .....	44
5.3.2	Role DC v autoimunitní reakci.....	46
<b>6</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>49</b>

6.1	Studie zaměřené na poruchy imunitních reakcí u pacientů s těžkými formami atopické dermatitidy .....	49
6.2	Úloha dendritických buněk u alergií a autoimunitních onemocnění .....	50
<b>7</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>53</b>
8.1	Přehledový článek shrnující společnou a rozdílnou imunopatologie alergických a autoimunitních onemocnění .....	53
8.2	Asociace polymorfismů genů pro cytokiny s klinickými a laboratorními změnami u pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy v průběhu dětství.....	61
8.3	Pozitivní korelace hladiny lehkých řetězců imunoglobulinů s tíží atopické dermatitidy .....	73
8.4	Rituximab jako možná nová biologická léčba atopické dermatitidy.....	79
8.5	Zvýšené zastoupení BDCA-3+ dendritických buněk v bronchoaleveolární laváži u pacientů s bronchiálním astmatem .....	82
8.6	Početní a funkční poruchy subpopulací dendritických buněk u pacientů s diabetem mellitem 1. typu a jejich příbuznými .....	93
8.7	Kazuistika T1D u jednovaječných čtyřčat.....	112
<b>9</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>119</b>
<b>10</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>121</b>
<b>11</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>121</b>
<b>12</b>	<b>Seznam vlastních publikací .....</b>	<b>144</b>

## 1 Abstrakt

Patologie imunitního systému může vyústit ve stavy imunodeficienci na základě poruch různých složek imunity, nebo ve stavy alergie či autoimunity, které jsou výsledkem špatné kontroly imunitních reakcí. Imunopatogeneze alergických a autoimunitních onemocnění je do značné míry společná oběma imunopatologickým stavům. Oba tyto stavy vznikají na podkladě nepřiměřené imunitní reakce, která vede k destrukci tkání a orgánů nebo k porušení jejich funkcí. Alergie i autoimunitní onemocnění jsou výsledkem kombinace vnitřních, zejména genetických a zevních faktorů jako je infekce.

V předložené dizertační práci se zaměřujeme právě na mechanismy, které vedou k poruchám regulace imunitní reakce. Na kohortách pacientů s alergickými a autoimunitními onemocněními jsme se věnovali genetické komponentě vnímavosti k těmto stavům, dále mechanismům vrozené imunity a zvláště dendritickým buňkám, které jsme vyšetřovali jak u alergií, tak u autoimunit, a posléze i získané imunitě, hlavně B lymfocytům a protilátkám. V jedné z prací předkládáme i naše zkušenosti s terapií právě ovlivněním B lymfocytární řady monoklonální protilátkou proti CD20 (rituximabem).

Souhrnem těchto prací dokládáme komplexnost imunitních reakcí, které se na alergických a autoimunitních onemocněních podílejí. Hlavní nálezy našich prací se týkají dendritických buněk. U alergií jsme dokumentovali specifické nálezy dendritických buněk v brochoalveolární laváži, které jsou charakteristické pro astma bronchiale. U autoimunit předkládáme nálezy alterace dendritických buněk u diabetu prvního typu, které se mohou podílet na vzniku onemocnění.

Dizertační práce se zabývá v obecné části poruchami regulace imunitní odpovědi na úrovni genetické i imunologické, ve vlastní výzkumné části potom předkládá konkrétní diskusi k jednotlivým vlastním výsledkům. Práce doplňuje dominantní výzkumný program pracoviště kandidátky, kterým je výzkum dendritických buněk a ukazuje na důležitost těchto buněk u alergií a autoimunit.

Klíčová slova: alergie, atopická dermatitida, diabetes mellitus 1. typu, dendritické buňky, cytokiny, protilátky

The pathology of immune system can lead to immune disorders. Immunodeficiencies are caused by insufficient or missing immune response. On the other hand, allergies and autoimmune disorders represent a consequence of wrong control of the immune reaction and breakdown of an immune tolerance. Immunopathogenesis of allergic and autoimmune diseases are to some extent common to both immunopathologies; both represent harmful hypersensitive reaction to autoantigen or allergen and lead to the destruction of tissues and organs or to their dysfunction. Allergy and autoimmunity result from the combination of internal, mainly genetic, and external factors, such as infection.

In this thesis, we focused on the mechanisms that lead to the disorders of regulation of immune reaction. We studied cohorts of patients with allergy or autoimmunity and we concentrated first on the genetic components that underlie both immunopathologies, further on mechanisms of innate immunity, particularly dendritic cells and finally on the adaptive immunity, mainly B cells and antibodies. One of our projects presented our experience with the therapy influencing B lymphocytes using monoclonal antibody against CD20 (rituximab).

In summary, our studies present a complex view on immune reactions that contribute to allergic and autoimmune diseases. Our main findings are concentrated on dendritic cells. We documented specific finding of subsets of dendritic cells in bronchoalveolar fluid in patients with asthma. In an area of autoimmune disease, we show alterations of dendritic cells in type I diabetes which can contribute to the pathogenesis of the disease.

The thesis is composed from two parts, in the first general and review part we discuss disorders of the immune regulation; in the second research part we present the discussion of our results. This thesis complements dominant research programme of candidate's department which is concentrated on dendritic cells and shows the importance of these cells in allergy and autoimmunity.

Key words: allergy, atopic dermatitis, diabetes mellitus type 1, dendritic cells, cytokines, antibodies

## 2 Úvod do problematiky

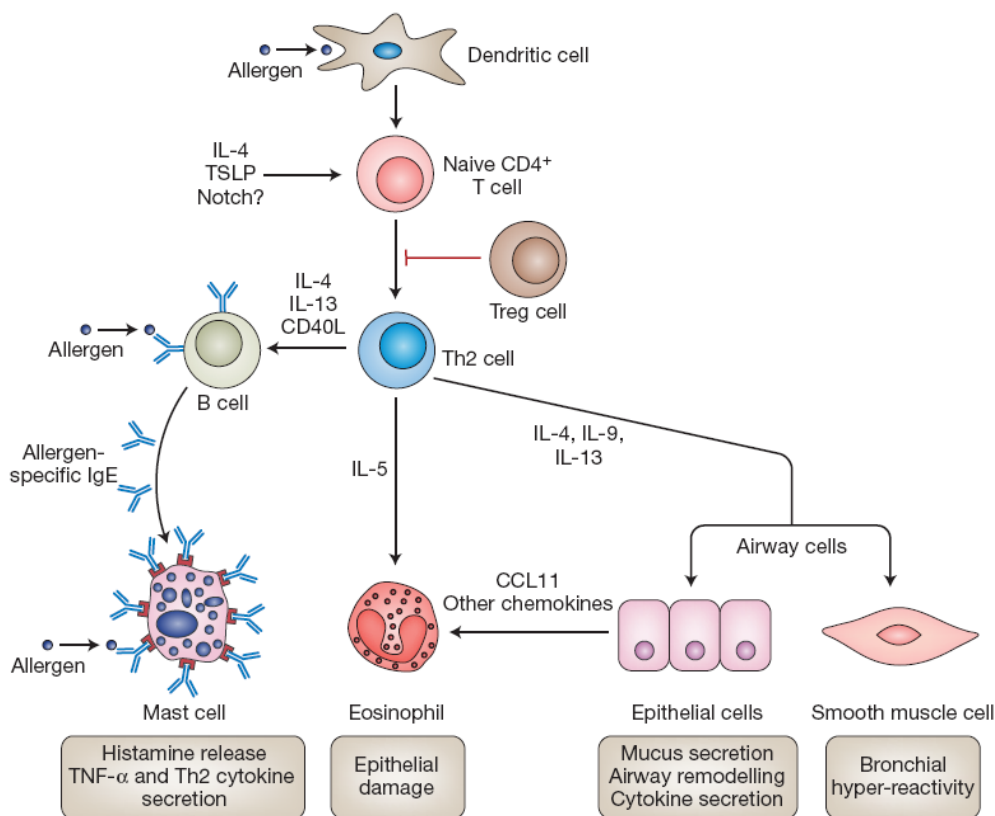
Imunitní systém člověka je výsledkem vývoje obranných mechanismů, které jsou uplatňovány u všech forem života. V tomto stadiu dosáhl imunitní systém sofistikované úrovně uspořádání, kdy je schopen zajistit rozpoznání a ochranu vlastní integrity, a zároveň účinně rozpoznání a zničení všech nebezpečí z vnějšího i vnitřního prostředí. Imunitní reakce jsou výsledkem logicky uspořádaných kroků, které vedou od aktivace vrozené imunity přes zapojení mechanismů získané imunity. Všemi stádii imunitních reakcí prostupují kroky regulační, které zajistí účinnost a bezpečnost mocných reakcí imunitního systému.

Patologie imunitního systému vyústí ve stavy imunodeficiencí na základě poruch různých složek imunity, nebo ve stavy alergie či autoimunity, které jsou výsledkem špatné kontroly imunitních reakcí. Právě těmto stavům se věnuje předložená dizertační práce. Ve dvou hlavních okruzích věnovaných alergiím a autoimunitám popisuje základní mechanismy funkce a regulace odpovídajících imunitních reakcí. Na tuto úvodní část navazují kapitoly diskutující vlastní publikované výsledků v oblasti alergií a autoimunitních onemocnění.



### 3 Imunitní reakce podílející se na patogenezi alergií

Vzájemná interakce genetických vlivů a vlivů prostředí může u některých jedinců vést k rozvoji alergických onemocnění. Alergická onemocnění jsou podmíněna hypersenzitivní reakcí imunitního systému na běžný neškodný antigen – alergen, která vede k zánětlivým změnám tkání a orgánů (obr. 1). Tato onemocnění jsou způsobena zejména I. typem imunopatologické reakce, která je založena na produkci protilátek třídy IgE proti běžným antigenům prostředí. Klasická IgE-mediovaná reakce I. typu vzniká u sensibilizovaných jedinců po styku s alergenem nyní již dobře popsanou, Th2-mediovanou cestou. Th2 lymfocyty produkují cytokiny regulující syntézu IgE protilátek B lymfocyty i aktivaci eosinofilů a žírných buněk. Imunokomplexy složené z IgE a alergenu, po vazbě na své vysoce afinní Fc-receptory (FcεRI) na povrchu žírných buněk a basofilů, indukují uvolnění dalších zánětlivých mediátorů, proteáz a cytokinů. V časně fázi se uvolňuje především histamin a heparin, v pozdní fázi jsou tvořeny sekundární metabolity, zejména produkty metabolismu kyseliny arachidonové – leukotrieny, prostaglandiny a tromboxany, které jsou vlastními mediátory klinických projevů alergické reakce.



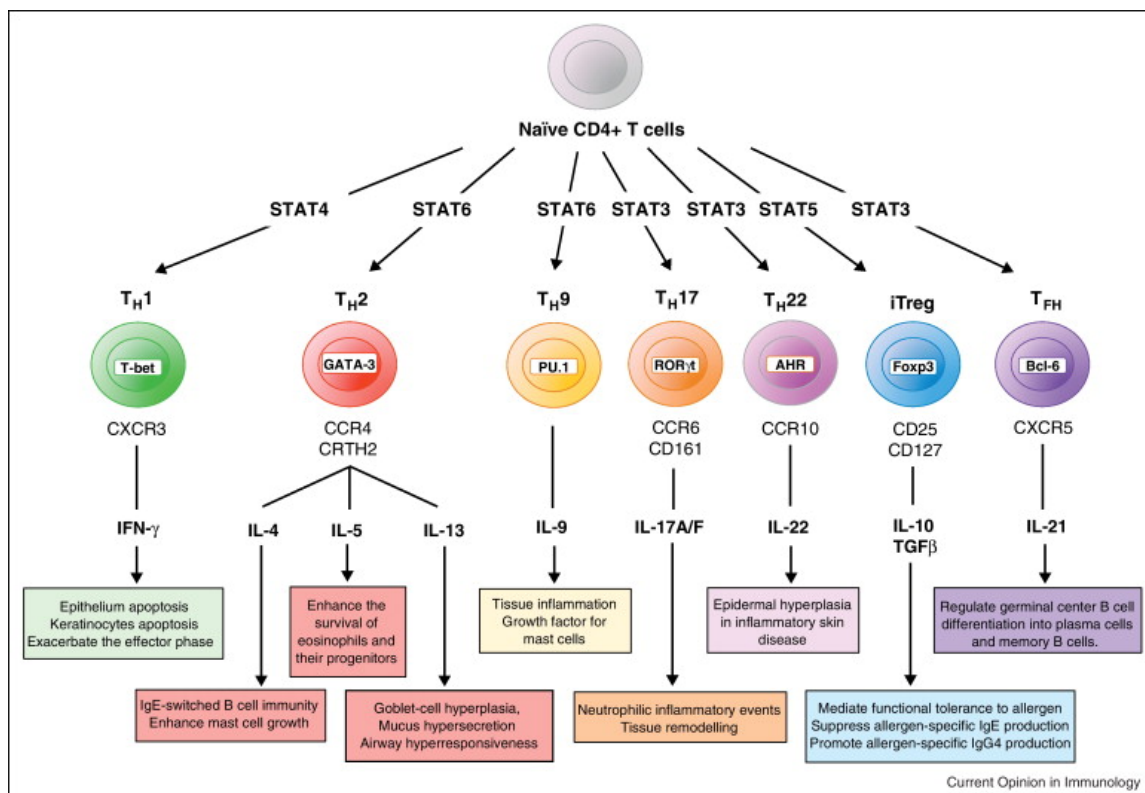
Obr. 1 Regulace alergické reakce u astma bronchiale. Převzato (Shum et al., 2008)

### 3.1 **Role vrozené imunity - pohlcení a zpracování alergenu**

Stejně jako ostatní reakce imunitního systému i alergická reakce začíná zapojením mechanismů obecné obrany organismu a reakcí vrozené imunity. Základním článkem alergické reakce je pohlcení alergenu antigen-prezentující buňkou, jeho zpracování a prezentace T-lymfocytům. Hlavní roli zde hrají především dendritické buňky (DC), které se nachází ve sliznicích dýchacích cest, zažívacího traktu i v kůži. Obdobně jako při běžném zpracování a prezentaci antigenu pracují DC i s alergenem. Podle povahy alergenu směřují potom DC u predisponovaného jedince další kroky alergické reakce zapojením Th2-větvě získané imunity. Vzhledem ke klíčové úloze DC u alergických reakcí a ve spojení s experimentální částí práce je problematice DC u alergií věnována část kapitoly 4., pojednávající právě o dendritických buňkách.

### 3.2 **Subpopulace T lymfocytů**

K diferenciaci naivních T lymfocytů do jednoho subtypu efektorových buněk Th1, Th2, Th17 nebo Treg dochází během několika dní kontaktu s antigen-prezentující buňkou (APC, Obr. 2) (Lafaille 1998). Faktorů odpovědných za vznik určitého typu efektorového T lymfocytu je mnoho: povaha a afinita antigenu, typ TCR signalizace, druh koreceptorových signálů, cytokinové prostředí. Ve vývoji jednotlivého typu T buněk je zapojeno mnoho molekulárních mechanismů, které jsou v případě alergických reakcí ovlivněny základní reaktivitou alergika a odpovídajícími poruchami v regulaci imunitní odpovědi. Alergickým reakcím dominuje Th2 typ buněčné imunitní odpovědi.



Obr. 2 Subpopulace T lymfocytů, které se vyvíjí z naivních lymfocytů. Převzato (Wabre 2012)

### 3.2.1 Th2 lymfocyty

Th2 lymfocyty hrají centrální roli v alergické reakci (Holgate 2008). Experimenty na myších modelech ukázaly, že cytokinové prostředí hraje velmi důležitou roli v regulaci diferenciace T lymfocytů, uplatnit se nicméně mohou i další faktory jako koncentrace antigenu, exprese kostimulačních molekul nebo Notch ligandy (Abbas et al. 1996; Amsen et al. 2004).

Diferenciace Th2 lymfocytů probíhá po odpovědi antigen-prezentujících buněk na okolní alergeny anebo parazity zejména pod vlivem IL-4 (Romagnani 1994; Akdis et al. 2004). Zdroj IL-4, který je odpovědný za daný fenotyp T lymfocytů ve fázi jejich diferenciace, zatím není zcela identifikován. V poslední době se jako potenciální možné zdroje jeví eosinofily, žírné buňky (Gessner et al. 2005) a NKT buňky (Wang et al. 2006). IL-4 se váže na své dva povrchové receptorové komplexy: jeden je složený z IL-4R $\alpha$  řetězce a společného  $\gamma$  cytokinového receptorového řetězce ( $\gamma$ c), druhý je složený z IL-4R $\alpha$  a IL-13R $\alpha$  řetězce. Vazbou na tyto řetězce IL-4 indukuje produkci transkripčního faktoru STAT6 v naivních T lymfocytech a další signalizační dráhy (Kelly-Welch et al. 2003). STAT6

následně aktivuje expresi hlavního diferenciačního transkripčního faktoru Th2 lymfocytů, GATA-3. GATA-3 a T-bet (transkripční faktor Th1 lymfocytů) mají antagonistický účinek. Pokud je zvýšená exprese IL-4 a GATA-3, dojde ke sníženému uvolňování T-bet, na druhé straně pokud je zvýšená hladina IFN- $\gamma$ , IL-12 a T-bet, je utlumena produkce GATA-3 (Ouyang et al. 1998). GATA-3 má vliv na up-regulaci promotorové oblasti souboru genů na chromozomu 5q31-33, mezi které patří geny kódující IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 a GM-CSF, zároveň je inhibována exprese IL-12 receptoru a vývoj Th1 lymfocytů (Zheng et al. 1997; Ray et al. 1999). Pokusy na myších modelech ukázaly, že pokud dojde k utlumení genů pro GATA-3, dojde k vymizení klíčových projevů astmatu: eosinofilie v dýchacích cestách, produkce hlenu a syntézy IgE (Zhang et al. 1999).

Interleukin IL-6 hraje také důležitou roli v indukci Th2 odpovědi, protože up-reguluje produkci IL-4 a inhibuje STAT1 fosforylaci, a tím zabraňuje expresi genu IFN $\gamma$  (Dodge et al. 2003; Detournay et al. 2005). IL-6 je produkován v časných fázích diferenciaci dendritickými buňkami, makrofágy a žírnými buňkami (Dodge et al. 2003).

Alergen-specifické Th2 lymfocyty byly identifikovány v periferní krvi (Parronchi et al. 1991; van der Heijden et al. 1991) i v postižených tkáních (van der Heijden et al. 1991; Del Prete et al. 1993) u alergických pacientů. Th2 cytokiny - IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 produkované Th2 lymfocyty mají nejrůznější přímý nebo nepřímý vliv na mnohé patofysiologické mechanismy u alergických pacientů. Tyto cytokiny vedou k produkci alergen-specifických IgE B lymfocyty (IL-4 a IL-13), mají vliv na shlukování žírných buněk (IL-4, IL-9 a IL-13) a na maturaci eosinofilů (IL-3, IL-5 a GM-CSF) a basofilů (IL-3 a IL-4). Zvýšené hladiny mRNA IL-4, IL-5 a IL-13 byly nalezeny v místech kůže, která byla i nebyla postižena atopickou dermatitidou (Hamid et al. 1996). Zvýšená Th2-cytokinová odpověď byla detekována v periferní krvi i v místě alergického zánětu, např. v dýchacích cestách u alergických pacientů (Robinson et al. 1993; Boniface et al. 2003; Cho et al. 2005). Klíčová úloha Th2 lymfocytů i jimi produkovaných cytokinů v alergické reakci je nyní již jednoznačně potvrzena.

#### 3.2.1.1 IL-4

Maturované Th2 lymfocyty produkují velké množství IL-4, který parakrinně stimuluje sousední naivní T lymfocyty k přeměně do Th2 fenotypu. Jejich role v alergické reakci není limitována jenom na schopnost indukovat produkci alergen-specifických imunoglobulinů E B

lymfocyty, ale i stimulovat infiltraci tkání žírnými buňkami a eosinofily. Data získaná na experimentálních myších modelech a u lidí ukazují, že patofyziologické důsledky vyplývající z alergické reakce mohou probíhat i za nepřítomnosti IgE a odpovědi žírných buněk, nicméně Th2 lymfocyty nebo jejich působky jsou nevyhnutelné pro patogenezi alergických onemocnění. Myši, které byly deficientní pro B lymfocyty, IgE, CD40 nebo žírné buňky, byly schopny vyvinout astma, ale u myši s deficiencí CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, IL-4, STAT6 nebo IL-5 byla sice utlumena bronchiální hypereosinofilie (Foster et al. 1997; Hogan et al. 1997), ale zároveň nedošlo k rozvoji astmatu (Akimoto et al. 1998; Ray et al. 1999; Mathew et al. 2001). Th2 lymfocyty, IL-4 a jeho vazba na odpovídající receptor jsou zásadně důležité pro rozvoj i udržení alergické reakce.

### 3.2.1.2 IL-5

IL-5 produkovaný Th2 lymfocyty je v plné míře odpovědný za eosinofilii v krvi i v postižených tkáních. Působí na progenitorové buňky v kostní dřeni a urychluje produkci eosinofilů (Johansson et al. 2004). Zvýšená hladina IL-5 byla zaznamenána v bronchoalveolární laváži (BAL) u alergických pacientů i myši, zvýšená hladina mRNA byla i v kůži pacientů s atopickou dermatitidou (Walker et al. 1992; Hamid et al. 1996; Rothenberg et al. 2006). Roli Th2 lymfocytů a IL-5 v alergické reakci podporuje i studie, která demonstrovala, že pasivní transfer T lymfocytů u IL-4 <sup>-/-</sup> myši vedl k rozvoji Th2 buněk a produkci IgE (Schmitz et al. 1994). Zdá se tedy, že v rozvoji alergické reakce za určitých okolností může být vliv IL-5 i důležitější než role IL-4. Klinické studie u lidí, kteří byli léčeni monoklonální protilátkou anti-IL-5 (mepolizumab), přinášejí ale neuspokojivé výsledky. Léčbou sice došlo k poklesu hladin eosinofilů v periferní krvi a ve sputu u astmatických pacientů, ale nedošlo ke zmírnění bronchiální hyperreakivity (Leckie et al. 2000; Kips et al. 2003; Flood-Page et al. 2007).

### 3.2.1.3 IL-9

IL-9 má mnoho imunologických funkcí, které jsou podobné jiným Th2 cytokinům. IL-9 působí přes IL-13 a indukuje produkci hlenu a působí chemoatrakci eosinofilů epiteliemi plicní tkáně (Steenwinckel et al. 2007).

Původně se, na základě mnoha *in vitro* studií, předpokládalo, že cytokin IL-9 je produkován Th2 lymfocyty, a tudíž byl zařazen do rodiny Th2 lymfocytů (Dugas et al. 1993; Petit-Frere et al. 1993). Mnohé studie u lidí potvrdily, že je IL-9 zvýšeně exprimován na úrovni mRNA i proteinu v CD3+ lymfocytech v BAL i bronchiální tkáni alergických pacientů (Shimbara et al. 2000; Erpenbeck et al. 2003; Tsicopoulos et al. 2004). Hladina IL-9 výrazněji koreluje s koncentrací alergen-specifických IgE v porovnání s IL-5 a IL-13, zároveň hladiny IL-9 byly vyšší u pacientů s astmatem než s alergickou rhinitidou (Devos et al. 2006). Výsledky získané z myších modelů astmatu jsou ale častokrát velmi rozporuplné. U transgenních myší zvýšeně exprimujících IL-9 byla po antigenní stimulaci zjištěna zvýšená bronchiální hyperreaktivita, eosinofilie a vysoké hladiny IgE (McLane et al. 1998), u IL-9 deficientní myši po sensibilizaci alergenu nebyly tyto fenomény pozorovány (McMillan et al. 2002). Studie u alergenem indukovaného astmatu s blokující protilátkou anti-IL-9 prokázaly snížení eosinofilie, IgE, bronchiální hyperreaktivity i poškození dýchacích cest (Kung et al. 2001; Cheng et al. 2002).

Poslední studie prokázaly, že interleukin 9 je produkován samostatným typem T lymfocytů, které byly označeny jako Th9 a hrají roli jedinečnou roli v imunitní odpovědi a v alergické reakci (Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008).

#### 3.2.1.4 IL-13

IL-13 patří mezi nejsilnější cytokiny produkované Th2 buňkami a nacházíme u něho mnoho účinků u alergického astmatu (Wills-Karp 2004). IL-13 se váže na společný receptorový komplex IL-4R $\alpha$  - IL-13R $\alpha$  (Mueller et al. 2002) a indukuje produkci CCL-7, -11 a -24 (Eotaxin-1, -2, and -3), chemokinů, které mají synergický efekt s IL-5 pro selektivní atrakci eosinofilů do plic (Radinger et al. 2004; Ravensberg et al. 2005). IL-13 je schopen indukovat produkci nejrůznějších dalších cytokinů a chemokinů (Kuperman et al. 2002). Blokování IL-13 protilátkou vede k utlumení bronchiální hyperreaktivity u myších modelů, zároveň se zmírní další alergické procesy jako eosinofilie, produkce hlenu a zánět dýchacích cest (Wills-Karp 2004). Knock-out myši pro tento cytokin jsou chráněny před rozvojem alergického astmatu (Wills-Karp 2004). Výsledky mnohých prospektivních studií, zejména u dětí, potvrdily silnou asociaci IL-13 s rozvojem alergických onemocnění. Vysoká produkce IL-13 mononukleárními buňkami pupečnickové krve po stimulaci Der p1 a fytohemaglutininu je asociovaná s rozvojem atopické dermatitidy ve 3 letech (Lange et al. 2003), zároveň byla

nalezena korelace prudkého vzestupu hladiny IL-13 a IL-5 v krvi v prvním roce života a rozvojem alergické symptomatologie v roce života (Neaville et al. 2003). Obdobně i studie u starších dětí potvrdily asociaci mezi alergenem stimulovanou produkcí IL-13 a klinickými projevy alergie (Contreras et al. 2003).

### 3.2.1.5 Chemokiny

Dalšími intercelulárními mediátory, které hrají důležitou roli v alergické reakci, jsou chemokiny. Chemokiny tvoří skupinu asi 40 malých, strukturálně podobných cytokinů, které interagují s transmembránovými G-proteinovými receptory. Chemokiny tvoří rozsáhlou síť. Mnohé chemokiny se váží na různé receptory a naopak jeden receptor je schopen vázat různé chemokiny (Palmqvist et al. 2007). Chemokiny regulují především migraci leukocytů jak v homeostáze, tak i v zánětu (Rot et al. 2004). Role chemokinů v alergické reakci spočívá nejen v regulaci migrace leukocytů, ale ovlivňují také buněčnou aktivaci, uvolňování mediátorů basofily a eosinofily, podporují Th2-polarizovanou zánětlivou reakci a regulaci produkce imunoglobulinu IgE (Gangur et al. 2000).

Chemokinový receptor CCR3 je exprimovaný na eosinofilech a basofilech a je receptorem pro CCL5 (RANTES), eotaxiny – CCL11 (eotaxin-1), CCL24 (eotaxin-2) a CCL26 (eotaxin-3) (Pope et al. 2005), MCP-3 a MCP-4 (Ugucioni et al. 1997). Důležitost jeho role v alergické reakci podporují výzkumy na myších modelech i u lidí. U knock-out myši, které neexprimují CCR3, byl popsán značně snížený alergický zánět v dýchacích cestách i v kůži (Humbles et al. 2002; Ma et al. 2002; Pope et al. 2005), obdobné výsledky byly dosaženy i po podání antagonisty CCR3 u myši (Das et al. 2006). Výrazně zvýšená exprese CCR3 byla zjištěna *in vivo* i *in vitro* na žírných buňkách na rozdíl od Th2 lymfocytů (Ochi et al. 1999; Romagnani et al. 1999).

Receptor CCR4 je exprimovaný především na Th2 lymfocytech, což vedlo různé skupiny k výzkumu role této molekuly u alergických onemocnění (D'Ambrosio et al. 1998). Jeho ligandy jsou makrofágy-derivovaný chemokin (MDC) a thymus-asociovaný a regulovaný chemokin (TARC) (Bonecchi et al. 1998). Mnohé studie potvrzují roli CCR4 v rozvoji Th2 odpovědi na alergen. Tyto studie dokládají, že up-regulovaná exprese CCR4 byla nalezena na Th2 lymfocytech u astmatických pacientů (D'Ambrosio et al. 2001), koncentrace CCR4+T lymfocytů koreluje s tíží onemocnění (Ishida et al. 2006) a že po stimulaci alergenem CCR4 hraje roli v migraci T buněk do dýchacích cest (D'Ambrosio et al.

2001; Nouri-Aria et al. 2002). Dalším z chemokinových receptorů, který je popsán v asociaci s Th2 fenotypem, je CCR8, nicméně jeho role v alergických onemocněních je rozporuplná.

Dalším chemoatraktivní receptor, který je výrazně zapojen do patogeneze alergických onemocnění u lidí, je CRTH2. CRTH2 (chemoattractant receptor for Th2 cells) jak už z názvu vyplývá, je exprimován hlavně na Th2 lymfocytech, nicméně je exprimován i na eosinofilech a basofilech (Nagata et al. 1999). CRTH2 je *in vitro* i *in vivo* selektivně exprimován na Th2 lymfocytech a na cytotoxických buňkách 2. typu (Tc2), ale jeho exprese nebyla detekována na jiných Th subtypech (Cosmi et al. 2000). Bylo zjištěno, že ligand pro tento receptor je produkován žírnými buňkami a že se jedná o prostaglandin D2 (Nagata et al. 1999; Hirai et al. 2001). Tyto studie přinášejí výsledky, které mohou přispět k porozumění vzájemných interakcí buněk v alergické reakci a podstaty chemoatraktivnosti buněk do místa alergického zánětu.

### 3.2.2 Th1

Na rozdíl od Th2 lymfocytů je vzájemný vztah Th1 subpopulace a atopických onemocnění velmi sporný. Th1 lymfocyty jsou subpopulace Th lymfocytů, které se diferencují z naivních CD4<sup>+</sup> lymfocytů pod vlivem IL-12 a antigen-prezentujících buněk stimulovaných mikrobiálními antigeny. Diferencované Th1 lymfocyty produkují IFN- $\gamma$ , který vede k intracelulární destrukci fagocytovaných mikrobů. Z nejrůznějších studií provedených v posledních dvou dekadách vyplývá vzájemná negativní interakce Th1 a Th2 systému. IFN- $\gamma$  produkovaný Th1 lymfocyty potlačuje rozvoj Th2 imunitní odpovědi, naopak IL-4 produkovaný Th2 potlačuje produkci IFN- $\gamma$  Th1 lymfocyty a vývoj Th1 odpovědi (Abbas et al. 1996; Ouyang et al. 1998). Nejrůznější studie dokládají korelaci mezi sníženou hladinou IFN- $\gamma$  nebo sníženou schopností produkce IFN- $\gamma$  v *in vitro* pokusech v novorozeneckém a kojeneckém období dětí, u kterých se později vyvinula alergická onemocnění (atopická dermatitida, astma) (Contreras et al. 2003). Tato Th1/Th2 nerovnováha patří mezi nejdůležitější imunoregulační mechanismy a v případě alergických onemocnění je patogenetickým podkladem tzv. hygienické hypotézy. Klíčovou roli v polarizaci imunitní reakce do určité Th odpovědi (Th1, Th2, Th17, Tregs) hrají dendritické buňky a stimulace mikrobiálním antigenem nebo alergenem přes jednotlivé typy TLR na jejich povrchu. Podrobněji bude tato problematika probrána ve stati o dendritických buňkách a jejich roli v imunopatologických stavech.



Studie z posledních let však poukazují na fakt, že alergická onemocnění nelze vysvětlit pouze pouhým posunem z Th1 do Th2, do patogeneze těchto onemocnění jsou zapojeny, zejména v chronických fázích, i další subpopulace T lymfocytů: Th1, Th17, regulační T lymfocyty (Tregs). I když je Th2 polarizace dominantní v lehčích formách astmatu, či časných stádiích atopické dermatitidy, při progresi onemocnění převládají spíše IFN- $\gamma$ -produkující Th1 a cytotoxické CD8+ T lymfocyty (Krug et al. 1996; Cho et al. 2005; Barnes 2008). Pokusy na myších modelech taky podpořily teorii o vlivu Th1 na alergický zánět. Adoptivní transfer Th1 buněk s následnou stimulací alergenem vede k migraci Th1 buněk do dýchacích cest a vzniku eozinofilního zánětu (Randolph et al. 1999).

### 3.2.3 Th17

Th1/Th2 rovnováha nebyla schopna vysvětlit všechny molekulární mechanismy, které vedly ke vzniku imunopatologických stavů. V poslední dekádě byly objeveny další subtypy T lymfocytů, které zasahují do imunopatologických reakcí a do patogeneze autoimunitních a alergických onemocnění – Th17 a T regulační lymfocyty (Weaver et al. 2006; Stockinger et al. 2007).

T lymfocyty produkující IL-17 byly popsány v roce 2000 jak na myším, tak lidském modelu (Infante-Duarte et al. 2000). Podle produkovaného cytokinu byly nazvány „Th17 lymfocyty“. Jejich vývoj je závislý na interleukinu-23 a transkripčních faktorech, které se odlišují od těch u Th1 nebo Th2 lymfocytů (Harrington et al. 2005; Park et al. 2005). Později byl jako klíčový diferenciační transkripční faktor identifikován ROR- $\gamma$ t (Ivanov et al. 2006). U této subpopulace lymfocytů existují výrazné rozdíly ve vlivu cytokinového prostředí na jejich diferenciaci. U myši bylo zjištěno, že klíčovým cytokinem vedle IL-23 je IL-6 v kombinaci s TGF- $\beta$  pro *in vitro* i *in vivo* diferenciaci Th17 lymfocytů (Bettelli et al. 2006; Veldhoen et al. 2006). Tato trojkombinace cytokinů vede k diferenciaci patogenetických Th17, pokud jsou ale při diferenciaci přítomny jen IL-6 s TGF- $\beta$ , vede to ke vzniku Th17, které zároveň s IL-17 produkují i IL-10 (McGeachy et al. 2007). U lidí je situace jiná. Pro svou diferenciaci potřebují Th17 zcela jiné cytokinové prostředí. TGF- $\beta$  zřejmě nehraje rozhodující roli v diferenciaci Th17, důležitá je kombinace IL-1 $\beta$  s IL-23 nebo IL-1 $\beta$  a IL-6 (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Wilson et al. 2007).

V posledním desetiletí se mnohé studie, zvláště na myších modelech, snažily prokázat roli Th17 v patogenezi alergických onemocnění, především astmatu a atopické dermatitidy.

Úloha Th17 v rozvoji alergických onemocnění však zatím není zcela jasná. Bylo prokázáno, že IL-17 mRNA i IL-17 byly zvýšené v plicích, sputu, bronchoalveolární laváži (BAL), v biopsiích kůže i sérech pacientů s astmatem v korelaci s tíží onemocnění, (Molet et al. 2001; Laan et al. 2002; Zhao et al. 2010). Stejně nálezy byly potvrzeny v chronické fázi atopické dermatitidy (Toda et al. 2003). Interleukin IL-17 zvyšuje produkci mnohých dalších cytokinů a chemokinů, včetně IL-6, IL-8, CCL20 bronchiálními nebo kožními fibroblasty, epiteliálními buňkami a keratinocyty (Molet et al. 2001; Toda et al. 2003; Kao et al. 2005). Výsledky ze studií patogeneze astmatu a atopické dermatitidy provedených na myších modelech přinášejí rozporuplné výsledky. Studie na deficientních myších kmenech IL-17A<sup>-/-</sup> nebo IL-17RA<sup>-/-</sup> prokázaly vliv IL-17A na indukci alergen-specifických Th2 lymfocytů, akumulaci eosinofilů a zvyšování hladiny IgE v séru (Nakae et al. 2002; Schnyder-Candrian et al. 2006). Na druhé straně výsledky studií na myších modelech astmatu indukovaného ovalbuminem ukázaly, že po podání blokační protilátky anti-IL-17A dojde k nárůstu migrace eosinofilů a produkce IL-5 v bronchoalveolární laváži (BAL) (Schnyder-Candrian et al. 2006). Zdá se, že Th17 nemají přímý vliv na Th2 lymfocyty, ale spíše potencují nespecifickou imunitu - migraci neutrofilů do místa zánětu, aktivaci žírných buněk a regulují Th2-mediovanou alergickou odpověď.

### 3.2.4 T regulační lymfocyty (Tregs)

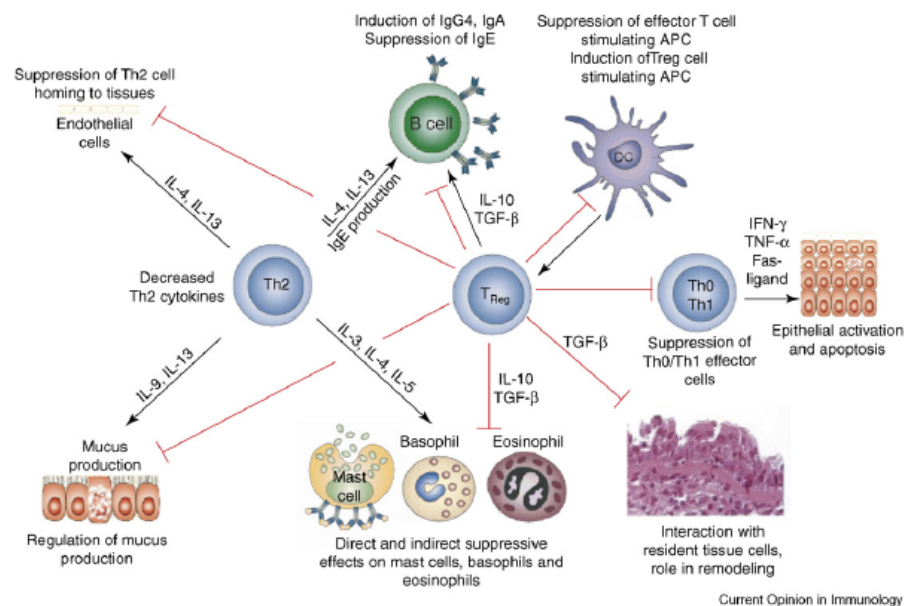
T regulační lymfocyty (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>) jsou další subpopulací T lymfocytů hrající roli v rozvoji alergií. Tregs jsou schopny potlačovat vznik alergické Th2 i Th1 odpovědi, a proto hrají důležitou regulační roli v reakci imunitního systému na alergeny a také v patogenezi alergických onemocnění (Akdis et al. 2004; Verhagen et al. 2006). V periferní krvi se nachází v počtech asi 5-10% z CD4<sup>+</sup> (Sakaguchi et al. 1995). CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> tvoří subtyp Tregs tzv. přirozených, konstitutivních Tregs (nTregs), které vznikají v thymu. Druhým subtypem jsou inducibilní Tregs, které vznikají v periférii efektorových T buněk vystavených antigenům. Tato populace se vyznačuje produkcí cytokinů, pomocí kterých negativně regulují imunitní reakci: IL-10 (Th3 lymfocyty), TGF-β (Tr1) (Sakaguchi 2004; Wing et al. 2006).

Predominance atopické dermatitidy u pacientů s onemocněním IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome), jehož podstatou je právě porucha funkce Tregs, vedla mnohé výzkumné skupiny ke studiu role Tregs u alergických onemocnění.

Tregs normálně inhibují expresi Th2 cytokinů v odpovědi na alergen u nealergických lidí (Ling et al. 2004). Švýcarská skupina ukázala, že u pacientů s astmatem se v krvi vyskytuje zvýšená koncentrace Th2 lymfocytů produkujících IL-4 na rozdíl od zdravých dárců, u kterých byl zvýšený podíl T regulačních buněk produkujících IL-10 (Akdis et al. 2004). U alergických pacientů byly zjištěny snížené počty Tregs i v BAL-u (Hartl et al. 2007). Zároveň i pokusy na myších modelech prokázaly suprimující vliv Tregs v dýchacích cest na alergický zánět a bronchiální hyperreaktivitu (Kearley et al. 2005; Lewkowich et al. 2005; Strickland et al. 2006).

Roli Tregs v supresi alergické reakce na alergen podporují i výsledky ze studií u alergen-specifické imunoterapie (SIT). Bylo prokázáno, že alergenová SIT vede ke zvyšování supresorové aktivity u alergen-specifických IL-10-produkujících Tr1 lymfocytů i CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> Tregs (Akdis et al. 1998; Jutel et al. 2003; Ling et al. 2004). Mezi supresorové molekuly alergen-specifických Tr1 buněk patří cytokiny IL-10, TGF-β a molekuly CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) a PD-1 (programmed death).

Všechny tyto studie prokazují, že Tregs hrají důležitou roli v regulaci alergické reakci. Souhrnný vliv Tregs na regulaci alergické odpovědi ukazuje následující obrázek (Obr. 3):



Obr. 3 Vliv regulačních T lymfocytů na regulaci alergické odpovědi. Převzato (Akdis 2006)

### 3.3 **B lymfocyty a imunoglobulin E**

Další důležitou skupinou leukocytů s významným vlivem na rozvoj alergické reakce jsou B lymfocyty. Role B lymfocytů v patogenezi alergických onemocnění je dána především produkcí alergen-specifických imunoglobulinů IgE.

#### 3.3.1 **IgE**

Aktivované Th2 lymfocyty up-regulují na svém povrchu molekulu CD40L, která aktivuje svůj ligand CD40 na B lymfocytech. B lymfocyty po této stimulaci Th2 lymfocyty za přítomnosti IL-4 a IL-13 produkují imunoglobuliny ve třídě IgE (Platts-Mills 2002). U alergických pacientů je tato polarizace výraznější. U pacientů trpících alergickou rhinitidou bylo zjištěno, že v nosní sliznici se nachází cca 4% B lymfocytů a 12-19% plasmatických buněk exprimujících IgE, u zdravých osob tyto subpopulace lymfocytů tvoří pouze 1% (KleinJan et al. 2000).

IgE se váže na své dva povrchové receptory: vysoko-afinní (FcεRI) a nízko-afinní (FcεRII) receptory. Vysoko-afinní receptor FcεRI je exprimován na povrchu všech typů granulocytů, především na basofilech a žírných buňkách, ale také na monocytech, DC a Langerhansových buňkách. Exprese FcεRI na povrchu basofilů a žírných buněk koreluje s hladinou IgE. Pokles IgE v séru vede ke snížení exprese FcεRI a snížené schopnosti degranulace basofilů a žírných buněk (MacGlashan et al. 1999; Holgate 2000). Nízko-afinní receptor FcεRII (CD23) je exprimován na povrchu mnohých buněk, včetně B buněk, makrofágů i na buňkách hladkých svalů v dýchacích cestách (Hakonarson et al. 1999). Na povrchu B lymfocytů je exprimován v obou svých isoformách. Studie na myších modelech i *in vitro* studie dokládají, že CD23 reguluje IgE expresi pomocí negativní zpětné vazby a následně i vlastní povrchovou expresi (Kisselgof et al. 1998). Obdobné výsledky podporují i klinické studie u bronchiálního astmatu s použitím monoklonální protilátky anti-CD23, IDEC-152. Po podání protilátky došlo k poklesu IgE, nicméně bez výraznějšího klinického významu (Rosenwasser et al. 2003).

IgE je považován za klíčový mediátor v patogenezi alergických onemocnění. Vysoké hladiny IgE detekované v séru jsou asociované s bronchiálním astmatem, atopickou dermatitidou a jinými alergickými onemocněními (Burrows et al. 1989). Hladiny IgE v séru jsou u atopických jedinců 10-krát i vícekrát vyšší než u zdravých lidí. Zvýšené hladiny IgE

v pupečnickové krvi jsou asociovány s predispozicí k atopii u malých dětí (Kobayashi et al. 1994). Nicméně u značného procenta pacientů s astmatem a alergickou rhinitidou naopak nenacházíme zvýšené hladiny IgE v séru (D'Souza et al. 1999). Tato onemocnění jsou považována za non-IgE-mediovaná a ukazují, že do patogeneze těchto alergických onemocnění jsou zapojeny další mediátory a buňky imunitního systému.

### 3.3.1.1 Lehké řetězce

Lidské imunoglobuliny jsou složeny ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců spojených disulfidickými můstky. Lehké řetězce  $\kappa$  a  $\lambda$  jsou během syntézy imunoglobulinů produkovány v nadbytku (Hannam-Harris et al. 1981; Hopper et al. 1986). Tyto volné lehké řetězce se vyskytují buď jako monomery (molekulová hmotnost 22-27 kDa) nebo dimery (molekulová hmotnost 44-55 kDa). Volné polyklonální lehké řetězce jsou detekovatelné u zdravých lidí v mnohých biologických tekutinách: sérum, moč, mozkomíšní mok (Bradwell et al. 2001; van der Heijden et al. 2006). Předpokládá se, že během 24 hodin se vyprodukuje cca 500mg volných lehkých řetězců, které jsou katabolizovány a vyloučeny ledvinami (1-10mg/24hod.) (Bradwell 2006).

Abnormální zvýšení monoklonálních lehkých řetězců v séru je spojováno především s maligní klonální proliferací plasmatických buněk – monoklonální gamapatií, MGUS (Bradwell 2006). Nadbytečná produkce volných lehkých řetězců (FLC) byla považována za vedlejší produkt syntézy imunoglobulinů, nicméně mnoho studií ukázalo, že lehké řetězce interagují s mnohými intracelulárními a extracelulárními proteiny (Nishimura et al. 1999; van den Beucken et al. 2001) i buňkami (Wall et al. 1996) a mají nejrůznější biologické působení, např. aktivace komplementu (Jokiranta et al. 1999). V posledních letech byla prokázána role volných lehkých řetězců v regulaci zánětlivé reakce u mnohých imunopatologických stavů. Bylo prokázáno, že volné lehké řetězce jsou schopny indukovat aktivaci žírných buněk, která vyústí v akutní hypersenzitivní reakci (Redegeld et al. 2002). Po podání specifického antigenu (alergenu) naivním myším, u kterých předem proběhl transfer alergen-specifických FLC, došlo k aktivaci žírných buněk, k lokálním otokům (při kožní aplikaci) nebo k bronchokonstrikci, pokud byl antigen podán intranasálně (Redegeld et al. 2003; Kraneveld et al. 2005). Stejné výsledky dokládají i studie s deficičními myšimi kmeny pro žírné buňky nebo studie s použitím specifického antagonisty F991, kdy hypersenzitivní reakci vyvolané

FLC lze zabránit podáním daného antagonisty (Redegeld et al. 2002; Kraneveld et al. 2005; van Houwelingen et al. 2007).

Zvýšené hladiny FLC v séru byly popsány u mnohých autoimunitních i alergických onemocnění. U autoimunit korelovaly hladiny FLC s hladinou IgG a aktivitou onemocnění ((van der Heijden et al. 2006; Gottenberg et al. 2007; Hutchison et al. 2008). Nedávno holandská výzkumná skupina popsala signifikantně vyšší hladinu FLC u pacientů s astmatem IgE i non-IgE mediovaným v porovnání se zdravými kontrolami (Kraneveld et al. 2005). Výsledky těchto studií dokládají, že spolupůsobení FLC a žírných buněk hraje důležitou roli v patogenezi atopických i non-atopických alergických onemocnění.

### 3.4 **Žírné buňky**

Žírné buňky jsou již dlouho asociovány s patogenezí alergických onemocnění. Koncentrují se v sliznicích dýchacích cest u astmatu (Kaur et al. 2006; Holgate 2008) i v dermis u atopické dermatitidy (Alenius et al. 2002). Přemostění IgE-FcεRI komplexů na povrchu žírných buněk vazbou alergenu vede k časně fázi alergické reakce, k degranulaci žírných buněk a k uvolnění vazoaktivních látek jako jsou histamin, tryptáza a jiné proteázy, heparin a další látky, které jsou uloženy v sekrečních granulech. Tyto působky vedou ke zvýšené kontraktilitě hladkých svalů, zvyšují mikrovaskulární permeabilitu a vazodilataci následně i k příznakům astmatu (pískoty, dušnost) nebo alergické rýmy (nasální obstrukce a sekrece). Zároveň dochází k produkci metabolitů kyseliny arachidonové – leukotrienů (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), prostaglandinů (PGD<sub>2</sub>) a tromboxanů (TXA<sub>4</sub>). Cytokiny a chemokiny uvolněné v časně fázi spouštějí během několika hodin pozdní fázi alergické reakci (Gould et al. 2008). Žírné buňky a eosinofily jsou taky důležitým zdrojem matrixových metaloproteináz (MMP-3 a MMP-9). MMP interagují s matrixovými proteiny a proteoglykany a podílejí se na remodelaci dýchacích cest (Wenzel et al. 2003). Žírné buňky tedy hrají roli v časně i pozdní fázi alergické reakce a jsou jedním z klíčových faktorů jejího rozvoje.

### 3.5 **Basofily**

Podobnou funkci jako žírné buňky mají i basofily, exprimující FcεRI, které po přemostění FcεRI rychle produkují cytokiny a histamin. Žírné buňky byly dlouho považovány za tkáňovou formu basofilů. Nicméně pomocí specifických markerů basofilů, např. basogranulinu, byla tato samostatná subpopulace granulocytů identifikována v dýchacích cestách astmatiků (Macfarlane et al. 2000; Mochizuki et al. 2003; Agis et al. 2006).

V posledních letech byla odhalena role basofilů jako hlavní zdroj IL-4 a IL-13 produkovaných po kontaktu s alergenem a následně polarizujících imunitní odpověď směrem k Th2. Kromě zmiňovaných cytokinů, basofily produkují i TSLP (thymic stromal lymphopoeitin) ((Min 2008). *In vitro* jsou basofily schopny indukovat přesmyk B lymfocytů k produkci IgE. Aktivované basofily zvyšují expresi CD40 ligandu na svém povrchu, který po rozeznání CD40 molekuly na povrchu B lymfocytů vede k jejich diferenciaci (Yanagihara et al. 1998).

### 3.6 **Eosinofily**

Dalším buněčným typem, který je velmi často popisován u alergického zánětu jsou eozinofily. Fyziologicky jsou eozinofily přítomny téměř výlučně v zažívacím traktu a nejsou přítomny v jiných tkáních. Hlavním maturačním a chemoatraktivním faktorem eosinofilů je IL-5. Také některé CC chemokiny jsou důležitým chemotaktickým faktorem pro eozinofily – eotaxin a RANTES. Eozinofily představují bohatý zdroj kationických proteinů uvolňovaných z granulí jako hlavní bazický protein (major basic protein – MBP), eozinofilní peroxidáza a eozinofilní kationický protein (ECP), destičky aktivující faktor (PAF), zároveň jsou schopny produkce eikosanoidů – prostacyklin (PGI<sub>2</sub>) a leukotrieny (LTC<sub>4</sub>). V poslední době bylo prokázáno, že eozinofily mají schopnost aktivovat dendritické buňky, které mohou polarizovat Th2 imunitní odpověď (Yang et al. 2008).

U alergických onemocnění jako astma nebo atopická dermatitida nacházíme poměrně často eozinofilii v periferní krvi korelující s tíží onemocnění (Holgate 2008). U pacientů se slabou kontrolou nad astmatem jsou eozinofily přítomny nejenom ve stěně dýchacích cest, ale i ve sputu nebo bronchoalveolární laváži (Holgate 2008). Jak už bylo popsáno výše (viz. Kap. 2.2.1.2.), klinické studie s mepolizumabem (monoklonální protilátka anti-IL-5) sice vedla

k dramatickému snížení počtu eozinofilů, nicméně bez výraznějšího inhibičního efektu na bronchiální hyperreaktivitu.

### 3.7 **Role genů v rozvoji alergické reakce**

Na vzniku a rozvoji alergických onemocnění se jasně podílí genetická dispozice. Alergie nicméně nepodléhají základním mechanismům mendelovské dědičnosti, jejich genetická komponenta je velmi komplexní. Vzhledem k polygenní dědičnosti, k pravděpodobnému vlivu více genů a kombinace těchto genů je výzkum genetiky alergie složitý. Navíc fenotyp onemocnění může být ovlivněn různou penetrancí, kombinací genů nesoucích různé polymorfismy a dokonce i vlivem prostředí na genetickou výbavu jedince.

Všechny studie, které se věnují genetice alergie a hledání zúčastněných genů, začínají genetickými studii rodin, kde se onemocnění vyskytuje. Velkou výhodou v tomto hledání je studium dvojčat, které usnadní mapování kandidátních genů. Riziko AD u dítěte je 50%, pokud jeden z rodičů má alergické onemocnění (AD, bronchiální astma nebo alergická rhinitida) a 75%, pokud oba rodiče jsou alergičtí. (Schultz Larsen 1993; Reich et al. 2003).

Většina kandidátních genů asociovaných s atopií, astmatem nebo AD je indentifikována nejvíce ze studií zaměřených na single nukleotide polymorfismů (SNP), které vedou ke změnám exprese daných genů. Zvýšená nebo snížená exprese daných proteinů ovlivňuje jejich výsledné zapojení v imunitní reakci. Výsledky studií v posledních desetiletích přinesly rozporuplné asociace mezi SNP a alergickými onemocněními a byly závislé na zkoumané populaci.

Většina studií u kavkazské populace, včetně genome-wide studií, potvrdily asociaci určitých SNP genů se zvýšenou hladinou IgE nebo s alergickými onemocněními: 1q21, 3q21 (CD80 a CD86), cluster cytokinových genů na 5. chromosomu 5q, 11q ( $\beta$ -řetězec Fc $\epsilon$ RI), 12q (IFN- $\gamma$  a STAT-6) a chromosom 16 (IL-4R), 20p a další. Tyto studie prokázaly sílu asociace chromozomálních úseků od slabé až po velmi silnou.

Na chromosomu 1q21 se nachází gen pro filaggrin, který je hlavní protein epidermální diferenciace a jeho mutace jsou asociovány s atopickou dermatitidou (Palmer et al. 2006; Weidinger et al. 2006). Mutace filaggrinu se vyskytují v časných fázích AD a indikují sklon k astmatu (Soderhall et al. 2007)

Nejvíce studovaným regionem genomu ve spojitosti s alergickým onemocněním je úsek na chromosomu 5q, kde jsou kódovány mnohé mediátory Th2-imunitní reakce: IL-4, IL-



5, IL-9, IL-13, GM-CSF, SPINK5. Mnohé studie potvrdily asociaci SNP těchto genů s rozvojem astmatu (Halapi et al. 2004), atopickou dermatitidou (Beyer et al. 2000) a závažností AD (Soderhall et al. 2002). Polymorfismus promotorové oblasti IL-4 (IL-4 - 590C/T) vede ke zvýšené aktivitě této oblasti a je asociovaný s AD (Woodward et al. 2001). Mnohé genové variace genu pro IL-13 jsou asociovány se zvýšenou hladinou IgE (Kabesch et al. 2006), s eosinofilií (Liu et al. 2004) a atopickou dermatitidou (Halapi et al. 2004).

Specifická imunitní odpověď je zahajována prezentací antigenů navázaných na HLA molekuly I. nebo II třídy T lymfocytům. HLA I. i II. třídy jsou zapojeny do patogeneze alergie (Kuwata et al. 1994; Saeki et al. 1994). HLA geny, nacházející se na krátkém raménku 6. chromozomu, představují nejvíce polymorfní úsek lidského genomu. Antigen HLA-DRB1 vykazuje velmi silnou asociaci s atopií i astmatem (Saeki et al. 1994). Alela A24 je zase asociována s AD (Lee et al. 2001).

Gen pro IL-4 receptor je velmi dobře popsán locus vázající se s atopií a astmatem (Hershey et al. 1997) i flexulární formou AD ((Callard et al. 2002). Některé SNP IL-4R jsou asociovány se zvýšenou expresí tohoto receptoru na povrchu buněk a s jeho zvýšenou senzitivitou k IL-4 (Risma et al. 2002).

Dalším genem, který je asociován s atopií, je gen pro ADAM33 (desintegráza A a metaloproteináza 33). SNP tohoto genu jsou asociovány s bronchiálním astmatem a kandidátním genem pro remodelaci buněčné stěny u astmatu ((Van Eerdewegh et al. 2002).

Interpretace výsledků asociačních studií kandidátních genů je poměrně složitá. Alergická onemocnění nejsou podmíněna mutací jednoho genu, ale jsou to onemocnění s polygenní dědičností. Z dosud provedených studií vyplývá, že některé polymorfismy mohou být asociovány s rizikem vzniku onemocnění u určité populace, ale nemusí být potvrzeny i u jiného etnika. Pro výsledný efekt SNP je důležitá i vzájemná interakce genů, například současná přítomnost SNP pro IL-4, IL-13 a STAT6 asociovaných s rizikem onemocnění (Sengler et al. 2002). V neposlední řadě pro výsledný fenotyp je podstatná i interakce genetického pozadí s prostředím (Barnes 2010).

## 4 Imunitní reakce podílející se na patogenezi autoimunitních onemocnění

Jednou ze zásadních funkcí imunitního systému je schopnost rozlišovat mezi vlastním a cizím. Tolerance vůči vlastním antigenům je za fyziologických podmínek vysoce regulovaný proces. Centrální tolerance, odehrávající se v thymu a kostní dřeni, hraje hlavní roli v ochraně organismu před imunitní reakcí namířenou proti vlastním antigenům. V periférii je tolerance k vlastním antigenům udržována několika mechanismy: funkční anergií, klonální delecí autoreaktivních lymfocytů a supresí regulačními T lymfocyty. Vznik autoimunitních onemocnění je podmíněn prolomením této tolerance (centrální nebo periferní) a následným působením autoreaktivních T a B lymfocytů a autoprotilátek.

Imunopatologických mechanismů, které se podílejí na rozvoji autoimunitních onemocnění, je mnoho a patří mezi ně víceméně všechny typy imunopatologických reakcí. II.-IV. typ imunopatologické reakce se účastní patogeneze většiny autoimunitních onemocnění. Jednotlivá onemocnění lze didakticky dělit dle převažujícího typu autoimunitní reakce: zprostředkované protilátkami třídy IgG a IgM (ADCC reakce, stimulační nebo blokační protilátky), imunokomplexy nebo Th1 zánětlivými buňkami. Imunopatologická reakce 1. typu je podkladem především alergických reakcí. U autoimunitních onemocnění prozatím nebyl popsán tento typ imunitní reakce na autoantigen jakožto příčina tkáňového poškození. Zvýšené hladiny IgE se však u autoimunit mohou objevit (u vaskulitid typu Churg-Straussové i u dalších vaskulitid, často u dermatomyositidy). V posledních letech vyšlo několik prací, které popsaly výskyt IgE protilátek proti autoantigenům (jaderné antigeny, tyreoidální peroxidáza, tyreoglobulin, hemidesmosomální protein BP180), proti kterým se většinou tvoří IgG protilátky.

Zapojení jednotlivých mechanismů a typů buněk do patogeneze autoimunitních onemocnění bude v následujících kapitolách představeno na příkladě orgánově specifického autoimunitního onemocnění – diabetes mellitus 1. typu (T1D).

### 4.1 ***Diabetes mellitus 1. typu***

Diabetes mellitus 1. typu je nejčastější autoimunitní onemocnění v dětském věku, jehož incidence v posledních dekádách výrazně stoupá. T1D je považován za chronické imunitně zprostředkované onemocnění. Je charakterizováno selektivní destrukcí  $\beta$ -buněk

pankreatu u geneticky predisponovaných lidí. Příčiny, které spouští autoimunitní reakci, nicméně nejsou známy.

Za vznik diabetu jsou považovány poruchy centrální i periferní tolerance, přispívající k perzistenci autoreaktivních T lymfocytů, jak bylo ukázáno u NOD myši, animálního modelu T1D (Anderson et al. 2005). Pouhá patologie získané imunity však nevysvětluje celý komplexní obraz T1D patologie, na které se podílejí i další faktory, hlavně genetické, ale i faktory vrozené imunity.

#### 4.1.1 Rizikové faktory rozvoje T1D

Obdobně jako u alergií, jsou za hlavní vnitřní rizikové faktory považovány genetické faktory. Zvýšený výskyt T1D v jedné rodině, riziko 6% pro sourozence pacienta s diabetem, nebo 30-50% riziko mezi jednovaječnými dvojčaty podporují vliv genetické determinace na manifestaci T1D (Todd 2010). Mnohé studie prokázaly výraznou asociaci s HLA systémem II. Třídy (Owerbach et al. 1983). Především HLA haplotypy DRB1\*0401-DQB1\*0302 a DRB1\*0302-DQB1\*0201 na chromosomu 6p21 (Davies et al. 1994; Hashimoto et al. 1994; Thomson et al. 2007) znamenají zvýšené riziko onemocnění. Kromě HLA systému mezi rizikové geny patří geny pro insulin, CTLA -4, PTPN22 a CD25 (Alizadeh et al. 2008).

Za vnější rizikové faktory je považována časná expozice kravskému mléku, deficiencie vitamínu D a infekce v dětství. Rozsáhlá studie TRIGR (Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk) se zabývala vlivem proteinů kravského mléka na rozvoj T1D u dětí s genetickým rizikem. Tyto děti byly vystaveny proteinům kravského mléka (nenaštěpeným nebo hydrolyzovaným) až po 6-8 měsíci života (TRIGR 2007; Luopajarvi et al. 2008; Akerblom et al. 2011). Výsledky této rozsáhlé dvojité zaslepené studie zatím nejsou k dispozici, randomizace bude odslepena až v roce 2017 kdy poslední pacient ve studii dosáhne věku 10 let.

Vitamínu D a jeho vlivu na imunitní systém byla v posledních letech věnována velká pozornost. Vzhledem k jeho supresivnímu účinku na imunitní reakci na buněčné úrovni a podporování regulačních T lymfocytů se nabízí jeho vliv na rozvoj autoimunitních onemocnění u lidí i na myších modelech (Giulietti et al. 2004; Baeke et al. 2008; Mora et al. 2008; Sochorova et al. 2009). Deficiencie vitamínu D byla zjištěna u pacientů s T1D v čase diagnózy (Littorin 2006). Probíhá také klinická studie fáze 1, kde byl vitamin D podáván dětem s genetickým rizikem rozvoje T1D (Wicklow et al. 2006). Studie prokázaly, že

suplementace vitamínem D u prediabetických jedinců může pomoci v prevenci anebo snížit iniciaci autoimunitního procesu pravděpodobně regulací selekce T lymfocytů v thymu – snížení autoreaktivních T lymfocytů a zvýšení zastoupení Tregs (Takiishi et al. 2012).

Vliv infekce v rozvoji T1D byl zkoumán na myších modelech i u lidí. Z výzkumů vyplývají 3 možná vysvětlení role infekce v patogenezi T1D (Shoenfeld et al. 2008):

1. Zvýšená imunogenicita způsobena infekčním zánětem, během kterého dochází ke zvýšené expresi autoantigenů a jejich rozeznání T lymfocyty
2. Polyklonální aktivace T a B lymfocytů během infekce a následná produkce autoprotilátek (Schatz et al. 1988)
3. Posledním možným vlivem infekce na rozvoj autoimunitní reakce je podobnost mikrobiálními proteinů s autoantigeny (molekulární mimikry), například podobnost virových antigenů s autoantigenem dekarboxylázou GAD65 (Hiemstra et al. 2001). Ve spojitosti s rozvojem T1D byla studována mnohá infekční agens. Mezi možné infekční spouštěcí faktory byly zařazeny enteroviry, cytomegalovirus (CMV), další viry, ale i některé bakterie.

Mnohé studie prokázaly významnou roli enterovirů v rozvoji T1D v asociaci s genetickými faktory. V sérech pacientů s T1D a u matek dětí s T1D byly zjištěny zvýšené hladiny IgM specifických protilátek v porovnání se zdravými kontrolami (King et al. 1983; Hyoty et al. 1995). Enterovirové infekce jsou také častější u příbuzných, u kterých se vyvinul diabetes (7). Tyto výsledky podporují i studie s detekcí enterovirové mRNA v krvi pacientů s čerstvou manifestací T1D i v průběhu onemocnění (Filippi et al. 2010). Nejčastějším enterovirovým kmenem u prediabetiků a pacientů s diabetem je Coxsák virus B4. Tento kmen byl detekován i v pankreatické tkáni u 50% vyšetřených (Dotta et al. 2007; Roep et al. 2010)).

I když různé enteroviry nebo CMV jsou schopné zničit buňky lidských ostrůvků pankreatu *in vivo* a indukovat T1D (Elshebani et al. 2007), mnohé studie na zvířecích modelech nepopsaly přímý účinek enterovirů na  $\beta$ -buňky pankreatu, ale spíše nepřímý efekt autoimunitní reakce spuštěné infekcí (Drescher et al. 2004; Horwitz et al. 2004). Obdobné výsledky přinesly i studie na zvířecích modelech zaměřené na roli CMV na rozvoj T1D, role CMV spočívá spíše v aktivaci makrofágů, proliferaci autoreaktivních T lymfocytů a v indukci produkce autoprotilátek proti  $\beta$ -buňkám pankreatu (van der Werf et al. 2003). Virové infekce vedou ke spuštění produkce interferonů imunitním systémem hostitele. Interferony primárně zabraňují replikaci virů, a tím zabraňují poškozování infikovaných buněk, nicméně, a to

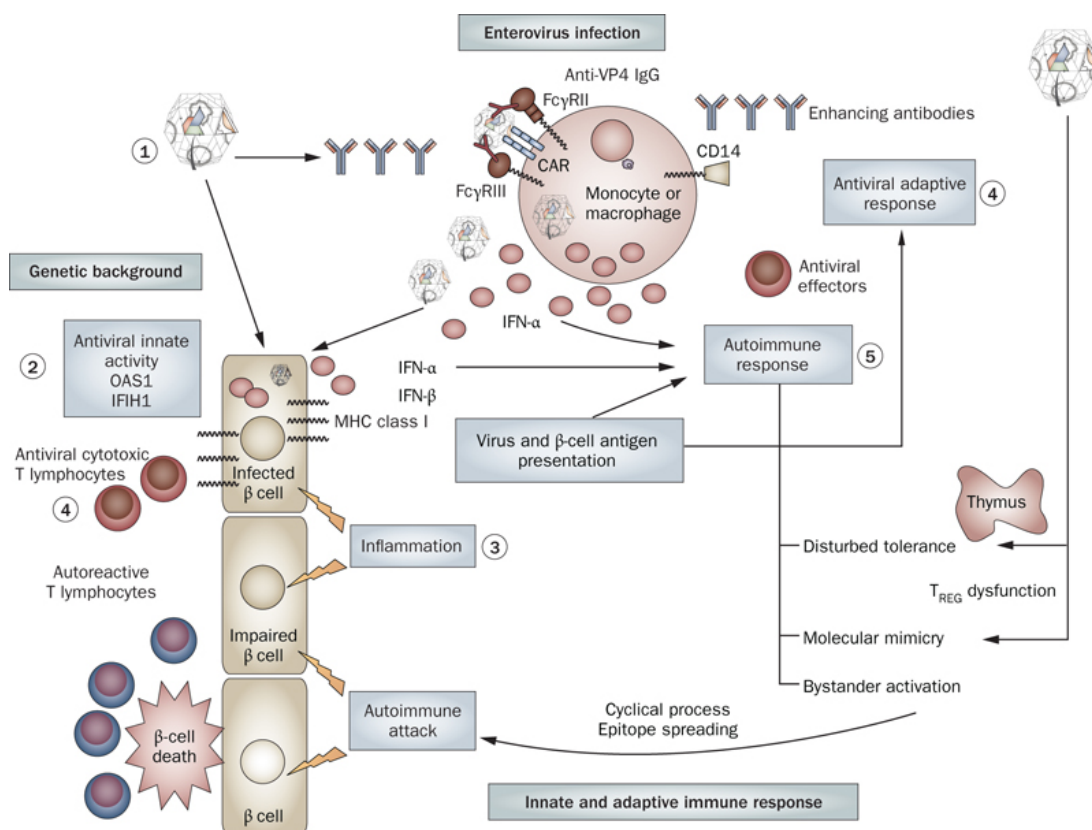
v případě  $\beta$ -buněk pankreatu, interferony a další prozánětlivé cytokiny (IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ ) vedou ke spuštění mechanismů vedoucích ke zničení buněk (Eizirik et al. 2009). Role interferonů bude více diskutována v kapitole 4.3.2.

Kromě virových infekcí i bakteriální infekce jsou považovány za rizikový faktor rozvoje autoimunitní reakce. Bakteriální DNA je schopna stimulovat přirozený imunitní systém, aktivovat TLR a indukovat produkci DNA autoprotilátek, a tudíž může hrát roli u autoimunitních onemocnění (Pisetsky 2008). Na druhé straně mnohé studie převážně na myších modelech (NOD myši) prokázaly, že bakteriální infekce může být asociována i s ochranou před vznikem T1D (*S. typhimurium*, *M.bovis*) (Harada et al. 1990; Zaccane et al. 2004). Druh mikroba a načasování, kdy dojde ke styku imunitního systému s infekčním agens, jsou velmi důležité faktory, které ovlivňují výslednou imunitní reakci a vedou k rozvoji autoimunitní reakce nebo k obraně organismu před infekcí (Goldberg et al. 2009).

#### 4.1.2 **Buněčné mechanismy v imunopatogenezi T1D**

V etiopatogenezi T1D se na destrukci  $\beta$ -buněk ostrůvků pankreatu podílejí hlavně autoreaktivní CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, dále B lymfocyty a dendritické buňky (Obr. 4). V posledních 2 dekadách se pozornost studií patogeneze T1D zaměřovala především na adaptivní imunitu (Tsai et al. 2008; Zipris 2008) a prokázala přímý vliv T lymfocytů na destrukci buněk ostrůvků pankreatu a také roli B lymfocytů v souvislosti s produkcí autoprotilátek a porušené B-buněčné toleranci (Miao et al. 2007; Wong et al. 2010).

Výsledky studií z posledních let ale prokázaly důležitou roli přirozené imunity na vzniku T1D (Zipris 2008; Kim et al. 2009). Především se zdá, že ústřední roli na rozvoji T1D by měly hrát dendritické buňky, které stojí na pomezí přirozené a adaptivní imunity a jsou odpovědné na indukci efektorových T lymfocytů a navození a udržení periferní tolerance (Tisch et al. 2009; Lehuen et al. 2010).



Obr. 4 Imunopathogeneze diabetu mellitu 1.typu. Převzato (Hober 2010)

#### 4.1.2.1 Autoprotilátky u T1D

Klinická manifestace T1D představuje až konečné stádium insulitidy, v čase diagnózy je již funkčních pouze 10-20% β-buněk. Manifestaci T1D předchází různě dlouhé asymptomatické období (několik měsíců až roky). První známky autoimunitního zánětu můžou být detekovatelné již v prvních letech života.

První známkou autoimunitního zánětu je přítomnost autoprotilátek. V současné době se využívá testování protilátek proti čtyřem typům autoantigenům: autoprotilátky proti insulinu (IAA), proti 65kD isoformě dekarboxylázy kyseliny glutamové (GADA), proti proteintyrosin-fosfatáze IA-2 molekuly (IA-2A) a proti buňkám ostrůvků (ICA, proti zinkovému transportéru Slc30A8). Tyto autoprotilátky se objevují již v časném dětství a jsou detekovatelné dlouho před diagnózou T1D (Barker et al. 2004). Z rodinných studií vyplývá, že pokud jsou pozitivní 3 ze 4 protilátek, tak riziko vzniku T1D je 60-100% během 5-10 let (Bingley et al. 1994).

Prvním typem autoprotilátek, které je možné detekovat již u malých dětí, jsou protilátky proti insulinu IAA, které jsou zároveň velmi silně asociovány s HLA DR4-DQ8 (Kimpimaki et al. 2001).

#### 4.1.2.2 T subpopulace zapojené do autoimunitní reakce u T1D

Patogeneze diabetu je zkoumána hlavně na myších modelech, non-obese diabetických (NOD) myších, protože získání čerstvé tkáně u lidí je víceméně nedostupné. Do imunopatogeneze T1D jsou zapojeny především autoreaktivní efektorové T lymfocyty. Mnohé studie ukazují na roli CD4 i CD8 lymfocytů na destrukci  $\beta$ -buněk pankreatu (Rabinovitch 1994; Mueller et al. 1997; Savinov et al. 2001). CD4 buňky jsou schopny způsobit nebo urychlit vznik onemocnění u mladých NOD myší. Dlouho byly za efektorové buňky považovány IFN- $\gamma$  produkující Th1 lymfocyty, jak bylo ukázáno na mnohých studiích u lidí i na myších modelech.

V posledních letech se ukázalo, že Th1 buňky nejsou jediné T lymfocyty zapojené do rozvoje autoimunitního zánětu. Výsledky novějších studií potvrdily i úlohu Th17 lymfocytů. Th17 jsou vysoce autopatogenní a jsou schopné indukovat zánět v tkáních a autoimunitní onemocnění.

#### 4.1.2.3 Th1 lymfocyty

Th1 buňky hrají již dlouho roli v rozvoji autoimunitní reakce. Především u orgánově specifických autoimunit byly Th1 lymfocyty popsány jako patognomické, na druhou stranu Th2 subpopulace má spíše inhibiční vliv (Bending et al. 2012).

Studie u pacientů s T1D ukázala, že T-buněčná odpověď na přirozené epitopy antigenů ostrůvků je velmi silně polarizovaná směrem Th1 k produkci IFN- $\gamma$  (Arif et al. 2004).

Experimentální studie dokumentují, že autoimunitní diabetes se nevyvine u T-lymfopenických myší nebo u myší bez thymu (O'Reilly et al. 1991). Autoantigen-specifické Th1 lymfocyty jsou schopny po transferu vyvolat onemocnění u novorozených myší (Katz et al. 1995). V místě autoimunitního zánětu byla nalezena zvýšená exprese IFN- $\gamma$  a jeho role v autoimunitním procesu je podložena mnohými dalšími studiemi: bloádou IFN- $\gamma$  pomocí

jeho solubilního receptoru dojde ke zlepšení onemocnění (Wang et al. 1997), akcelerace onemocnění po podání IL-12 (Yang et al. 2004) nebo nepřítomnost onemocnění u STAT-4 nebo T-bet deficitních myší (Nicoletti et al. 1996; Esensten et al. 2009). Na druhé straně bylo ale prokázáno, že mutace v genu pro IFN- $\gamma$  nezabrání rozvoji diabetu u NOD myší (Hultgren et al. 1996).

Jednou z hlavních patogenetických rolí IFN- $\gamma$  u diabetu je zvyšování exprese MHC molekul na povrchu buněk ostrůvků a antigenní prezentace (von Herrath et al. 1997).

#### 4.1.2.4 Th17 lymfocyty

V poslední dekádě mnohé studie poukazují i na roli Th17 na rozvoji mnohých autoimunitních onemocnění, včetně T1D. Výsledky studií nicméně přinášejí rozporuplné výsledky – IL-17A může hrát roli poškozující (Jain et al. 2008; Emamaullee et al. 2009) i protektivní (Han et al. 2010; Nikoopour et al. 2010). Patogenní role Th17 byla prokázána u myší, u kterých po podání anti-IL-17 nebo inhibitorů IL-17 (IL-25) došlo ke zmírnění projevů diabetu (Emamaullee et al. 2009). U lidí bylo prokázáno zvýšené procento Th17 lymfocytů v periferní krvi (Honkanen et al. 2010; Marwaha et al. 2010). IL-17 je zároveň toxický pro buňky pankreatu *in vitro* (Honkanen et al. 2010), zvláště v přítomnosti prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  (Arif et al. 2011). Další kritickým cytokinem pro rozvoj T1D u myší je IL-21 (Th17-related cytokin), a to spíše v pozdějších fázích onemocnění, protože jeho neutralizace v ranných fázích je neefektivní (Sutherland et al. 2009; McGuire et al. 2011).

Studie také prokázaly, že se nemoc může vyvinout u NOD-SCID myší po transferu *in vitro* polarizovaných Th17, nicméně další analýza prokázala konverzi transferovaných Th17 lymfocytů do Th1 subtypu (Bending et al. 2012). Obdobné výsledky byly potvrzeny ve studii u dětí s revmatoidní artritidou (Nistala et al. 2010).

#### 4.1.2.5 Regulační T lymfocyty

Imunologická tolerance je soubor mnohých mechanismů, které jsou důležité pro homeostázu organismu a pro neodpovídavost na vlastní antigeny. V současnosti známe



dva základní typy tolerance: centrální (selekce autoreaktivních T lymfocytů v thymu) a periferní (anergie, ignorance, suprese).

V periferní toleranci hrají zásadní roli regulační T lymfocyty (Tregs, CD25+FoxP3+), které se podílí na supresi efektorových T lymfocytů, včetně autoreaktivních (Wing et al. 2006; Sakaguchi et al. 2010; Li et al. 2012). Vrozené nebo získané poruchy v Tregs jsou asociovány s lymfoproliferací a vznikem různých autoimunit. Mezi primární imunodeficiencie spojené s autoimunitními onemocněními patří IPEX (mutace genu pro FoxP3), APECED (nebo také APS-1, autoimunitní polyglandulární syndrom 1, mutace genu pro AIRE) nebo ALPS (mutace genu pro FAS/FAS ligand).

FoxP3+ regulační T buňky dělíme na nTregs, vznikající v thymu a iTregs (aTregs), které se diferencují v periférii (Bluestone et al. 2003).

Mnohé důkazy prokazují, že regulační mechanismy imunitní reakce jsou důležité pro výsledné projevy autoimunitních onemocnění, včetně diabetu I. typu. Studie u pacientů s diabetem neprokázaly rozdíly v počtu Tregs, stanovené pomocí exprese CD4, CD25, FoxP3 (Brusko et al. 2005; Leung et al. 2010), studie nepopisují ani rozdíly v počtu CD4+25+ a CD4+25high lymfocytů v závislosti na délce trvání diabetu (Brusko et al. 2005; Lindley et al. 2005; Putnam et al. 2005).

Funkční vlastnosti nTregs, studované na modelech NOD myši, jsou závislé na IL-2 (Setoguchi et al. 2005). Nízká hladina IL-2 vede ke sníženému počtu nTregs v myších pankreatech, a tím k porušené regulační funkci v periférii (Dendrou et al. 2008). Také genetické studie u lidí i myši prokázaly asociaci signální dráhy IL-2 s T1D (Rainbow et al. 2008). U NOD myši bylo popsáno, že nTregs jsou schopny konverze do diabetogenních efektorových buněk (Zhou et al. 2009), které spouští zánětlivý proces a indukují T1D. Tento proces je možné zvrátit aplikací IL-2 (Tang et al. 2008).

Také u lidí bylo nalezeno snížení počtu nTregs v pankreatických ostrůvcích u pacientů čerstvou manifestací T1D (Willcox et al. 2009) i jejich funkční poruchy přirozených Tregs (Brusko et al. 2005; Lindley et al. 2005). U T1D pacientů bylo zjištěno zvýšené procento nTregs exprimujících IFN- $\gamma$  (McClymont et al. 2012). T lymfocyty pacientů s T1D jsou také rezistentní k supresi regulačními T lymfocyty (Lawson et al. 2008; Schneider et al. 2008).

Inducibilní Tregs (iTregs) jsou Tregs vznikající v periférii, mohou být i indukované z naivních T lymfocytů za přítomnosti IL-2 a TGF- $\beta$  (Zheng et al. 2002; Davidson et al. 2007). iTregs mají podobné charakteristiky jako nTregs: exprese CD25, CTLA-4, GITR a produkce IL-10 a TGF- $\beta$ , které přispívají k jejich regulačním funkcím (Weber et al. 2006; Li

et al. 2012), inhibují proliferaci T buněk *in vitro* a *in vivo* (Vignali et al. 2008) a inhibují produkci IFN- $\gamma$  (Weiner 2001; Barrat et al. 2002).

Studie u lidí i myši tedy prokazují, že na patogenezi autoimunitního diabetu se podílí jak neefektivní funkce nTregs, tak velmi potentní efektorové T lymfocyty.

## **5 Úloha dendritických buněk v rozvoji imunopatologických reakcí ve vztahu k alergiím a autoimunitním reakcím**

Dendritické buňky (DC) jsou antigen-prezentující buňky, které mají jedinečnou schopnost spouštět primární imunitní reakci. DC jsou schopny pohltit, zpracovat a následně přenést informaci z prostředí až k buňkám adaptivní imunity. DC jsou nejen schopny navodit imunitní reakci vůči signálům ze zevního prostředí, ale taktéž hrají důležitou roli v indukci imunologické tolerance a v regulaci T-buněčné imunitní reakce.

Několik původních prací našeho pracoviště se týká problematiky dendritických buněk u alergických nebo imunopatologických onemocnění, proto bude v následujících kapitolách detailněji přiblížena funkce DC v lidském organismu a jejich roli v patogenezi imunopatologických reakcí.

### **5.1 *Biologie dendritických buněk***

Dendritické buňky jsou hlavní antigen-prezentující buňky, které se vyskytují v různých orgánech a tkáních. Tato specifická subpopulace leukocytů byla popsána před mnoha lety u myši v lymfoidních tkáních a následně byla zjištěna jejich přítomnost téměř ve všech orgánech těla (Steinman et al. 1973). Jejich hlavní role na sliznicích a v kůži spočívá v rozeznání cizorodých antigenů vnějšího prostředí. Následně DC migrují do lymfatických tkání, kde již zpracované antigenní peptidy předkládají naivním T lymfocytům (Upham 2003). Dendritické buňky rozhodují i o polarizaci T-buněčné odpovědi do Th1 nebo Th2, recentně byl popsán i jejich vliv na rozvoj T regulačních a Th17 lymfocytů.

#### **5.1.1 *Pohlčení a prezentace antigenu***

Dendritické buňky představují významné procento buněk, které se nachází podél linií interagujících se zevním prostředím – ve sliznicích dýchacích cest, gastrointestinálního a urogenitálního traktu a kůže. V těchto non-lymfoidních orgánech se DC nacházejí především v nezralém stavu, ve kterém jsou výborně připravené pro pohlčení antigenů ze zevního prostředí. Už jejich charakteristická morfologie – buňky s dlouhými výběžky (dendrity),

výrazně napomáhá jejich funkci. DC jsou většinou uloženy pod bazální membránou, ale jejich dendrity vybíhají přes epitel do lumenu dýchacích cest nebo gastrointestinálního traktu bez porušení epiteliální bariéry (Rescigno et al. 2001; Jahnsen et al. 2004).

Nezralé DC jsou velmi dobře vybavené pro pohlcování a zpracovávání antigenů. U DC nacházíme 3 způsoby pohlcení antigenu. Prvním způsobem pohlcení je receptorem mediovaná endocytóza za pomoci klatrinových sítí. Na povrchu dendritických buněk se nachází značné množství specializovaných receptorů (C-lektinové receptory, Fc receptory (CD64 a CD32), integriny a scavengerové receptory), které rozeznávají motivy asociované s cizorodými antigeny. Nejdůležitější z těchto receptorů jsou C-lektinové receptory jako langerin, DC-SIGN, dectin, manosový receptor nebo DEC-205. Pohlcení antigenu zprostředkované lektinovým receptorem vede k účinnější antigenní prezentaci T lymfocytům, než je tomu u pohlcení antigenu za pomoci tekuté fáze (van Vliet et al. 2007). C-lektiny jsou exprimované na povrchu buněk a jsou schopné vázat nejen bakteriální nebo virové antigeny, ale i alergeny.

Druhým způsobem pohlcení antigenu je makropinocytóza, děj, při kterém dochází k pohlcení většího množství tekutiny s rozpustnými antigeny vychlípáním membrány DC za působení aktinového systému. Následně je antigen pomoci koncentračního gradientu dopraven do endocytického kompartmentu. Makropinocytóza je základním mechanismem potřebným pro pohlcení partikulí jako viry (Pelkmans et al. 2003; Meier et al. 2004), bakterie (Kolb-Maurer et al. 2002), apoptotické buňky (Henson et al. 2001). Také ji využívají Langerhansovy buňky k pohlcení alergenů jako Bet v 1 nebo Phl p 1. Třetím, posledním mechanismem, typickým pro nezralé Langerhansovy buňky nebo DC kultivované *in vitro*, je fagocytóza, která je využívána především pro pohlcování celých bakterií nebo apoptotických buněk, zároveň by mohla být dominantním způsobem pro přijímání alergenů.

### 5.1.2 **Maturace a migrace DC**

Klíčovým momentem pro indukci buněčné imunity je migrace DC z periferních tkání, z místa zánětu do spádových lymfatických uzlin aferentními lymfatickými cévami. Migrační děj je ovlivněn chemotaktickým gradientem. Během maturace DC po pohlcení antigenu dochází k expresi chemotaktických receptorů CCR7 a CXCR4, zároveň exprese CCR6 je utlumena, a tím dochází k migraci DC přednostně do T-oblasti lymfatických uzlin (Forster et al. 1999). Na druhé straně T- oblasti lymfatických uzlin produkují chemotaktické faktory -

jako CCR7 ligand, MIP3- $\beta$  a CXCR4 ligand stromal cell-derived factor-1 potřebné k vytvoření chemotaktického gradientu.

Po té, co se DC dostanou do lymfatických uzlin, jejich schopnost pohlcovat antigeny je výrazně utlumena a DC získávají schopnost stimulovat naivní T lymfocyty. Tomuto procesu metamorfózy DC, při kterém dochází u DC k fenotypickým i funkčním změnám, se říká maturace. Jedná se o klíčový proces nutný k správné stimulaci naivních T lymfocytů dendritickými buňkami.

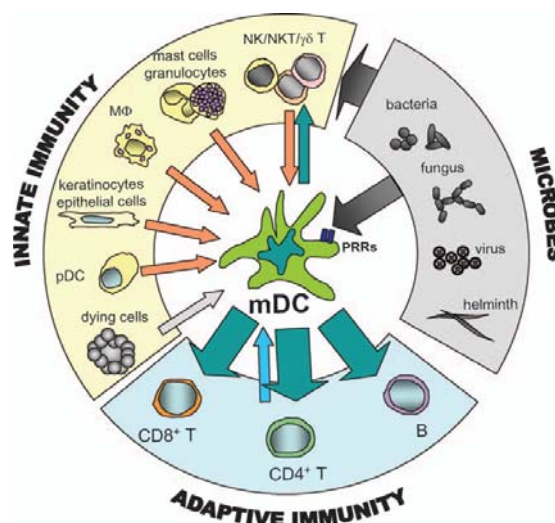
Ve většině tkání se DC vyskytují v tzv. nezralém stavu, kdy na svém povrchu nemají molekuly nezbytné pro aktivaci T lymfocytů. Nezralé DC předávají organismu informaci o skladbě vnitřního prostředí a upozorňují včas na hrozící nebezpečí. Nezralé DC se vyskytují téměř ve všech periferních tkáních, a přicházejí tedy do kontaktu s antigenem brzy po jeho průniku do organismu. Pokud není v organismu přítomna infekce, či jiný druh signálu nebezpečí, tak nezralé dendritické buňky pohlcují průběžně odumřelé buňky zdravých tkání a molekuly rozpuštěné v mezibuněčné tekutině, následně migrují do lymfatických uzlin, pohlcené molekuly zpracují a vystaví je na svém povrchu (Niess et al. 2005). Specifické T lymfocyty, které takový antigenní peptid rozpoznají, nejsou aktivovány, ale jsou buď zcela utlumeny, nebo se z nich vytvoří regulační T lymfocyty. Takto se nezralé dendritické buňky podílejí na zachování tolerance vůči vlastním tkáním (Bonifaz et al. 2002; Tarbell et al. 2004; Tarbell et al. 2006).

Pokud však nezralé dendritické buňky rozpoznají podnět, který představuje pro organismus nebezpečí, tzv. signály nebezpečí, nejčastěji se jedná o patogenní mikroorganismy, nekrotické, ale i maligně transformované buňky, DC se aktivují a stávají se z nich zralé dendritické buňky, které dokážou jako jediné aktivovat naivní T-lymfocyty ((Matzinger 1994; Medzhitov et al. 1997; Matzinger 1998). Zralé DC se od nezralých liší expresí povrchových markerů i funkčními charakteristikami (Inaba et al. 2000; Mellman et al. 2001). U DC dochází k morfologickým změnám, ke ztrátě adhesivních struktur, k reorganizaci cytoskeletu a DC získávají schopnost zvýšené pohyblivosti (Trombetta et al. 2005). Rozdíl ve složení povrchových molekul mezi nezralými a zralými DC spočívá zejména ve vyšší expresi kostimulačních molekul (CD80, CD86, CD40), maturačních znaků (CD83), chemokinových receptorů (CCR7) a dalších adhezivních molekul na zralých DC, které zesilují signály zprostředkované dendritickou buňkou a zahajují aktivaci různých druhů T lymfocytů (Caux et al. 1994). Dochází také ke zvýšení exprese komplexů MHC molekul I. a II. třídy s antigeny (Cella et al. 1997; Pierre et al. 1997). Mezi funkční změny patří ztráta schopnosti fagocytovat, ale naopak se zvyšuje kapacita zpracování antigenu. Antigenní štěpy

jsou pak vystaveny na povrchu spolu s molekulami MHC a předloženy lymfocytům T. Během procesu zrání produkují DC řadu cytokinů, které modulují vznikající imunitní odpověď. Mezi nejdůležitější patří IL-1, IL-6, TNF, IL-12, IL-10, IL-23 (Heufler et al. 1996; Banchereau et al. 1998; Blanco et al. 2008). Kombinace exprese povrchových molekul a určité cytokinové prostředí dává DC schopnost polarizovat imunitní odpověď do Th1, Th2, Tregs nebo Th17.

Dendritické buňky představují spojení mezi přirozenou imunitou, založenou na rozpoznávání signálů nebezpečí, a adaptivní imunitou, která je specificky namířená proti těmto peptidům. Imunitní odpověď přirozené imunity je založena na identifikaci evolučně konzervovaných motivů patogenů (PAMPs – pathogen-associated molecular patterns). PAMPs jsou molekulární motivy mikrobů jako bakterie, viry, houby a parazity a které se odlišují od motivů nalezených u eukaryotických organismů (Obr. 5). Rozpoznání PAMPs společně s antigeny dendritickými buňkami vyvolává imunitní odpověď, produkci prozánětlivých cytokinů a efektivní stimulaci T-buněčné odpovědi (Akira et al. 2001; Eisenbarth et al. 2002). Vzájemné působení PAMPs s dendritickou buňkou představuje třetí signál, společně s prvním signálem (interakce mezi T-buněčným receptorem a MHCII molekulou) a druhým signálem (kostimulace pomocí kostimulačních molekul CD80 a CD86) a vede k aktivaci specifické imunitní odpovědi (Akira et al. 2001).

Signály nebezpečí jsou dendritickými buňkami rozpoznávány pomocí receptorů, tzv. pattern-recognition receptors (PRRs). Nejlépe definovanou rodinou PRRs jsou tzv. Toll-like receptory (TLRs), které rozeznávají virové nebo bakteriální motivy. Dalšími PRR receptory exprimovanými DC jsou membránové C-typ lektiny, intracelulárně exprimované NOD-like receptory (NLRs) nebo RIG-I-like helikázy (RLHs).



Obr. 5 Regulace aktivace DC. Převzato (Ueno, Immunol Rev 2007)

### 5.1.2.1 TLR receptory (TLR)

Toll receptory, které rozeznávají specificky určité mikrobiální motivy, byly poprvé popsány u drozofil (Lemaitre et al. 1996). Později byly jim podobné receptory – Toll-like receptory (TLR) objeveny i u jiných živočišných druhů, včetně lidí (Kumagai et al. 2008). U lidí a ostatních savců rozeznáváme 10 typů TLR, u myši jich je známých 13, které se liší svoji lokalizací na buňce i typem ligandů, které vážou.

Patogeny jako bakterie, houby nebo prvoky mají značné množství extracelulárních antigenů nebo součástí buněčných stěn ve formě glykolipidů a peptidoglykenů. Tyto mikrobiální motivy jsou rozeznávány specializovanými receptory dendritických buněk – TLR lokalizovanými na povrchu buněk (TLR 1,2,4,5,6,10). Na druhou stranu viry jsou intracelulárními patogeny, které využívají hostitelský metabolismus pro svoji replikaci a tvoří „cizí“ glykolipidové nebo peptidoglykanové struktury. Na detekci především virových infekcí, ale i některých bakteriálních slouží TLR umístěné intracelulárně v endosomálním kompartmentu (TLR 3,7,8 a 9), které jsou schopny vázat genetický materiál (DNA, RNA). Kromě patogenních ligandů jsou DC schopny vázat i vlastní proteiny, včetně mnohých heat-shock proteinů (HsP). Další ligandy viz. Tab.1.

Molekulární složení jednotlivých ligandů, které rozeznávají TLR na povrchu patogenů, je značně odlišné od peptidoglykanů, glykolipidů a lipoproteinových motivů, které se nacházejí v lidském organismu. Na základě těchto vlastností je přirozený imunitní systém schopen rozlišovat mezi vlastní a cizí antigenní strukturou (Janeway 1989). Molekulární struktury bakterií, virů, hub a prvků rozeznávané TLR jsou vysoce konzervované, a proto je přirozený imunitní systém schopen používat omezené množství TLR pro detekci širokého spektra patogenů.

TLR4 rozeznává lipopolysacharid (LPS) Gram-negativních bakterií (Poltorak et al. 1998; Hoshino et al. 1999), ligandem TLR2 jsou součásti buněčné stěny Gram-pozitivních bakterií a hub – kyselina lipoteichoová a peptidoglykany (Takeuchi et al. 1999). TLR2 je schopen tvořit i heterodimery s TLR1 a TLR6, které vážou triacyl- a diacyl-lipopeptidy (Takeuchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2002). TLR5 je receptorem pro bakteriální protein flagelin, který je nezbytný pro pohyb bakterií (Hayashi et al. 2001; Takeuchi et al. 2001; Takeuchi et al. 2002; Uematsu et al. 2006). TLR3 rozeznávají dvoušroubovici RNA (dsRNA) a polyinositolovou-polycytidylovou kyselinu (poly I:C, syntetická dsRNA) (Alexopoulou et al. 2001). TLR7 a TLR8 jsou receptorem pro virovou jednošroubovici RNA (ssRNA) (Heil et al. 2004). Na druhé straně, ligandem pro TLR9 je virová i bakteriální DNA i DNA prvků

(Coban et al. 2005; Ishii et al. 2006; Coban et al. 2007). TLR9 receptor rozeznává bakteriální a virovou DNA s nemetylovanými CpG motivy (Hemmi et al. 2000) a také hypometylované úseky lidské DNA (Deane et al. 2006; Uematsu et al. 2006). Nemetylované CpG motivy jsou hojně přítomny v bakteriální DNA, kdežto u savců jsou takovéto motivy velmi vzácné (Ishii et al. 2006).

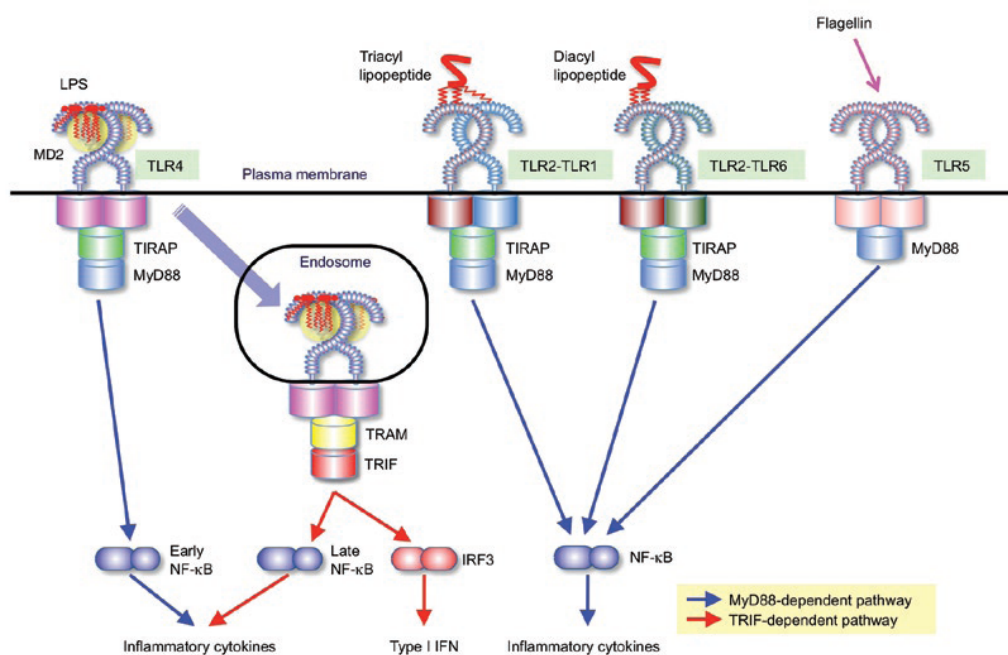


**Tabulka 1. Rozpoznávání mikrobiálních komponent pomocí Toll-like receptorů  
(upraveno dle (Anders et al. 2005; Akira 2009))**

mikrobiální komponenta	druh patogenu	Receptor
<b>Bakterie</b>		
LPS	Gram-negativní bakterie	TLR4
diacyl lipopeptidy	Mykoplazmy	TLR6/TLR2
triacyl lipopeptidy	Bakterie a mykobakterie	TLR1/TLR2
LTA	Streptokoky skup. B	TLR6/TLR2
peptidoglykan	Gram-pozitivní bakterie	TLR2
poriny	Neisseria	TLR2
lipoarabinomanan	Mycobakterie	TLR2
flagelin	Bičíkaté bakterie	TLR5
CpG-DNA	Bakterie a mykobakterie	TLR9
ND	uropatogenní bakterie	TLR11
<b>Plísně a houby</b>		
zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
fosfolipomanan	<i>Candida albicans</i>	<b>TLR2</b>
manan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
glukuronoxylomanan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 a TLR4
<b>Paraziti</b>		
GPI-mutin	Trypanosoma	TLR2
glykoinositolfosfolipidy	Trypanosoma	TLR4
Hemozoin	Plasmodium	TLR9
profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
<b>Viry</b>		
DNA	DNA-viry	TLR9
dsRNA	Viry	TLR3
ssRNA	RNA viry	TLR7 a TLR8
proteiny obalu	RSV, MMTV	TLR4
hemaglutinin protein	Virus spalniček	TLR2
<b>Hostitel</b>		
Heat-shock proteiny 60, 70		TLR2 a TLR4
Fibrinogen		TLR4
mRNA		TLR3 a TLR7
HMGB1		TLR2 a TLR4
DNA		TLR9

TLRs se skládají mnohých na leucin bohatých oblastí (LRRs – leucin-rich repeats) a jedné homologní domény Toll-interleukin-1 receptoru (TIR) (Akira et al. 2006). Další důležitou molekulou je MyD88, která se skládá z TIR domény a „death“ domény (DD), je asociována s TIR doménou TLR. Na základě zapojení molekuly MyD88 se signalizace přes TLR dělí na MyD88-dependentní a independentní. Molekula MyD88 je zapojena do signalizace přes TLR 1,2,4,5,6,7 a 9 (Takeuchi et al. 2000; Hemmi et al. 2003). MyD88-dependentní signalizace je obecně považována za nezbytnou v prozánětlivé reakci. MyD88 spouští intracelulární kaskádu, která finálně vede k translokaci transkripčního nukleárního faktoru (NF- $\kappa$ B) a indukci produkce prozánětlivých cytokinů – IL-1beta, IL-6, IL-8 a TNF-alfa (Takaoka et al. 2005). MyD88-dependentní signalizace při stimulaci TLR7 a TLR9 vede k transkripci IFN-inducibilních genů a k následné produkci interferonů (IFN) I. typu (Cao et al. 2007).

MyD88-independentní signalizace probíhá kaskádovitou aktivací jiných adaptorových proteinů jako TRIF, TIRAP a TRAM, vede taktéž k aktivaci NF- $\kappa$ B a produkci prozánětlivých cytokinů, včetně IFN-beta. Tato signalační kaskáda je využívána u TLR3 a částečně i u TLR4 (Yamamoto et al. 2002; Yamamoto et al. 2003; Yamamoto et al. 2003). Obě tyto signalační cesty (MyD88- dependentní a MyD88-independentní pathways) přispívají k maturaci DC, a stejné nebo různé TLR aktivují stejné, ale přesto rozličné signalační kaskády (Obr. 6).



Obr. 6 Regulace aktivace DC. Převzato (Kawai & Akira, Nature Immunol 2010)

### 5.1.2.2 C-lektinové receptory

TLR však nejsou jediné PRR, které rozeznávají PAMP molekuly a jejichž signalizace vede k aktivaci DC v odpovědi na signály nebezpečí. C-lektinové receptory jsou rozmanitou rodinou receptorů schopné vázat uhlovodíkové motivy (Zelensky et al. 2005). Fyziologická funkce C-lektinů je velmi různorodá, některé typy hrají roli v adhesi mezi různými typy buněk, na druhé straně jiné specificky rozeznávají určité uhlovodíky derivované z patogenních struktur a hrají roli v rozeznávání patogenů i jejich internalizaci.

C-lektiny zprostředkovávají receptorem-mediovanou fagocytózu nebo endocytózu myeloidními buňkami. Mezi tyto receptory patří např. manózový receptor (MR), dectin-1, DEC-205, DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin), BDCA-2 (blood dendritic cell antigen-2) a Langerin.

### 5.1.3 Interakce dendritických buněk s T lymfocyty

Jednou ze základních vlastností DC je aktivace T-buněčné odpovědi - stimulace T-dependentní protilátkové odpovědi, proliferace T lymfocytů a schopnost iniciovat a polarizovat imunitní odpověď.

Adaptivní T buněčná imunitní odpověď je iniciována v sekundárních lymfatických orgánech (lymfatických uzlinách), kde dochází ke specifickému fyzickému kontaktu zralých dendritických buněk s naivními T lymfocyty, tzv. imunologické synapsi. Proliferující buňky poté diferencují v efektorové CD4<sup>+</sup> pomocné T lymfocyty nebo CD8<sup>+</sup> cytotoxické T lymfocyty.

Imunologická synapse je velmi komplexní spojení DC a T lymfocytu za pomoci mnoha desítek molekul: centrálně je interakce MHC komplexu s komplexem TCR, molekuly podílející se na vzniku nebo modulaci signálu (koreceptory, kostimulační molekuly) nebo zajišťující stabilitu interakce (adhezivní molekuly). Imunologická synapse je závislá také na přeskupení cytoskeletu, který je potřebný pro vytvoření clustru receptorů (Friedl et al. 2004).

Pro správnou stimulaci T lymfocytů je zapotřebí 3 signálů: 1. komplex MHC-peptid-TCR, 2. kostimulační signál (molekuly skupiny B7 – jako CD86/80 a CD28/CTLA-4) a 3. polarizační signál (cytokiny). Vzájemnou kombinací těchto signálů (výše exprese membránových proteinů, produkce specifických cytokinů, množství antigenu, maturační

signály DC) jsou dendritické buňky schopny polarizovat výslednou imunitní reakci směrem Th1, Th2, Th17 nebo Tregs (Steinman 2003; Ueno et al. 2007).

Th1 imunitní odpověď je závislá na produkci IL-12 dendritickými buňkami a vede k produkci velkého množství IFN- $\gamma$  T lymfocyty (Macatonia et al. 1995).

Mnohé patogeny jako schistosomy, houby nebo cholerový toxin používají dendritické buňky k indukci Th2 odpovědi. V současné době jsou známy dva faktory působících na DC a podílející se na polarizaci Th2. IL-10 produkovaný samotnými DC nebo přítomný v mikroprostředí vede spíše ke vzniku Th2 lymfocytů. Druhým mediátorem je thymický stromální lymfopoetin (TSLP), který je produkovaný epiteliálními buňkami a indukuje Th2 buňky produkující IL-4. pDC stimulované za pomoci CD40 indukují CD4+ lymfocyty produkující IL-10 (Ito et al. 2007) nebo CD8+ (Gilliet et al. 2002).

Dendritické buňky, které produkují IL-23, stimulují T lymfocytární subpopulace produkující IL-17 (Langrish et al. 2005). Rozvoj Th17 buněk závisí také na IL-6 a transformujícím růstovém faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) u myši (Bettelli et al. 2006) a na IL-1 a IL-6 u lidí (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Wilson et al. 2007).

Dendritické buňky hrají důležitou roli v centrální i periferní toleranci (Steinman 2003). Periferní tolerance je aktivně udržována tzv. tolerogenními DC (Moser 2003). Tento typ DC indukuje diferenciaci a proliferaci T buněk s regulační nebo supresí funkcí (Battaglia et al. 2004; Sakaguchi et al. 2005). Také maturační stav DC určuje schopnost indukovat Tregs. Neaktivované nezralé DC v periférii prezentují neustále vlastní antigeny autoreaktivní T lymfocytům, ale protože chybí kostimulační molekuly tato interakce vede k anergii, delecii těchto antigen-specifických T buněk (Steinman et al. 2000; Hawiger et al. 2001) nebo k indukci antigenně specifických FoxP3+ Tregs (Kretschmer et al. 2005).

## 5.2 **Subpopulace DC**

Dendritické buňky představují vývojově různorodou skupinu antigen prezentujících buněk. U lidí i myši se vyskytují DC v různých tkáních – v epidermis i dermis kůže, v marginální zóně sleziny, v T-zóně i germinálních centrech lymfatických uzlin, v thymu, v játrech i v periferní krvi. Ontogeneze DC zahrnuje 2 typy vývoje DC z hematopoetických progenitorových buněk – myeloidní a lymfoidní. Myeloidní dává vznik všem typům myeloidních DC (mDC) a lymfoidní dráhou vznikají plasmacytoidní DC (pDC). Oba typy vývoje jsou pod přímým vlivem Flt3-ligandem (Flt3L) jak bylo prokázáno ve studiích *in vitro*

tak i *in vivo* (Blom et al. 2000; Maraskovsky et al. 2000; Pulendran et al. 2000). Podání Flt3L u lidí vede ke zvýšení počtů mDC i pDC (Pulendran et al. 2000). Obdobné výsledky prokazují i pokusy na Flt3L-deficientních myších, u kterých byl pozorován snížený počet DC v periferních i lymfoidních orgánech (McKenna et al. 2000).

Společně obě skupiny jsou charakterizované jako lineage negativní (CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD56-) a zároveň HLA-DR+, dále se ale navzájem liší fenotypickými znaky a zároveň funkcí, a to především v regulaci B-buněčné proliferace a diferenciaci T lymfocytů do Th1, Th2, Th17 nebo Tregs.

### 5.2.1 Myeloidní DC (mDC)

Funkce a fenotypické znaky u mDC se liší podle orgánu, ve kterém se nacházejí: v kůži, ve sliznicích, v sekundárních lymfatických orgánech a v periferní krvi.

Myeloidní DC představují 0,5-1% cirkulujících mononukleárních buněk (Hammad et al. 2006). Jsou charakterizovány především expresí CD11c, dále však je tato podskupina dělená dle exprese dalších pro DC charakteristických povrchových molekul BDCA-1 (mDC1), BDCA-3 (mDC2) (blood dendritic cell antigen-1 a 3) a CD16 (Ueno et al. 2007). Přesná fyziologická funkce cirkulujících mDC není známá, předpokládá se, že slouží jako reservoár prekurzorových buněk, které během zánětu migrují do místa zánětu a následně do lymfatických uzlin (Ueno et al. 2007). Obecně platí, že mDC v odpovědi na CD40 nebo stimulací přes TLR produkují velké množství IL-12 a aktivují diferenciaci Th1 lymfocyty (Reis e Sousa et al. 1999).

Více jsou prozkoumané subtypy mDC, které se nacházejí v kůži a liší se svojí funkcí i expresí povrchových molekul – C-lektinů a TLR. Langerhansovy buňky (LC) se nacházejí v epidermis a na svém povrchu exprimují CD1a a Langerin, TLR 1,2,3,6, méně 7,10. LC jsou schopny silně aktivovat naivní CD4+ T lymfocyty a polarizovat imunitní reakci jak do Th1 s produkcí IFN $\gamma$  T lymfocyty, tak i do Th2 se sekrecí IL-4, IL-5 a IL-13 (Blanco et al. 2008).

Druhým subtypem mDC v kůži jsou intersticiální DC (intDC), které jsou uloženy v dermis. Na svém povrchu typicky exprimují DC-SIGN, TLR 2,4,5 (Blanco et al. 2008). intDC indukují především CD4+ T lymfocyty a diferenciaci naivních B lymfocytů (Ueno et al. 2007).

V plicích bylo identifikováno několik subpopulací DC: BDCA-1 (mDC1) a BDCA-3 (mDC2). Na rozdíl od mDC1 v periferní krvi, BDCA-1+ buňky mají na svém povrchu různou

expresi CD14. U mDC2 nacházíme 2 subpopulace s rozdílnou expresí CD14 (Demedts et al. 2005).

Imunohistochemických barvením bylo zjištěno, že CD1a+ pozitivní DC byly nalezeny hlavně v epitelu velkých i malých dýchacích cest, ale tento typ buněk nebyl nalezen v parenchymu plic (Demedts et al. 2005).

### 5.2.2 Plasmacytoidní DC (pDC)

Plasmacytoidní DC typicky představují méně než 0,3% cirkulujících mononukleárních buněk (de Heer et al. 2004). pDC na svém povrchu exprimují receptor CD45RA, IL-3R $\alpha$  (CD123), TLR 1, 6, 7, 9 a 10 a ILT-7 (immunoglobulin—like transcript) (Blanco et al. 2008). pDC v periferní krvi i v plicích jsou CD14- (Demedts et al. 2005). Z C-lektinů je na povrchu pDC exprimován BDCA-2 (blood dendritic cell antigen-2).

U myši pDC se vyvíjejí v primárních lymfoidních orgánech (thymus, kostní dřeň, játra), později v dospělosti jsou kontinuálně produkovány v kostní dřeni (O'Keeffe et al. 2002). Za fyziologických podmínek, pDC migrují přes venuly s vysokým endotelem do sleziny, lymfatických uzlin a slizničních lymfoidních tkání (O'Keeffe et al. 2002). Obecně se pDC považují za buňky schopné preferenčně polarizovat T-lymfocytární odpověď Th2 směrem (Rissoan et al. 1999).

pDC hrají významnou roli v obraně proti virovým infekcím. Jsou hlavním zdrojem produkce interferonů I typu (IFN $\alpha/\beta$ ) po stimulaci virovými antigeny nebo ligandy TLR7-9. pDC mohou být aktivované virem (Cella et al. 1997), IL-3 a CD40 ligandem (CD40L) (Grouard et al. 1997) a mikrobiálními komponenty ve formě CpG DNA (hypometylované úseky DNA) (Bauer et al. 2001). Pokud jsou pDC aktivovány pomocí IL-3 a CD40L, sekretují zanedbatelné množství IL-12 a jsou schopny polarizovat imunitní odpověď do Th2 (Rissoan et al. 1999; Gilliet et al. 2002). U lidí rozeznáváme 2 subtypy pDC na základě exprese CD2 molekuly. Obě subpopulace CD2<sup>low</sup> a CD2<sup>high</sup> pDC produkují IFN $\alpha$  po expozici virem a exprimují granzym B i TRAIL. Nicméně CD2<sup>high</sup> pDC, které tvoří přibližně 20-30% pDC v krvi, jsou schopny více indukovat proliferaci T lymfocytů (Matsui et al. 2009).

### 5.3 **Role DC v imunopatologických stavech**

Dendritické buňky mají jedinečnou schopnost indukovat antigen-specifickou reaktivitu nebo neodpovídavost v závislosti na různorodém mikroprostředí, kde se v organismu nachází. DC představují hlavní klíč v přirozené regulaci a dysregulaci imunitní odpovědi a v indukci toleranci vlastních nebo cizích antigenů. Zároveň toto podtrhuje jejich roli v rozvoji různých imunopatologických stavů – alergiích, autoimunitách nebo jiných zánětlivých stavech.

Abnormality DC v homeostaze byly popsány u mnohých onemocnění, včetně alergií, autoimunitních onemocnění, infekcí i nádorů.

#### 5.3.1 **Role DC v alergické reakci**

Z dosavadních poznatků vyplývá, že u geneticky predisponovaných jedinců jsou dendritické buňky schopny po kontaktu s alergenem polarizovat imunitní odpověď Th2 směrem. Dendritické buňky se nachází hlavně na rozhraní zevního a vnitřního prostředí, tj. na sliznicích a v kůži, kde se setkávají s alergeny. V následných odstavcích se budou věnovat roli DC v patogenezi dvou alergických onemocněních, na které jsme se zaměřili v našich publikacích: atopická dermatitida a bronchiální astma.

DC dýchacích cest hrají centrální úlohu v patogenezi zánětu dýchacích cest a onemocnění dýchacích cest. (Hammad et al. 2009). Plicní DC jsou většinou v nezralém stádiu, schopny velmi efektivně rozeznávat a pohlcovat alergeny pomocí rozeznání PAMPs přes PRR receptory. To vede k aktivaci DC a jejich následné migraci do lymfatických uzlin, kde se diferencují do zralých DC (Kapsenberg 2003). Inhalační alergeny nicméně nejsou schopny plně aktivovat DC, pokud chybí signál PAMP-PRR. Takto nezralé DC indukují převážně Tregs. Tyto alergen-specifické Tregs inhibují přirozené i adaptivní imunitní reakce po následné expozici alergenem a mediují tolerogenní odpověď na inhalační alergeny (Ostroukhova et al. 2004). Reexpozice alergenu vede k aktivaci alergen-specifických Tregs, které produkují IL-10 a TGF- $\beta$ , které inhibují antigen prezentující buňky a plnou aktivaci naivních T lymfocytů (Ostroukhova et al. 2004).

Plně aktivované DC jsou ale slabým zdrojem produkce IL-4, který je potřebný pro diferenciaci Th2 lymfocytů. Mnohé studie potvrdily, že hlavním zdrojem IL-4 jsou

aktivované žírné buňky, které po expozici alergenem migrují do lymfatických uzlin (Sokol et al. 2009; Wynn 2009).

Role dendritických buněk v alergickém zánětu a klinické projevy astmatu jsou velmi dobře nastudovány na myším modelu experimentálního astmatu vyvolaného inhalací inhalace ovalbuminu (OVA) (Wills-Karp 2000). Myší model prokázal zvýšení počtu DC v dýchacích cestách po expozici alergenem (van Rijt et al. 2002; Hammad et al. 2009). Jedním z možných mechanismů, proč k tomu dochází, je aktivace TLR4 a syntéza metaloproteinázy (MMP) 9 (Vermaelen et al. 2003). Bylo prokázáno, že přenesení ovalbuminem-pulzovaných DC do dýchacích cest naivních myší a reexpozici OVA aerosolu vede k OVA senzibilizaci, následné Th2 imunitní reakci, eozinofilnímu zánětu v dýchacích cestách, hyperplasii pohárkových buněk a bronchiální hyperreaktivitě (Lambrecht et al. 2000; Sung et al. 2001). Dále studie prokázaly, že deplece DC u OVA-senzibilizovaných myší zabraňuje aeroalergenem indukované bronchiální hyperreaktivitě a po jejich opětném vrácení se u myší plně projeví astma (Lambrecht et al. 1998; van Rijt et al. 2005).

V poslední dekádě byl objeven faktor, který má velmi úzký vztah k Th2-mediované imunitní reakci i alergickým onemocněním. TSLP (thymic stromal lymphopoietin) je produkovaný epiteliálními buňkami, fibroblasty, keratinocyty a stromálními buňkami a jeho receptor je exprimován na lidských mDC a pDC (Soumelis et al. 2002). Exprese TSLP může být indukována různými stimuly, jako jsou TLR ligandy a prozánětlivé cytokiny (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-13) (Bogiatzi et al. 2007). U pacientů s astmatem byla nalezena zvýšená exprese TSLP epitelovými buňkami, která koreluje se závažností astmatu (Ying et al. 2005). TSLP stimuluje dendritické buňky k produkci Th2 chemoatraktantů jako TARC (CCL17) a CCL22 (Ito et al. 2005), i IL-8 a eotaxin-2, chemotaktických faktorů pro granulocyty a eosinofily (Isaksen et al. 2002). Pod vlivem TSLP DC exprimují OX40L na svém povrchu a indukují diferenciaci naivních T lymfocytů směrem Th2, které produkují IL-4, IL-5, IL-13 a transkripci GATA-3 (Soumelis et al. 2002; Ito et al. 2005).

Dendritické buňky, mDC i pDC, hrají také zásadní roli v patogenezi atopické dermatitidy. V akutní fázi AD jsou atrahovány prekurzory Langerhansových buněk (LC) a zánětlivé dendritické epitelové buňky (IDEC), které vznikají z periferních monocytů, z periferní krve do místa zánětu (Wollenberg et al. 1996; Novak et al. 2002; Soumelis et al. 2002; Leung et al. 2003; Ito et al. 2005). V kožních biopsiích akutních ložisek bylo nalezeno zvýšené množství mDC jako LC i IDEC (Wollenberg et al. 1996). Oba tyto subtypy buněk exprimují zvýšené množství vysokoafinního receptoru pro IgE (Fc $\epsilon$ RI) (Bieber et al. 1992; Wollenberg et al. 1996). Po vazbě komplexu IgE-alergen na Fc $\epsilon$ RI a jeho následnou



internalizaci LC migrují do lymfatických uzlin, zde prezentují alergen naivním T lymfocytům a iniciují Th2 imunitní reakci. Na druhé straně bylo prokázáno, že stimulace FcεRI na povrchu IDEC vede k produkci IL-12 a IL-18 a polarizuje imunitní reakci směrem Th1 a stimuluje produkci IFN- $\gamma$ . Tento mechanismus by mohl vést k přesmyku iniciální Th2 reakci v akutních stádiích směrem k Th1 u chronických fází onemocnění (Novak et al. 2004).

Kromě mDC, FcεRI exprimují i pDC, proto pDC mohou indukovat Th2 imunitní odpověď po styku s alergenem (Novak et al. 2004; Novak et al. 2005). U pacientů s AD bylo nalezeno zvýšené množství pDC v periferní krvi, nicméně v kožních lézích AD bylo detekováno jen malé množství pDC (Wollenberg et al. 2002). Studie také prokázaly, že pDC aktivované přes komplex IgE-FcεRI produkují snížené množství IFN- $\alpha$  po stimulaci virovými antigeny, což by mohlo vysvětlit zvýšený sklon k virovým komplikacím (zvláště eczema herpeticatum) u pacientů s AD (Wollenberg et al. 2002).

### 5.3.2 Role DC v autoimunitní reakci

Autoimunitní onemocnění představují skupinu chorob založených na imunopatologické reakci proti vlastním antigenům, které se objevují u osob s určitým genetickým rizikem. V patogenezi autoimunitních onemocnění se uplatňují mechanismy specifické imunity zprostředkované T a B lymfocyty. Úloha vrozené imunity u autoimunit ale není úplně objasněna, nicméně přispění nebo dokonce ústřední role vrozené imunity k autoimunitám oživuje roli infekce v rozvoji T1D (Zipris 2008; Kim et al. 2009).

Jak už bylo popsáno výše, prezentací antigenu a ovlivňováním mikroprostředí přímým buněčným kontaktem nebo sekrecí různého spektra cytokinů jsou dendritické buňky schopny iniciovat i regulovat/polarizovat imunitní odpověď. NOD (non-obese diabetic mice) myši slouží jako experimentální model pro studium T1D – diabetes u nich vzniká spontánně (Sadelain et al. 1990). Bylo prokázáno, že maturační stav DC výrazně ovlivňuje výslednou polarizaci imunitní odpovědi. Nezralé DC jsou klíčové pro indukci periferní tolerance (Steinman et al. 2003), na druhé straně zralé DC jsou výborné antigen-prezentující buňky, schopné stimulovat i naivní T lymfocyty a produkovat prozánětlivé cytokiny. U NOD myši byly popsány DC prezentující antigeny  $\beta$ -buněk v pankreatických ostrůvcích i lymfatických uzlinách (Calderon et al. 2008). Na druhé straně nezralé DC pulzované antigeny  $\beta$ -buněk jsou schopny zabránit vzniku diabetu u NOD myši, pravděpodobně indukcí Tregs (Lo et al. 2006). Mnohé studie na myších modelech i u lidí prokázaly roli DC i některých cytokinů, hlavně

interferonů 1. typu (IFN $\alpha/\beta$ ), v rozvoji autoimunit. Experimentální modely prokázaly, že DC jsou schopny indukovat autoimunitní reakci na vlastní antigeny (Bondanza et al. 2003; Eriksson et al. 2003). Studie také prokázaly, že transfer konvenčních DC prezentujících antigeny mohou iniciovat diabetogenní odpověď u myši (Ludewig et al. 1998). Myší modely ukazují, že pDC, které produkují velké množství IFN $\alpha$ , hrají hlavní roli v iniciální fázi rozvoje T1D (Stewart et al. 1993; Li et al. 2011).

Z důvodu obtížného získání DC přímo z pankreatu nebo pankreatických lymfatických uzlin *in vivo*, jsou DC u lidí studovány „nepřímo“ v periferní krvi. Početní deficity mDC i pDC byly popsány u pacientů s T1D (Peng et al. 2003; Summers et al. 2003; Vuckovic et al. 2007; Hinkmann et al. 2008; Chen et al. 2008; Allen et al. 2009; Nieminen et al. 2012). U pacientů s T1D byla nalezena také porušená exprese CCR2 na pDC, která by mohla být asociována s maturací DC a jejich migrací do lymfatických uzlin a periferních tkání (Nieminen et al. 2012).

Ukazuje se, že role DC v rozvoji autoimunitních reakcí je pravděpodobně velmi úzce spojena s jejich unikátní funkcí – první linií obrany proti infekcím. Za pomoci různých povrchových i intracelulárních receptorů (TLR, C-lektiny, a další) DC rozeznávají mikrobiální motivy PAMP. Na jedné straně existují studie ukazující, že některé infekce (salmonela, schistosoma) předcházejí vzniku diabetu (Zacccone et al. 2003; Zacccone et al. 2004). Na druhé straně aktivací některých z těchto receptorů, hlavně intracelulární TLR7 a 9, a následných signalizačních kaskád dojde k produkci interferonů 1. typu (IFN $\alpha/\beta$ ) a potenciaci rozvoje diabetu. Hlavním zdrojem těchto cytokinů jsou především pDC (Krug et al. 2001). Interferony mohou následně modulovat aktivitu a maturaci DC. DC ztrácejí svoje tolerogenní vlastnosti a stávají se z nich plně maturované antigen-prezentující buňky, které exprimují na svém povrchu velké množství HLA II a kostimulačních molekul. Tyto buňky dále produkují IFN $\alpha$ , vedou k další maturaci DC a dochází k bludnému kruhu, který vede k potenciaci prezentace autoantigenů (Gottenberg et al. 2007).

Role IFN $\alpha$  v patogenezi autoimunit, včetně diabetu 1. typu, byla prokázána jak na myších modelech, tak i u lidí (Summers et al. 2003; Theofilopoulos et al. 2005). U myši byla popsána zvýšená exprese MHC I na  $\beta$ -buňkách ostrůvků, ale ne na buňkách exokrinní části. Tato exprese je závislá na interakci IFN- $\alpha$  a jeho receptorem na  $\beta$ -buňkách (Lang et al. 2005). Stimulace receptorů TLR 3,7 a 8 vede k výrazné produkci IFN- $\alpha$  a expresi MHC I na  $\beta$ -buňkách a vyvolává u myši diabetes (Lang et al. 2005). Zablokování receptoru pro IFN- $\alpha$  u myši vede téměř k úplné prevenci vzniku diabetu (Li et al. 2011). U lidí může léčba pomocí

IFN- $\alpha$  indukovat nebo vyvolat exacerbaci autoimunitních laboratorních fenoménů (přítomnost autoprotilátek) nebo i onemocnění.

IFN- $\alpha$  hraje taky významnou roli v aktivaci B lymfocytů, jejich přeměně na plasmablasty a v produkci autoprotilátek, které jsou přítomny již řadu měsíců až let před propuknutím onemocnění. IFN- $\alpha$  zvyšuje expresi CD38 na B lymfocytech a faktoru BAFF (faktor aktivující B lymfocyty) na monocytech a DC. BAFF následně přispívá k perzistenci autoreaktivních B lymfocytů (Litinskiy et al. 2002). Po aktivaci různými viry, produkují pDC IFN- $\alpha$  a IL-6, které ovlivňují plasmablasty k přeměně na buňky produkující protilátky ((Jego et al. 2003).

Všechny tyto studie potvrzují roli DC, hlavně pDC, a IFN- $\alpha$  v patogenezi T1D. Tyto poznatky by v budoucnu mohly výrazně přispět k terapeutickým možnostem diabetu a případně hlavně k zabránění vzniku toho onemocnění.

## 6 Cíle práce

Teoretická část dizertační dokumentuje nejnovější poznatky o mechanismech patogeneze imunopatologických stavů – alergických a autoimunitních onemocnění. V několika kapitolách jsou popsány různé molekuly, typy buněk a jejich působky, které se podílejí na rozvoji alergické nebo autoimunitní reakce a které následně vedou k poškození tkání a rozvoji onemocnění.

Společné a rozdílné imunopatologické mechanismy byly již shrnuty v námi publikovaném přehledovém článku (viz. 6.1) a dále byla tato problematika řešena v článcích u konkrétních alergických a autoimunitních onemocnění. Tyto články jsou rozděleny do dvou částí: *Studie zaměřené na poruchy imunitních reakcí u pacientů s těžkými formami atopické dermatitidy* a *Úloha dendritických buněk u alergií a autoimunitních onemocnění*.

### 6.1 **Studie zaměřené na poruchy imunitních reakcí u pacientů s těžkými formami atopické dermatitidy**

Atopická dermatitida je chronické kožní alergické onemocnění, které je podmíněno komplexem vzájemných interakcí porušené vrozené a adaptivní imunitní reakce. Jedná se o multifaktoriální onemocnění se silnou genetickou predispozicí, které je spouštěno zevními faktory prostředí. Porušená kožní bariéra je přispívá k zvýšené vnímavosti k infekcím a k hyperreaktivitě různých druhů buněčných populací.

#### **Asociace genů pro cytokiny a jejich receptory s atopickým pochodem u pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy**

Cílem našich práce bylo prozkoumat genetické pozadí pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy (AD) a určit sílu vlivu genů na další průběh alergického fenotypu v průběhu dětství.

#### **Korelace volných lehkých řetězců s aktivitou atopické dermatitidy**

Ve druhé publikaci jsme využili jedinečnou kohortu dětí získaných v předchozí studii a u ní jsme se zaměřili na humorální parametry. U pacientů s atopickou dermatitidou nalézáme v séru vysoké hladiny IgE i specifických IgE proti inhalačním a potravinovým alergenům.

Zvýšená produkce IgE B lymfocyty je doprovázena nadprodukcí volných lehkých řetězců (FLC). FLC byly donedávna spojovány především s monoklonální nadprodukcí imunoglobulinů při monoklonálních gamapatiích. V nedávné době ale byla zvýšená hladina detekována i u pacientů s autoimunitními onemocněními doprovázených s hypergamaglobulinémií IgG a později i alergickými onemocněními (astma). Recentní studie u myši i lidí popsaly vliv FLC v anafylaktické reakci. V naší studii jsme se zaměřili na detekování FLC v séru pacientů s AD a na jejich korelaci s aktivitou onemocnění.

### **Nové možnosti biologické léčby u atopické dermatitidy**

Terapeutické možnosti u pacientů s AD jsou cíleny především na lokální terapii kůže. Při těžkých formách AD přistupujeme k celkové imunosupresivní léčbě, která má limitující klinický efekt, především u dospělých pacientů. Jedním z možných nových terapeutických postupů se jako vhodným jevílo podání monoklonální protilátky proti B lymfocytům – anti-CD20 (rituximab). Cílem naší studie bylo zjistit klinický efekt rituximabu a zároveň detekovat možné změny v laboratorním obraze v průběhu léčby.

## **6.2 Úloha dendritických buněk u alergií a autoimunitních onemocnění**

V imunopatogenezi alergických i autoimunitních onemocnění jsou za hlavní efektorové považovány buňky hlavně subpopulace jednotlivých typů T lymfocytů. Pro aktivaci specifické imunitní odpovědi jsou ale nezbytné buňky vrozené imunity, hlavně dendritické buňky.

Dendritické buňky jsou schopny nejenom aktivovat ale i polarizovat imunitní reakci a hrají zásadní roli v patogenezi imunopatologických stavů. DC. Iničiální interakce mezi antigenem a dendritickou buňkou rozhoduje o typu výsledných efektorových buněk (Th1, Th2, Th17, Tregs). V následujících pracích jsme se zaměřovali na zastoupení jednotlivých subpopulací DC a jejich funkční změny u pacientů s bronchiálním astmatem a diabetem mellitem 1. typu.

### **Subpopulace dendritických buněk u pacientů s bronchiálním astmatem**

PRR receptory, jako C-lektiny nebo TLR jsou zásadní pro rozeznávání patogenů, ale i některých alergenů dendritickými buňkami. Dendritické buňky a jejich subtypy v dýchacích cestách jsou klíčové pro patogenezi alergického zánětu dýchacích cest. DC ve tkáních

(plicích) nejlépe odrážejí jejich funkci v nejrůznějších imunopatologických stavech, včetně bronchiálního astmatu. U mnohých alergických onemocnění bylo studováno hlavně zastoupení DC v periferní krvi. Bronchoalveolární laváž skýtá možnost získat nepřímo DC z dýchacích cest a studovat jejich funkce *ex vivo*. Cílem práce bylo stanovit zastoupení jednotlivých subpopulací DC v periferní krvi a v bronchoalveolární laváži a stanovení exprese různých C-lektinů a TLR na jejich povrchu.

### **Úloha dendritických buněk v patogenezi diabetu mellitu 1. typu**

V etiologii T1D jsou popisovány mnohé environmentální faktory, mezi nejvíce studovaný rizikový faktor pro rozvoj T1D jsou považovány infekce nejrůznějšími viry, hlavně enteroviry, nebo bakteriemi. Epidemiologické i laboratorní nálezy potvrzují tuto korelaci infekce a T1D. TLR jsou klíčové komponenty přirozeného imunitního systému, které rozeznávají různé mikrobiální motivy. Signalizace přes TLR receptory může aktivovat dendritické buňky, makrofágy a jiné antigen-prezentující buňky. Dendritické buňky a TLR jsou považovány za klíčové buňky a molekuly v imunopatogenezi T1D. Cílem naší práce bylo stanovit rozdílnou reaktivitu DC po stimulaci různými TLR ligandy u pacientů s T1D.

### **Jedinečná kazuistika jednovaječných čtyřčat s diabetem mellitem 1. typu**

Genetické faktory patří mezi další rizikové (endogenní) faktory v etiologii T1D. Především polymorfismy MHC II třídy hrají protektivní nebo rizikovou roli v rozvoji T1D. Cílem této práce bylo stanovení exprese různých imunopatogenních genů a zastoupení buněčných subpopulací v jedinečné kazuistice jednovaječných monozygotných čtyřčat, u kterých došlo k manifestaci T1D v rozličném čase.

## 7 Metodika

Ve všech experimentech byla použita periferní krev a sérum, případně bronchoalveolární laváž (BAL) pacientů a zdravých dárců po podepsání informovaného souhlasu. V některých studiích byly použity periferní mononukleární buňky izolovány z periferní krve nebo BAL-u, které byly následně simulovány různými TLR ligandy.

Vzhledem k velké heterogenitě jsou příslušné metody podrobně uvedeny v odpovídajících publikacích. Nyní uvádím pouze výčet použitých metod, na kterých jsem se podílela. \* jsou označeny ty, které jsem zaváděla nebo optimalizovala:

- Stanovení polymorfismů vybraných genů pomocí polymerázová řetězová reakce (PCR)
- Stanovení exprese TLR pomocí real-time RT-PCR
- Stanovení exprese genů pomocí mikroarray
- \* Stanovení subpopulací dendritických buněk v periferní krvi a BAL-u a také subpopulací T-lymfocytů pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie
- \* Cytometrická analýza exprese povrchových markerů DC (TLR, C-lektiny kostimulační molekuly CD80, 83 a 86) a intracelulárních znaků regulačních T lymfocytů (FoxP3, Helios)
- \* Kvantifikace cytokinové produkce v supernatantech a v séru pomocí metody ELISA, multiplexové analýzy Luminex nebo intracelulárního značení

## 8 Výsledky a diskuze

Výsledky této práce byly shrnuty do sedmi publikací. V následujícím oddíle jsou tyto publikace uvedené ve formě, ve které byly otištěny v zahraničním tisku (mimo publikace č. 6, která prochází recenzním řízením). Každé publikaci předchází komentář, který shrnuje a diskutuje zásadní výsledky práce a hodnotí jejich význam.

### 8.1 *Přehledový článek shrnující společnou a rozdílnou imunopatologie alergických a autoimunitních onemocnění*

Alergická a autoimunitní onemocnění jsou podmíněná zevními (environmentálními) a vnitřními (genetickými, neuroendokrinními) faktory a jejichž imunopatogeneze je v značné míře společná. Oba tyto imunopatologické stavy vznikají na podkladě nepřiměřené imunitní reakce, která vede k destrukci tkání a orgánů nebo k porušení jejich funkcí. Tato souhrnná práce představuje metaanalýzu společných i rozdílných vlivů na rozvoj alergických a autoimunitních onemocnění, mechanismy tkáňového poškození, klinických projevů a léčebných možností.





## Allergy and autoimmunity: Parallels and dissimilarity The Yin and Yang of Immunopathology

Jiřina Bartůňková<sup>a,\*</sup>, Jana Kayserová<sup>a</sup>, Yehuda Shoenfeld<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology, 2nd Medical Faculty, Charles University of Prague, University Hospital Motol, V Úvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic

<sup>b</sup> Centre for Autoimmune Diseases, Department of Medicine "B", Sheba Medical Centre, Tel-Aviv University, Tel-Hashomer 52621, Israel

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 September 2008

Accepted 19 September 2008

Available online 9 October 2008

#### Keywords:

Autoimmune disease

Allergy

HLA

Cytokines

Autoantigens

### ABSTRACT

The etiopathogenesis of allergy and autoimmune diseases is caused by genetic and acquired (environmental) factors, which might be common to both immunopathologies. Genetic factors play an important role in the development and process of immunopathological diseases. Several studies suggest a close relation between gene polymorphism of HLA and cytokines and development of autoimmunity and allergy. Certain gene polymorphisms act as risk or as protective factors. The infection also plays an important role in the induction of allergy and autoimmunity — as a trigger or as a protective factor. Moreover, similar clinical manifestations of both immunopathologies could result in diagnostic problems. This review summarizes the linkage of mechanisms of etiopathogenesis, clinical manifestations and therapeutic strategy between allergic and autoimmune diseases.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### Contents

1. Introduction . . . . .	302
2. Factors influencing the development of allergic and autoimmune diseases . . . . .	303
2.1. Internal factors . . . . .	303
2.1.1. Genetic influences . . . . .	303
2.2. External factors . . . . .	304
3. Common mechanisms of tissue damage in autoimmune and allergic diseases . . . . .	305
3.1. Type I of immunopathological reaction . . . . .	305
3.2. Type II of immunopathological reaction . . . . .	305
3.3. Type III of immunopathological reaction . . . . .	306
3.4. Type IV of immunopathological reaction . . . . .	306
4. Differential diagnostics from the viewpoint of clinical manifestations of allergic and autoimmune diseases . . . . .	306
5. Common therapeutic procedures in allergies and autoimmune diseases . . . . .	306
6. Conclusion . . . . .	307
Take-home messages . . . . .	307
References . . . . .	307

### 1. Introduction

Allergy is defined as a pathologically exaggerated immune response to an external allergen. On the other hand, the basis of autoimmune diseases is a pathological reaction to an

\* Corresponding author. Tel.: +420 2 224435960; fax: +420 2 224435962.  
E-mail address: [jirina.bartunkova@lfmotol.cuni.cz](mailto:jirina.bartunkova@lfmotol.cuni.cz) (J. Bartůňková).

internal antigen, autoantigen. However, the borderline between these two immunopathological conditions is not explicit. Some experimental animal models of autoimmune diseases as rheumatoid arthritis and experimental allergic encephalomyelitis may be induced by the external application of an antigen. On the contrary, in chronic allergies the gradual development of sensitization to autoantigen might modify the originally allergic disease and add an autoimmune component.

Both allergies and autoimmune diseases can be classified as terms of hypersensitivity, or more recently as immunopathological conditions. These are defined as pathological processes in which, in their onset, an excessive immunological reaction occurs to the external or internal antigens and results in damage to tissues or organs or in their impaired function.

Allergic and autoimmune diseases are the result of a combination of congenital, genetic causes and acquired, external triggering factors, which are common to a certain extent to both entities – infection, medications, chemicals, food, UV radiation, etc. The basic difference is that the elimination of an allergen usually leads to the disappearance of clinical symptoms. Due to its nature, an autoantigen cannot be eliminated and therefore autoimmune diseases usually have a progressive or chronic character. Even an allergic inflammation may turn into chronicity, since it is maintained or induced by various impulses without marked dependence on the original allergen, which triggered the initial response (chronic bronchial asthma, chronic atopic dermatitis, and chronic urticaria).

A simplified Th1/Th2 hypothesis represented a model of pathophysiology of certain diseases. With regard to the reciprocal interaction and antagonism of Th1 and Th2 immune reaction, it appears that in patients with Th2 immune reaction mediated disease there is a lesser Th1 mediated diseases. Some studies confirm this hypothesis and show a decreased incidence of atopic diseases in patients with autoimmune diseases [1,2]. Conversely, other studies have found a reverse dependence: Edwards et al. [3] identified in their study parallel manifestations of allergic and autoimmune diseases. In children with allergic diseases, a higher prevalence of autoantibody positivity against thyroid peroxidase [4] and a higher level of anticardiolipin antibodies [5] was observed. However, studies carried out in England [6] and Turkey [7] did not prove any relation between the incidence of allergic and autoimmune diseases.

Allergy and autoimmunity have many parallels and yet, at the same time, they have many differences. They can be considered, in philosophic conception, to be the yin and yang of immunopathology: “it is characteristic of yin and yang that they each contain in themselves a seed of their counterpart and therefore are inseparably connected. The unity of their own antagonistic forces results in continuous changes and movements of ch'i, which are the principles in the process of creation, and extinction of all things and phenomena. This process has a cyclic character, as the yin, after it reaches its extreme, is changed into the yang and vice versa” [8].

In this review, we try to summarize the similarities and differences of factors influencing the pathogenesis of autoimmune and allergic disease and to introduce some diagnostic problems between these two immunopathologies

arising from their resemblances and the therapeutic possibilities in the practice of clinical immunologist.

## 2. Factors influencing the development of allergic and autoimmune diseases

The onset and course of allergic and autoimmune diseases is always conditioned by a combination of internal (genetic) and external (environmental) factors. Although the mechanisms leading to the individual pathological state are different, the latest findings suggest a possible common pathogenetic connection.

### 2.1. Internal factors

Amongst the principal factors that influence the outbreak and progress of immunopathological diseases is the linkage to HLA genes, cytokine encoding genes and hormonal factors. In this review we are focusing mainly on genetics factors affecting autoimmunity and allergy.

It is disputable whether a certain genetic background simultaneously predisposes at once to autoimmune and allergic disease or whether the presence of one immunopathology eliminates the other. Several studies have been devoted to this problem.

#### 2.1.1. Genetic influences

The role of genetic factors in allergic and autoimmune diseases is indicated by a relatively high concordance of the occurrence of the disease in monozygotic twins, which fluctuates in various nosologic units between 25 and 80%. The risk of a child having AD is 50% if one parent has an atopic disease (AD, asthma or allergic rhinitis) and 75% if both parents are affected [9]. Both immunopathological conditions are considered to be a diseases with polygenic heredity. In their onset, more genes participate and the resulting phenotype of the disease is the result of a combination of various genes and their polymorphisms.

Studies of the human genome have revealed a large number of genes in all the human chromosomes connected with the origin of various diseases [10]. Certain genes are characteristic only of certain diseases (e.g. HLA B27 in ankylosing spondylitis, ADAM 33 in asthma [11]) and, on the other hand, some loci are common in various clinical diseases (3q21 is associated with atopic dermatitis and psoriasis) [12].

**2.1.1.1. HLA system.** The specific immune response is initiated by the presentation of antigens, either the body's own or foreign, bound to HLA molecules to T lymphocytes. The HLA genes, located on the short arm of chromosome 6, represent the most polymorphous section of the human genome.

More than one hundred diseases associated with HLA class I and II genes have been described in many studies. The frequency of individual polymorphisms in autoimmune and allergic diseases has been studied intensively during the past few decades. Some HLA-associated diseases are connected with only one allele, for example HLA B27 and ankylosing spondylitis, while others are associated with polymorphisms of the alleles of more genes of HLA class I and II (type 1 diabetes mellitus – T1D and multiple sclerosis) [10]. Results

from many studies show that some alleles represent a risk of an onset of the immunopathological response and also alleles that are protective [13].

The HLA haplotype, which is most often connected with autoimmune diseases in the Caucasian population, is the 8.1 ancestral haplotype which is characterized by HLA-A\*01, -B\*08, -DRB1\*03, -DQB1\*02 and -DQA1\*05 alleles. An association with this haplotype can be found in more than thirty autoimmune diseases [14,15]. The allele HLA-DRB1\*03 represents a risk factor for T1D, coeliac disease, Addison's disease, Sjögren's syndrome, myasthenia gravis. Moreover, the haplotype HLA-DRB1\*0301-HLA-DQB1\*0201 is associated not only with a clinical manifestation of the disease but also with the severity of the histopathological picture and the autoantibody positivity [16]. Studies focusing on the association between HLA and allergic diseases have revealed that the individual, aforementioned alleles that may induce autoimmune disorders can represent a risk also in various allergic responses. The allele HLA-DRB1\*03 is also described in association with asthma [17] or latex-fruit allergy [18].

On the other hand it is also documented that the same allele can be risk for one disease and at the same time protective for the other. HLA DRB1\*07, for example, is particularly associated with allergic rhinitis [19], asthma [20] and atopic eczema [21]. Various allergic responses are linked to the same allele: HLA DRB1\*07 plays an important role in the induction of mite allergy and also represents a risk in the allergic reaction to wasp venom. This allele is further associated with increased total serum levels of IgE [22]. On the contrary, it is protective for Graves–Basedow's disease and ITP [23,24].

Numerous studies therefore conclude that in various immunopathological conditions it is possible to observe an association with the same HLA haplotype or with the same alleles (mainly, HLA class II), which suggests that only the predisposition to the disease is hereditary and its clinical manifestations are dependent on other conditions.

**2.1.1.2. Genes encoding cytokines and their receptors.** Cytokines play a key role in the regulation of an immune reaction – both physiological and pathological. Genes for cytokines and their receptors are dispersed in the whole genome. The functional polymorphism of genes for cytokines may lead to the defective or excessive production of a certain cytokine, which results in disorders in the regulation of Th1/Th2 balance. Certain studies have been concerned with associations between cytokine gene polymorphisms and Th1 or Th2 mediated diseases [13]. It is well known that Th1/Th2 paradigm is not responsible for pathogenesis of all autoimmune and allergic disorders. T regulatory lymphocytes (Treg) and mainly Th17 cells, recently described T lymphocyte subpopulation, are involved in the induction of autoimmune and allergic diseases. In this review, we are focusing on the Th1 and Th2-mediated diseases.

IL-12 is considered to be an important cytokine in the induction of Th1 type immune reaction. A different frequency of its single nucleotide polymorphism (SNP) –1188A/C was described in psoriasis (Th1 diseases) and atopic dermatitis (Th2 diseases) in comparison to control. This suggests that IL12B SNP is associated with susceptibility to AD and PsV, presumably by affecting the Th1/Th2 balance [25]. On the contrary, different frequency of the polymorphism of IL-13,

the cytokine characteristic for allergic reaction, was observed in relation to bronchial asthma in comparison with children with juvenile idiopathic arthritis (JIA) [26]. Results from a wide body of studies suggest that the same genetic variant of a gene may protect against some diseases but could be simultaneously predisposed to others.

Polymorphisms of cytokine genes and their receptors seem to be crucial genetic factors for the development of immunopathological reactions and are associated with a predisposition to incidences of allergic and autoimmune diseases.

## 2.2. External factors

Allergic manifestations are markedly dependent on the induction of an immunopathological reaction triggered by a certain allergen. After its elimination, clinical symptoms usually disappear. Since a number of allergens are ubiquitous and cannot be eliminated from the environment of a hypersensitive individual, several atopic disorders are manifested as the chronic in their nature. Moreover, persons with a genetic predisposition to atopy gradually develop polyvalent allergies. Many other external factors, however, contribute to sensitization towards certain allergens, namely infectious diseases and damage to mucous membranes with toxic agents.

The infection can play a role in the induction of an autoimmune disease and allergy in two different ways: both as a trigger and as a protective factor. With respect to allergies, many epidemiological and experimental studies support the so-called hygienic theory that partly explains the rise of allergic diseases by the lack of common infections in early childhood. Infections of various types of bacteria (BCG, *Lactobacillus spec.*), viruses (hepatitis A virus) as well as parasites (*Schistosoma mansoni*) may prevent the development of allergies [27], because microorganisms might shift a Th2 immune reaction into a Th1-mediated, or stimulate the IL-10 production (immunosuppressive cytokine produced by Th2 or Treg lymphocytes). On the other hand, in allergic patients, an infection or induced inflammation may lead to allergic manifestation or deterioration in symptoms that already exist (in particular respiratory viruses can impair asthmatic manifestations, whereas staphylococci infections can impair the manifestations of atopic eczema). This often results in a vicious circle of infectious-allergic inflammation, usually of a chronic nature.

As a triggering mechanism in autoimmune diseases, infections are considered to be the one of the most important external factors. However, no infectious agent has so far been directly linked to a particular autoimmune disease. In pathogenesis of T1D, the influence of an infection by the Coxsackie virus has been researched, but no direct evidence has yet been found – the same holds for a viral etiology of sclerosis multiplex (associated with EBV, CMV and other infections). Infections may contribute to the induction of an autoimmune disease by means of various mechanisms, which may be combined. However, the main role is played by the molecular mechanisms of inflammation-induced damage to tissues (exposure to latent determinants, inflammatory cytokine induced HLA ectopic expression, aberrant presentation of intracellular peptides, expression of costimulatory molecules, activation of anergic autoreactive T-lymphocytes, and also an activation of autoreactive lymphocytes with

bacterial or viral superantigens, microbial mimicry). Clinical manifestations of the disease may occur even a long time after the infectious disease. Similarly, as in allergies, the hygienic hypothesis can also be applied to a certain extent to autoimmunity: infections can also protect against the development of an autoimmune inflammation. Some studies indicate that an infection in the earliest years of life reduces the risk of the occurrence of T1D, non-specific inflammatory bowel diseases and sclerosis multiplex [27]. In an experimental model of autoimmune encephalomyelitis, induced by an immunization with myelin antigen, the incidence and severity decreases after a previous infection caused by bacteria or parasites [27].

Medicaments, chemicals (including foodstuffs) and UV radiation may participate in an incidence of autoimmune disease probably due to the modification of autoantigens and to damage to regulation mechanisms. An autoimmune disease may develop even during the treatment of an allergy, and a case has been described recording the development of Sjögren's syndrome after allergen-specific immunotherapy [28]. The listed factors may also be direct causes of allergic diseases (medicament, food allergy, contact allergy to chemicals, solar urticaria...); the disruption of protective barriers facilitates the entrance of allergens into the organism and triggers allergic reaction.

Numerous external factors are considered to be common to allergy and autoimmunity. To the intent of "yin-yang" philosophy, infections, drugs and the others represent "forces" which direct the immune response to hyperresponsive reaction to an external antigen or to impaired reaction to self-antigen.

### 3. Common mechanisms of tissue damage in autoimmune and allergic diseases

#### 3.1. Type I of immunopathological reaction

The basis of the majority of allergic diseases is immunopathological reaction type I according to Coombs and Gel. This reaction is also defined as an early hypersensitivity reaction, because it occurs very soon after the contact with an allergen. The first contact with an antigen (allergen) results in the sensitization of the organism: it stimulates the differentiation of the Th2 lymphocytes and the proliferation of B lymphocytes which, under the influence of cytokines, produce IgE antibodies. These antibodies consequently bind to high-affinity IgE receptors on the surface of mast cells and basophils. Repeated contact with an allergen may lead to IgE bridging and consequently to the aggregation of receptors on the surface of basophiles and mast cells and the immediate release of their mediators; in the first phase it is mainly histamine and heparin, and, consequently, in the second stage metabolites of arachidonic acid – leukotrienes, prostaglandins and thromboxanes are produced. This type of immune response to an autoantigen as the cause of tissue damage has not yet been described in autoimmune diseases, although IgE elevated levels may appear in a number of autoimmune diseases (typically in Churg–Strauss vasculitis and other vasculitides, and often in dermatomyositis). Nevertheless, some studies, recently appeared, describe the incidence of IgE antibodies against human antigens in both allergic and autoimmune diseases. In a certain percentage of patients

with atopic dermatitis there have been identified several autoantigens, against which IgE antibodies were formed: Hom s 1–5, DFS 70 MnSOD, isoform V  $\beta$ -tubulin. These antigens are expressed in various cells (basophils, mast cells, T-lymphocytes) and in various tissues (the brain, bones, small intestine, liver, lungs, muscles, skin, uterus) [29].

Furthermore it has been found out that the level of IgE antibodies corresponds with the severity of the disease. In atopic dermatitis, during the exacerbation of cutaneous manifestations in response to external allergens, IgE autoantibodies increase rapidly [29]. Manganese-superoxide dismutase (MnSOD) is an enzyme protecting mitochondrial DNA against oxidation damage and can be found both in healthy skin and in inflammatory lesions in atopic dermatitis, psoriasis or contact dermatitis. UV radiation, mechanical damage, acute or chronic inflammations increase its expression mainly in atopic dermatitis. Simultaneously, IgE antibodies against MnSOD exist in humans and their level correlates with the activity of the disease [30]. The experiments also confirmed that the administration of a xenogenous antigen similar to a self-antigen ( $\alpha$ NAC) induces an allergic immune response [31]. Therefore many mechanisms of IgE autoimmunity may interfere with the pathogenesis of an allergic disease. Chronic allergic disease thus may become "autoimmune" [32].

Some authors have recently described the incidence of IgE antibodies against autoantigens, against which are mostly produced IgG antibodies in various autoimmune conditions. In systemic lupus erythematosus, there have been found elevated levels of IgE antibodies against nucleic antigens without specific clinical symptoms and without specific IgE against common allergens [33]. IgE antibodies against thyroid peroxidase and thyroglobulin were detected in patients with Hashimoto's disease and chronic urticaria [34] and patients with bullous pemphigoid produce IgE antibodies against hemidesmosomal protein BP180 [35].

Although an eosinophil-induced inflammation is typical for the pathogenesis of allergic disease, an experimental animal model of induced autoimmune eosinophilic inflammation and a coincidence of eosinophilic tissue inflammation were described also in patients with autoimmune diseases [36].

#### 3.2. Type II of immunopathological reaction

Type II of immunopathological reaction is mediated by IgG and IgM antibodies that are able to activate a complement which leads to a lysis of the cell or induce an ADCC type reaction (antibody dependent cellular cytotoxicity). Among the diseases caused by this type of reaction, there are drug allergies and many autoimmune diseases (autoimmune cytopenia, Goodpasture's syndrome) and also autoimmune disorders, where the production of antibodies does not lead to tissue damage but through its activity mediates an activation function in Graves–Basedow's disease or an inhibition, as it is in myasthenia gravis.

In the serum of atopic individuals with asthma there have also been recorded IgG antibodies against  $\beta$ -adrenergic ( $\beta_2$ ) receptors and against bronchial epithelium [37]. These antibodies play an important pathogenetic role in the development of asthma and they also influence the response to the administration of  $\beta$ -mimetics in allergic bronchial asthma.

**Table 1**

Differential diagnosis of clinical manifestations that can be common for both allergic and autoimmune diseases

Symptoms	Allergy	Autoimmunity
Cutaneous	Urticaria: acute/chronic	Food and drug allergies, pollen allergy (immunopathological reaction type I)
	Angioedemas	Drugs food, insects ...
	Eczema	Contact, less often atopic (acral form)
	Pruritus	AD, urticaria, mucosal oedema
	Purpura	Drug allergies
Mucosal	Swollen eyelids	Contact allergy, Pollinosis
	Conjunctivitis	Pollinosis, animal fur allergy
	Aphtae	Food allergy
	Rhinitis, sinusitis	Inhalant allergy
	Cough, dyspnea	Allergic bronchial asthma
	Nausea, stomach-ache, diarrhea	Food allergy

AD – atopic dermatitis, CFA – cryptogenic fibrosing alveolitis, IBD – inflammatory bowel disease, PBC – primary biliary cirrhosis, SLE – systemic lupus erythematosus.

### 3.3. Type III of immunopathological reaction

Under certain circumstances, immunocomplexes formed by an antibody (IgG nebo IgA) and an antigen (exo- or auto-) may be the basis for the 3rd type of immunopathological reaction. These immunocomplexes are not eliminated by phagocytes, but are stored in tissue, mainly in the walls of arteries, glomeruli and articular synovia. Immunocomplexes bind to the Fc receptors of phagocytes or activate a complement triggering a cascade of damaging reactions in which neutrophils and mast cells play an auxiliary role. This results in an inflammation, which is characteristic for systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritides, glomerulonephritides, polyarteritis nodosa, serum-induced disease or allergic alveolitis.

### 3.4. Type IV of immunopathological reaction

The delayed hypersensitivity is the 4th type of tissue damage, which develops within 48 h following an antigenic stimulus. Immunopathological reaction is caused by an inflammatory reaction that is dependent on Th1 lymphocytes and cells of the monocytic – macrophage system. A frequent

sign is the formation of granulomas, which are typical in sarcoidosis and mycobacterial infections. Belonging amongst diseases mediated by this type of immune reaction are: allergic contact dermatitis, and from autoimmunities it is sclerosis multiplex and type I diabetes mellitus.

## 4. Differential diagnostics from the viewpoint of clinical manifestations of allergic and autoimmune diseases

Autoimmunity and allergies represent two well establish clinical groups of immunology with their characteristic clinical symptoms. For all of that, as it was described in previous sections, besides etiopathogenesis, these two immunopathologies also have similar clinical manifestations, which may cause problems during diagnosis. Examples of some of these manifestations are listed in Table 1 [38].

Certain clinical symptoms may be considered allergic even though they may be connected to an autoimmune disease or vice versa. However, it is possible that both immunopathologies may occur simultaneously in one patient. A coincidence of some allergic and autoimmune diseases is given in Table 2.

## 5. Common therapeutic procedures in allergies and autoimmune diseases

A parallel can also be found in the therapeutic field of autoimmune and allergic diseases. In allergic diseases, a golden standard is the elimination of an allergen from the environment where the patient lives. This is not possible in autoimmune diseases, since the antigen is endogenous (body's own). Celiac disease is an exception, because the gluten-free diet prevents the development and progression of the disease.

Besides classical medication used in therapy of both pathologies, such as corticoids and other immunosuppressive including new biological therapy such as monoclonal antibodies, there is an analogy in allergen immunotherapy and immunotherapy by means of an autoantigen. In the first case,

**Table 2**

Coincidence of allergic and autoimmune diseases

Autoimmune diseases	Allergic manifestations	Coincidence	Reference
Rheumatoid arthritis	Hayfever dust allergy	Inverse association	[2]
Rheumatoid arthritis	Asthma hayfever AD	No significant difference	[7]
Sclerosis multiplex	IgE level against mites	Inverse association Elevated IgE levels lead to a higher frequency of allergic disorders but decrease the severity of sclerosis multiplex	[40]
Sclerosis multiplex	Asthma	Positive association	[3]
Type I diabetes mellitus	Asthma hayfever AD	Inverse association	[1]
		Decrease allergy prevalence (asthma, hay fever, eczema) in patients with T1D	

AD – atopic dermatitis, T1D – type I of diabetes mellitus.

the therapy has been empirically administered to patients for decades, but only recently a scientific foundation for this procedure has been established. In the second case, the procedure (autoantigen immunotherapy) had been verified first in laboratory animals, on the basis of a scientific hypothesis, and it was later applied to human medicine. In neither case the treatment has a 100% success rate and therefore there are many questions, both fundamental and methodological, yet to be answered. Immunotherapy by means of an autoantigen starts from experimental models in the field of oral tolerance. Oral application of an autoantigen leads to antigen-specific or so called by-stander inhibition of an autoimmune inflammation by a mechanism of deviation of immune reaction from damaging Th1 or Th17 reaction to protective Th2 or Th3 response [39]. The knowledge about the inflammation inhibition with a by-stander effect made it possible to use this therapeutic procedure in diseases where the particular antigen is not fully known. Nevertheless, the application of this therapeutic procedure in human medicine was, after the initial enthusiasm, disappointing. To date, none of the studies that have been carried out have shown substantial improvement in patients with autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, uveitis, multiple sclerosis and type I diabetes mellitus) following an orally administered autoantigen. Further studies in other autoimmune diseases have been undertaken, as there is a great number of variables: dose of antigen, frequency of its application, timing of the therapy, combination with other procedures, etc. Negative results therefore do not necessarily mean the failure of the principle, but rather a methodological embarrassment, which could be elucidated by other studies.

In conclusion, the basic treatment strategies of allergic and autoimmune diseases may be different, but the treatment facilities can interweave. Avoidance of allergen, if it is possible, and allergen immunotherapy are the main therapies of allergy accompanying with symptomatic therapy, immunosuppressive drugs are used in the treatment of mild and severe forms of allergic diseases. The corticoids and other immunosuppressive drugs are the first choice in the treatment of autoimmune disease. As it was discussed above, the “autoantigen immunotherapy” could be another possible therapy strategy of autoimmunity.

## 6. Conclusion

It results from the given survey that autoimmunity and allergy are diseases in whose origin the factors of polygenic heredity including a whole number of common gene loci or defined alleles and also many similar environmental factors participate. In clinical practice, it is necessary to take into account the pervasion of clinical symptoms of the disease where one imitates the other, or both immunopathologies may occur simultaneously in one patient. Therefore, autoimmunity and allergy may be considered to be a “yin and yang” of immunopathology, in which each of them has its own face; they are their own reciprocal contrasts, but each contains the seed of the other and may switch one into the other.

Supported by the Czech Ministry of Health (VZ 00000064203), and the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (VZ MSM 0021620812).

## Take-home messages

- Allergy is defined as an exaggerated immune response to an external allergen, while autoimmune diseases to an internal antigen, autoantigen: however, autoimmune diseases may be induced by the external application of an antigen, while in chronic allergies the gradual development of sensitization to autoantigens might modify the originally allergic disease.
- The multiple defects in immune regulation are hallmarks of both pathologies: similar genes and external triggering factors contribute to the manifestation of allergy and autoimmunity.
- Similar clinical manifestations of both immunopathologies could result in diagnostic problems: allergy may mimic autoimmune disease and vice versa.
- Both allergy and autoimmunity may occur in one patient.
- Similar therapeutic approaches are used in the treatment of both pathologies including biological therapy.

## References

- [1] Meerwaldt R, Odink RJ, Landaeta R, Aarts F, Brunekreef B, Gerritsen J, et al. A lower prevalence of atopy symptoms in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Exp Allergy* 2002;32(2):254–5.
- [2] Hartung AD, Bohnert A, Hackstein H, Ohly A, Schmidt KL, Bein G. Th2-mediated atopic disease protection in Th1-mediated rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(4):481–4.
- [3] Edwards LJ, Constantinescu CS. A prospective study of conditions associated with multiple sclerosis in a cohort of 658 consecutive outpatients attending a multiple sclerosis clinic. *Mult Scler* 2004;10(5):575–81.
- [4] Lindberg B, Ericsson UB, Fredriksson B, Nilsson P, Olsson CM, Svenonius E, et al. The coexistence of thyroid autoimmunity in children and adolescents with various allergic diseases. *Acta Paediatr* 1998;87(4):371–4.
- [5] Ricci G, Maldini MC, Patrizi A, Pagliara L, Bellini F, Masi M. Anti-cardiolipin antibodies in children with atopic dermatitis. *J Autoimmun* 2005;24(3):221–5.
- [6] Sheikh A, Smeeth L, Hubbard R. There is no evidence of an inverse relationship between TH2-mediated atopy and TH1-mediated autoimmune disorders: lack of support for the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(1):131–5.
- [7] Kaptanoglu E, Akkurt I, Sahin O, Hocaoglu S, Nacitarhan V, Elden H, et al. Prevalence of atopy in rheumatoid arthritis in Sivas, Turkey. A prospective clinical study. *Rheumatol Int* 2004;24(5):267–71.
- [8] M. Lao-c', Tao-te-7ing (Kniha o Tao a cnosti). Bratislava: CAD Press.
- [9] Reich K, Westphal G, König IR, Mossner R, Schupp P, Gutgesell C, et al. Cytokine gene polymorphisms in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2003;148(6):1237–41.
- [10] Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004;64(6):631–49.
- [11] Cookson W. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunol Rev* 2002;190:195–206.
- [12] Bowcock AM, Cookson WO. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 2004;13:R43–55 Spec No 1.
- [13] Bartůňková JŠA, Kayserová J. Alergie a autoimunita – jin a jang imunopatologie. *Alergie* 2006;2:107–16.
- [14] Lie BA, Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2005;17(5):526–31.
- [15] Dittmar M, Ide M, Wurm M, Kahaly GJ. Early onset of polyglandular failure is associated with HLA-DRB1\*03. *Eur J Endocrinol* 2008.
- [16] Anaya JM, Mantilla RD, Correa PA. Immunogenetics of primary Sjogren's syndrome in Colombians. *Semin Arthritis Rheum* 2005;34(5):735–43.
- [17] Juhn YJ, Kita H, Lee LA, Smith RW, Bagniewski SM, Weaver AL, et al. Childhood asthma and human leukocyte antigen type. *Tissue Antigens* 2007;69(1):38–46.
- [18] Blanco C, Sanchez-Garcia F, Torres-Galvan MJ, Dumpierrez AG, Almeida L, Figueroa J, et al. Genetic basis of the latex-fruit syndrome: association with HLA class II alleles in a Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(5):1070–6.
- [19] Yang L, Zhang Q, Zhang P. [Analysis of HLA-DRB1 allele polymorphism for patients with allergic rhinitis]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 1999;34(3):147–9.

- [20] Moffatt MF, James A, Ryan G, Musk AW, Cookson WO. Extended tumour necrosis factor/HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample. *Thorax* 1999;54(9):757–61.
- [21] Saeki H, Kuwata S, Nakagawa H, Etoh T, Yanagisawa M, Miyamoto M, et al. HLA and atopic dermatitis with high serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94(3 Pt 2):575–83.
- [22] Cardaba B, Cortegano I, Florido F, Arrieta I, Aceituno E, del Pozo V, et al. Genetic restrictions in olive pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(2 Pt 1):292–8.
- [23] Inaba H, Martin W, De Groot AS, Qin S, De Groot LJ. Thyrotropin receptor epitopes and their relation to histocompatibility leukocyte antigen-DR molecules in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2286–94.
- [24] El Neaeney WA, Barakat SS, Ahmed MA, El Nabie WM, Ahmed ME. The relation between HLA-DRB1 alleles and the outcome of therapy in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Egypt J Immunol* 2005;12(2):29–38.
- [25] Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, et al. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2002;30(2):161–6.
- [26] Heinzmann A, Jerkic SP, Ganter K, Kurz T, Blattmann S, Schuchmann L, et al. Association study of the IL13 variant Arg110Gln in atopic diseases and juvenile idiopathic arthritis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112(4):735–9.
- [27] Kamradt T, Goggel R, Erb KJ. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends Immunol* 2005;26(5):260–7.
- [28] Turkcapar N, Kinikli G, Sak SD, Duman M. Specific immunotherapy-induced Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int* 2005;26(2):182–4.
- [29] Zeller S, Glaser AG, Vilhelmsson M, Rhyner C, Cramer R. Immunoglobulin-E-mediated reactivity to self antigens: a controversial issue. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;145(2):87–93.
- [30] Schmid-Grendelmeier P, Fluckiger S, Disch R, Trautmann A, Wuthrich B, Blaser K, et al. IgE-mediated and T cell-mediated autoimmunity against manganese superoxide dismutase in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(5):1068–75.
- [31] Bunder R, Mittermann I, Herz U, Focke M, Wegmann M, Valenta R, et al. Induction of autoallergy with an environmental allergen mimicking a self protein in a murine model of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(2):422–8.
- [32] Mittermann I, Aichberger KJ, Bunder R, Mothes N, Renz H, Valenta R. Autoimmunity and atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4(5):367–71.
- [33] Atta AM, Sousa CP, Carvalho EM, Sousa-Atta ML. Immunoglobulin E and systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(10):1497–501.
- [34] Concha LB, Chang CC, Szema AM, Dattwyler RJ, Carlson HE. IgE antithyroid antibodies in patients with Hashimoto's disease and chronic urticaria. *Allergy Asthma Proc* 2004;25(5):293–6.
- [35] Fairley JA, Fu CL, Giudice GJ. Mapping the binding sites of anti-BP180 immunoglobulin E autoantibodies in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2005;125(3):467–72.
- [36] Barbie DA, Mangi AA, Lauwers GY. Eosinophilic gastroenteritis associated with systemic lupus erythematosus. *J Clin Gastroenterol* 2004;38(10):883–6.
- [37] Rottem M, Shoenfeld Y. Asthma as a paradigm for autoimmune disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;132(3):210–4.
- [38] Bartůňková J. Alergie a autoimunita. In: Špičák VPP, et al, editor. *Alergologie*. Prague: Galén; 2004. p. 99–111.
- [39] Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;3(11):947–54.
- [40] Kira J, Kawano Y, Yamasaki K. Multiple sclerosis with mite antigen-specific IgE. *J Neurol Sci* 1998;157(2):138–42.

### **Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis**

New therapies are under development to improve the efficacy of the treatment of rheumatoid arthritis. Monotherapies should promise to be good enough as traditional ones in improvement of disease course and symptoms. In a recent study, **Cohen SB et al (Arthritis and rheumatism 2009;60:335–344)** intended to compare the efficacy and safety of pamapimod (a selective inhibitor of the alpha-isoform of p38 MAP kinase) as a monotherapy in comparison with methotrexate (MTX) treatment in adult patients with active rheumatoid arthritis (RA). Patients in a randomly assigned to 1 of 4 treatment groups and received 12 weeks of double-blind treatment. One group received MTX (7.5 mg/week with planned escalation to 20 mg/week), and 3 groups received pamapimod (50, 150, or 300 mg) once daily. The primary efficacy end point was the number of patients meeting the American College of Rheumatology 20% improvement criteria (achieving an ACR20 response) at 12 weeks. Secondary end points included ACR50 and ACR70 responses, change from baseline in the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28), categorical analyses of DAS28/European League Against Rheumatism response, and change from baseline in each parameter of the ACR core set of measures. Safety monitoring included recording of adverse events (AEs), laboratory testing, immunology assessments, administration of electrocardiograms, and assessment of vital signs. As a result, patients assigned to receive MTX and pamapimod had similar demographics and baseline characteristics. At week 12, fewer patients taking pamapimod had an ACR20 response (23%, 18%, and 31% in the 50-, 150-, and 300-mg groups, respectively) compared with patients taking MTX (45%). Secondary efficacy end points showed a similar pattern. AEs were typically characterized as mild and included infections, skin disorders, and dizziness. Pamapimod was generally well tolerated, but the 300-mg dose appeared to be more toxic than either the 2 lower doses or MTX. The researchers concluded that pamapimod was not as effective as MTX in the treatment of active RA.

### **Regulatory T cells induced by GM-CSF suppress ongoing experimental myasthenia gravis**

It was previously observed that treatment utilizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) had profound effects on the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG). In this study, **Sheng JR et al (Clin Immunol 2008;128:172–80)** show that EAMG induced by repeated immunizations with acetylcholine receptor (AChR) protein in C57Bl6 mice is effectively suppressed by GM-CSF treatment administered at a stage of chronic, well-established disease. In addition, this amelioration of clinical disease is accompanied by down-modulation of both autoreactive T cell, and pathogenic autoantibody responses, a mobilization of DCs with a tolerogenic phenotype, and an expansion of regulatory T cells that potently suppress AChR-stimulated T cell proliferation in vitro. These observations suggest that the mobilization of antigen-specific Tregs in vivo using pharmacologic agents, like GM-CSF, can modulate ongoing anti-AChR immune responses capable of suppressing antibody-mediated autoimmunity.

## 8.2 ***Asociace polymorfismů genů pro cytokiny s klinickými a laboratorními změnami u pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy v průběhu dětství***

Astma bronchiale, alergická rhinitida i atopická dermatitida jsou multifaktoriální onemocnění, u kterých genetické faktory představují jeden s rizikových faktorů. Funkční polymorfismy genů pro cytokiny vedou k nadprodukcí nebo naopak nedostatečné produkci cytokinů a tato dysbalance vede ke změně Th polarizace. Mnohé studie, včetně genome-wide studií potvrdily asociaci nejrůznějších genů s alergickými onemocněními (cytokiny, ADAM33, filagrin). Bylo popsáno silné genetické spojení mezi cytokinovým clustrem na chromosomu 5q34 a atopickou dermatitidou a astmatem. Především polymorfismy v genech pro cytokiny IL-4, receptor IL-4 (IL-4R $\alpha$ ), IL-5 a IL-13 jsou asociovány s rozvojem i tíží astmatu, inhalační alergie, atopické dermatitidy, či zvýšeným IgE (viz. Kapitola 2.7).

Klinické projevy atopické dermatitidy se během dětství typicky mění. Ekzém se projeví nejčastěji v kojeneckém věku, často i těžkou generalizovanou formou. Během dětství může dojít k postupnému lokalizování do záhybů (flexulární forma) až vymizení ekzému a objevení se symptomů inhalační alergie – alergické rhinitidy a astma bronchiale. Ke změně klinického fenotypu dochází nejčastěji kolem třetího roku věku. Atopická dermatitida je zároveň velmi často asociována s potravinovou alergií, spektrum potravinových alergenů se během dětství vyvíjí, může dojít k jejímu úplnému vymizení nebo změně spektra alergenů.

Tato studie byla koncipována jako prospektivní, protože neexistuje mnoho studií, které by se věnovaly asociaci genetického pozadí s atopickým pochodem v průběhu dětství. Sledování trvalo první 4 roky života našich pacientů. U dětí, u kterých jako prvním projevem alergie byla atopická dermatitida ve velmi těžké formě, jsme následně sledovali změny klinického stavu, vývoj samotné AD a rozvoj dalších alergických onemocnění jako bronchiální astma nebo alergická rýma.

Ve spolupráci s dermatology jsme vytvořili soubor dětí, které byly do studie zařazeny ihned po diagnostikování těžké formy atopické dermatitidy a bylo u nich stanoveno 21 polymorfismů genů pro 13 cytokinů a jejich receptorů. V průběhu prvních let života jsme u těchto dětí sledovali změny klinického stavu a laboratorního obrazu – hladiny imunoglobulinů, hlavně IgE, specifické IgE proti nejčastějším alergenům: inhalačních (roztoče, pyly trav a stromu, plísňe) a potravinových (vaječný bílek a bílkovinu kravského mléka). V tomto projektu jsme studovali asociaci mezi genotypy, fenotypy a haplotypy těchto polymorfismů a změnami v klinické manifestaci AD a změnami atopického pochodu.



V naší práci jsme zjistili signifikantní asociaci mezi genotypy 7 polymorfismů IL-4 -1098G/T, -590C/T, IL-6 -174C/G, nt565A/G a IL-10 -1082A/G, -819C/T, a -592A/C a atopickou dermatitidou. Signifikantní asociaci jsme našli také mezi haplotypy TNF- $\alpha$  AA a IL-4 GC a AD.

Potvrdili jsme trend klinického zlepšení projevů AD během dětství (pokles SCORAD skóre). Dále jsme zjistili, že statisticky významnou asociaci mezi polymorfismy IL-4R (+1902 A/G) a pozitivitou specifických IgE proti pylům stromů v sérech pacientů. Pozitivní trend byl nalezen i mezi polymorfismy IL-10 -819C/T a -590A/C a rozvojem alergické rhinitidy v dětství.

V souladu s jinými studiemi i tato práce prokázala asociaci mezi polymorfismy genů pro cytokiny (IL-4, IL-6 a IL-10) a atopickou dermatitidou, zejména její těžkou formou. Naše výsledky naznačují, že polymorfismy pro IL-4R a IL-10 by mohly být použity v predikci vývoje atopického pochodu u dětí s těžkou formou AD.

# A Prospective Study in Children With a Severe Form of Atopic Dermatitis: Clinical Outcome in Relation to Cytokine Gene Polymorphisms

J Kayserova,<sup>1</sup> K Sismova<sup>1</sup> I Zentsova-Jaresova,<sup>1</sup> S Katina,<sup>2,3</sup> E Vernerova,<sup>1</sup>  
A Polouckova,<sup>1</sup> S Capkova,<sup>4</sup> V Malinova,<sup>5</sup> I Striz,<sup>6</sup> A Sediva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Charles University, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Applied Mathematics and Statistics, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University, Bratislava, Slovakia

<sup>3</sup>Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

<sup>4</sup>Paediatric Department of Dermatology, Paediatric Outpatient Department, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, General University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>6</sup>Department of Immunogenetics, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

## ■ Abstract

*Background and Objective:* The course of atopic dermatitis (AD) in childhood is characterized by typical changes in phenotype, including a shift from skin involvement to respiratory allergy usually around the third year of age. We thus designed a prospective study to monitor the outcome of severe AD and to investigate the association between cytokine gene polymorphisms and clinical manifestations.

*Methods:* Clinical and laboratory follow-up of 94 patients with severe AD and 103 healthy controls was performed using routine methodology. Allele, genotype, and haplotype frequencies of single nucleotide polymorphisms of 13 selected cytokine/receptor genes were analyzed using PCR with sequence-specific primers.

*Results:* In our study, genotypes of 7 polymorphisms—IL-4 -1098G/T and -590C/T, IL-6 -174C/G and nt565A/G, and IL-10 -1082A/G, -819C/T, and -592A/C were significantly associated with atopic AD ( $P < .05$ ). A significant association was also found for TNF- $\alpha$  AA and IL-4 GC haplotypes and AD.

We confirm the progressive clinical improvement of AD together with a decrease in the severity index SCORAD (SCORing atopic dermatitis) during childhood ( $P < .05$ ). We found significant differences between IL-4R $\alpha$  +1902 A/G and positivity of tree pollen-specific IgE ( $P < .05$ ) in the AD group. Moreover, a weak association was also found between IL-10 -819C/T and IL-10 -590A/C and the appearance of allergic rhinitis ( $P < 0.1$ ).

*Conclusions:* We confirmed a clinical shift in allergic phenotype in the first 3 years of life, and showed an association between IL-4, IL-6, and IL-10 polymorphisms and AD. Our data indicate that IL-4 $\alpha$  and IL-10 polymorphisms may be considered predictive factors of respiratory allergy in children with AD.

**Key words:** Allergic rhinitis. Allergy. Atopic dermatitis. Single nucleotide polymorphism. Cytokines.

## ■ Resumen

**Antecedentes y objetivo:** La evolución de la dermatitis atópica (DA) en la infancia se caracteriza por alteraciones típicas en el fenotipo, entre ellas el paso de afectación cutánea a alergia respiratoria, que se produce habitualmente alrededor de los tres años de edad. Por tanto, se diseñó un estudio prospectivo para evaluar el desenlace de la DA grave e investigar la asociación entre los polimorfismos genéticos de las citocinas y las manifestaciones clínicas.

**Métodos:** Se realizó un seguimiento clínico y de laboratorio de 94 pacientes con DA grave y 103 controles, utilizando los métodos habituales. Se analizaron las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de polimorfismos de un solo nucleótido de 13 genes de receptores/citocinas seleccionados, mediante PCR con cebadores de secuencia específica.

**Resultados:** En el estudio, los genotipos de 7 polimorfismos (-1098G/T y -590C/T en *IL-4*, -174C/G y nt565A/G en *IL-6* y -1082A/G, -819C/T, y -592A/C en *IL-10*) mostraron una asociación significativa con la DA atópica ( $p < 0,05$ ). También se encontró una asociación significativa entre los haplotipos AA en TNF- $\alpha$  y GC en *IL 4* y la DA.

Se confirma una mejoría clínica progresiva de la DA junto con una disminución del índice de gravedad SCORAD (SCORing atopic dermatitis) en la infancia ( $p < 0,05$ ). Se encontraron diferencias significativas entre +1902 G/A en *IL-4R $\alpha$*  y la positividad de IgE específica para el polen de árboles ( $p < 0,05$ ) en el grupo con DA. Además, se halló una asociación débil entre -819C/T en *IL-10* y -590A/C en *IL-10* y la aparición de rinitis alérgica ( $p < 0,1$ ).

**Conclusiones:** Se confirmó un cambio clínico en el fenotipo alérgico durante los tres primeros años de vida, y se encontró una asociación entre los polimorfismos en *IL-4*, *IL-6* e *IL-10* y la DA. Los datos indican que los polimorfismos en *IL-4R $\alpha$*  e *IL-10* pueden considerarse factores predictivos de alergia respiratoria en niños con DA.

**Palabras clave:** Rinitis alérgica. Alergia. Dermatitis atópica. Polimorfismo de un solo nucleótido. Citocinas.

## Introduction

The prevalence of allergic disease in Western countries has increased steadily in recent decades. In developed countries, the prevalence of asthma and atopic dermatitis (AD) is 10% and 15%, respectively, and is substantially higher among children [1]. Genetic predisposition has been proven to play a substantial role in the etiopathogenesis of AD [2]. The risk of a child having AD is 50% if 1 parent has an atopic disease (AD, asthma, or allergic rhinitis [AR]) and 75% if both parents do [2, 3]. Several genome screens for AD have been reported in the literature and have determined genome-wide significant linkage on chromosomes 1q, 3q, 3p, and 17p. A substantial number of candidate gene studies have revealed that multiple genes are involved in allergic inflammation (reviewed in [4,5]). Multiple single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes and chromosomal regions that consistently show association with AD, asthma, and the severity of these diseases have been identified [1,5,6].

The immunopathogenesis of AD is a very complex process that involves an array of molecules, but it is evident that cytokines play a key role in the development of the clinical presentation of AD. AD is characterized by an overexpression of type 2 helper (T<sub>H</sub>2) cytokines, such as interleukin (IL) 4, IL-5, IL-13, and the immunoregulatory cytokine IL-10, which have been observed in a significant proportion of acute AD skin lesions compared with the skin of healthy individuals [2,7]. Several studies have reported a population-dependent association between cytokine gene polymorphisms that affect cytokine production and chronic inflammatory disease; the association between gene polymorphisms in certain cytokines and allergic diseases in particular has been well documented [6,8-11]. Functional polymorphisms in cytokine-encoding genes may lead to defective or excessive cytokine production, resulting in disorders in T<sub>H</sub> polarization. A strong genetic link to bronchial

asthma and AD was described for the cytokine cluster on chromosome 5q34, including IL-4, IL-13, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, and IL-9 [1]. Certain polymorphisms in the genes encoding IL-4, IL-4 receptor alpha chain (IL-4R $\alpha$ ), IL-5, and IL-13 are associated with the development of asthma, inhalation allergies, and AD, and with elevated serum immunoglobulin (Ig) E levels [12-16]. This association has not been observed in all populations, and some population studies have not detected any association between AD, asthma, and cytokine polymorphisms [2]. The exact role of cytokines and cytokine polymorphic variants in the course and long-term outcome of AD therefore remains unclear, with many possible effects described in the studies cited above.

AD is predominantly a disease of childhood. The first clinical symptoms usually appear early. Sometimes, and particularly in severe forms, AD lesions may already be present during the neonatal period. The typical feature of AD is its diversified course during childhood. The turning point is usually around the third year of age, when clinical expression of the disease can change. First, the infantile stage can change to the childhood stage, with involvement of flexor surfaces, or symptoms can become less severe and even completely disappear. Second, the children can develop respiratory allergies, such as bronchial asthma and AR. Furthermore, AD is often associated with food allergies, which can subside during childhood or persist and increase in variety and intensity.

We designed a prospective study with the goal of correlating the genetic pattern of the inherited cytokine set with the outcome of initially severe AD in very young infants. The association between a particular cytokine/cytokine receptor gene polymorphism and clinical status was analyzed after the third year of life. First, we investigated the polymorphic frequencies of selected cytokine/cytokine receptor genes in patients with AD and healthy controls. Second, we focused on a set of polymorphic variants of the alpha chain of the receptor

for the *IL-4* and *IL-10* genes and examined the association between these changes and clinical status and laboratory markers of AD during infancy and childhood.

## Patients and Methods

### Patients, Controls, and Study Design

Ninety-four pediatric patients (32 girls and 62 boys) from the Czech population with severe forms of AD were evaluated at the departments of dermatology and immunology at Charles University, 2<sup>nd</sup> Medical School, and University Hospital Motol, in Prague in the Czech Republic. The mean age of the patients at the time of diagnosis was 3.12 months (range, 0.5–27 months). There was a higher prevalence of boys (66%).

The diagnosis of AD, AR/asthma bronchiale, and food allergy was based on the SCORAD (SCORing atopic dermatitis) index (50–80), on clinical manifestations, and on levels of specific IgE and positive skin prick tests, respectively. The frequency of follow-up was dependent on clinical status, with 1 obligatory control during the first 3 years of life. Changes in the course of AD and food allergy, and the appearance of asthma or AR have been reported during childhood. In addition to the clinical manifestations of AD and respiratory allergy, we also evaluated total IgE serum levels, and serum levels of specific IgE against food allergens (particularly cow milk protein and egg white) and respiratory allergens, grass pollen, and tree pollen according to genotype. These immunologic parameters were investigated during the follow-up visits. We compared clinical status and laboratory markers at the time of diagnosis (3–6 months of age) and in the third year of life. Seventy-four patients (26 girls and 48 boys) older than 3 years of age were available for statistical analysis in prospective settings.

The control group for the genetic study consisted of 103 unrelated healthy blood donors who were recruited for an anthropological study at the Institute of Clinical and Experimental Medicine (IKEM) in Prague. Males and females were represented equally. The absence of allergy was a major criterion for inclusion in the control group; the controls were further matched for ethnicity (Caucasian population).

Informed consent was obtained prior to inclusion in the study from the patients' parents/guardians and from healthy donors.

### Detection of Cytokine SNPs

The SNPs of genes encoding 13 selected cytokines and cytokine receptors were detected using polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) designed for the 13th IHWC (Cytokine Typing Tray Kit, Collaborative Transplant Study at the University Heidelberg, Heidelberg, Germany). Each PCR mix also contained an internal positive control primer pair for the  $\beta$ -globin gene or for C-reactive protein (CRP) at a concentration 5 times lower than that of the specific primers. Genomic DNA was isolated from the peripheral blood cells of the patients using a DNA kit (Quiagen), and PCR reactions were performed in a 96-well plate (volume of 10  $\mu$ L) containing genomic DNA, Taq

DNA polymerase (Promega), 200nM dNTP (Promega, UK), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), and primers (Cytokine Typing Tray Kit). PCR fragments were separated by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

We analyzed the following SNPs: *IL-1 $\alpha$*  -889C/T (rs1800587); *IL-1 $\beta$*  -511C/T (rs16944) and +3962C/T (rs1143634); *IL-1R* pst1 1970C/T (rs2234650) and *IL-1R $\alpha$*  mspa1 11100C/T (rs315952); *IL-2* -330G/T (rs2069762) and +166G/T (rs2069763); *IL-4* -1098T/G (rs2243248), -590C/T (rs2243250), and -33C/T (rs2070874); *IL-4R $\alpha$*  +1902G/A (rs1801275); *IL-6* -174G/C (rs1800795) and nt565A/G (rs1800797); *IL-10* -1082A/G (rs1800896), -819C/T (rs1800871), and -592A/C (rs1800872); *IL-12* -1188A/C (rs3212227); *TGF- $\beta$ 1* codon 10 C/T (rs1982073) and codon 25 G/C (rs1800471); *TNF- $\alpha$*  -308G/A (rs1800629) and -238G/A (rs361525); and *INF- $\gamma$*  UTR 5644 A/T (rs2430561).

Allele, genotype, and haplotype frequencies of the above polymorphisms were also determined.

### Analysis of Total Serum IgE Levels and Allergen-Specific IgE Levels

Total serum IgE and specific IgE antibodies levels against cow milk protein, egg white, grass pollen, and tree allergens of the patients were analyzed using the Immulite system (DPC Biermann, Germany). We chose to investigate grass and trees pollen as these are the most prevalent inhalant allergens in our region.

### Statistical Analyses

All statistical analysis were performed using MS Excel and R software [17]. Statistical significance was set at  $P < .05$ . Where necessary,  $P$  values were adjusted using the Benjamini and Hochberg (BH) multiple correction method [18].

### Statistical Analysis of Clinical Changes

The age groups (equidistant intervals, in years) were defined as follows: group 1, 0.50–1.49 years, group 2, 1.50–2.49 years, group 3, 2.50–3.49 years, group 4, 3.50–4.49 years, and group 5, 4.50–5.49 years. To test mean differences in the SCORAD index between 1) the reference age group (group 1) and the other age groups, and 2) stochastically ordered age groups (group 1 vs 2, group 2 vs 3, group 3 vs 4, and group 4 vs 5), the Mann-Whitney test for independent samples was applied.

### Frequency of Cytokine Gene Polymorphisms in Patients With AD and in Healthy Donors

Allele, genotype, and haplotype frequencies of SNPs were calculated using the gene-counting method. The distributions of these frequencies in patients and healthy donors were compared using the  $\chi^2$  test. To compare the observed and expected genotype frequencies among controls, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was analyzed using the  $\chi^2$  test. The associations between genotypes and haplotypes and the risk of AD were estimated by computing odds ratio (ORs) and 95% CIs from  $3 \times 2$  or  $4 \times 2$  contingency tables estimated using generalized linear models (GLM, binomial family, logit

link) separately for particular polymorphisms (for details, see Results), with haplotypes or genotypes as rows, and patients and controls as columns. *P* values were also adjusted using the BH multiple correction method.

### Association Between IL-4R $\alpha$ and IL-10 Gene Polymorphisms and Changes in Clinical Status in AD Patients

We used the  $\chi^2$  test of homogeneity (equality) for the rows in the 3 $\times$ 3 contingency tables for AD, AR, asthma, food allergy, total IgE, and specific IgE against egg white, cow milk, and tree and grass pollens [19] (Table not shown). The rows were represented by type of change, specifically: 1) negative to positive values; 2) no change; and 3) positive to negative values. The columns were represented by genotype, specifically the *IL-4R $\alpha$*  polymorphism +1902 (AA, GA, and GG) and the *IL-10* polymorphisms -1082 (AA, GA, and GG), -819 (CC, CT and TT), and -592 (AA, CA, and CC) (Table not shown). The choice of SNPs was directly related to significant genotype and haplotype results from the previous section (for details, see Results). Changes in clinical status and laboratory markers were compared by time of diagnosis (3-6 months of age and third year of life). The null hypothesis was defined as the probability distributions of +1902 (AA, GA, GG) for all types of change are equal, and the alternative hypothesis was that at least 2 probability distributions of +1902 (AA, GA, GG) would not be equal (and likewise for other polymorphisms in *IL-10*). GLM could not be used because of the numerous low frequencies.

## Results

### Differences Between Allele, Genotype, and Haplotype Frequencies of Cytokine Gene Polymorphisms in Patients With AD and in Healthy Controls

We investigated SNPs in 13 selected cytokines associated with immune reactions in AD patients and unrelated healthy controls. First, deviation from HWE was tested for the control group (data not shown). Most of the SNPs passed the HWE test. We observed a deviation for IL-1 $\alpha$  -889 and IL-10 -1082 (*P*=.0015). The healthy controls—all blood donors—were not selected randomly and were free of immunologic disorders such as asthma, AR, and AD. We therefore propose that this exceptional deviation from HWE could have occurred by chance. There was insufficient justification for excluding these SNPs from the association study and we were able to use this group as a control group for children with severe AD. Comparable results have been found in studies comparing the distribution of cytokine gene SNPs in the Czech population [20] and for IL-1 $\alpha$  -889 in the Macedonian population, where few SNPs (IL-1 $\alpha$  -889, IL-1 $\beta$  -511, IL-1 $\beta$  +3962, and IFN $\gamma$  UTR5644) were not in HWE [21].

The frequencies of genotypes, alleles, and haplotypes were analyzed and compared between patients and controls.

### Allele Frequencies

There were no statistically significant differences between

patients and controls in terms of the allele frequencies of the SNPs investigated (data not shown).

### Genotype Frequencies

We found statistically significant differences between the patients and controls for the genotype frequencies of *IL-4*, *IL-4R $\alpha$* , *IL-6*, and *IL-10*. The results of the genotype analysis of these SNPs are shown for the 2 groups in Table 1. The genotype frequencies of the other cytokines are not shown.

The most frequent genotypes in the patient group compared to the control group were IL-4 TT at position -1098 (88.6% in patients vs 74.5% in controls, OR=2.67, *P*=.008) and IL-4 CT at position -590 (34.16% in patients vs 19.6% in controls; OR=2.12, *P*=.013) and IL-6 GG at position -174 (46.2% in patients vs 29.1% in controls, OR=2.09, *P*=.007) and IL-6 GG at position -nt565 (47.3% in patients vs 32.0% in controls, OR=2.67, *P*=.015). These polymorphisms were associated with an increased risk of severe AD.

In contrast, we detected significantly lower frequencies of the genotypes IL-4 GT at position -1098 (11.4% in patients vs 25.5% in controls, OR=0.37, *P*=.008); IL-4 CC at position -590 (61.2% in patients vs 75.49% in controls, OR=0.52, *P*=.019); IL-6 CG at position -174 (35.5% in patients vs 51.5% in controls, OR=0.52, *P*=.013); and IL-6 AG at position -nt565 (34.4% in patients vs 52.4% in controls, OR=0.48, *P*=.006) in patients compared to healthy controls and these were associated with a reduced risk of severe AD.

The genotype IL-10 AG at position -1082 was negatively associated with severe AD (OR=0.42, *P*=.002). Interestingly, IL-10 AA at position -1082 was significantly associated with an increased risk of severe AD (OR=2.02, *P*=.019).

The heterozygous CT genotype of *IL-10* at position -819 was also found to be negatively associated with severe AD (OR=0.44, *P*=.003), while the homozygous CC genotype of *IL-10* at position -819 was significantly associated with an increased risk of severe AD (OR=1.88, *P*=.017).

The frequencies of the AA, AC, and CC genotypes of *IL-10* at position -590 were 8%, 25%, and 55% in patients and 5%, 48%, and 49% in controls, respectively. The heterozygous genotype IL-10 AG at position -590 was significantly associated with a reduced risk of AD (OR=0.45, *P*=.005). On the other hand, the genotype IL-10 CC at position -590 was significantly associated with an increased risk of severe AD (OR=1.8, *P*=.023).

### Haplotype Frequencies

For the investigation of functional SNPs, we also determined haplotype frequencies of *IL-2* (-330, +166), *IL-4* (-1098, -590, and -33), *IL-6* (-174 and nt565), *IL-10* (-1082, -819, and -592), *TGF- $\beta$ 1* (codon 10 and 25), and *TNF- $\alpha$*  (-308 and -238) in patients and controls. The relative frequencies are shown in Table 2. Each patient and healthy donor had 2 haplotypes.

Significant differences in haplotype frequencies were detected only for *IL-4* and *TNF- $\alpha$* . The haplotype IL-4 GC was higher in controls (12.8%) than in patients (5.62%) (OR=0.41, *P*=.01). At the same time, the haplotype TNF- AA was lower in patients (0%) than in controls (3.47%) (*P*=.01). However, 3

Table 1. Genotype Frequencies of Selected Cytokine Gene Polymorphisms in Patients With Atopic Dermatitis (AD) and Healthy Controls

Gene	Loci	Genotype	AD		Controls		OR (95%, CI)	P Value <sup>b</sup>
			No.	%	No.	%		
<i>IL-4</i>	-1098	G/G	0	-	0	-	-	NS
		G/T	10	11.36	26	25.49	0.37 (0.17-0.83)	.008 <sup>c</sup>
		T/T	78	88.64	76	74.51	2.67 (1.21-5.91)	.008 <sup>c</sup>
	-590	C/C	54	61.36	77	75.49	0.52 (0.28-0.96)	.019 <sup>c</sup>
		C/T	30	34.09	20	19.61	2.12 (1.10-4.10)	.013 <sup>c</sup>
<i>IL-4Rα</i>	+1902	T/T	4	4.55	5	4.90	0.92 (0.24-3.55)	NS
		A/A	52	59.09	55	53.92	1.23 (0.69-2.20)	NS
		A/G	32	36.36	43	42.16	0.78 (0.44-1.41)	NS
		G/G	4	4.55	4	3.92	1.17 (0.28-4.81)	NS
<i>IL-6</i>	-174	C/C	17	18.28	20	19.42	0.93 (0.45-1.90)	NS
		C/G	33	35.48	53	51.46	0.52 (0.29-0.92)	.013 <sup>c</sup>
		G/G	43	46.24	30	29.13	2.09 (1.16-3.77)	.007 <sup>c</sup>
	nt565	A/A	17	18.28	16	15.53	1.22 (0.58-2.57)	NS
		A/G	32	34.41	54	52.43	0.48 (0.27-0.85)	.006 <sup>c</sup>
		G/G	44	47.31	33	32.04	1.19 (0.64-2.22)	.015 <sup>c</sup>
<i>IL-10</i>	-1082	A/A	29	32.95	20	19.61	2.02 (1.04-3.90)	.019 <sup>c</sup>
		A/G	43	48.86	71	69.61	0.42 (0.23-0.76)	.002 <sup>c</sup>
		G/G	16	18.18	11	10.78	1.84 (0.80-4.21)	NS
	-819	C/C	55	62.50	48	47.06	1.88 (1.05-3.35)	.017 <sup>c</sup>
		C/T	26	29.55	50	49.02	0.44 (0.24-0.80)	.003 <sup>c</sup>
		T/T	7	7.95	4	3.92	2.12 (0.60-7.49)	NS
	-592	A/A	8	9.09	5	4.90	1.94 (0.61-6.16)	NS
		A/C	25	28.41	48	47.06	0.45 (0.24-0.82)	.005 <sup>c</sup>
		C/C	55	62.50	49	48.04	1.80 (1.01-3.22)	.023 <sup>c</sup>

Abbreviations: NS, nonsignificant; OR, odds ratio.

<sup>a</sup>OR AD-to-controls with 95% CI.

<sup>b</sup>Statistical significance,  $P < .05$ .

<sup>c</sup>Corrected for multiple testing according to Benjamini and Hochberg method [18].

*IL-10* haplotypes (GCC, ACC, and ATA) were detected in both groups, but no differences in frequencies of *IL-10* haplotype distribution were detected between the groups. There were also no significant between-group differences for the other haplotype frequencies of the cytokine gene polymorphisms analyzed.

### Clinical Outcome of AD Patients

Our study was designed as a prospective study with early enrolment of AD patients and a turning point at 3 years of age established as a critical period for the potential diversification of clinical outcome. As expected, the severity of AD in our series decreased significantly during childhood. The SCORAD index in the second, third, fourth, and fifth year of life were significantly decreased compared to those in the first year ( $P = .011$ ,  $P < .001$ ,  $P = .003$ ,  $P < .001$ , respectively, Figure). At the turning point of 3 years, skin involvement was less noticeable but still prevalent in 71 patients (95.5%; SCORAD, 10-55). AD had disappeared completely in just 3 patients. During the study period, increased levels ( $>0.35$  kU/L) of specific IgE against inhaled allergens (grass pollen and/or tree pollen) were detected in 50 children (grass pollen only, 17 patients;

tree pollen only, 23 patients; and grass and tree pollen, 10 patients). Fourteen patients developed respiratory allergy, namely hay fever ( $n = 7$ ) and bronchial asthma ( $n = 7$ ); 2 children developed both asthma and AR. The cumulative results are shown in Table 3.

### Association Between Polymorphisms in the Receptor Alpha Chain of *IL-4* and *IL-10* and the Onset of Respiratory Allergy in Children With AD During Childhood

*IL-10* and *IL-4Rα* polymorphisms have been previously highlighted as associated with an asthma phenotype and elevated IgE levels [9]. We therefore focused on polymorphic variants of these cytokine genes. We further characterized the association between selected polymorphisms and the course of allergic disease.

We analyzed the relationship between the polymorphisms in *IL-4Rα* (at 1 position) and *IL-10* (at all 3 tested positions) and the process of allergy manifestation, focusing on the onset of AD and, in particular, the appearance of asthma and/or AR, and changes in total IgE and allergen-specific IgE levels. The results are shown in Table 4.

On investigating the polymorphism in *IL-4Rα* at position

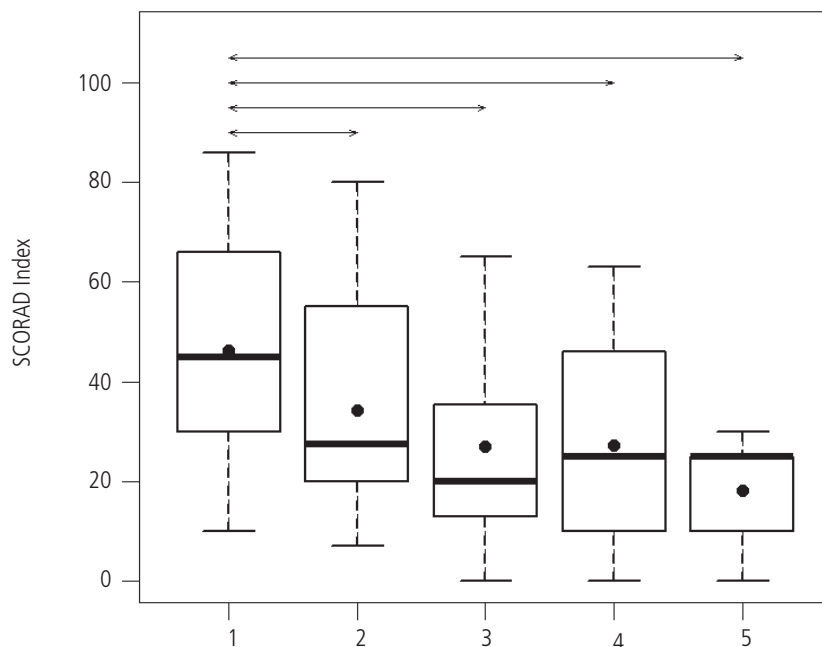
Table 2. Haplotype Frequencies of Selected Cytokine Gene Polymorphisms in Patients With Atopic Dermatitis (AD) and Healthy Controls

Gene	Haplotype	AD		Controls		OR (95% CI)	P Value <sup>a</sup>
		No.	%	No.	%		
<i>TGF-β1</i>	CC	8	4.49	16	7.77	0.56 (0.23-1.34)	NS
	CG	63	35.39	61	29.61	1.30 (0.85-1.99)	NS
	TG	107	60.11	129	62.62	0.90 (0.60-1.36)	NS
<i>TNF-α</i>	AA	0	—	7	3.47	—	.011 <sup>b</sup>
	AG	26	14.13	27	13.37	1.07 (0.60-1.91)	NS
	GA	9	4.89	10	4.95	0.99 (0.39-2.49)	NS
	GG	149	80.98	158	78.22	1.19 (0.72-1.95)	NS
<i>IL-2</i>	GG	65	38.24	67	33.17	1.25(0.82-1.91)	NS
	GT	1	0.59	1	0.50	1.19 (0.07-19.16)	NS
	TG	62	36.47	72	35.64	1.04 (0.68-1.59)	NS
	TT	42	24.71	62	30.69	0.74 (0.47-1.17)	NS
<i>IL-4</i>	GC	10	5.62	26	12.75	0.41 (0.19-0.87)	.011 <sup>b</sup>
	TC	129	72.47	148	72.55	1.00 (0.64-1.56)	NS
	TT	39	21.91	30	14.71	1.63 (0.96-2.75)	NS
<i>IL-6</i>	CA	66	35.48	85	41.26	0.78 (0.52-1.18)	NS
	CG	1	0.54	8	3.88	0.13 (0.02-1.08)	NS
	GA	0	—	1	0.49	—	NS
	GG	119	63.98	112	54.37	1.49 (0.99-2.24)	NS
<i>IL-10</i>	ACC	65	34.57	65	31.55	1.15(0.75-1.75)	NS
	ATA	43	22.87	54	26.21	0.84 (0.53-1.32)	NS
	GCC	80	42.55	87	42.23	1.01 (0.68-1.51)	NS

Abbreviations: NS, nonsignificant; OR, odds ratio.

<sup>a</sup>Statistical significance,  $P < .05$ .

<sup>b</sup>Corrected for multiple testing according to Benjamini and Hochberg method [18].



**Figure.** Association between patient age and SCORAD index. Box plots of SCORAD index for particular age groups (in years)—1: 0.50-1.49, 2: 1.50-2.49, 3: 2.50-3.49, 4: 3.50-4.49, and 5: 4.50-5.49. Full circles: arithmetic averages; bold solid lines: medians;  $P$  values of  $< .05$  from Mann-Whitney test for independent samples were considered to be significant ( $* < .05$ ,  $** < .01$ ,  $*** < .001$ ). SCORAD indicates SCORing atopic dermatitis.

+1902, we found a significant association ( $P<.05$ ) between the genotypes of *IL-4R $\alpha$*  and an increased level of tree pollen-specific IgE at the clinical turning point (third-fourth year of life). The AA and AG genotypes were more frequent (50% of all AA genotypes and 47.4% of all AG genotypes) in patients with increased levels of specific IgE than in patients lacking the corresponding specific IgEs (0% for both genotypes). In addition, the GG genotype was characteristic in the patient group (33.3% of all GG genotypes), with a shift from an initially positive specific tree pollen IgE level to a negative value. This particular genotype was not found (0%) in patients who were consistently negative for specific tree pollen IgE or who possessed highly positive specific IgEs at the turning point.

Moreover, the tendency towards the association of *IL-10* SNPs with allergic rhinitis (AR) was found for positions -819C/T and -592C/A ( $P=.085$  and  $P=.083$ , respectively). In the group of patients who developed AR, the AA genotype at position

Table 3. Changes in Clinical Status and in Immunoglobulin (Ig) E Levels in Patients (n=74) During Childhood

	Enrolment in Study No. (%)	Withdrawal From Study at 3 Years of Age No. (%)
Atopic dermatitis	74 (100)	71 (95.8) <sup>a</sup>
Asthma bronchiale	2 (2.7)	9 (12.5) <sup>b</sup>
Allergic rhinitis	1 (1.35)	9 (12.5) <sup>b</sup>
Specific IgE against grass pollen	3 (4.05)	27 (36.49)
Specific IgE against tree pollen	6 (8.1)	33 (44.59) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Atopic dermatitis disappeared in 3 patients.

<sup>b</sup>Two children had both asthma and rhinitis at 3 years of age

<sup>c</sup>One patient had positive specific IgE only during infancy (negative at 3 years of age).

Table 4. Association Between *IL-4R $\alpha$*  and *IL-10* Receptor Gene Polymorphisms and Alteration of Clinical Status of Patients With Atopic Dermatitis

Permutation <i>P</i> Value <sup>a</sup>	<i>IL-10</i>			<i>IL-4R<math>\alpha</math></i>
	-1082A/G	-819C/T	-592A/C	+1902A/G
Atopic dermatitis	0.771	0.610	0.614	0.644
Asthma bronchiale	0.880	0.467	0.471	0.334
Allergic rhinitis	0.241	0.085 b	0.083b	0.536
Serum level of total IgE	0.970	0.661	0.646	0.289
Serum level of specific IgE against white egg	0.300	0.939	0.937	0.157
Serum level of specific IgE against cow milk	0.694	0.875	0.857	0.516
Serum level of specific IgE against grass pollen	0.506	0.661	0.644	0.664
Serum level of specific IgE against tree pollen	0.821	0.128	0.129	0.036c

Abbreviation: Ig, immunoglobulin.

<sup>a</sup>Statistical significance was set at  $P<.05$ .

<sup>b</sup> $P<.01$  (Corrected for multiple testing according to Benjamini and Hochberg method) [18].

<sup>c</sup> $P<.05$ .

-590 was more frequent than the AC and CC genotypes (60% of all AA genotypes, 4.5% of all AC genotypes, and 10% of all CC genotypes, respectively). On the other hand, in the group of patients without AR, the frequency of the AA genotype was decreased in comparison with that of the AC and CC genotypes (40% of all AA genotypes, 95.5% of all AC genotypes, and 87.5% of all CC genotypes, respectively). We obtained similar results for polymorphisms at the -819 position: the TT genotype was increased in comparison with the CC and CT genotypes (60% of all TT genotypes, 10% of all CC genotypes, and 4.5% of all CT genotypes, respectively) in the group of children with AR, while the frequencies of the CC and CT genotypes were higher than that of the TT genotype in the group of patients without AR (87.5% of all CC genotypes, 95.5% of all CT genotypes, and 40% of all TT genotypes, respectively) (data not shown).

No significant differences were detected for any of the other parameters or for any other positions of *IL-10* polymorphisms.

## Discussion

AD is a complex multifactorial disease with a strong genetic predisposition. Several studies have demonstrated a genetic linkage to AD in different populations worldwide [2].

In our association study, we focused on an array of cytokines and receptors thought to play an important role in the regulation of immune response and particularly in the pathogenesis of AD [2,6] and compared the distribution of alleles, genotypes, and haplotypes between AD patients and controls. We described the genotypes of 7 polymorphisms



of *IL-4*, *IL-6*, and *IL-10* significantly associated with AD (Table 1). A significant association was also found for *TNF- $\alpha$*  AA and *IL-4* GC haplotypes and AD (Table 2). Functional polymorphisms of cytokine genes and their receptor genes are among the most investigated inherited factors that might influence the occurrence and course of AD, but the results are contradictory [6]. The importance of cytokine genes in susceptibility to AD has also been highlighted by previously published genetic association studies [6,22]. These studies described the chromosomal regions that have a major importance in susceptibility to AD, including regions that contain the genes for several cytokines located on chromosome 5q31-33, such as *IL-3*, *IL-4*, *IL-5*, and *IL-13*. Associations between polymorphisms in *IL-4*, *IL-6*, and *IL-13* and extrinsic AD [23, 24], asthma [25], AR [13], and elevated levels of IgE [13] have been described. Nonetheless, a German study carried out by Reich et al [2] and an American study by Hoffjan et al [8], did not prove any association between cytokine gene polymorphisms and AD. More specifically, studies of *IL-10* polymorphisms have failed to find an association with AD in Caucasian populations [4,6]. This discrepancy may be due to the group of patients analyzed—very young infants with severe AD—or to population dependence.

In our prospective study, we followed the natural course of AD and the changes in its phenotype in the first 3 years of life. We confirmed the previously reported shift toward respiratory allergy in early infancy [26]. Asthma bronchiale and/or AR appeared in more than 20% of patients, and positivity for specific IgE against grass pollen and tree pollen was detected in 36.5% and 44.6% of the patients, respectively. AD disappeared completely in just 3 patients. We also wanted to identify the genetic background represented by a set of cytokine genes, particularly *IL-4R $\alpha$*  and *IL-10*, which might potentially influence the above-described outcome of an early stage of severe AD. Besides the influence on general atopic status, the genetic background including cytokine gene polymorphisms might also influence an “atopic march”, ie, dynamic changes in atopic status that occur in a child’s first years of life. Such an association has not yet been studied.

The main goal of our prospective study was therefore to investigate the influence of a genetic inherited background on the outcome of initially severe AD. However, the expected influence of an inherited set of cytokine genes showed a relatively mild effect on final outcome. We found an association between *IL-4R $\alpha$*  +1902 A/G and the appearance of tree pollen-specific IgE during the first 3 years of life.

It is well known that *IL-4* plays an important role in the regulation of IgE production. The *IL-4R $\alpha$*  chain is a common component of both *IL-4* and *IL-13* receptors and is indispensable for the binding and signal transduction of *IL-4* [27]. SNPs in this cytokine receptor have many functional consequences. An association between *IL-4R $\alpha$*  polymorphisms and atopy, particularly asthma, has been described as one of the few proven strong associations between cytokine gene polymorphisms and asthma [25,28] or allergic rhinitis [29,30]. Several studies have detected an association between *IL-4R $\alpha$*  and sensitization to pollen allergens [30], total serum IgE [31,32], and the expression of CD23 [15]. We could not confirm an association between this cytokine receptor gene polymorphism and AD in our case-control study or the clinical manifestation

of inhalant allergy in our cohort of patients with AD. Nonetheless, we did observe an association between *IL-4R $\alpha$*  and an increased level of specific IgE against common inhalant allergens.

While the association between *IL-4* and *IL-4R $\alpha$*  and AD has already been studied [15,23,30], this is the first time that a positive association with the outcome of atopic march in children has been proven in a prospective study [6].

Furthermore, we identified a trend towards an association between *IL-10* polymorphisms and severe AD in patients who subsequently developed AR (Table 4). No other associations were observed. *IL-10*, as a cytokine with various roles in immunoregulatory processes, has attracted much attention in other studies evaluating allergic disorders [10]. Although polymorphisms in the *IL-10* gene have been shown to alter both *IL-10* mRNA and protein expression, their relevance to the onset of AD or AR and asthma remains unclear [33,34]. *IL-10* SNPs at -1082, -819, and -592 are strongly linked to ethnicity [35]. Only 3 haplotypes of the promoter region have been described in the Caucasian population (GCC, ACC, and ATA) [36], coinciding with our findings. Several studies have reported an association between *IL-10* polymorphisms and atopy and/or allergic diseases. Associations between the ATA haplotype, the low *IL-10*-producing haplotype, and increased eosinophil counts in patients with asthma have been demonstrated [37]. Some studies have reported an association between the ATA haplotype and severity of asthma [9,38]. An association between allelic frequencies in *IL-10* SNPs at -1082, -819, and -592 and total serum IgE levels among AD patients [11, 39] and asthma [34] has been reported. Moreover, statistical significance has been found between *IL-10* -592C>A and eosinophil cell count in asthma patients [40]. Here, we add a trend towards the development of AR in children with severe AD bearing -819C/T and -592A/C polymorphisms in the *IL-10* promoter region. Our results do not reach high statistical significance but they do support an important regulatory role of *IL-10* in allergic disorders.

In conclusion, analysis of the polymorphisms of cytokines and their receptor genes revealed a strong association between *IL-4*, *IL-6*, and *IL-10* and atopic dermatitis. An association between *IL-4* and *TNF $\alpha$*  haplotypes was also found.

Moreover, we have reported, for the first time, that *IL-4R $\alpha$*  +1902 polymorphisms and *IL-10* -819 and -592 polymorphisms are associated with an increased level of tree pollen-specific IgE and a slightly increased risk of AR in children with severe AD. *IL-4R $\alpha$*  and *IL-10* polymorphisms thus represent candidate markers for the prediction of potential onset of inhalant allergy in pediatric patients with AD. Further observations of our cohort would enable a more precise mapping of the associations between genetic background and clinical outcome of severe atopy in early childhood.

## Acknowledgments

We thank Ondřej Cinek from the Laboratory of Molecular Genetics, Department of Paediatrics, University Hospital Motol, Prague in the Czech Republic for his professional and technical support.

This study was supported by the project MZOFNM2005 of the Czech Republic Ministry of Health, and by project VZ MSM 0021620812 of the Ministry of Education, Youth and Sports. The statistical analysis was partially supported by the project VEGA 1/0077/09.

## References

- Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2008; 358:1483-94.
- Reich K, Westphal G, Konig IR, Mossner R, Schupp P, Gutgesell C, Hallier E, Ziegler A, Neumann C. Cytokine gene polymorphisms in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2003; 148:1237-41.
- Schultz Larsen F. Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol.* 1993; 28:719-23.
- Barnes KC. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125:16-29 e1-11; quiz 30-1.
- Sengler C, Lau S, Wahn U, Nickel R. Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments. *Respir Res.* 2002; 3:7.
- Kiyohara C, Tanaka K, Miyake Y. Genetic susceptibility to atopic dermatitis. *Allergol Int.* 2008; 57:39-56.
- Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 1994; 94:870-6.
- Hoffjan S, Ostrovnaia I, Nicolae D, Newman DL, Nicolae R, Gangnon R, Steiner L, Walker K, Reynolds R, Greene D, Mirel D, Gern JE, Lemanske RF, Jr, Ober C. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113:511-8.
- Lyon H, Lange C, Lake S, Silverman EK, Randolph AG, Kwiatkowski D, Raby BA, Lazarus R, Weiland KM, Laird N, Weiss ST. IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children. *Genet Epidemiol.* 2004; 26:155-65.
- Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Iikura Y, Tobe T. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006; 17:583-90.
- Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim JS, Kim JW. Interleukin-10 haplotype associated with total serum IgE in atopic dermatitis patients. *Allergy.* 2005; 60:1146-51.
- Kabesch M, Schedel M, Carr D, Woitsch B, Fritzsche C, Weiland SK, von Mutius E. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:269-74.
- Nieters A, Linseisen J, Becker N. Association of polymorphisms in Th1, Th2 cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of EPIC-Heidelberg. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34:346-53.
- Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WH, Wahn U, Nickel R. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113:489-95.
- Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med.* 1997; 337:1720-5.
- Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, Harkins MS, Meyers DA, Bleecker ER. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114:80-7.
- Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing V, Austria.
- Benjamini Y, Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society B.* 1995; 57:289-300.
- Agresti A. *Categorical Data Analysis.* Wiley: New York, 2002: 734.
- Kubistova Z, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, Ambruzova Z, Mytilineos J, Petrek M. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population. *Int J Immunogenet.* 2006; 33:261-7.
- Trajkov D, Mirkovska-Stojkovicik J, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Sandevska E, Gogusev J, Spiroski M. Association of cytokine gene polymorphisms with bronchial asthma in Macedonians. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2008; 7:143-56.
- Mahdavian SA, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Amirzargar AA, Movahedi M. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Iranian patients with asthma. *J Clin Immunol.* 2009; 29:57-62.
- Novak N, Kruse S, Kraft S, Geiger E, Klucken H, Fimmers R, Deichmann KA, Bieber T. Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2002; 119:870-5.
- He JQ, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WT, Sandford AJ. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun.* 2003; 4:385-9.
- Beghe B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T, Keith TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33:1111-7.
- Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Forster J, Bauer CP, Wahn V, Zepp F, Wahn U. Atopic dermatitis in early infancy predicts allergic airway disease at 5 years. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28:965-70.
- Izuhara K, Yanagihara Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM. Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106:565-71.
- Bottema RW, Nolte IM, Howard TD, Koppelman GH, Dubois AE, de Meer G, Kerckhof M, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS. Interleukin 13 and interleukin 4 receptor-alpha polymorphisms in rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 153:259-67.
- Amirzargar AA, Movahedi M, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Mahloji M, Mahdavian SA. Polymorphisms in IL4 and IL4RA confer susceptibility to asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2009; 19:433-8.

30. Hesselmar B, Bergin AM, Park H, Hahn-Zoric M, Eriksson B, Hanson LA, Padyukov L. Interleukin-4 receptor polymorphisms in asthma and allergy: relation to different disease phenotypes. *Acta Paediatr.* 2010; 99:399-403.
31. Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology.* 1999; 96:365-71.
32. Wjst M, Kruse S, Illig T, Deichmann K. Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants. *Eur J Immunogenet* 2002; 29:263-8.
33. Halapi E, Hakonarson H. Recent development in genomic and proteomic research for asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2004; 10:22-30.
34. Zhang J, Chen H, Hu L, Fu J, Zhang H, Chen Y. [Correlation between polymorphism of IL-4 and IL-10 gene promoter and childhood asthma and their impact upon cytokine expression]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2002; 82:114-8.
35. Rady PL, Matalon R, Grady J, Smith EM, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tying SK, Hughes TK. Comprehensive analysis of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter: implications for immune regulation in specific ethnic populations. *Genet Test.* 2004; 8:194-203.
36. Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study. *Genes Immun.* 2002; 3:407-13.
37. Karjalainen J, Hulkkonen J, Nieminen MM, Huhtala H, Aromaa A, Klaukka T, Hurme M. Interleukin-10 gene promoter region polymorphism is associated with eosinophil count and circulating immunoglobulin E in adult asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33:78-83.
38. Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet.* 1998; 352:113.
39. Lacy K, Archer C, Wood N, Bidwell J. Association between a common IL10 distal promoter haplotype and IgE production in individuals with atopic dermatitis. *Int J Immunogenet.* 2009; 36:213-6.
40. Immervoll T, Loesgen S, Dutsch G, Gohlke H, Herbon N, Klugbauer S, Dempfle A, Bickeboller H, Becker-Follmann J, Ruschendorf F, Saar K, Reis A, Wichmann HE, Wjst M. Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Hum Mutat.* 2001; 18:327-36.

■ *Manuscript received March 4, 2011; accepted for publication, October 13, 2011.*

■ **Anna Sediva**

Department of Immunology  
Charles University, 2nd Faculty of Medicine  
University Hospital Motol, Prague  
Vúvalu 84  
150 06 Czech Republic  
E-mail: anna.sediva@fnmotol.cz

### 8.3 ***Pozitivní korelace hladiny lehkých řetězců imunoglobulinů s tíží atopické dermatitidy***

Jak už bylo popsáno v kapitole 1.1.3.1, mnohé studie prokázaly roli volných lehkých řetězců (FLC) v regulaci zánětlivé reakce u mnohých imunopatologických stavů. Jejich zvýšená hladina byla popsána v několika imunopatologických stavech (autoimunitní onemocnění i astma) a korelovala s aktivitou těchto onemocnění.

V naší práci jsme navázali na předchozí studii dětí s těžkou formou atopické dermatitidy, u kterých jsme stanovili hladinu volných kappa a lambda řetězců v séru a výsledky jsme korelovali s aktuálním klinickým stavem a hladinou IgE.

Oba typy volných lehkých řetězců kappa i lambda i jejich poměr kappa/lambda byly výrazně zvýšeny u pacientů s AD.

Skupinu pacientů jsme dále rozdělili do 4 typů dle tíže projevů AD: klidové stádium bez projevů, lehká forma AD, středně těžká forma AD a generalizovaná těžká forma AD. U skupiny pacientů s velmi závažnými projevy byla nalezena zvýšená hladina kappa, lambda i poměru kappa/lambda při porovnání se skupinou pacientů bez projevů i zdravými kontrolami. Korelace hladin FLC s celkovým IgE v séru ale prokázána nebyla.

Tato studie ukázala, že zvýšení hladiny FLC je přímo úměrné aktivitě onemocnění. Tato zvýšení by mohla souviset s aktivací B lymfocytů a FLC by mohly představovat další diagnostický laboratorní marker aktivity onemocnění nezávislý na celkovém IgE.

# Serum Immunoglobulin Free Light Chains in Severe Forms of Atopic Dermatitis

J. Kayserova\*, S. Capkova†, A. Skalicka\*, E. Vernerova\*, A. Polouckova\*, V. Malinova‡, J. Bartunkova\* & A. Sediva\*

\*Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Motol, Prague; †Department of Dermatology, Pediatric Outpatient Department, University Hospital Motol, Prague; and ‡Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, 1st Faculty of Medicine, General University Hospital, Prague, Czech Republic

Received 28 August 2009; Accepted in revised form 22 December 2009

Correspondence to: A. Sediva, Prof., MD, PhD, Department of Immunology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, University Hospital Motol, Prague, V úvalu 84, 150 06 Czech Republic. E-mail: anna.sediva@fmotol.cz

## Abstract

An increase in immunoglobulin free light chains (FLC) was recently described in several pathological conditions, including asthma. FLC pathology is classically associated with monoclonal gammopathies. Its association with allergic disorders is surprising and unexplained. We therefore tested a cohort of children with severe atopic dermatitis (SCORAD 50–80) to determine the serum levels of free kappa and lambda chains, and correlated the results with clinical status and relevant laboratory markers. Seventy-three patients with severe forms of AD, all children from 3 months to 3 years of age and ninety healthy age-matched controls were included in the study. Light chains in sera were tested using the Freelite assay (Binding Site, Birmingham, UK). There were highly significant differences in both kappa (mean: 7.05 and 3.22 mg/l) and lambda (mean: 10.99 and 9.8 mg/l) serum levels between patients and controls, respectively ( $P < 0.0001$ ). The kappa/lambda ratio in patients with allergy (mean: 0.64) was significantly higher than in controls (0.33) ( $P < 0.0001$ ). We further observed significantly increased levels of FLC and their ratio in the group of patients with severe forms of AD in comparison to the group of patients with a resting stage of the disease or healthy controls ( $P < 0.05$  and  $P < 0.0001$ , respectively). On the other hand, we could not confirm any association of FLC levels with age or total IgE levels. In conclusion, an increase in FLC reflects disease activity in children with severe atopic dermatitis. FLC might thus represent an additional diagnostic marker independent of total IgE levels.

## Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a complex disorder, which is determined in part genetically. Its pathogenesis is mediated by abnormal immune reactions. Detailed mechanisms and interactions are not yet known. AD has multiple forms of clinical presentation that differ in the time of appearance and in the severity and character of the disease. Factors that underlie such diversity are also unknown.

There is no typical laboratory marker of the disease. In only about 60% of cases are increased levels of IgE and/or specific IgE, mostly to egg white and milk, found in the early stages of the disease [1]. Despite the lack of a marker, the involvement of the immune system in the pathogenesis of the disease is evident. The role of B cells and immunoglobulins is widely accepted, but also insufficiently specified.

Immunoglobulin molecules are composed of heavy and light chains that form whole intact immunoglobulin molecules in activated plasma cells secreting antibodies. The genes for immunoglobulins are located on chromosome 14q32 for the heavy chain, 2p12 for the kappa and 22q11 for the lambda light chains. Heavy and light chain proteins are assembled in the endoplasmic reticulum, following the complex and highly orchestrated process of B-cell development and immunoglobulin synthesis. During these processes, light chains are always produced in slight excess over heavy chains [2, 3]. This excess of light chains is partly degraded intracellularly and partly secreted; however, the details of this process are only marginally described in the literature [4]. Little is known about light chain secretion under normal circumstances, although there is a substantial knowledge of monoclonal light chain overproduction in pathological states of diseases such as monoclonal gammopathy,

multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia [4, 5]. In these cases, a significant excess of immunoglobulins is the outcome of clonal production by pathological clones of plasma cells. Under these circumstances, free light chains (FLC) are detected in large amounts. Recently, the detection of such secreted light chains was enabled with the launch of Freelite, an assay targeting a specific site of the light chain that is normally hidden inside the intact molecule of immunoglobulin [6]. With the ongoing application of this assay, it became apparent that not only monoclonal gammopathies, but also other conditions, tend to secrete increased amounts of FLC, albeit in much lower quantities.

Inspired by recent reports describing the increase of FLC in some autoimmune and allergic diseases [7–10], and a newly described mechanism for allergic diseases based on mast cell sensitization by Ig FLC [11], we decided to investigate FLC levels in a cohort of children with AD.

## Patients and methods

**Patients.** The study was designed to be retrospective and picked up the thread of our previous prospective study with children with severe forms of AD. We initially concentrated on children with the most severe forms of disease, characterized by an early and severe involvement of skin with typical lesions covering large body areas. Children between 3 and 6 months of age were included in the study. The initial SCORAD score was above 50 in all children, and in many cases, it reached maximal values. Such inclusion criteria helped to homogenize the target population and narrow the normally extremely wide diversity of disease forms. Children were prospectively followed in our department for a period of several years (to 3 years of age). Ninety frozen serum samples were collected from 73 patients at different ages and in different stages of disease activity and ninety frozen samples of 90 healthy age-matched controls were included in the study. In the group of patients, single serum analysis was performed in 57 patients; in 15 patients two and in one patient three consecutive serum samples in different time points were analysed. Serum samples of healthy controls were collected from children who underwent minor surgeries in our hospital.

First, we analysed the differences in serum levels of FLC between patients and controls; we also correlated the concentration of IgE in patients' serum with the levels of FLC. Second, we correlated the concentration of FLC and their ratio with the severity of AD at the time of blood collection.

For the association study of FLC with clinical status, any changes in the progress of AD during childhood were documented in all patients; nevertheless, the clinical status (based on the SCORAD index) at the exact time

point of blood collection was available in only 57 patients. These patients were divided into four groups according to their clinical status (SCORAD index) [12]: group 1 – patients without clinical manifestation of AD, i.e. resting stage of AD ( $n = 9$  patients); group 2 – patients with mild eczema ( $n = 13$  patients); group 3 – patients with moderate eczema ( $n = 25$  patients) and group 4 – patients with severe eczema ( $n = 10$  patients). Informed consent, obtained according to the ethical standards of the Ethical Committee of University Hospital Motol, was obtained from all patients prior to admittance to the study.

**Methods.** Retrospectively, we investigated frozen serum samples from patients and controls for levels of FLC, kappa ( $\kappa$ ) and lambda ( $\lambda$ ), using the Freelite assay (Binding Site, UK). Sera from both groups were collected within the same time period and were stored for comparable length of time. Levels of total IgE were measured using the Immulite system (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA). Total serum IgG levels were analysed with the Image system (Beckman Coulter, CA, USA).

Clonality of FLC was tested in patient samples with the highest FLC levels (two patients,  $\kappa$ : 8.82–8.57 mg/ml,  $\lambda$ : 10.5–14.6 mg/ml). The immunofixation electrophoresis Minifix™ Kit (Binding Site, Birmingham, UK) was used for analysis.

**Statistic analysis.** The Mann–Whitney *t*-test was used to determine differences between the groups of patients and controls and to analyse differences between the four groups of patients divided by disease severity. Linear regression analysis was used to determine significant differences between serum IgE levels and levels of FLC in the group of patients. Results of statistical analyses were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

First, we analysed the serum levels of immunoglobulin FLC in 90 serum samples from 73 children with atopic dermatitis and 90 age-matched healthy donors. Despite the fact that all serum concentrations of kappa and lambda were in the normal range for the Freelite assay in both groups, we found highly significant differences between these two cohorts.

Comparing patients and controls, we found significantly higher levels of free  $\kappa$  chains (mean  $\pm$  SD: patients  $7.05 \pm 4.63$  mg/l and controls  $3.22 \pm 2.82$  mg/l), as well as of  $\lambda$  chains (patients  $10.99 \pm 1.79$  mg/l and controls  $9.82 \pm 2.18$  mg/l) ( $P < 0.0001$  for both). The ratio of  $\kappa/\lambda$  was also significantly different between patients and controls (mean  $0.64 \pm 0.35$  and  $0.33 \pm 0.23$ , respectively;  $P < 0.0001$ ), Fig. 1A–C.

The two patient samples with the highest levels of FLC were tested for clonality. However, no monoclonal component was detected in either  $\kappa$  or  $\lambda$  chains (data not shown).

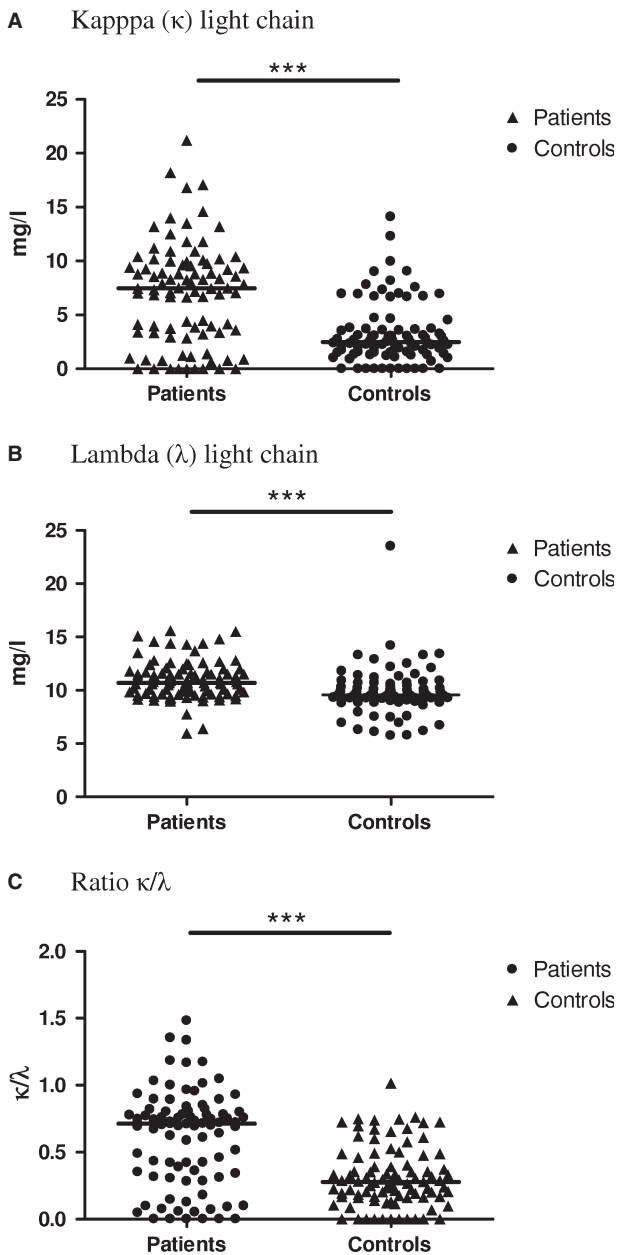


Figure 1 Comparison of levels of free light chains (FLCs), kappa (A) and lambda (B) and their ratio (C) between allergic patients ( $n = 73$ , number of serums = 90) and healthy controls ( $n = 90$ , number of serums = 90),  $P < 0.0001$  (\*\*\*), bars represent median.

Second, we compared levels of FLC with clinical manifestations of AD at the time point of blood collection. The levels of free  $\kappa$  chains,  $\lambda$  chains and their ratio was decreased in the group of healthy controls compared to the mild form ( $P < 0.0001$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.0001$ , respectively), moderate form ( $P < 0.0001$  for all three parameters) and severe form of AD ( $P < 0.0001$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.0001$ , respectively; Fig. 2A–C). We also found low serum levels of free  $\kappa$  chains in the group of patients without any recent manifestation of AD (resting

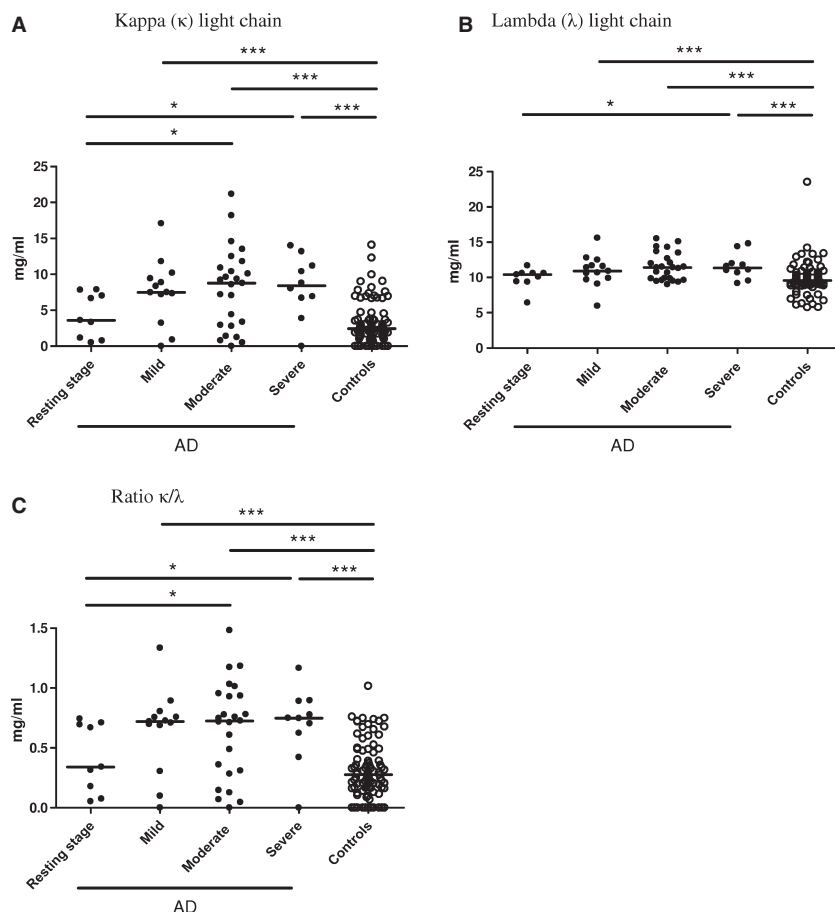
stage) compared to the groups of patients with moderate eczema ( $P < 0.05$ ) and severe AD ( $P < 0.05$ ), Fig. 2A. Similar differences were observed for  $\lambda$  chains (Fig. 2B) and the  $\kappa/\lambda$  ratio (Fig. 2C) between the group of patients without any acute manifestation of AD (group 1) and patients with severe eczema ( $P < 0.05$  for both parameters).

We also compared the concentrations of total IgE and IgG with disease severity. The laboratory parameters are shown in Table 1. The mean values of total serum IgE were higher in the groups of patients with active forms of AD, particularly in the group of patients with the generalized form (severe eczema) (1299.85 UI/l) and in patients with moderate eczema (318.93 UI/l), but the difference between these groups was not statistically significant.

No correlation between the serum levels of FLC (Fig. 3) and their ratio (data not shown) and total serum IgE and IgG levels was found in the patient group.

## Discussion

In our study, we clearly showed that there were increased levels of both the kappa and lambda chains of immunoglobulins, as well as their ratio, in a cohort of children with severe forms of atopic dermatitis. The differences in the FLC levels between AD subjects and controls without AD reached very high levels of statistical significances even if the absolute levels of FLC are only slightly above normal population values (Fig. 1A–C) [5]. These results correspond to previous reports documenting similar findings in systemic autoimmune diseases such as Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and allergic diseases [8–10, 13]. To our knowledge, this is the first report concerning atopic dermatitis. Our cohort of AD children was very homogenous with regard to the severity of clinical presentation and early manifestation of the disease. The observed phenomenon is clearly demonstrated; however, its explanation and its significance are not yet clear. The detected FLC were not monoclonal. The FLC increase did not correlate with serum concentrations of immunoglobulins, either IgG or IgE. It is also not known whether FLC bear allergen specificity. Out of several reports on this subject available so far, two reports have touched upon that question with opposite results. In an animal model, FLC were capable of transferring allergic disease [14]; while in a human study, the antigenic specificity of FLC was not proven [15]. In our study, we showed a significant correlation of FLC concentration with disease severity (Fig. 2A–C). Our findings implicate a direct association of the observed phenomenon with pathogenesis of the disease. It is, however, impossible to distinguish whether or not this is only a secondary epiphenomenon or whether increased light chain production is in direct association with the



**Figure 2** Comparison of levels of FLCs, kappa (A) and lambda (B) and their ratio (C) between the groups of patients according to the severity of the disease,  $P < 0.0001$  (\*\*\*), bars represent median.

pathogenic steps leading to the clinical presentation of AD. A recent report supports the second option, presenting mast cells as crucial targets in FLC-mediated hypersensitivity responses. In these reactions, surface bound FLC mediate the mast cell activation and subsequent degranulation. Released mast cell mediators then initiated and regulated inflammatory responses, which are important in the pathogenesis of severe forms of AD [11, 16–20].

Another interesting question touches on the basic principles of antibody production. This complex process is highly orchestrated in B cells. Light chains are not secreted until the late stages of B-cell development, being substituted in pro and pre B cells stages by surrogate light chains. The excess of light chain production and the role of its secreted form are not fully elucidated. A recent report presents a review of the literature and suggests several immunomodulatory functions for light

**Table 1** Levels of total serum IgE and IgG in relation to the severity of the disease and mean of age of patients in each group.

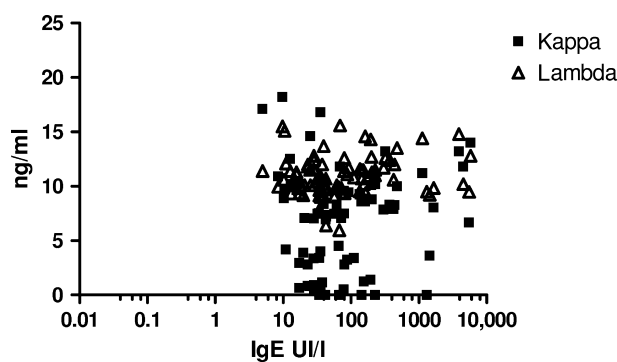
	n	IgE (UI/l)	IgG (g/l)	Age (months)
		Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Group 1	9	266.28 ± 468.94	8.41 ± 3.15	52.11 ± 28.4
Group 2	13	47.53 ± 29.8	7.37 ± 2.57	26.75 ± 14.6
Group 3	25	318.93 ± 932.6	6.71 ± 2.52	31 ± 16.7
Group 4	10	1293.85 ± 1996.4	6.24 ± 2.83	26 ± 17.55

Group 1 – patients without clinical manifestation of AD – resting stage (SCORAD index <5).

Group 2 – patients with mild form of AD (SCORAD index 5–25).

Group 3 – patients with moderate form of AD (SCORAD index 25–50).

Group 4 – patients with severe form of AD (SCORAD index >50).



**Figure 3** Correlation between concentration of total IgE and FLCs kappa and lambda in the group of patients.



chains, from enzymatic activity to binding of an array of molecules and a role in cellular interactions [19]. As higher levels of polyclonal FLC are observed in active forms of autoimmune/allergic disease (our study and others [8, 16, 19, 21]), the involvement of FLC as the pathogenic mechanism of these diseases might be implied. On the other hand, it is possible that the observed phenomena only reflect a state of general activation of B cells; however, this possibility is unlikely because high levels of FLC are not associated with similarly increased levels of immunoglobulins. In any case, the assessment of FLC may contribute to the elucidation of activity of the disease in clinical settings. The test is easily accessible and is fast. Its clinical value, after setting reference values, would be beneficial for stratification of disease activity in patients suffering from AD.

## Conclusion

We observed increased levels of free immunoglobulin light chains, both kappa and lambda, and their ratio in children with severe forms of atopic dermatitis. Moreover, increases in FLC reflect disease activity. While several questions concerning the pathogenic steps behind this observation are still unanswered, the test might reflect the state of B-cell activation and might contribute to a mosaic of possibilities for investigation into the disease. FLC might thus represent an additional diagnostic marker independent of total IgE levels. It is certain that further studies are needed to confirm this initial observation.

In conclusion, this first study observes increased FLC in the serum of patients with atopic dermatitis. The level of FLC correlates with disease activity, unlike total IgE serum levels.

## Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Health, Czech Republic VZ MZ ČR 00064203, the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic VZ MSM 0021620812 and GAUK 7840/2007.

## References

- 1 Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:805–19.
- 2 Hannam-Harris AC, Smith JL. Free immunoglobulin light chain synthesis by human foetal liver and cord blood lymphocytes. *Immunology* 1981;43:417–23.
- 3 Hopper JE, Papagiannēs E. Evidence by radioimmunoassay that mitogen-activated human blood mononuclear cells secrete significant amounts of light chain Ig unassociated with heavy chain. *Cell Immunol* 1986;101:122–31.
- 4 Pratt G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br J Haematol* 2008;141:413–22.
- 5 Katzmān JA, Clark RJ, Abraham RS *et al*. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002;48:1437–44.
- 6 Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP *et al*. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;47:673–80.
- 7 van der Heijden M, Kraneveld A, Redegeld F. Free immunoglobulin light chains as target in the treatment of chronic inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533:319–26.
- 8 Gottenberg JE, Aucouturier F, Goetz J *et al*. Serum immunoglobulin free light chain assessment in rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66:23–7.
- 9 Hutchison CA, Cockwell P, Harding S, Mead GP, Bradwell AR, Barnett AH. Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with type II diabetes: an early marker of diabetic kidney disease? *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:667–76.
- 10 Kraneveld AD, Kool M, van Houwelingen AH *et al*. Elicitation of allergic asthma by immunoglobulin free light chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1578–83.
- 11 Redegeld FA, van der Heijden MW, Kool M *et al*. Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses. *Nat Med* 2002;8:694–701.
- 12 Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, de Waard-van der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol* 2007;157:645–8.
- 13 Hopper JE, Golbus J, Meyer C, Ferrer GA. Urine free light chains in SLE: clonal markers of B-cell activity and potential link to in vivo secreted Ig. *J Clin Immunol* 2000;20:123–37.
- 14 Nauta A, Knippels L, Garssen J, Redegeld F. Animal models of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:355–9.
- 15 Nakano T, Takahashi H, Miyazaki S *et al*. Antigen-specific free immunoglobulin light-chain antibodies: could it be a new diagnostic marker for patients with allergy? *Clin Biochem* 2006;39:955–9.
- 16 Redegeld FA, Nijkamp FP. Immunoglobulin free light chains and mast cells: pivotal role in T-cell-mediated immune reactions? *Trends Immunol* 2003;24:181–5.
- 17 Redegeld FA, Van Der Heijden MW, Kool M, Kraneveld AD, Nijkamp FP. Functional role for Ig free light chains in immediate and delayed hypersensitivity responses. *Inflamm Res* 2004;53 (Suppl 1):S6–8.
- 18 Rocken M, Hultner L. Heavy functions for light chains. *Nat Med* 2002;8:668–70.
- 19 Thio M, Blokhuis BR, Nijkamp FP, Redegeld FA. Free immunoglobulin light chains: a novel target in the therapy of inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:170–4.
- 20 Groot Kormelink T, Thio M, Blokhuis BR, Nijkamp FP, Redegeld FA. Atopic and non-atopic allergic disorders: current insights into the possible involvement of free immunoglobulin light chains. *Clin Exp Allergy* 2009;39:33–42.
- 21 Bradwell A. *Serum Free Light Chain Analysis*. Birmingham: The Binding Site Ltd., 2006.

#### 8.4 ***Rituximab jako možná nová biologická léčba atopické dermatitidy***

Jak už bylo výše řečeno, atopická dermatitida je onemocnění spíše dětského věku. Tíže onemocnění osciluje mezi velmi lehkými lokalizovanými projevy až po těžkou generalizovanou formu. Léčba AD závisí na tíži onemocnění a je především lokální – emolienca, lokální kortikoidy nebo topické modulatory a jiné lokální protizánětlivé prostředky. Při těžkých závažných formách, u kterých selže lokální terapie, přistupujeme k celkové imunosupresivní léčbě – azathioprinem nebo cyklosporinem A. Zde zasahujeme již na úrovni adaptivní imunity do T buněčné odpovědi.

Léčba rituximabem je již součástí léčebných postupů mnoha autoimunitních onemocnění (SLE, vaskulitidy) a vede ke zlepšení klinického stavu i k postupnému sestupu autoprotilátek v séru. Nicméně využití toho preparátu v léčbě alergických onemocnění je velmi omezené a zatím je pouze ve fázi několika málo klinických studií. V patogenezi atopické dermatitidy na podkladě imunopatologické reakce 1. typu (původně extrinsický typ AD) hraje zásadní roli přecitlivělost na jednotlivé alergeny a tvorba specifických IgE. U většiny pacientů s atopickou dermatidou, především u těžké formy, detekujeme v séru vysoké hladiny IgE s multiproteinovou senzibilizací proti inhalačním a potravinovým alergenům. V paralele s autoimunitními onemocněními se tudíž léčba anti-CD20 protilátkou jevila jako velmi slibná. I přes určitý dočasný terapeutický efekt doprovázený poklesem SCORAD indexu jsme u pacientů nepozorovali dlouhotrvající léčebný efekt. Dokonce jsme u jednoho pacienta pozorovali mírnou nežádoucí příhodu. U jednoho pacienta jsme nicméně s odstupem času dosáhli

Laboratorní změny se projevovaly vymizením B lymfocytů, ale beze změny celkových hladin imunoglobulinů, včetně celkové IgE nebo specifických IgE. Naše studie prokázala pouze přechodný klinický efekt rituximabu u pacientů s velmi závažnou formou atopické dermatitidy, biologická léčba s anti-CD20 se jeví spíše vhodnější pro léčbu mírnější formy AD, jak prokázala švýcarská studie (Simon 2008).

1. *QOL*. Our baseline QOL assumptions were based on data published by Niebauer et al,<sup>2</sup> as referenced by Revicki et al.<sup>1</sup> It is important to note that a percentage improvement in QOL, when assessed by using a health status measure such as the Asthma Quality of Life Questionnaire (AQLQ) used by Niebauer et al,<sup>2</sup> does not translate into the same percentage of improvement in QOL assessed by using a preference-based “utility” measure (eg, assessed through standard gamble or time tradeoff techniques) and the QOL measure necessary for a cost-effectiveness analysis. Thus we used a report by Rutten-van Molken et al<sup>3</sup> showing that an improvement of 0.9% based on a standard gamble method corresponded with an 8.8% improvement in AQLQ score. Therefore to accurately incorporate the data published by Niebauer et al,<sup>2</sup> we assumed that the additional improvement in QOL by omalizumab beyond any improvement that is accounted for based on FEV<sub>1</sub> was 0.9%.

A great advantage of a model-based approach is that we can subject these assumptions to sensitivity analysis. Even when we assumed a 1:1 correlation between the AQLQ score and time tradeoff preference measures (a 7.2% improvement in QOL), we obtained a cost-effectiveness ratio of omalizumab in excess of \$200,000 per quality-adjusted life year, a result that is rarely considered acceptable value for money.

2. *Model structure*. Another advantage of the Asthma Policy Model is that it can evaluate the effect of asthma treatments under alternative natural history scenarios. The model can and was adjusted to study varying asthma severities and not only mild-to-moderate persistent asthma, as suggested by Revicki et al.<sup>1</sup>
3. *Validity of FEV<sub>1</sub>*. Prior work by our group establishes the validity of FEV<sub>1</sub> percent predicted, both as a main outcome and as a predictor of other important outcome measures.<sup>4-9</sup> Still, recognizing that FEV<sub>1</sub> percent predicted might not fully predict prognosis, we included additional independent effects of omalizumab on symptoms, acute exacerbations, costs, and QOL.
4. *Interpretation of prior work*. Brown et al<sup>10</sup> state that the exacerbation rates and utility values used in their cost-effectiveness model were for “omalizumab-treated responders and patients receiving standard therapy in the ETOPA study.” This suggests that their analysis was conducted on omalizumab responders. In an unblinded clinical setting in which few medication alternatives are available for patients with severe persistent asthma uncontrolled with high-dose inhaled corticosteroid or combination therapy, a small perceived clinical benefit despite the lack of clear objective measures of improvement might make the likelihood of discontinuation low. There are no tests to identify who will respond to omalizumab therapy. At a minimum, clinicians would treat patients with omalizumab for several months before determining response or nonresponse, and this cost could produce less favorable cost-effectiveness results.

Ann C. Wu, MD<sup>a</sup>  
A. David Paltiel, PhD<sup>b</sup>  
Karen M. Kuntz, ScD<sup>c</sup>  
Scott T. Weiss, MD, MS<sup>d</sup>  
Anne L. Fuhlbrigge, MD<sup>d</sup>

From <sup>a</sup>the Department of Ambulatory Care and Prevention, Harvard Medical School, and Children's Hospital, Boston; <sup>b</sup>the Department of Epidemiology and Public Health, Yale School of Medicine, New Haven, Conn; <sup>c</sup>the Department of Health Policy and Management, Harvard School of Public Health, Boston, Mass; and <sup>d</sup>the Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Mass. E-mail: [ann.wu@childrens.harvard.edu](mailto:ann.wu@childrens.harvard.edu). Supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute through grant R01 HL68201-01A1.

Disclosure of potential conflict of interest: A. D. Paltiel has received research support from the National Institutes of Health. S. T. Weiss has received research support from the National Institutes of Health and Genentech. A. L. Fuhlbrigge is on the speakers' bureau for GlaxoSmithKline and Merck, designed and analyzed studies for Novartis, was a member of Sepracor's Data Safety Monitoring Board, and has received research support from Boehringer Ingelheim, GlaxoSmithKline, and Merck. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Revicki D, Brown R, Dale P. Questioning the economic evaluation of omalizumab. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1514.
2. Niebauer K, Dewilde S, Fox-Rushby J, Revicki DA. Impact of omalizumab on quality-of-life outcomes in patients with moderate-to-severe allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:316-26.
3. Rutten-van Molken MP, Custers F, van Doorslaer EK, Jansen CC, Heurman L, Maesen FP, et al. Comparison of performance of four instruments in evaluating the effects of salmeterol on asthma quality of life. *Eur Respir J* 1995;8:888-98.
4. Kitch BT, Paltiel AD, Kuntz KM, Dockery DW, Schouten JP, Weiss ST, et al. A single measure of FEV<sub>1</sub> is associated with risk of asthma attacks in long-term follow-up. *Chest* 2004;126:1875-82.
5. Fuhlbrigge AL, Weiss ST, Kuntz KM, Paltiel AD. Forced expiratory volume in 1 second percentage improves the classification of severity among children with asthma. *Pediatrics* 2006;118:e347-55.
6. Fuhlbrigge AL, Bae SJ, Weiss ST, Kuntz KM, Paltiel AD. Cost-effectiveness of inhaled steroids in asthma: impact of effect on bone mineral density. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:359-66.
7. Paltiel AD, Fuhlbrigge AL, Kitch BT, Liljas B, Weiss ST, Neumann PJ, et al. Cost-effectiveness of inhaled corticosteroids in adults with mild-to-moderate asthma: results from the asthma policy model. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:39-46.
8. Moy ML, Fuhlbrigge AL, Blumenschein K, Chapman RH, Zillich AJ, Kuntz KM, et al. Association between preference-based health-related quality of life and asthma severity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;92:329-34.
9. Kuntz KM, Kitch BT, Fuhlbrigge AL, Paltiel AD, Weiss ST. A novel approach to defining the relationship between lung function and symptom status in asthma. *J Clin Epidemiol* 2002;55:11-8.
10. Brown R, Turk F, Dale P, Bousquet J. Cost-effectiveness of omalizumab in patients with severe persistent allergic asthma. *Allergy* 2007;62:149-53.

Available online April 14, 2008.  
doi:10.1016/j.jaci.2008.01.073

## Anti-CD20 (rituximab) treatment for atopic eczema

### To the Editor:

We read with interest the study by Simon et al<sup>1</sup> published in the latest issue of the *Journal of Allergy and Clinical Immunology* reporting, for the first time, the use of anti-CD20 treatment in the management of atopic eczema.

Making similar assumptions and inspired by a series of articles demonstrating the effect of anti-CD20 treatment in autoimmune diseases,<sup>2-4</sup> we initiated rituximab treatment in 2 patients with severe atopic dermatitis. We were particularly impressed by the effect of rituximab on the level of IgE in a trial of anti-CD20 treatment in systemic lupus erythematosus.<sup>5</sup> As Simon et al, we assumed that anti-CD20 treatment might target complex immunopathologic reaction, resulting in chronic atopic eczema. B cells in this case are a logical therapeutic target, not only as antibody-producing cells but also as antigen-presenting cells for relevant allergens.<sup>6,7</sup>

In the beginning of 2007, we recruited 2 patients with severe form of atopic dermatitis. Both patients were followed for years

**TABLE I.** Patients' characteristics and laboratory data

	Patient 1					Patient 2				
	Before therapy		After therapy			Before therapy		After therapy		
Time (wk)	0	2	6	10	22	0	2	6	10	22
SCORAD score	99	89		58		63	55		74	
Extent	98	81		70		41	41		24	
Intensity	17	15		10		11	11		14	
Subjective symptoms	20	20		9		16	8		20	
WBC ( $\times 10^9/L$ )	12.9	22.5	11.2	14.4	12.9	4.1	6.9	6.4	10.1	6.5
Eosinophils ( $\times 10^9/L$ )	1.61	1.08	1.13	1.28	0.83	0.46	0.64	0.54	0.10	0.67
Total serum IgE level (IU/mL)	30,956	33,642	40,900	52,371	21,523	11,718	11,679	13,132	12,211	7,731
CD4 <sup>+</sup> T <sub>H</sub> 2 lymphocytes (cells/ $\mu$ L)	19.07	18.49	2.6	10.7		3.86	2.28	6.76	0.44	
Plasma cells (cells/ $\mu$ L)	5.17	6.83	2.78	4.40		5.00	0.15	0.04	0.02	

CD<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2 lymphocytes are immunophenotyped as CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup> cells and plasmatic cells as CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> cells.

and were unsuccessfully treated with all available therapeutic options. At the time of inclusion to the study, their treatment was limited to the local care and antihistaminic agents. They had normal blood counts with the exception of increased eosinophils and typical laboratory markers associated with atopic eczema (Table I, time 0). Rituximab was administered twice in a 2-week interval at the recommended dose of 500 mg intravenously. One patient experienced an immediate reaction after injection, with temporary malaise and chills of short duration. There were no other adverse effects observed.

Clinical and laboratory data are shown in Table I. Despite temporary improvement demonstrated by the decrease of SCORAD scores (Table I), we did not observe significant improvement, as demonstrated in the study by Simon et al.<sup>1</sup> Furthermore, partial improvement only lasted until the tenth week after the initiation of the study, and subsequent deterioration of the clinical status led to the introduction of immunosuppressive regimens in both patients.

Concerning laboratory data, improved clinical status was reflected by lower eosinophil counts (Table I) that again increased in the 22nd week of the study. As expected, circulating B cells were not detectable after administration of rituximab. We detected a significant decrease of absolute plasma cell numbers (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) in one of the patients. We could not confirm significant changes in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, as described by Simon et al.,<sup>1</sup> but we detected a significant decrease of CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2 lymphocytes in both patients (from 19 to 11 cells/ $\mu$ L and from 4 to 0.5 cells/ $\mu$ L, respectively; Table I). IgE levels were always in the high range, and we did not observe any changes in specific IgE levels. We also measured the numbers of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood, without any significant changes during the observation period (data not shown).

In conclusion, in 2 patients with severe atopic eczema, we could not confirm substantial long-term improvement, as demonstrated in the study by Simon et al.<sup>1</sup> The most probable explanation for this discrepancy is the severity of the disease in our patients, who presented with the most challenging and most severe form of atopic dermatitis, as documented by SCORAD score and by the resistance to standard treatment modalities. A lower dose of rituximab, which was sufficient for elimination of circulating B cells but not sufficient for clinical effect, also remains one of the possible causes of different clinical outcome.

We thank our patients, Ales Janda, MD, for B-cell analysis, and Roche s.r.o., Czech Republic, for providing rituximab.

Anna Šedivá, MD, PhD<sup>a</sup>  
Jana Kayserová, MD<sup>a</sup>  
Eva Vermerová, MD<sup>a</sup>  
Andrea Poloučková, MD<sup>a</sup>  
Štěpánka Čapková, MD<sup>b</sup>  
Radek Špišek, MD, PhD<sup>a</sup>  
Jiřina Bartůňková, MD, PhD<sup>a</sup>

From the Departments of <sup>a</sup>Immunology and <sup>b</sup>Dermatovenerology, Second Medical Faculty and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. E-mail: [anna.sediva@lfmotol.cuni.cz](mailto:anna.sediva@lfmotol.cuni.cz).

Supported by Research Project VZ 00064203, Ministry of Health, Czech Republic.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Simon D, Hösl S, Kostylina G, Yawalkar N, Simon HU. Anti-CD20 (rituximab) treatment improves atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:122-8.
- Vigna-Perez M, Hernandez-Castro B, Paredes-Saharopoulos O, Portales-Perez D, Baranda L, Abud-Mendoza C, et al. Clinical and immunological effects of rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R83.
- De Vita S, Quartuccio L. Treatment of rheumatoid arthritis with rituximab: an update and possible indications. *Autoimmun Rev* 2006;5:443-8.
- Morrison LH. Therapy of refractory pemphigus vulgaris with monoclonal anti-CD20 antibody (rituximab). *J Am Acad Dermatol* 2004;51:817-9.
- Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, Risselada A, Klareskog L, van Vollenhoven R, et al. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clin Immunol* 2007;122:62-74.
- Silverman GJ, Carson DA. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003;5(suppl 4):S1-6.
- Admyre C, Bohle B, Johansson SM, Focke-Tejkl M, Valenta R, Scheynius A, et al. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1418-24.

Available online April 14, 2008.  
doi:10.1016/j.jaci.2008.03.007

## Reply

To the Editor:

We appreciate the comments of Šedivá et al<sup>1</sup> regarding our investigator-driven study on anti-CD20 (rituximab) treatment for atopic eczema (AE).<sup>2</sup> The authors confirm our observation that rituximab has a positive clinical effect in patients with severe AE. However, in the 2 patients they have treated with rituximab, the clinical condition appeared to improve less compared with that seen in our patients, and the positive effect was time limited. We agree with Šedivá et al<sup>1</sup> that the most likely reasons for the

## 8.5 **Zvýšené zastoupení BDCA-3+ dendritických buněk v bronchoalveolární laváži u pacientů s bronchiálním astmatem**

Dendritické buňky v dýchacích cestách hrají důležitou roli v patogenezi astmatu. Na slizničních površích se setkávají se zevními antigeny, alergeny a následně iniciují imunitní odpověď. Studium DC přímo v plicní tkáni nebo ve sliznici dýchacích cest u lidí je poměrně nedostupné. Nicméně DC získané pomocí bronchoalveolární laváže mohou poskytnout poměrně dostupný zdroj DC z dýchacích cest.

V naší studii jsme zaměřili na stanovení subtypů DC v BAL-u a periferní krvi u pacientů s astmatem bronchiale a u zdravých kontrol. Dále jsme se zaměřili i na expresi C-tytu lektinů a TLR na povrchu DC.

Pomocí mnohobarevné cytometrie jsme zavedli metodiku pro detekci jednotlivých subtypů DC v periferní krvi a BAL. V periferní krvi i BAL-u jsme detekovali 4 subpopulace mDC (CD16+ nebo CD16- a BDCA-1+ nebo BDCA-3+) a subpopulaci pDC.

U obou sledovaných skupin jsme našli stejné rozložení subpopulace v periferní krvi: nejvíce zastoupenou subpopulace byly CD16+BDCA-1+, následovaly CD16+BDCA-3+ a CD16-BDCA-3+ (mDC2), nejméně početnou populací byly CD16-BDCA-1+ (mDC1). Distribuce mDC se ale výrazně lišila v BAL-u. U zdravých kontrol bylo rozložení podobné jako v periferní krvi, ale u pacientů s astmatem dominovaly subpopulace CD16-BDCA-3+ (mDC2) a CD16+BDCA-3+. Zároveň i exprese BDCA-3 na DC v BAL-u byla u astmatiků signifikantně vyšší než v periferní krvi.

Mnohé studie prokazují, že dendritické buňky jsou schopné rozeznávat alergeny pomocí povrchových receptorů typu C-lektinů. Proto jsme sledovali i expresi vybraných C-lektinů na povrchu DC v BAL-u i periferní krvi: DC-SIGN, DEC205 a manozový receptor – MR. U pacientů s astmatem jsme našli signifikantně vyšší zastoupení MR+ na mDC i expresi receptoru MR na povrchu DC.

V naší práci jsme prokázali výrazné zastoupení BDCA-3+ DC v BAL-u u pacientů s astmatem. Některé studie před námi již ukázaly zvýšené zastoupení mDC v periferní krvi atopiků. V BAL-u to prozatím studováno nebylo. Funkčně se lidské mDC2 podobají myším CD8 $\alpha$ + dendritickým buňkám, které jsou schopny polarizovat imunitní odpověď Th2 směrem. Naše výsledky exprese MR jsou také v souladu s předchozími studiemi, které prokázaly důležitost C-lektinů (hlavně MR a DC-SIG) v rozeznávání alergenů a indukci Th2- imunitní odpovědi.

# Selective Increase in Blood Dendritic Cell Antigen-3-Positive Dendritic Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Allergic Patients

J. Kayserova\*<sup>1</sup>, I. Zentsova-Jaresova\*<sup>1</sup>, V. Budinsky\*, D. Rozkova\*, J. Kopecka\*<sup>†</sup>, E. Vernerova\*, P. Pohunek<sup>‡</sup>, V. Skalicka<sup>‡</sup>, R. Spisek\* & A. Sediva\*

\*Department of Immunology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; <sup>†</sup>Life Technologies Czech Republic, Prague, Czech Republic; and <sup>‡</sup>Department of Paediatrics, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Received 12 July 2011; Accepted in revised form 7 October 2011

Correspondence to: A. Sediva, Second Medical Faculty, Charles University of Prague, University Hospital Motol, V úvalu 84, 150 09 Prague, Czech Republic. E-mail: anna.sediva@fnmotol.cz

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

## Abstract

Dendritic cells (DCs) are specific antigen-presenting cells that play critical roles in the initiation and polarization of immune responses. DCs residing in the lungs might be detected in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). We analysed DC compartment in the peripheral blood and BALF of patients with allergy and in controls. Plasmacytoid and four distinct subsets of myeloid DCs [characterized by the expression of blood dendritic cell antigen (BDCA)-1<sup>+</sup> and -3<sup>+</sup> and CD16 positivity or negativity] were detected in both tested compartments. We further evaluated the expression of C-type lectins [mannose receptor (MR), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) and dendritic and epithelial cells (DEC)-205] relevant to the pathogenesis of asthma. Interestingly, we found a selective increase in the frequency of myeloid DC-expressing BDCA-3 and MR particularly in BALF from allergic patients. Specific and highly statistically significant increase in BDCA-3<sup>+</sup> and/or MR<sup>+</sup> DCs brings a novel characteristic to BAL analysis in allergic patients.

## Introduction

Dendritic cells (DCs) are bone marrow-derived specific antigen-presenting cells that have critical role in the initiation and polarization of effector immune responses [1–3]. DCs reside specifically in the mucosal compartments at the interface between the environment and the organism, compartments where they constitutively sample antigens [4]. Depending on the nature of the antigenic content, DCs orchestrate the immune response, maintaining tolerance to self and harmless antigens and eliciting adequate immune response against pathogen and/or danger signals. Initiation of an adaptive immune response represents the hallmark of DC function. To fulfil their destiny, DCs constantly migrate between body compartments, particularly between mucosal surfaces and regional lymph nodes [5]. DCs are, therefore, detectable both in peripheral blood, representing the systemic response of organism, and in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), representing a mucosal surface sample. In both of these compartments, DCs form a small, but

well-defined population, representing approximately 0.5% of leucocytes (CD45<sup>+</sup>) [6]. The lung is the largest epithelial surface in the body and is exposed to an enormous challenge of microbes and other environmental antigens [7]. Owing to the obvious importance of lung DCs, there have been several attempts to characterize DC subsets in the lungs [7–10]. Recent work by Ten Berge [9] improved the methodology for working with the BALF DCs isolated from patients' samples. There are, however, still only a few reports on lung DCs, particularly from human studies [11]. There is also not a consensus on the subsets of DCs that reside in the lungs [9, 12, 13], especially in pathology.

Therefore, we initiated the study on lung DCs in respiratory allergy. We present the development of a feasible flow cytometry-based method for the parallel investigation of DC subsets in the peripheral blood and BALF of asthma patients. In the peripheral blood as well as in the BALF, plasmacytoid DCs (pDCs) and myeloid DCs (CD16<sup>-</sup> mDCs) do not account for the total DC population. Another subpopulation of CD16<sup>+</sup> mDCs was

**Table 1** Characteristics of patients and control group.

Number (n)	Total number	Children Male/female	Adults Male/female
<b>Blood</b>			
Asthma/allergic rhinitis	11	1/1	2/7
Healthy donors	10	0/1	3/6
<b>Bronchoalveolar lavage (BAL)</b>			
Asthma	7	3/4	0
Controls	4	1/3	0

Dendritic cell subsets were investigated in peripheral blood in allergic patients with bronchial asthma or allergic rhinitis ( $n = 11$ ) and healthy controls ( $n = 10$ ). BAL was acquired from seven asthmatic children. Because of the limited diagnostic reasons for bronchoscopy in childhood, we chose four controls for BAL analysis with non-atopic diagnosis.

already described in peripheral blood [8, 14, 15]. In addition to measuring the individual subsets of DCs, we also analysed the expression of lectins dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), dendritic and epithelial cells (DEC)-205 and mannose receptor (MR). These molecules with pattern recognition receptor (PRR) function have crucial roles in respiratory tract diseases [10, 13, 16].

## Patients and methods

**Patients.** We analysed DC subsets in peripheral blood and BALF in allergic patients and healthy controls, and characteristics of the groups are shown in Table 1.

**Peripheral blood samples:** Peripheral venous blood was collected from 11 patients with asthma and/or allergic rhinitis (pollinosis) and 10 healthy donors into EDTA tubes. Total serum IgE and specific IgE antibodies (against inhaled allergens – birch, grass and tree pollen) were elevated in all allergic patients (Table 2). All healthy controls had a total serum IgE in normal range and did not have any allergic history.

**Bronchoalveolar lavage fluid samples:** BALF was obtained during fibre-optic bronchoscopy from seven patients with asthma. Four children with non-allergic diseases (interstitial lung fibrosis, Kartagener's syndrome, lung vasculitis and atelectasis of right middle lobe) served as a control group.

Informed consent was obtained from all patients and controls prior to blood collection and bronchoscopy.

**Bronchoalveolar lavage fluid.** BALF was performed using a flexible fibre-optic bronchoscope (Olympus, Hamburg, Germany) placed in the right middle lobe. BAL fluid was collected in siliconized tubes to prevent cell adherence and was kept at 4 °C. BAL fluid was filtered through sterile gauze and centrifuged for 5 min at 266 *g* at 4 °C. The supernatant was removed, and the cells were subsequently resuspended in 300  $\mu$ l phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1% foetal bovine serum at 4 °C and stained with monoclonal antibodies.

**Staining of dendritic cells.** One hundred microlitres of whole peripheral blood and 100  $\mu$ l of BALF cell suspension were stained with monoclonal antibodies for 30 min at 4 °C. Subsequently, red blood cells were lysed, cells washed in 3 ml PBS with 2 mmol EDTA, and analysed. We set up an eight-colour flow cytometry panel for simultaneous detection of all DC subsets in one sample tube [17]. We used following monoclonal antibodies: CD3-FITC, CD19-FITC, CD20-FITC, CD56-FITC, CD14-Dyomics590, CD16-Alexa700 (all from Exbio, Prague, Czech Republic), CD45-Pacific Blue (Dako, Glostrup, Denmark), human leucocyte antigen (HLA)-DR-PerCP [Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Germany], CD123-PECy7 (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD11c-APC (Invitrogen, Paisley, UK), blood dendritic cell antigen (BDCA)-1-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), BDCA-3-PE (Miltenyi Biotec), BDCA-1-APC (Miltenyi Biotec), BDCA-3-APC (Miltenyi Biotec), MR-PE (BD), DC-SIGN-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and DEC-205-PE (BD). All antibodies were titrated to determine the optimal concentrations. A lineage cocktail (CD3, CD19, CD20 and CD56) was used to exclude other leucocytes subpopulations (T and B lymphocytes, NK cells). Antibody-capture beads (BD) were used for single-colour compensation controls for each reagent used in this study. Gating controls were determined using fluorescence minus one (FMO) controls for CD14, CD16 and lectins.

At least 300 000 events were acquired on FACSaria™ (BD) and subsequently analysed using FLOWJO software (Treestar, Ashland, OR, USA). All samples were processed and analysed immediately after blood sampling.

**Statistics.** The Mann–Whitney test was used for statistical analysis, and  $P < 0.05$  was considered to be significant. Data are expressed as median with range.

**Table 2** Laboratory markers in allergic patients and healthy controls measured in peripheral blood and bronchoalveolar fluid.

	Peripheral blood		Bronchoalveolar lavage			
	IgE total	C-reactive protein	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils	Eosinophils
	Range (UI/ml)	Range(mg/l)	Range (%)	Range (%)	Range (%)	Range (%)
Allergic patients	30.6–491	<8.0	14.4–97.6	0.4–58	0.2–84.4	0.4–0.8
Controls	0–10.1	<8.0	19.4–73.6	4.4–80	0.3–17.2	0

## Results

### Identification of DC subsets in the peripheral blood and BALF by eight-colour flow cytometry

The plasmacytoid DCs (pDCs) were characterized as CD45<sup>+</sup>, lineage-negative (CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>), CD14<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> and CD123<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>. mDCs were characterized as CD45<sup>+</sup>, lineage-negative (CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>), CD14<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>. These cells were then divided into CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> subgroups. In both subgroups, the expression of lectins (BDCA-1, BDCA-3, MR, DC-SIGN and DEC-205) was analysed.

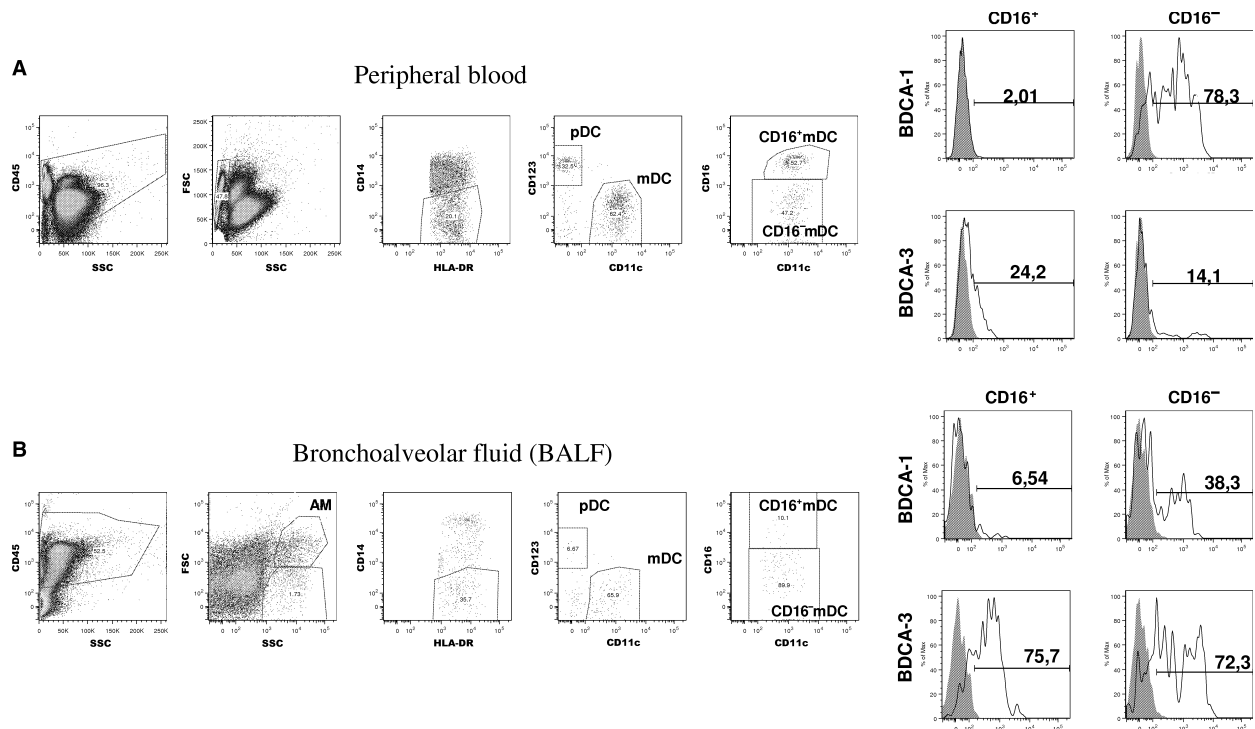
First, we identified 'classical' myeloid DCs (CD16<sup>-</sup> mDC) and pDCs in the peripheral blood and in the bronchoalveolar lavage using flow cytometry. Gating strategy is shown on a representative flow cytometry analysis [18, 19] (Fig. 1). Allergic patients had significantly lower frequency of pDCs in the BALF when compared to the blood. On the other hand, we found

a significant increase in CD16<sup>-</sup> mDCs in the BALF of allergic patients compared to the blood ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2A, B).

We detected CD16<sup>+</sup> mDCs in samples from both PB and BALF in patients and controls (Fig. 1). We did not find any significant differences in CD16<sup>+</sup> mDCs between patients and controls, or between blood and BALF, but the relative number of CD16<sup>+</sup> mDCs seemed to be decreased in the BALF compared to the peripheral blood in both groups (Fig. 2C). CD16<sup>+</sup> mDCs are more frequent than CD16<sup>-</sup> mDCs in the peripheral blood from patients and controls.

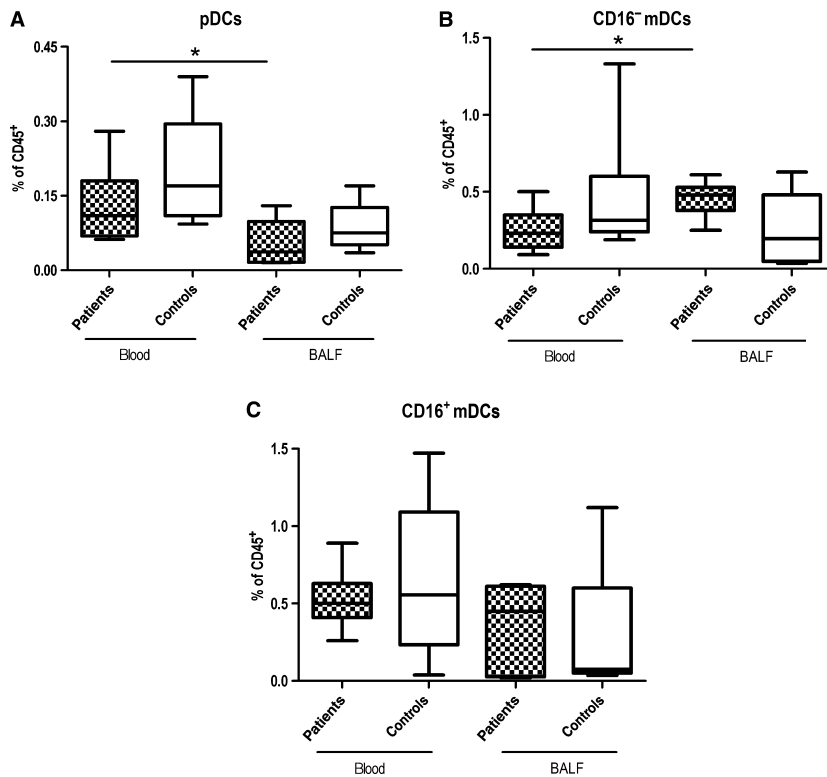
### Differential expression of BDCA-1 and BDCA-3 in allergic patients in BALF

Myeloid DCs can be further subclassified according to the expression of BDCA-1 and BDCA-3. In humans, CD16<sup>-</sup>BDCA-1<sup>+</sup> cells are termed mDC1 and CD16<sup>-</sup>BDCA-3<sup>+</sup> represents mDC2 [4, 20]. We analysed the expression of BDCA molecules on both CD16<sup>-</sup> and



**Figure 1** Flow cytometry analysis of dendritic cell (DC) population from whole blood and bronchoalveolar lavage. First, white blood cells were gated based on side scatter (SSC) and CD45 expression, and this was followed by exclusion of T and B lymphocytes, NK cells and granulocytes (CD3, CD19, CD20, CD56 negative) and the inclusion of human leucocyte antigen-DR<sup>+</sup> cells. In case of peripheral blood, lympho-monocytes were gated based on forward scatter and SSC. In case of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples, the alveolar macrophages (AM) and CD14<sup>+</sup> monocytes were excluded. Plasmacytoid DCs (pDCs) and myeloid DCs (mDCs) were distinguished based on the expression of CD123 and CD11c, respectively. Subsequently, gating of mDCs (CD11c<sup>+</sup> cells) was based on the expression of CD16. mDCs were divided into 'classical' mDC (CD16<sup>-</sup>) and CD16<sup>+</sup> mDCs. Both groups were investigated for the expression of C-type lectins [blood dendritic cell antigen (BDCA)-1, BDCA-3] using histograms. Grey histograms indicate the unstained controls, and white histograms indicate the expression of BDCA-1 or BDCA-3. The results presented here are from one allergic patient and are representative of 20 blood and 10 BALF samples.





**Figure 2** Dendritic cell (DC) subsets in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF). DCs form a small, but well-defined population, representing approximately 0.5% of total leucocytes (CD45<sup>+</sup>) in both the peripheral blood and BALF. The frequency of plasmacytoid DCs (pDCs) (A), 'classical myeloid DCs (mDCs)' CD16<sup>-</sup>mDCs (B) and CD16<sup>+</sup>mDCs (C) was investigated. Significant differences between blood and BALF are indicated by horizontal bars: \* $P < 0.05$ .

CD16<sup>+</sup> compartments. Four separate populations of mDCs can thus be identified: CD16<sup>-</sup>BDCA-1<sup>+</sup> (mDC1), CD16<sup>-</sup>BDCA-3<sup>+</sup> (mDC2), CD16<sup>+</sup>BDCA-1<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup>BDCA-3<sup>+</sup>. All of the DC subsets in patients and controls were present in the blood and BALF. There were no significant differences in the distribution of DC subsets between allergic patients and controls in the peripheral blood. The most prevalent population of DCs in the blood in both groups was CD16<sup>-</sup>BDCA-1<sup>+</sup> followed by both BDCA-3<sup>+</sup> subsets (CD16<sup>+</sup>BDCA-3<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup>BDCA-3<sup>+</sup>) and finally the CD16<sup>+</sup>BDCA-1<sup>+</sup> (Fig. 3A). The distribution of myeloid DC subsets in the BALF from healthy controls resembled their frequency in the peripheral blood, with CD16<sup>-</sup>BDCA-1<sup>+</sup> DCs being the most frequent subset (Fig. 3B). However, there was a striking difference in the proportion of BDCA-3-expressing mDCs in the BALF from allergic patients. While CD16<sup>-</sup>BDCA-3<sup>+</sup> DCs only represented  $0.035 \pm 0.024\%$  (mean  $\pm$  SD) of CD45<sup>+</sup> cells in the peripheral blood, they accounted for  $0.271 \pm 0.076\%$  of CD45<sup>+</sup> leucocytes in the BALF ( $P < 0.001$ ) and represented the most dominant DC population together with CD16<sup>-</sup>BDCA-1<sup>+</sup>. Similarly, the frequency of CD16<sup>+</sup>BDCA-3<sup>+</sup> DCs was four times higher in allergic patients  $0.06 \pm 0.052\%$  to  $0.244 \pm 0.23\%$  ( $P = 0.07$ ) (Fig. 4A). Moreover, the expression of BDCA-3<sup>+</sup> on DCs in the BALF of allergic patients was significantly higher than on BDCA-3<sup>+</sup> DCs in the peripheral blood ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4B).

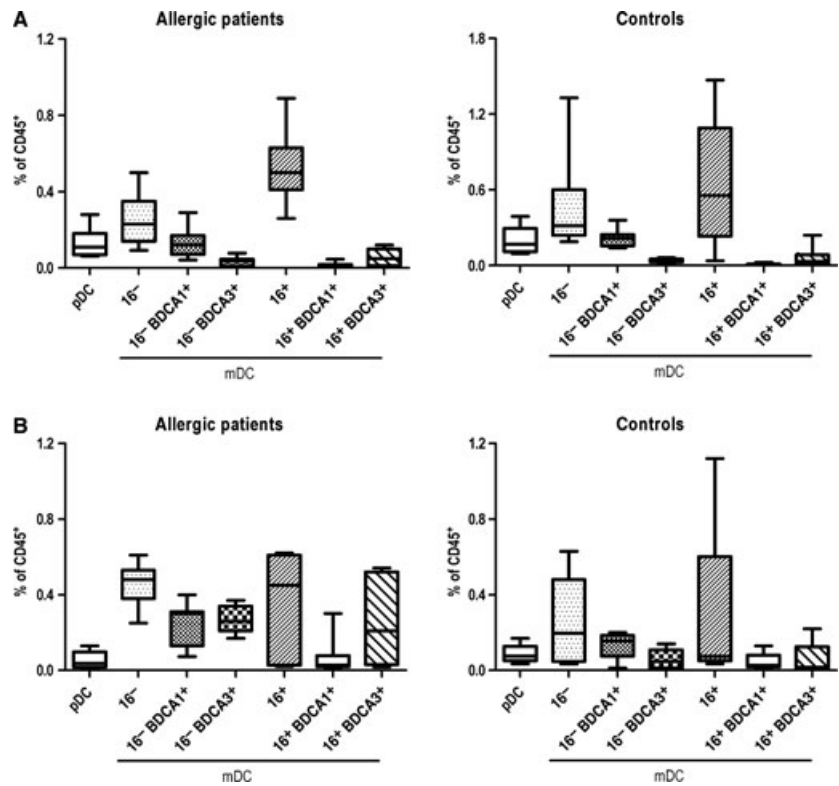
In the BALF from asthma patients, BDCA-3<sup>+</sup> DCs, both CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup>, formed strikingly dominant population significantly increased in comparison with controls.

#### Different expression of lectins on the surface of DCs in peripheral blood and BALF

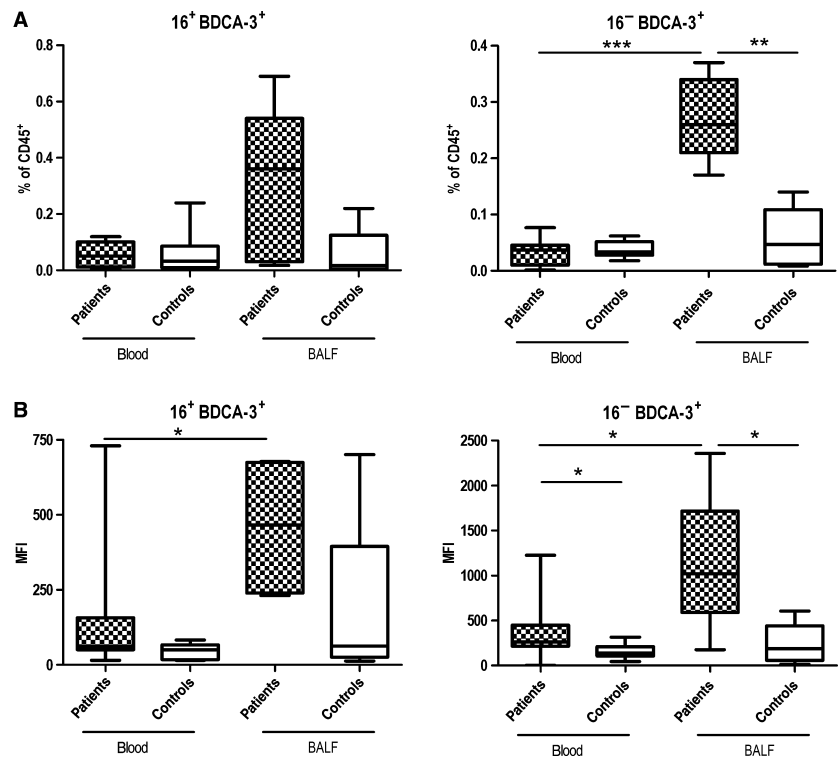
In addition to the DC-specific lectins BDCA-1 and BDCA-3, we also analysed the expression of other lectin molecules implicated in the binding of an allergen to DCs. DC-SIGN, DEC-205 and MR were all found on the CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> DC subsets in the blood and mainly in the BALF (Fig. 5A). Similar to BDCA-3, there was a dramatic increase in MR<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> mDCs in the BALF compared to the peripheral blood in both groups ( $P < 0.01$  and  $P < 0.01$ , respectively). Moreover, the MR expression on CD16<sup>-</sup> mDC was significantly increased in the BALF of allergic patients compared to healthy controls ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5B). Similar results were found for DC-SIGN and DEC 205 (Fig. 5A).

#### Discussion

Dendritic cells play the central role in the development of immune reaction. Their unique capacity to translate the activation of the innate immune system to the adaptive immune response puts DCs in a crucial position



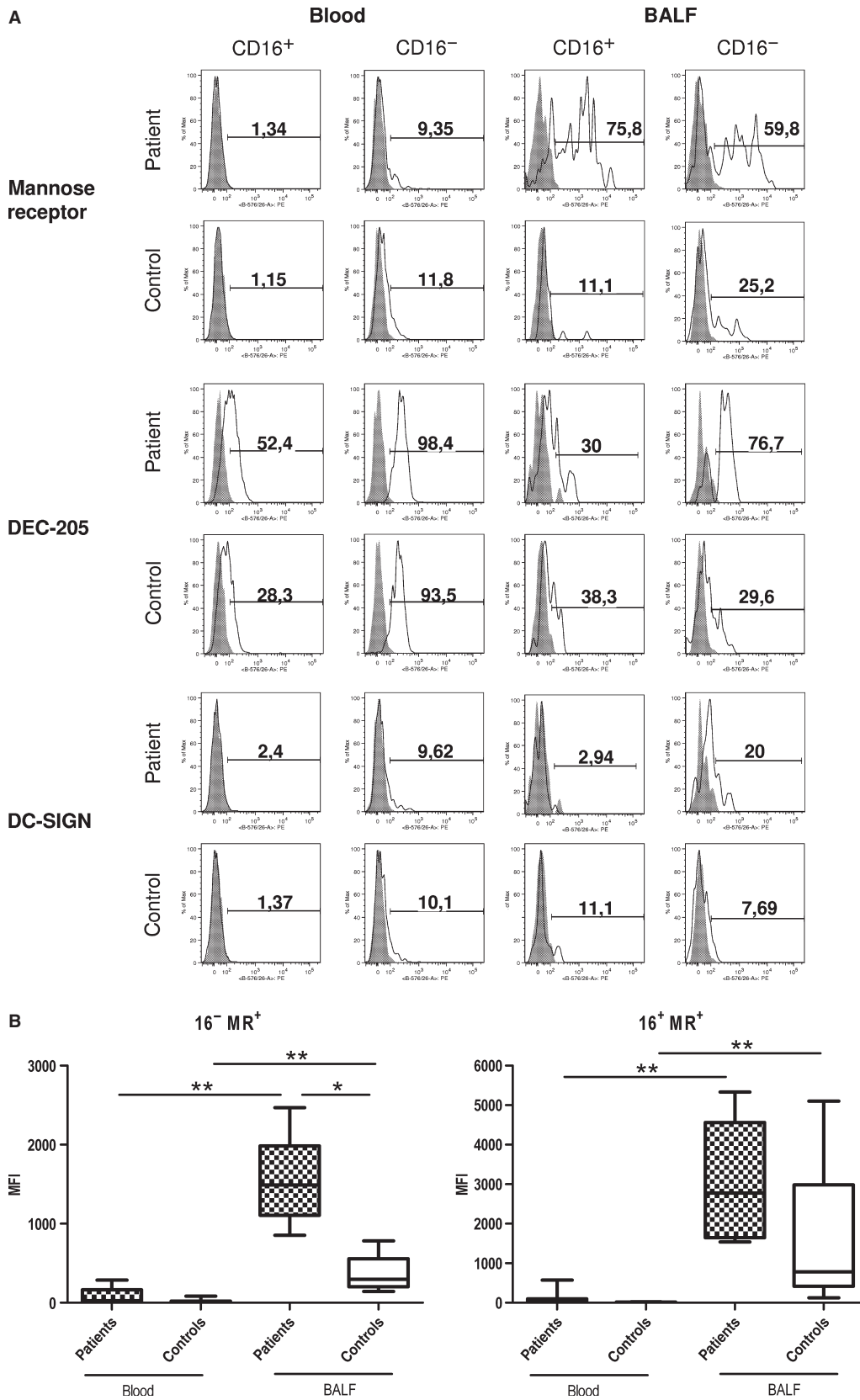
**Figure 3** Distribution of dendritic cell (DC) subpopulations in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage. Plasmacytoid DCs (pDCs) and four populations of myeloid DCs (mDCs), based on the previously described characteristics of these cells [CD45<sup>+</sup>, human leucocyte antigen (HLA)-DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>], blood dendritic cell antigen (BDCA)-1 or BDCA-3 expression and presence of CD16, are shown in the peripheral blood (A) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (B).



**Figure 4** Relative numbers (percentage of CD45<sup>+</sup>) of CD16<sup>+</sup> blood dendritic cell antigen (BDCA)-3<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup>BDCA-3<sup>+</sup> myeloid DCs (mDCs) in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The frequency (A) and surface expression (B) of BDCA-3<sup>+</sup> mDCs (CD16<sup>+</sup> mDCs and CD16<sup>-</sup> mDCs) were analysed in samples from both the peripheral blood and lungs. Significant differences between blood and BALF or between groups are indicated by horizontal bars: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

in an immune network [1, 2]. This network is of particular importance on mucosal and epithelial surfaces, specifically in the lungs. Lung DCs continuously sample and

present inhaled antigens and induce tolerance to harmless substances and adequate immune response to pathogens and other antigens [10]. DCs residing in the lungs con-



sist of several subsets with specific functions as recently reviewed [12, 21]. There is, however, still no consensus on the lung DC spectrum. The situation is particularly difficult in inflammatory conditions in which the cellularity of the lung tissue and surfaces undergoes striking changes. Here, we present a feasible flow cytometry-based method for DC identification in the BALF.

There is a general consensus that two major subsets of DCs, myeloid (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs), reside in the lungs (for detailed review see Ref. [7]). While pDCs represent a well-characterized subset, mDCs consist of a heterogeneous population. BDCA-1 and BDCA-3 are considered as specific markers of mDC subsets and were found in samples from both the peripheral blood and lungs [4, 8]. We developed an eight-colour flow cytometry method to distinguish pDCs and mDCs, defined as lineage-negative, CD45<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup> and BDCA1<sup>+</sup> or BDCA3<sup>+</sup>. However, applying these criteria did not cover the total DC lung population (Fig. 1). Another subpopulation of mDCs, CD16-positive, is clearly present in samples from both the peripheral blood and BALF. In agreement with Piccioli *et al.* [22], we analysed pDCs and all four subpopulations of mDCs, based on BDCA-1 or BDCA-3 expression and CD16 positivity. All investigated DC populations were present both in the peripheral blood and in the BALF.

Concerning pDCs, we observed their lower numbers in allergic lungs. Such finding is consistent with described role of pDCs in the maintenance of tolerance to antigens in lungs [23]. The population of mDCs showed more pronounced differences between allergic and control subjects. BDCA-1- and BDCA-3-expressing mDCs dominate the DC subpopulations in allergic patients (Fig. 4). Both CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> BDCA-3<sup>+</sup> mDCs are strikingly increased in the BALF of patients with allergy. The presence of BDCA-3<sup>+</sup> cells has been previously demonstrated in lung tissue [4], but the predominance of this subset in the BALF of allergic patients was not yet shown and is of particular interest.

The BDCA-3 molecule is identical to thrombomodulin. In a recent study, thrombomodulin (BDCA-3, CD141) was identified by allergen-induced gene expression microarray performed on DCs as a gene that was differentially induced in allergen-stimulated DCs from atopic individuals [24]. Furthermore, sorted BDCA-3<sup>+</sup> DCs induced a Th2-polarized response, suggesting that BDCA-3<sup>+</sup> expression on DCs may have a significant role

in allergic diseases. BDCA-3<sup>+</sup> DCs, in some reports also referred to as mDC2s, were showed to be more prevalent in the peripheral blood in atopic individuals (Fig. 2B) [24, 25]. The presence of this population in the BALF has not yet been tested. In this context, our results support the importance of BDCA-3<sup>+</sup> DC subset in the immune reactions in asthmatic lungs.

Human BDCA-3<sup>+</sup> DCs have also been suggested to be homologous to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs [26]. In mouse models, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T cells are involved in allergic airway inflammation and induce the production of Th2 cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13 [27]. These reports further indicate the potential significance of BDCA-3<sup>+</sup> DC subset in the BALF of asthmatic patients.

In addition to DC-specific lectins BDCA-1 and BDCA-3, we also analysed other lectin molecules on blood and lung DCs. Immature DCs express a plethora of specialized cell receptors for patterns associated with foreign antigens, such as the C-type lectin carbohydrate receptors (DC-SIGN, macrophage MR and DEC-205) [21, 28–30]. Their role in allergen uptake in DCs has already been described [31–33] and very recently confirmed for a larger set of allergens [34].

We describe here a significant increase in the expression of both MR and DC-SIGN in classical, CD16<sup>-</sup> mDCs in BALF of allergic patients, confirming thus the importance of DCs in antigen/allergen processing on a border with external environment. Lung DCs are in an immature state *in situ* and express the MR [28]. The MR expression on DCs is crucial for the Th2 polarization of an immune response [34], and DC-SIGN expression on DC surface is also important in DCs–T cells interaction [29]. These previous studies clearly demonstrate the importance of the expression of lectins on DCs in allergy; however, its presence and/or significance on DCs in the BALF of allergic patients have not yet been profoundly investigated. Our findings thus complement recently published data. Concerning other lectins, DEC-205, with repeatedly described role in antigen uptake [35], was also increased in blood CD16<sup>+</sup> mDCs and BALF CD16<sup>-</sup> mDCs from allergic patients. Such finding might suggest a systemic nature of allergic response, with distinct roles for different subsets of DCs in different compartments.

In summary, we present a flow cytometry-based approach for the detection of DC subsets in the BALF. There was a striking difference in the proportion of BDCA-3-expressing mDCs in the BALF of allergic

**Figure 5** Surface expression of C-type lectins on CD16<sup>+</sup> myeloid DCs (mDCs) and CD16<sup>-</sup> mDCs in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Here, we show a detailed analysis of C-type lectin receptor expression on dendritic cell (DC) subsets in the peripheral blood and BALF using histograms (A). The grey histograms indicate unstained controls, and the white histograms indicate the expression of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), dendritic and epithelial cells (DEC)-205 and mannose receptor (MR). The frequency of MR-positive mDCs (CD16<sup>+</sup> mDCs and CD16<sup>-</sup> mDCs) and the expression of MR on mDCs (B) were investigated in the peripheral blood and BALF. Significant differences between the blood and BALF or between groups are indicated by horizontal bars: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. The results presented here are from one allergic patient and are representative of 20 blood and 10 BALF samples.

patients. The proportion of CD16<sup>-</sup>BDCA-3<sup>+</sup> DCs in the BALF of allergic patients was tenfold higher than in the peripheral blood. Similarly, the frequency of CD16<sup>+</sup>BDCA-3<sup>+</sup> DCs was four times higher in patients (Fig. 4A). Similar to the BDCA-3 molecule, there was a dramatic increase in MR<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup>mDCs in the BALF of allergic patients compared to the peripheral blood and the expression of MR on 16<sup>-</sup> mDCs in the BALF was significantly increased compared to the healthy controls (Fig. 5B). Similar results were found for other two C-type lectins. Specific increase in BDCA-3<sup>+</sup> and/or MR<sup>+</sup> DCs in allergic children, particularly in the BALF, brings new insight into the pathogenesis of bronchial asthma and together with the recently published data supports the role of these molecules in the allergen uptake and Th2 polarization. The importance of increased BDCA-3 and MR expression on lung mDCs for the pathogenesis of allergic reaction and bronchial asthma requires further studies.

## Acknowledgment

This work was supported by the project MZ0FN2005 from the Czech Ministry of Health and by the project MSM0021620812 of the Czech Ministry of Education, Youth and Sports.

## References

- Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419–26.
- Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:17–58.
- Bratke K, Klein C, Kuepper M, Lommatzsch M, Virchow JC. Differential development of plasmacytoid dendritic cells in Th1- and Th2-like cytokine milieus. *Allergy* 2011;66:386–95.
- Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:177–84.
- Cook DN, Bottomly K. Innate immune control of pulmonary dendritic cell trafficking. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:234–9.
- van Haarst JM, de Wit HJ, Drexhage HA, Hoogsteden HC. Distribution and immunophenotype of mononuclear phagocytes and dendritic cells in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:487–92.
- Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA *et al.* Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol* 2006;177:7784–93.
- Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A* 2010;77:410–9.
- Ten Berge B, Muskens F, Kleinjan A *et al.* A novel method for isolating dendritic cells from human bronchoalveolar lavage fluid. *J Immunol Methods* 2009;351:13–23.
- von Garnier C, Nicod LP. Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss Med Wkly* 2009;139:186–92.
- Tsoumakidou M, Tzanakis N, Papadaki HA, Koutala H, Siafakas NM. Isolation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from human bronchoalveolar lavage fluid. *Immunol Cell Biol* 2006;84:267–73.
- GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol* 2008;1:442–50.
- Hattori T, Konno S, Hizawa N *et al.* Genetic variants in the mannose receptor gene (MRC1) are associated with asthma in two independent populations. *Immunogenetics* 2009;61:731–8.
- Kassianos AJ, Jongbloed SL, Hart DN, Radford KJ. Isolation of human blood DC subtypes. *Methods Mol Biol* 2010;595:45–54.
- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100:4512–20.
- Inoue K, Takano H, Koike E *et al.* Candida soluble cell wall beta-glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: possible role of antigen-presenting cells. *Respir Res* 2009;10:68.
- Horvath R, Budinsky V, Kayserova J *et al.* Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin Immunol* 2009;131:60–9.
- Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006;120:260–71.
- Sochorova K, Horvath R, Rozkova D *et al.* Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 2007;109:2553–6.
- Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P *et al.* BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037–46.
- Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 2009;10:1237–44.
- Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E *et al.* Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 2007;109:5371–9.
- de Heer HJ, Hammad H, Soullie T *et al.* Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004;200:89–98.
- Yerkovich ST, Roponen M, Smith ME *et al.* Allergen-enhanced thrombomodulin (blood dendritic cell antigen 3, CD141) expression on dendritic cells is associated with a TH2-skewed immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:209–16.e4.
- Spears M, McSharry C, Donnelly I *et al.* Peripheral blood dendritic cell subtypes are significantly elevated in subjects with asthma. *Clin Exp Allergy* 2011;41:665–72.
- Robbins SH, Walzer T, Dembele D *et al.* Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 2008;9:R17.
- Agrawal DK, Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010;10:39–48.
- Cochand L, Isler P, Songeon F, Nicod LP. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:547–54.
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100:575–85.
- Mahnke K, Guo M, Lee S *et al.* The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 2000;151:673–84.

- 31 Deslee G, Charbonnier AS, Hammad H *et al.* Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:763–70.
- 32 Emara M, Royer PJ, Abbas Z *et al.* Recognition of the major cat allergen Fel d 1 through the cysteine-rich domain of the mannose receptor determines its allergenicity. *J Biol Chem* 2011;286:13033–40.
- 33 Huang HJ, Lin YL, Liu CF, Kao HF, Wang JY. Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma. *Mucosal Immunol* 2011;4:519–27.
- 34 Royer PJ, Emara M, Yang C *et al.* The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. *J Immunol* 2010;185:1522–31.
- 35 Birkholz K, Schwenkert M, Kellner C *et al.* Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood* 2010;116:2277–85.

## 8.6 **Početní a funkční poruchy subpopulací dendritických buněk u pacientů s diabetem mellitem 1. typu a jejich příbuznými**

Jak bylo uvedeno v kapitole 3, hlavní patogenetickou roli u diabetu jsou T lymfocyty, které vedou k destrukci  $\beta$ -buněk pankreatických ostrůvků a k následné poruše tvorby insulinu. Jak ale popisuje kapitola 4.3.2, mnohé studie posledních let dokládají důležitou roli i vrozené imunity, hlavně dendritických buněk v patogenezi diabetu. Dendritické buňky stojí na pomezí mezi vrozenou a specifickou imunitou, jsou schopné rozeznat antigeny a polarizovat imunitní odpověď směrem k toleranci nebo autoimunitní reakci.

Na rozvoji diabetu mellitu 1. typu se podílejí jak genetické vlivy, tak vlivy prostředí, především je zmiňována role infekcí. V této práci jsme studovali zastoupení subpopulace DC v periferní krvi a sledovali jsme reaktivitu DC na různé ligandy TLR. Periferní mononukleární buňky jsme stimulovali různými ligandy TLR, jako modelu působení infekce na DC a měřili jsme produkci cytokinů produkovaných dendritickými buňkami.

Do studie jsme zařadili pacienty s čerstvě manifestovaným diabetem a jejich prvostupňové příbuzné. Skupinu prvostupňových příbuzných jsme dále stratifikovali do 2 skupin na základě pozitivivity nebo negativity diabetogenních autoprotilátek v séru (anti-GAD65 a anti-IA2).

V periferní krvi pacientů i příbuzných je signifikantně nižší počet obou subpopulací DC – mDC i pDC v porovnání se zdravými kontrolami. mDC v podskupině příbuzných s pozitivními autoprotilátkami byly signifikantně nižší než u zdravých kontrol, obdobný trend jsme pozorovali i v porovnání s příbuznými bez autoprotilátek.

Výrazné rozdíly jsme našli u stimulovaných periferních mononukleárních buněk (PBMC) ligandem TLR-9 u příbuzných, kteří produkovali výrazné množství IFN- $\alpha$ . Týkalo se to především příbuzných v riziku rozvoje T1D – příbuzní s pozitivními autoprotilátkami i příbuzných bez autoprotilátek ale s vysoce rizikovým genotypem.

Naše studie prokázala početní i funkční změny v subpopulacích DC v periferní krvi, především pDC, u pacientů s T1D a jejich prediabetických příbuzných. Naše data podporují teorii o patogenezi T1D, že infekce, rizikový faktor T1D, je schopna u geneticky predisponovaných jedinců vyvolat imunitní reakci, aktivaci pDC a produkci IFN $\alpha$ , který by následně mohl přispívat k destrukci  $\beta$ -buněk a vzniku T1D.

## *Numerical and functional alterations in dendritic cells subpopulations in patients with type 1 diabetes and their relatives*

Jana Kayserova<sup>1</sup>, Katerina Stechova<sup>2</sup>, Dudkova Eva<sup>1</sup>, Zdenek Sumnik<sup>2</sup>, Stanislava Kolouskova<sup>2</sup>, Hana Hromadkova<sup>1</sup>, Radek Spisek<sup>1,3</sup>, Anna Sediva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Charles University, 2<sup>nd</sup> Medical School, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Charles University, 2<sup>nd</sup> Medical School, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Sotio a.s., Prague, Czech Republic

### **Abstract:**

**Introduction:** Dendritic cells (DCs) play an important role in the induction and maintenance of immunological tolerance and participate in the pathogenesis of autoimmune diseases including type 1 diabetes (T1D). In our study we aimed at investigation of dendritic cells subpopulations and their response to TLR stimulation in T1D patients and their relatives in risk of T1D development.

**Patients and methods:** We have analyzed frequency of both myeloid (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs) in peripheral blood of 97 T1D patients (69 T1D onset, 28 long term compensated T1D), 67 their first degree relatives classified according to the positivity of autoantibodies and genetic risk, and 64 healthy controls.

**Results:** A significantly lower number of mDCs as well as of pDCs was found in the groups of patients with T1D ( $10^6/L$ , mean $\pm$ SD: T1D onset - mDC  $9.88\pm 8.4$  and pDC  $5.54\pm 4.6$ ; T1D long-term - mDC  $4.19\pm 3.3$  and pDC  $6.1\pm 4.5$ ) and first degree relatives (mDC  $14.0\pm 7.4$ ; pDC  $9.8\pm 5.8$ ) compared to healthy controls (mDC  $18.7\pm 9.7$ ; pDC  $14.4\pm 9.4$ ), ( $p<0.001$  and  $p<0.01$ , respectively).

We have further tested the production of IFN-alpha upon appropriate TLR ligands targeting TLR 3,4,7, 8 and 9 on pDCs. Only stimulation with CpG 2216 induced IFN-alpha production that was higher in relatives in risk of T1D development before the onset of a disease in comparison with controls (pg/mL, mean $\pm$ SD:  $821.7\pm 1589.0$ ;  $410.2\pm 579.8$ , respectively;  $p<0.01$ ). The level of production of IFN-alpha raised gradually with increasing severity of predictive risk of T1D development.



**Conclusion:** Our data demonstrate disturbances in DCs numbers and function most expressed during pre-diabetic stage and during an onset of a T1D. Increasing IFN-alpha production by pDCs upon TLR9 stimulation reflects the severity of risk of disease development among relatives of patients with T1D.

## **Introduction**

Type 1 diabetes (T1D) is a T-cell-mediated autoimmune disease that involves slow and progressive pancreatic islet beta-cell destruction and loss of insulin secretion. Both genetic background and environment have a major influence on the immune mechanisms involved in the pathogenesis of the disease [1-3].

Over the last 2 decades, studies addressing the pathogenesis of type 1 diabetes have focused primarily on the role of adaptive immunity [3, 4], demonstrating the direct role for T lymphocytes in the destruction of pancreatic islet cells and for B lymphocytes in autoantibody production and defective B cell tolerance [5, 6]. Recent studies, however, suggested an important role for the innate immune system in the development of T1D [3, 7]. Particularly dendritic cells (DCs), standing at the interface between innate and adaptive immunity, seem to play an important role in T1D development [8, 9]. The DCs, by presenting the antigen and by influencing microenvironment through a local contact and secretion of an array of cytokines, determine the direction of immune responses [8]. Such the capability of DCs to regulate immune environment is particularly important in autoimmune diseases as T1D.

DCs presenting beta-cells antigens were observed in pancreatic islets and lymph nodes of animal models [10]. Transfer of conventional DCs presenting antigens was shown to initiate diabetogenic response in mice [11]. Similar effect was also described for plasmacytoid DCs (pDCs). Plasmacytoid DCs are very potent producers of type I interferons and have been also shown to promote the development of autoimmune diabetes in mice [12]. Viral infections have been for a long time considered to contribute to the pathogenesis of type I diabetes. In this regard pDCs represent a particularly relevant population as they express TLRs 7-9, receptors involved in the recognition of viral infections. It is, however, noteworthy that both types of DCs had also protective role under certain circumstances [13, 14]. The accumulation of knowledge on crucial role of DCs in the development of diabetes in animal models promoted similar studies in humans [15]. Due to the apparent difficulties with obtaining pancreatic DCs or DCs from pancreatic lymph nodes in humans, these studies mostly focused on peripheral blood DCs. There is, however, considerable discrepancy regarding the status of DCs observed in human cohorts [16-21].

In this study, we investigated the frequency and functional characteristics of DCs subsets in well-defined cohorts of diabetic patients and their relatives at high risk of T1D development. Based on published data and preliminary results we particularly concentrated on a population of pDCs and their cytokine production upon TLR stimulation [9, 22]. Patients and their first

degree relatives have been followed for long time under the preventive program run at the Department of Pediatrics. This study thus provides an insight into the characteristics of the DCs compartment at various stages of the T1D pathogenesis, including autoantibody positive individuals at high risk of T1D, newly diagnosed patients and stabilized patients on insulin replacement therapy.

## **Patients and methods**

### Patients and controls

DCs subsets were analyzed in peripheral blood of ninety-seven patients with T1D (69 patients with T1D onset and 28 patients with long-term compensated T1D), in 67 their first-degree relatives and 64 healthy controls. Serum titers of diabetic autoantibodies anti-GAD65 and anti-IA2 were analyzed in relatives (siblings of our patients). We found 21 relatives with positive autoantibodies and 35 without any autoantibody (in 11 relatives the investigation of autoantibodies was not available). Genetic risk of association of HLA class II and T1D was also analyzed in this group. Twelve relatives were HLA typed using allele-specific primers [23]. Characteristics of the groups are shown in Tab. 1A. The informed consent was obtained prior to the entrance into the study from all patient guardians and healthy donors.

Peripheral venous blood was collected from all donors into EDTA tubes. Determination of DC subsets (pDC and mDC), as well as staining protocol were described previously [24]. We used following monoclonal antibodies: CD3-FITC, CD19-FITC, CD20-FITC, CD56-FITC, CD14-Dyomics590, CD16-Alexa700 (all from Exbio, Prague, Czech Rep.), CD45-Pacific Blue (Dako, Glostrup, Denmark), HLA-DR-PC7 (Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Germany), CD123-PE (eBioscience, San Diego, CA), CD11c-APC (Invitrogen, Paisley, UK). All antibodies were titrated to determine the optimal concentrations.

At least 200.000 events were acquired on FACS Aria™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and subsequently analysed using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA). All samples were processed and analyzed immediately after blood sampling.

### Media and cell cultures

Complete culture medium (CM), consisted of RPMI 1640 supplemented with 0,5% human AB serum, 2mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin (all from Gibco, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) was used for the culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Cells were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

## Stimulation of PBMC with TLR ligands

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by standard Ficoll-Paque (Amersham, Upsalla, Sweden) gradient centrifugation.  $2 \times 10^5$  PBMC were suspended in 200  $\mu$ L of CM and stimulated with purified TLR ligands: poly (I:C)(Sigma): 50  $\mu$ g /ml, LPS (Sigma): 1  $\mu$ g /ml, loxoribine (Invivogen): 500  $\mu$ M, ssPolyU complexed with Lyovec (Invivogen): 10  $\mu$ g /ml, CpG ODN2006 and CpG ODN2216 (Invivogen): 5  $\mu$ g/ml.

After the 24-hours incubation at 37<sup>0</sup>C, the supernatants were harvested and production of IFN-alpha was determined using multiplex Luminex cytokine fluorescent bead-based immunoassays (Millipore, Bedford, MA). Assays were run according to the manufacturers' protocol. Data were collected using the Luminex-100 system (Luminex, Austin, TX). A five-parameter regression formula was used to calculate the sample concentrations from the standard curves.

Within PBMC, CpG ODN-induced IFN-alpha is produced exclusively by pDCs [25]. As we stimulated PMBC and not pDCs alone, the concentration of IFN alpha measured by luminex assay was recalculated regarding the concentration of pDCs in peripheral blood. Final concentrations were determined for all experiments as IFN-alpha concentration produced by 10 pDCs.

The figures and statistical analysis were generated using Graph Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA) software programs.

## Statistics

In all experiments nonparametric Mann–Whitney test was used for statistical analysis between patients groups and healthy controls and  $p < 0.05$  was considered to be significant.

## **Results**

### *Decreased DCs subpopulations in T1D patients and relatives*

We were systematically investigating mDCs and pDCs numbers in well-defined cohorts of T1D patients and their relatives. DCs numbers, both mDCs and pDCs, were highly significantly lower in both T1D patients and also relatives compared to healthy controls ( $p < 0.001$ , resp.  $p < 0.01$ ) (Fig.1, Tab.1).

Relatives of T1D patients are in higher risk to develop the disease. We have observed that relatives with positive islet specific autoantibodies tend to lower DCs numbers than these without autoantibody positivity (Fig.2, Tab.1).

### *Increased production of IFN-alpha upon TLR9 stimulation of PBMC*

Stimulation of PBMC with TLR 3, 4, 7 and 8 ligands (poly I:C, LPS, loxoribin and ssRNA, respectively) and also TLR9 ligand CpG 2006 provoked only negligible IFN-alpha production. Only TLR9 stimulation with CpG 2216 induced considerable amount of IFN-alpha (Fig. 3).

### *Similar TLR9 expression in DCs of T1D patients and healthy controls*

We have further focused on pDCs as cells with major importance in anti-viral response and crucial producers of IFN-alpha. Plasmacytoid DCs express a set of characteristic TLR receptors. We have demonstrated previously that pDCs dominantly expressed TLR molecule is TLR9 and we did not find any differences in expression between patients and healthy controls (data not shown).

### *Increased production of IFN-alpha upon CpG2216 stimulation in first degree relatives in T1D risk*

Stimulation of PBMC with TLR9 ligand CpG 2216 led to the production of IFN-alpha (Fig.3). Despite significantly lower numbers of pDCs, relatives produced an increased amount of IFN-alpha after the stimulation with TLR9 ligand compared to healthy donors ( $p < 0.01$ ) (Fig.4, Tab.1). We did not find differences in IFN-alpha production between relatives with or without autoantibodies, but both groups produced increased level of IFN-alpha compared to healthy controls ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ; respectively) (Fig.5, Tab.1). Relatives with negative autoantibodies were further divided in subgroups according to genetic risks. The level of IFN-alpha production reflected increasing risk of T1D development, with lowest IFN-alpha

production associated with low genetic risk and increased levels with increasing probability of T1D onset (Fig.5).

## **Discussion**

The importance of DCs in a pathogenesis of diabetes is now well-proven in animal studies [2, 26, 27]. Strong evidence for specifically pDCs in an initiation of autoimmune diabetes in NOD mice was credibly demonstrated in a recently published study [1]. However, much less evidence on a role of DCs in T1D is available in humans. So far only several studies addressed the role of DCs in humans, with conflicting, even contradictory results [15-21]. Here we add further data and confirm alteration of blood dendritic cells subsets not only in T1D patients, but also in their first degree relatives in high risk for development of T1D. We have found reduced numbers of both mDCs and pDCs in T1D patients (Fig.1) which is in accordance with observations published by majority of so far available studies [17-19, 21]. Different results in earlier studies [16, 20] might be due to differences in cohorts of patients, their age, disease duration and different methodology.

First degree relatives of T1D patients, followed in the preventive program before T1D onset, represent pre-diabetic state, a time window when immune destruction of beta cells is ongoing. This cohort presents with the similar, even if less pronounced, disturbances in DCs subsets as T1D patients (Fig.1 and 2).

Previous animal studies, and particularly recent publication by Diana [1, 28-30] show an importance of IFN-alpha produced by pDCs in an initiation of autoimmune diabetes. Furthermore, interferon alpha therapy in humans is in some cases associated with T1D development [31]. We were, therefore, looking at IFN-alpha production by pDCs stimulated by TLR ligands. Out of a set of pDCs expressed TLR 7, 8 and 9 ligands used in our study only TLR9 ligand CpG 2216 induced a significant IFN-alpha production (Fig.3). IFN-alpha production is comparable between T1D patients and controls. We have, however, observed differences in IFN-alpha production among relatives with genetic risk, with a general trend to secrete higher amount of IFN alpha with increasing risk of development of T1D (Fig. 4 and 5). This observation is particularly striking in autoantibody negative relatives. Division of these into subgroups according to their genetic risk of a disease demonstrates a gradual increase of IFN-alpha production with increasing grading of probability of T1D development. The exact role of IFN-alpha in an initiation and maintenance of T1D is not known in humans, however, recent publication [1] elucidates a complex of early events leading to autoimmune diabetes in NOD mice and documents an importance of pDCs and IFN-alpha in a pathogenesis of a disease. These events are represented by a crosstalk between B-1a cells, neutrophils and pDCs activated by immune complexes formed by self DNA, anti DNA IgG



and neutrophil derived cathelicidin-related antimicrobial peptide. Such complexes activate pDCs through TLR9 pathway and lead to IFN-alpha production with further detrimental effect on pancreatic beta cells. Similar studies were never performed in humans due to obvious obstacles to obtain pancreatic tissues. Our results, however, partly mirror these pathogenic steps leading to diabetes in NOD mice. Early decrease of pDCs numbers in pre-diabetic stage and at an onset of a disease might reflect their influx to pancreas. Activation of pDCs through TLR9 stimulation and increased secretion of IFN-alpha also show similarities to events described in a mouse model.

In summary, here we show that the patients in a time of onset of T1D and their first degree relatives with high risk of T1D development have significantly lower numbers of pDCs in their peripheral blood. We also show alterations in IFN-alpha secretion upon TLR9 stimulation specifically with CpG 2216 in relatives in genetic risk of T1D development. Finally we point at a similarity with recently published findings that demonstrates an importance of TLR9 activated pDCs and IFN-alpha production in early events leading to diabetes development in NOD mice [1].

Our data demonstrate disturbances in DCs numbers and function most expressed during pre-diabetic stage and during an onset of a disease. These findings add a piece of knowledge to accumulating evidence that particularly pDCs keep pivotal position in an orchestration of T1D development. Further concentration of investigation of T1D before and during its onset is of crucial importance.

## References:

1. Diana, J., et al., *Innate immunity in type 1 diabetes*. Discov Med, 2011. **11**(61): p. 513-20.
2. Todd, J.A., *Etiology of type 1 diabetes*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 457-67.
3. Zipris, D., *Innate immunity and its role in type 1 diabetes*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2008. **15**(4): p. 326-31.
4. Tsai, S., A. Shameli, and P. Santamaria, *CD8+ T cells in type 1 diabetes*. Adv Immunol, 2008. **100**: p. 79-124.
5. Miao, D., L. Yu, and G.S. Eisenbarth, *Role of autoantibodies in type 1 diabetes*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 1889-98.
6. Wong, F.S., et al., *To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(6): p. 723-31.
7. Kim, H.S. and M.S. Lee, *Role of innate immunity in triggering and tuning of autoimmune diabetes*. Curr Mol Med, 2009. **9**(1): p. 30-44.
8. Lehuen, A., et al., *Immune cell crosstalk in type 1 diabetes*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 501-13.
9. Tisch, R. and B. Wang, *Role of plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes: friend or foe?* Diabetes, 2009. **58**(1): p. 12-3.
10. Calderon, B., et al., *Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 6121-6.
11. Ludewig, B., et al., *Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1493-501.
12. Stewart, T.A., et al., *Induction of type 1 diabetes by interferon-alpha in transgenic mice*. Science, 1993. **260**(5116): p. 1942-6.
13. Kared, H., et al., *Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 78-84.
14. Marin-Gallen, S., et al., *Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2010. **160**(2): p. 207-14.
15. Summers, K.L., et al., *Characterization of dendritic cells in humans with type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1005**: p. 226-9.
16. Allen, J.S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 138-45.
17. Hinkmann, C., et al., *Reduced frequency of peripheral plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes*. Horm Metab Res, 2008. **40**(11): p. 767-71.
18. Chen, X., et al., *Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood*. Clin Immunol, 2008. **129**(3): p. 413-8.
19. Nieminen, J.K., et al., *Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2012. **35**(11): p. 2303-10.
20. Peng, R., et al., *Abnormal peripheral blood dendritic cell populations in type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1005**: p. 222-5.
21. Vuckovic, S., et al., *Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children*. Clin Immunol, 2007. **123**(3): p. 281-8.
22. Diana, J., et al., *Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes*. Nat Med, 2013. **19**(1): p. 65-73.

23. Cinek, O., et al., *HLA class II genetic association of type 1 diabetes mellitus in Czech children*. *Pediatr Diabetes*, 2001. **2**(3): p. 98-102.
24. Horvath, R., et al., *Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease*. *Clin Immunol*, 2009. **131**(1): p. 60-9.
25. Krug, A., et al., *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(7): p. 2154-63.
26. Clare-Salzler, M.J., et al., *Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(3): p. 741-8.
27. Saxena, V., et al., *The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse*. *J Immunol*, 2007. **179**(8): p. 5041-53.
28. Li, Q. and H.O. McDevitt, *The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse*. *Clin Immunol*, 2011. **140**(1): p. 3-7.
29. Li, Q., et al., *Interferon-alpha initiates type I diabetes in nonobese diabetic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(34): p. 12439-44.
30. Nakashima, T., et al., *Administration of interferon (IFN)-alpha exacerbates reovirus type-2-triggered autoimmune insulinitis in DBA/1J mice*. *Scand J Immunol*, 2012. **76**(4): p. 378-86.
31. Nakanishi, K. and S. Saitoh, *Clinical and genetic characteristics of patients with type I diabetes associated with interferon therapy*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(2): p. 471-3.

### **Acknowledgement:**

We would like to thank Anna Fialova, PhD for contribution to result analysis.

The study was supported by the project GAČR P302/10/1679 from Grant Agency of Czech Republic and by project IGA NT/11407-5 from Internal Grant Agency of Czech Ministry of Health.

Table 1. Patients' characteristics

	<b>n</b>	<b>M</b>	<b>F</b>	<b>Age</b> Mean±SD	<b>mDC</b> x10e6/L Mean±SD	<b>pDC</b> x10e6/L Mean±SD	<b>IFN-alpha</b> pg/ml per 10pDC Mean±SD
<b>T1D patients</b>	<b>97</b>	<b>48</b>	<b>47</b>				
T1D onset	69	36	33	10.2±4.7	9.88±8.4	5.54±4.6	452.7±728.8
long-term T1D	28	12	16	13.7±7.9	4.19±3.3	6.1±4.5	394.4±559.0
<b>First-degree relatives</b>	<b>67</b>	<b>22</b>	<b>45</b>	<b>13.9±7.9</b>	<b>14.0±7.4</b>	<b>9.8±5.8</b>	<b>821.7±1589.0</b>
+ autoantibodies	21				13.2±10.1	10.6±7.6	643.4±712.3
- autoantibodies	35				15.2±6.5	9.6±5.3	1084.4±2080.8
<b>Healthy controls</b>	<b>64</b>	<b>43</b>	<b>21</b>	<b>14.9±11.0</b>	<b>18.7±9.7</b>	<b>14.4±9.4</b>	<b>410.2±579.8</b>

## T1D figures

Fig. 1 Myeloid and plasmacytoid DCs in T1D patients and their relatives

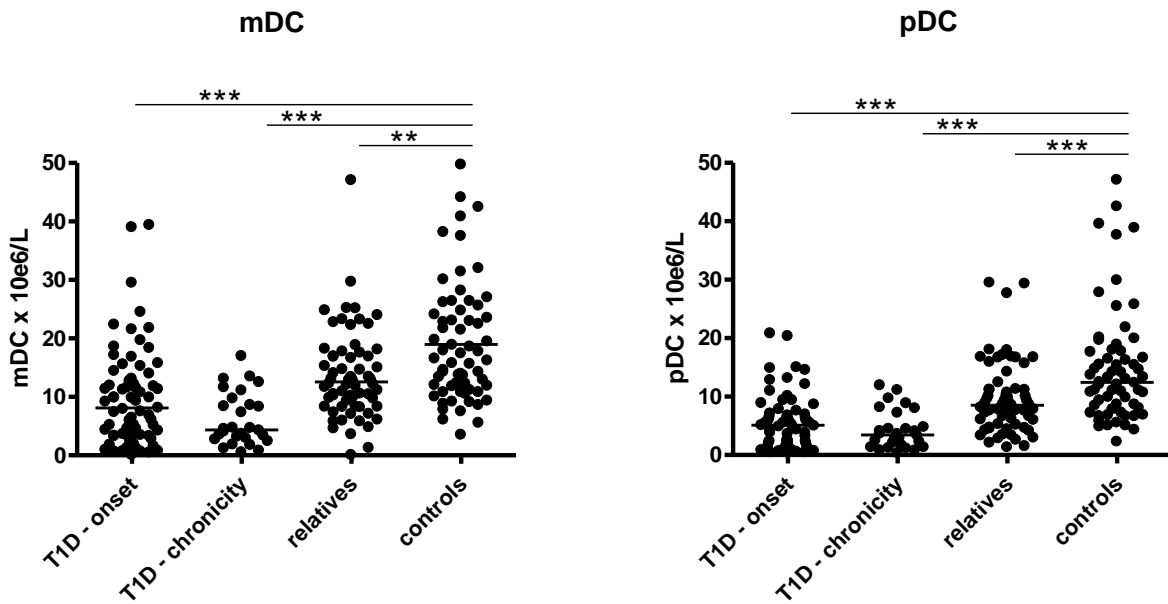


Fig. 1

Numbers of mDCs and pDCs (median) were investigated in well defined cohorts of T1D patients, their relatives and in healthy controls. DCs numbers were highly significantly lower in all cohorts in comparison with controls. The statistical significance was determined as \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

Fig. 2 Myeloid and plasmacytoid DCs in relatives

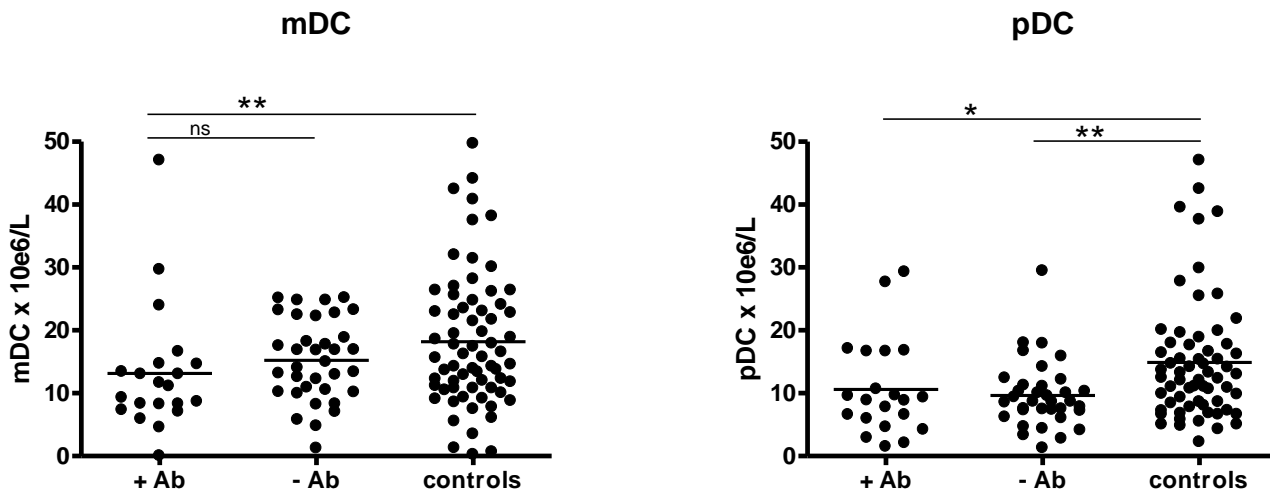


Fig. 2

Relatives with positive islet specific autoantibodies tend to lower mDCs numbers (median) than these without autoantibody positivity. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

Fig.3 IFN-alpha production upon TLR ligands stimulation

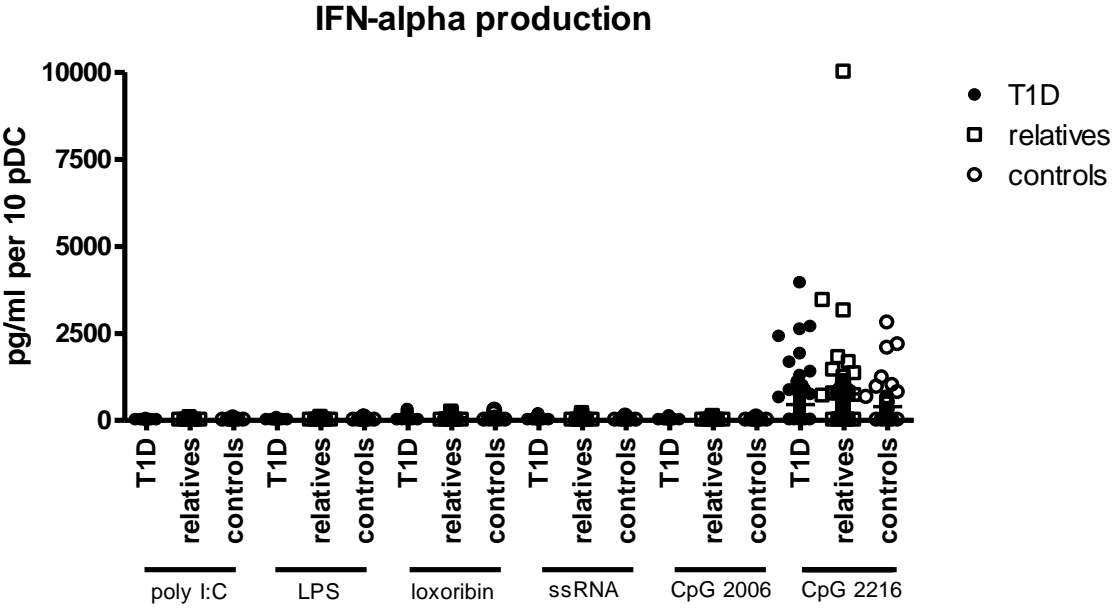


Fig.4 IFN-alpha production upon CpG2216 stimulation

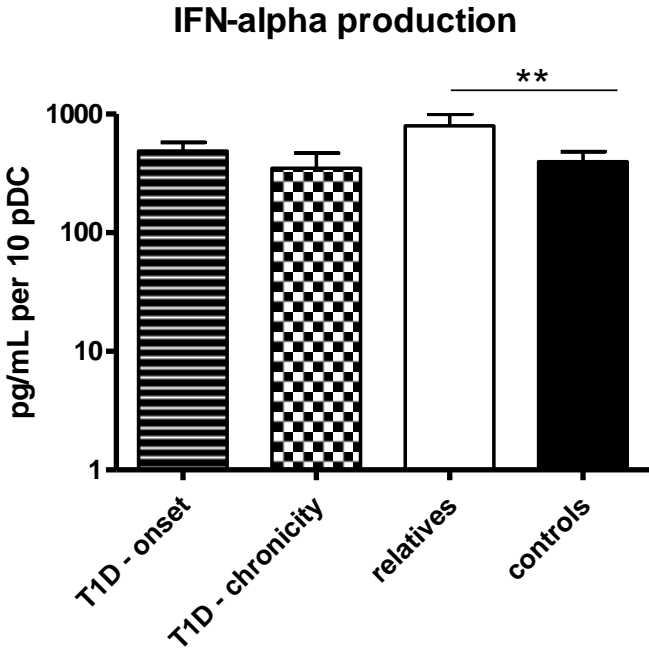


Fig.4 IFN-alpha production (mean±SEM) by pDCs of T1D patients and their relatives

\*\* p < 0.01.



Fig.5 Comparison of IFN-alpha production by pDCs between autoantibody positive and negative relatives.

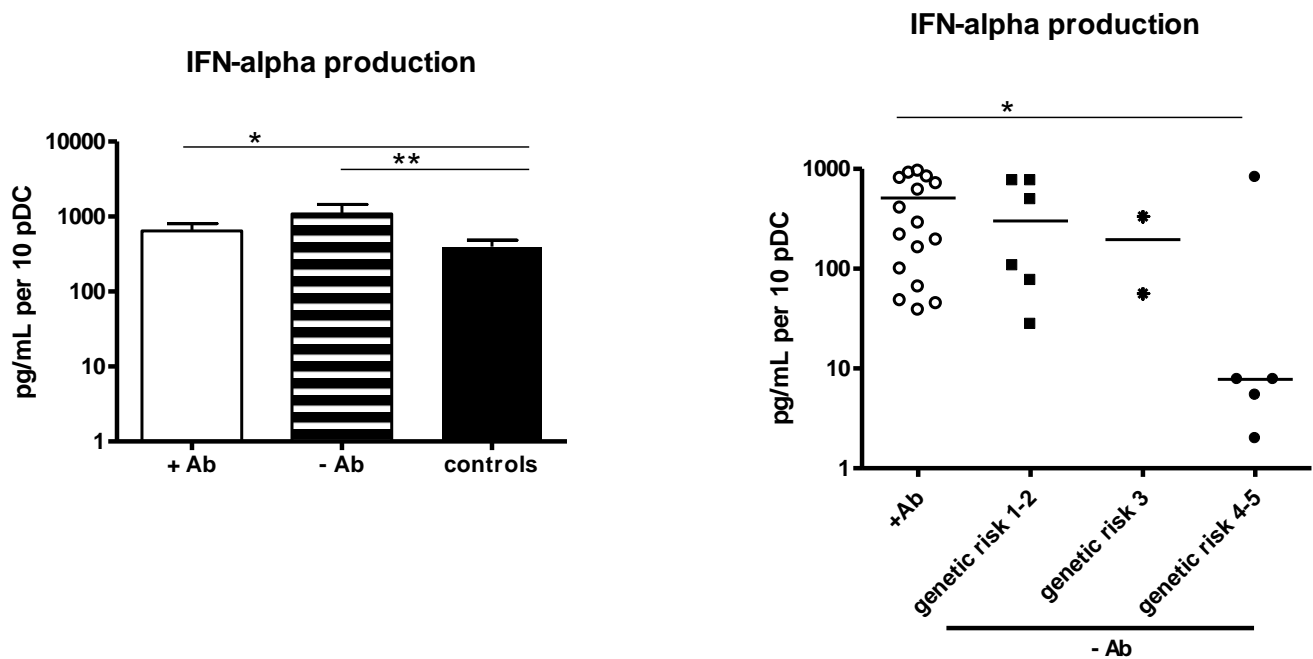


Fig.5 IFN-alpha production (mean±SEM) by pDCs of relatives with positive (n=21) and negative autoantibodies (n=35). \*\* p < 0.01, \* p < 0.05. Production of IFN-alpha (median) by pDCs of relatives with negatives autoantibodies with HLA class II associated with T1D risk in Czech population: high risk 1-2 (n=6), borderline 3 (n=2) and low risk group 4-5 (n=4). \* p < 0.05.

## 8.7 **Kazuistika T1D u jednovaječných čtyřčat**

T1D vzniká u geneticky predisponovaných jedinců. Mnohé studie zabývající se vlivem genetického pozadí na rozvoj autoimunit.

V této práci jsme prezentovali jedinečnou kazuistiku monozygotických čtyřčat, kdy u dvou z nich vznikl diabetes ve stejném čase, jedno čtyřče bylo v tom období ve stádiu prediabetu. Všechny 4 děti měly pozitivní autoprotilátky v séru (anti-GAD65 a anti-IA2) a zároveň všechny děti byly sérologicky pozitivní pro enterovirovou infekci s EV68-71 sérotypem. Zároveň jsme vyšetřovali i oba rodiče a starší sestru čtyřčat. U všech subjektů jsme se analyzovali rozdíly mezi diabetickými a nediabetickými dětmi na mRNA úrovni jako genový expresi profil pomocí microarray a taktéž na buněčné úrovni (počet DC v periferní krvi, reaktivita na TLR ligandy a diabetogenní peptidy).

Mezi diabetickými a nediabetickými dětmi jsme našli rozdílnou genovou expresi v signálních drahách pro interferonovou antivirovou reakci, signalizaci v TLR3 a TLR4, signalizace IFN  $\alpha/\beta$  a v antigenní prezentaci MHC I.

U všech čtyřčat i u jejich rodičů jsme našli snížený počet pDC a mDC v porovnání se zdravými kontrolami. Starší sestra počtem pDC odpovídala spíše zdravé populaci. Po stimulaci diabetogenními peptidy produkovaly PBMC zvýšené množství TGF- $\beta$  a nízkou hladinu IL-10. Opačné výsledky byly detekovány u zdravých členů rodiny, včetně dítěte s prediabetem. PMBC diabetických dětí produkovaly vyšší množství IFN- $\alpha$  ve srovnání se zdravými členy.

Tato jedinečná kazuistika dokumentuje vznik T1D v rozdílném čase u geneticky stejně predisponovaných jedinců a podporuje zásadní roli infekce na rozvoj tohoto onemocnění.

ARTICLE

# Case report: type 1 diabetes in monozygotic quadruplets

Katerina Stechova<sup>\*,1</sup>, Zbynek Halbhuber<sup>2</sup>, Miluse Hubackova<sup>1</sup>, Jana Kayserova<sup>3</sup>, Lenka Petruzelkova<sup>1</sup>, Jana Vcelakova<sup>1</sup>, Stanislava Kolouskova<sup>1</sup>, Tereza Ulmannova<sup>1</sup>, Maria Faresjö<sup>4,5</sup>, Ales Neuwirth<sup>6</sup>, Radek Spisek<sup>3</sup>, Anna Sediva<sup>3</sup>, Dominik Filipp<sup>6,7</sup> and Zdenek Sumnik<sup>1,7</sup>

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the lack of insulin due to an autoimmune destruction of pancreatic beta cells. Here, we report a unique case of a family with naturally conceived quadruplets in which T1D was diagnosed in two quadruplets simultaneously. At the same time, the third quadruplet was diagnosed with the pre-diabetic stage. Remarkably, all four quadruplets were positive for anti-islet cell antibodies, GAD65 and IA-A2. Monozygotic status of the quadruplets was confirmed by testing 14 different short tandem repeat polymorphisms. Serological examination confirmed that all quadruplets and their father suffered from a recent enteroviral infection of EV68-71 serotype. To assess the nature of the molecular pathological processes contributing to the development of diabetes, immunocompetent cells isolated from all family members were characterized by gene expression arrays, immune-cell enumerations and cytokine-production assays. The microarray data provided evidence that viral infection, and IL-27 and IL-9 cytokine signalling contributed to the onset of T1D in two of the quadruplets. The propensity of stimulated immunocompetent cells from non-diabetic members of the family to secrete high level of IFN- $\alpha$  further corroborates this conclusion. The number of T regulatory cells as well as plasmacytoid and/or myeloid dendritic cells was found diminished in all family members. Thus, this unique family is a prime example for the support of the so-called 'fertile-field' hypothesis proposing that genetic predisposition to anti-islet autoimmunity is 'fertilized' and precipitated by a viral infection leading to a fully blown T1D.

*European Journal of Human Genetics* advance online publication, 23 November 2011; doi:10.1038/ejhg.2011.212

**Keywords:** type 1 diabetes; monozygotic quadruplets; enteroviral infection; gene expression array; cytokine array; genetic predisposition to diabetes

## INTRODUCTION

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease, the complexity of which is underlined by undesirable interactions between genes and environmental factors in genetically predisposed individuals.<sup>1</sup> Although T cells are central to the mechanism of beta-cell destructions,<sup>2–5</sup> a critical involvement of other cellular and humoral components of adaptive and innate immune system have also been demonstrated.<sup>1,6–8</sup> Among environmental factors, infectious agents such as viruses primarily sensed by innate immune mechanisms are considered very potent triggers of T1D.<sup>9–12</sup> Notably, and in this context, several recently published findings suggest a strong link between T1D and enteroviral infections.<sup>13–15</sup>

To prevent the clinical onset of T1D, immuno-intervention should be undertaken in the clinically silent pre-diabetic phase. However, it is difficult to identify suitable candidates for such interventions.<sup>16</sup> The pre-diabetic phase is usually marked by the presence of autoantibodies to beta-cell antigens,<sup>17,18</sup> but the presence of these antibodies alone is not sufficient to induce destruction of beta cells.<sup>2</sup>

Here, we report a case of a family with monozygotic quadruplets where after an apparent enteroviral infection, two sisters were diagnosed with T1D while a third quadruplet was at pre-diabetic stage. To gain an insight into the molecular mechanism involved in the pathogenesis of this disease, all family members were studied for the presence of islet cell antibodies, gene expression profile of immune regulatory pathways, cellularity of T regulatory cells (Tregs) and dendritic cells (DCs), and cytokine responses.

## MATERIALS AND METHODS

### Family history

The quadruplets were born into a family with an older sibling after a physiological conception. Their development followed a typical path. At the age of 5, two of these quadruplets were simultaneously diagnosed with T1D, while a third quadruplet was in a pre-diabetic phase. Interestingly, one month before the clinical manifestation, the two diabetic girls suffered from an apparent mild infection with respiratory symptoms. Laboratory tests showed that all quadruplets and their father suffered from an enteroviral infection. All family members were subjected to the glucose tolerance test one week after the diagnosis. Upon obtaining a parental informed consent, blood samples of all

<sup>1</sup>Department of Paediatrics, 2nd Medical Faculty of Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; <sup>2</sup>Central European Biosystems, Prague, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Immunology, 2nd Medical Faculty of Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic; <sup>4</sup>Department of Natural Sciences and Biomedicine, School of Health Sciences, Jönköping University, Jönköping, Sweden; <sup>5</sup>Division of Paediatrics & Diabetes Research Centre, Department of Clinical & Experimental Medicine, Faculty of Health Sciences, Linköping University, Linköping, Sweden; <sup>6</sup>Laboratory of Immunobiology, Institute of Molecular Genetics AS CR, Prague, Czech Republic  
\*Correspondence: Associated Professor K Stechova, Laboratory of Autoimmune Diseases, Department of Paediatrics, University Hospital Motol, V Uvalu 84, Prague 5 – Motol, 150 06, Czech Republic. Tel: +420 602 194 803; Fax: +420 224 432 020; E-mail: katerina.stechova@lfmotol.cuni.cz

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 14 June 2011; revised 13 October 2011; accepted 21 October 2011

family members were collected and analysed. A family tree and clinical data are provided in Figure 1.

### HLA typing, confirmation of monozygosity and viral studies

All family members were HLA typed using allele-specific primers.<sup>19</sup> Serum samples from both the parents and the quadruplets were examined for signs of viral infections by ELISA, complement fixation and non-direct immunofluorescence. We focused on enteroviruses and coxsackie viruses as they are suspected to have a role in T1D development.<sup>13–15</sup> Monozygotic status of the quadruplets was confirmed by testing 14 different short tandem repeat polymorphisms using Aneufast multiplex QF-PCR kit (molGENTIX, S.L., Barcelona, Spain), recommended by CODIS (Combined DNA Index System).<sup>20</sup>

### Immune cell isolation

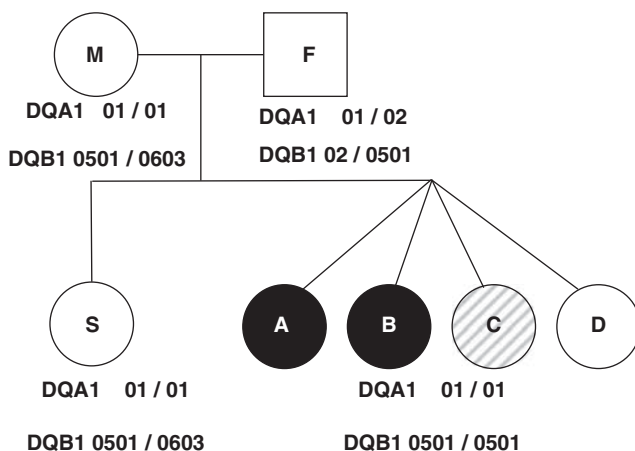
Peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and cultured as described elsewhere.<sup>21</sup> After 72 h, cells were washed and subjected to RNA extraction and supernatants were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used for cytokine analysis.

### Gene expression profiling

RNA isolated from PBMCs was amplified and hybridized to a high-density gene array chip (NimbleGen, Roche-NimbleGen Inc., Madison, WI, USA) where 47 633 human genome targets are presented with 8 probes per target. Chips were imaged (InnoScan 700 scanner, Innopsys, Carbonne, France), raw data were analysed using NimbleScan 2.4 software (Roche-NimbleGen Inc.) and used for further statistical analysis.

### Statistical and gene array analysis

The goal of this analysis was to identify differences in the activity of the immune signalling pathways between the diabetic quadruplets and their non-diabetic siblings. The gene array statistical analysis was performed using the network linking (GeneSpring GX10, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) and the pathway analysis softwares (MetaCore, GeneGo, Inc., St Joseph, MO, USA). Using unpaired *t*-tests, only the differences in gene expression with *P*-values  $<0.05$  were considered as statistically significant. The numbers used to generate the heat map represent normalized intensity values calculated as a  $\log_2$  ratio of gene expression to the chip median expression value.



**Figure 1** The family tree with indicated HLA DQ types. The quadruplets (A–D) are genetically monozygotic and DQ homozygous. The quadruplets A and B had simultaneous presentation of T1D just 1 month after an apparent enteroviral infection. The quadruplet C is in the pre-diabetic phase. The quadruplet D and an older sister (S) are diabetes free. All four quadruplets (A–D) produce anti-islet cell antibodies to GAD65 and IA-2 autoantigens. HLA DQ types of mother (M) and Father (F) are also indicated.

### Cellularity of Tregs and DCs

Tregs ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ ) and DCs (plasmacytoid, pDC as well as myeloid, mDC) from freshly isolated PBMCs were counted and identified by flow cytometry (FACS) as described elsewhere.<sup>22</sup> Family data were compared with the control samples derived from 23 healthy volunteers (12 females/11 males), median of age 18 years, range 14–26 years.

### PBMC cytokine responses

To assess the cellular responses to Toll-like receptor 9 (TLR9) stimulation,  $2 \times 10^5$  freshly isolated PBMCs were stimulated with ODN 2216 (Invivogen, Toulouse, France) for 24 h ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) and cytokine productions were measured using multiplexed antibodies (Milliplex, Millipore, Billerica, MA, USA) on luminescent beads (Luminex 100 IS, Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Similarly, a spontaneous secretion of cytokines was measured in the supernatants derived from PMBCs using a cytokine microarray (Ray Biotech, Norcross, GA, USA). Cytokine concentrations were compared with the relevant value ranges of the control population without statistical analysis.

## RESULTS

### Short tandem repeat polymorphisms test, HLA typing, anti-islet cell antibodies, glucose tolerance test and anti-viral antibodies

All quadruplets exhibited identical results in all 14 short tandem repeat polymorphisms tested. The quadruplets are homozygous for HLA DQA 01 and DQB 0501 (Figure 1). The HLA class II alleles in the quadruplets are not associated with an increased risk for T1D in the Czech population.<sup>19</sup> Remarkably, all four quadruplets were positive for anti-islet autoantibodies GAD65 and IA-2A, indicating an ongoing anti-islet autoimmunity in the non-diabetic quadruplets. The quadruplet C had a reduced first-phase insulin response and a 1-hour glucose concentration of 8.7 mmol/l, a typical characteristic of a pre-diabetic stage. Only this quadruplet had an evidence of current Enterovirus 68–71 infection with IgM, IgA and IgG antibodies. The father and the other quadruplets had anamnestic Enterovirus 68–71 IgG antibodies only.

### Functional genomics

Among the 47 633 probe-sets tested, 2136 entities (with proved difference  $P \leq 0.05$ , and fold change  $\geq 1$ ) were unique for the non-diabetic quadruplets and 2589 entities were typical of the two diabetic sisters. Out of 10 immune signalling networks with the largest differences in the gene expression profile between the diabetic and the non-diabetic quadruplets (Table 1), 4 are related to antiviral responses: (i) antiviral actions of interferons, (ii) TRIF-specific

**Table 1** Ten most differently regulated immune signalling networks between the diabetic (A and B) and the non-diabetic (C and D) quadruplets

Signalling pathways	<i>P</i> -value
Antiviral actions of interferons	0.0003
Role of TLR-3 and -4 in antiviral response:	0.0011
Trif-specific signalling pathways	
IFN alpha/beta signalling pathway	0.0019
IL-27 signalling pathway	0.0034
Antigen presentation by MHC class I	0.0056
IL-4-antiapoptotic action	0.0141
IL-12-induced IFN-gamma production	0.0260
IL-9 signalling pathway	0.0359
Human NKG2D signalling	0.0366
IL-4 signalling pathway	0.0456

TLR3 and TLR4 signalling pathways, (iii) IFN alpha/beta signalling and (iv) antigen presentation by MHC class I. Important differences were also found in four other regulatory pathways related to the interleukin signalling and T-cell differentiation pathways (IL-4, -9, -12 and -27). A gene cluster analysis of these pathways is presented in the Figure 2 where the gene expression for the diabetic and the non-diabetic quadruplets is compared.

### Cellularity of Tregs and DCs

The relative number of Tregs was decreased in all family members in comparison with the value range of the control group (Supplementary Figure 3a). Similarly, the absolute numbers of pDCs and mDCs were also decreased compared with the mean of the control subjects (Supplementary Figure 3b and 3c, respectively). The only exception for the decrease in pDCs was the older sister and that for the decrease in mDCs was the quadruplet B.

### Spontaneous and induced cytokine production by PMBCs

PMBCs from the diabetic quadruplets produced high levels of TGF-beta1 and low or undetectable levels of IL-10. A completely opposite pattern of production of these two cytokines was observed in the pre-diabetic quadruplet C (Supplementary Figure 4). Remaining healthy members of the family produced intermediate to low levels of IL-10 and low to undetectable levels of TGF-beta1. All family members produced comparable levels of IL-13 (Supplementary Figure 4). Thus, IL-10/TGF-beta-1 imbalance between the diabetic and the non-diabetic members of the family was the most striking result of this analysis. In addition, we detected higher spontaneous levels of IFN- $\gamma$  and other Th1 cytokines mainly in the non-diabetic quadruplet D. Moreover, only the father's PMBCs produced detectable amounts of IL-17 (data not shown).

The stimulation of PMBCs with TLR9-specific ligand led to the increased production of IFN- $\alpha$  in the non-diabetic quadruplets, the older sister and the mother. Concentration of IFN- $\alpha$  was slightly increased in the diabetic siblings as opposed to the controls. In contrast, PMBCs from the father were refractory to TLR9 stimulation (Supplementary Figure 5).

## DISCUSSION

A simultaneous clinical manifestation of T1D in siblings is rare. Taken into account that the probability of a natural conception of quadruplets is extremely low,<sup>23</sup> the chance for the quadruplets to also be monozygotic and DQ homozygous is truly exceptional. Here, we documented a unique case of a family with naturally conceived quadruplets where two of them have already developed T1D and the third is in a pre-diabetic state with impaired first-phase insulin response in ivGTT. Moreover, all four quadruplets are positive for anti-GAD65 and IA-2A antibodies. Thus, the probability for an early onset of T1D in the two, so far non-diabetic quadruplets is quite high.<sup>24</sup>

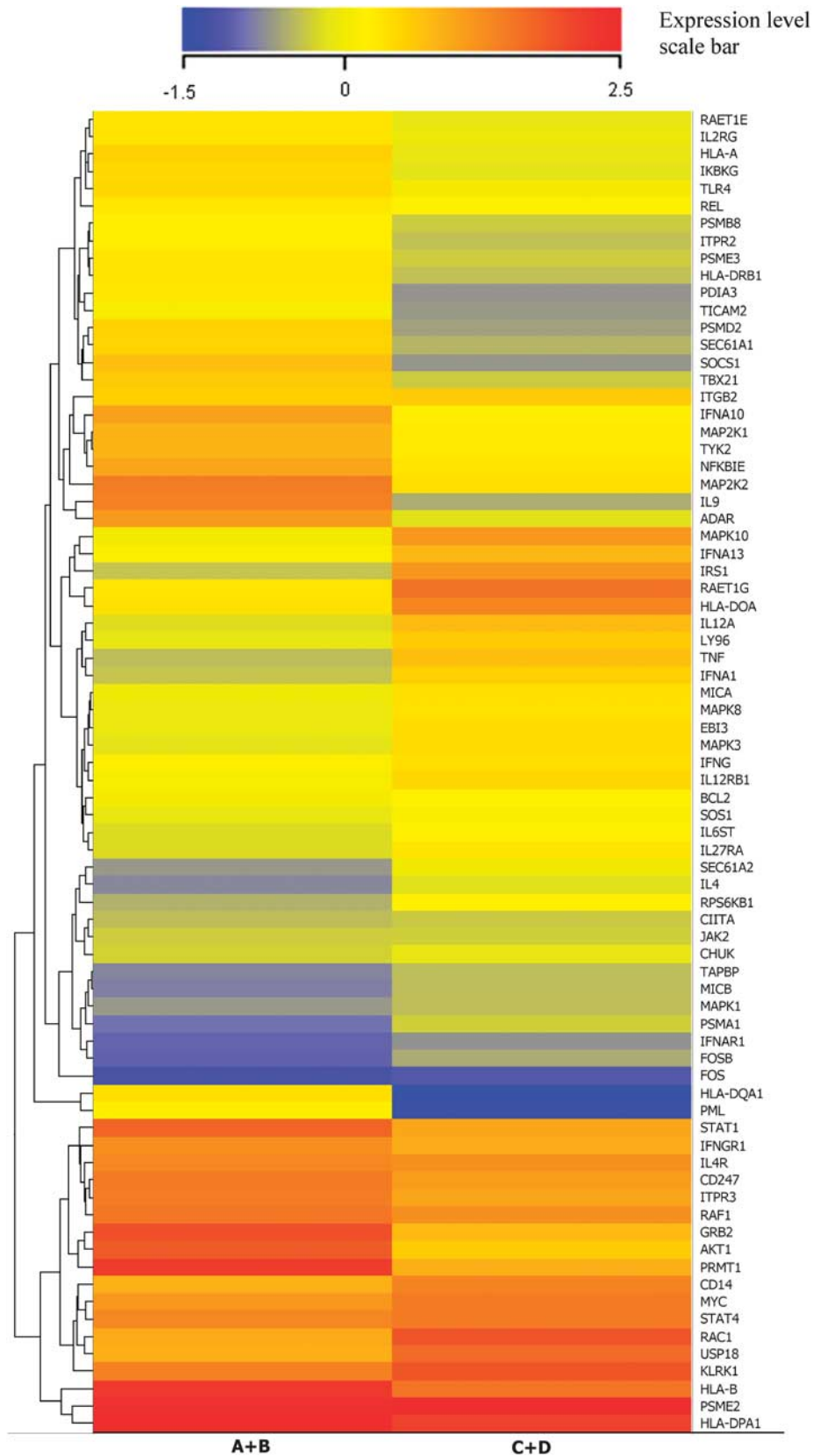
An interplay between genetic predisposition and environmental factors is implicated in T1D pathogenesis.<sup>25,26</sup> External factors such as food, infections and stress factors should be taken into account. The quadruplets had the same duration of lactation and they have similar eating habits. They all attend the same kindergarten and follow a standard national vaccination programme. According to their medical records they did not suffer from any major childhood diseases and infections. The parents reported that both diabetic quadruplets showed visible signs of a mild respiratory infection just 1 month before the onset of diabetes. No other infection or medical conditions were reported before the onset of T1D. Serological examinations

revealed that, indeed, all the quadruplets suffered from an enteroviral infection, still ongoing in the pre-diabetic quadruplet C. Viral infections are considered to have an important role in T1D pathogenesis, but the exact molecular mechanisms are still unknown.<sup>25,26</sup> In this context, our data are consistent with the recently published meta-analysis of 33 prevalence studies suggesting that enterovirus infection is common among patients with T1D.<sup>27</sup>

Our microarray data provided additional evidence to support the notion that viral infection may have contributed to the onset of T1D in the two quadruplets. Notably, cellular anti-viral responses were more prominent in the diabetic sisters where the antiviral signalling of interferons was the most significantly affected pathway. In the diabetic and the non-diabetic sisters, three other virus-sensing pathways exhibited different activation status, namely, TRIF-dependent TLR3 and TLR4 antiviral responses, IFN $\alpha/\beta$  signalling and antigen presentation by MHCI. Various evolutionarily conserved microbial structures, so-called pathogen-associated molecular patterns, are recognized by pattern recognition receptors. Toll-like receptors (TLRs) represent a prototypical class of such receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns.<sup>28</sup> Moreover, TLR3 and TLR4 can signal the presence of viral RNAs and proteins, respectively. In addition, only TLR3 and 4 signal via adaptor protein TRIF, which triggers antiviral immune responses through the production of type I interferons (IFN $\alpha/\beta$ ) and inflammatory cytokines.<sup>29</sup> TRIF signalling also leads to MyD88-independent DC maturation.<sup>30</sup> In turn, interferons may not only significantly contribute to the development of Th1 immune responses considered as prodiabetogenic<sup>31</sup> but they can also cause the upregulation of MHC class I molecules on pancreatic beta cells, thus initiating the diabetogenic process itself.<sup>9,32</sup> An alternative pathway able to transduce the detection of enteroviral infection to interferon  $\alpha/\beta$  production involves the cytoplasmic helicase receptor MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5).<sup>33,34</sup> A recent genome-wide association study implicated MDA5 in the pathogenesis of T1D.<sup>35</sup> Thus, although we cannot preclude the contribution of other external factors and type of viruses, our serological and microarray data argue for a possible involvement of enteroviruses of EV68–71 serotypes in the development of T1D in our quadruplets. The propensity of stimulated PMBCs isolated from non-diabetic members of the family (with the exception of the father) to secrete high levels of IFN- $\alpha$  compared with the controls lends further support for this conclusion.

The other four pathways with the most prominent differences between the diabetic and the non-diabetic siblings are cytokine IL-27, -4, -12 and -9 signalling cascades affecting T-cell differentiation. Among these interleukins, the most promising candidates for diabetes-associated markers seem to be IL-27 and IL-9. Notably, it has been demonstrated that IL-27 functions as the key regulator of IL-10 and IL-17 production in human CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>36</sup> Nowak and colleagues<sup>37</sup> also identified IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. Moreover, it has also been shown that IL-9 synergizes with TGF-beta1 to differentiate naive CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 cells and postulated an additional role for IL-9 in mediating the suppressive function of Tregs in experimental autoimmune encephalomyelitis.<sup>38</sup> Thus, our microarray data are coherent with these findings and provide further support for the importance of IL-27 and IL-9 cytokine signalling in the development of T1D.

FACS analysis of freshly isolated PMBCs from all family members showed that the first-degree relatives of the diabetic quadruplets display a general decline in the number of pDCs and/or mDCs. Moreover, all family members displayed a lower number of naturally occurring Tregs. This is in agreement with a previously documented



**Figure 2** Microarray heat map of genes belonging to 10 most differentially regulated pathways between the diabetic and the non-diabetic quadruplets. A simplified view with averaged gene expression values of diabetic (A and B) and non-diabetic sisters (C and D) is presented. Red and blue indicate an increase and a decrease in the gene expression levels, respectively, as indicated in the scale bar. The affiliation of all listed genes with one of the ten signaling pathways listed in Table 1 is presented in the Supplementary Table.

situation where siblings of T1D patients often reveal lower number of Tregs with impaired functional capabilities.<sup>39</sup> We have also previously reported that PMBCs from young patients with T1D, predominantly produced Th3 cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ .<sup>40,41</sup> However, a predominant secretion of TGF- $\beta$  over IL-10 seen in our diabetic quadruplets has not been reported so far. Strikingly, this production pattern exhibited a reverse relation in their pre-diabetic sister. Although the mechanism underpinning this cytokine production pattern is not known at this time, it is suggestive of a switch in the regulation of cytokine expression during the transition from pre-diabetic to clinically manifested T1D phase.

The open question is then why, if all quadruplets show signs of enteroviral infection and concomitantly are positive for anti-islet autoantibodies GAD65 and IA-2A, only two of them have developed diabetes despite their identical genetic background? In this respect, the lack of information concerning the quadruplets' autoantibody positivity before enteroviral infection precluded us to establish direct causative links between the enteroviral seropositivity, islet autoimmunity and the onset of diabetes.<sup>42</sup> Enteroviruses enter the body via ingestion and young children are their main target and reservoir. The incubation period lasts usually 3–6 days and symptoms of infection are usually subclinical, or very mild in the form of uncomplicated summer cold. Initially, enterovirus-specific antibodies of IgM class are detectable in 1–3 days after infection and are present for several months. After 7–10 days post-infection, a seroconversion to IgG class occurs and long lasting antiviral IgG antibodies, called anamnestic, are produced.<sup>43</sup> The quadruplet C is the only individual from this family that is still serologically positive for the presence of enterovirus-specific IgM antibodies. Thus, although a pre-diabetic stage of the quadruplet C correlates with a more recent occurrence of enteroviral infection, its positivity for anti-islet autoantibodies GAD65 and IA-2A indicates that this infection might not be a primary cause of the anti-islet autoimmunity, which rather results from a genetic predisposition of quadruplets to diabetes.<sup>44</sup> This line of arguments is further supported by a recent study suggesting that the progression from islet autoimmunity to fully blown T1D may increase after an enterovirus infection.<sup>15</sup> In this respect, the timing of infection and its periodic recurrence as well as a dose of the virus are certainly important parameters when considering the effect of viral infection on the same diabetes-susceptible genetic background. It is of note that a pair-wise concordance of T1D is <40% among monozygotic twins (data from monozygotic quadruplets are not available) strongly advocating for a critical role of exogenous factors in the development of T1D.<sup>45,46</sup> Taken altogether, the identical genetic background among quadruplets does not guarantee the synchronization of the onset of diabetes. In addition, an individual medical history and immunological experience reflected in differential level of gene hypermethylation could represent an important endogenous factor causing a discordance among genetically identical siblings.<sup>47</sup> Thus, the correlation between our microarray data indicating an involvement of viral infection in the development of diabetes and the appearance of clinically apparent mild respiratory, possibly viral infection in two girls 1 month before clinical diagnosis of T1D is indicative that a viral infection contributed to the autodestructive diabetic process. Although the identity of this viral agent remains uncertain, EV68–71 serotypes positivity points to enteroviruses as obvious suspects. However, as we have no direct evidence linking enteroviruses to the onset of diabetes in these quadruplets, caution has to be exercised in the interpretation of these results.

In sum, this unique family case study provides a support for the so-called 'fertile-field' hypothesis proposing that genetic predisposition to

anti-islet autoimmunity is 'fertilized' and precipitated by viral infections.<sup>48</sup> Our microarray data suggest that the viral activation of TRIF-mediated TLR signalling amplified by ensuing overproduction of IFN  $\alpha/\beta$  cytokines could lead to an imbalance between anti- and pro-inflammatory signals towards the latter, resulting in a relatively rapid progression of T1D in genetically susceptible young quadruplets.<sup>18</sup> Several lines of evidence also point to the contribution of enteroviral insult that preceded the clinically manifested onset of a fully blown and pre-diabetic stage of T1D in three out of four quadruplets. The finding that the remaining quadruplet is anti-islet autoantibody-positive, but still diabetes free with normal glucose tolerance test likely attests to her genetic predisposition to anti-islet autoimmunity. Thus, this family case is a prototypical example of the efficiency of environmental factors to cause disease in genetically identical predisposed individuals.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Gene expression study was exclusively supported by project NPVII 2B06019 from the Czech Ministry of Education. Studies on Tregs and DCs were supported by the project VZ MSM 0021620812 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, and by the project MZOFNM2005 from the Ministry of Health and by the project GACR P302/10/1679. AN and DF as well as the cytokine analysis were supported by the project NPVII 2B08066 from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports. This work was also partially supported by Grant AVOZ50520514 from the Academy of Sciences of the Czech Republic.

- 1 Todd JA: Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 2010; **32**: 457–467.
- 2 Atkinson MA, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; **358**: 221–229.
- 3 Tree TI, Peakman M: Autoreactive T cells in human type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; **33**: 113–133.
- 4 Skowera A, Ellis RJ, Varela-Calviño R *et al*: CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3390–3402.
- 5 Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ *et al*: Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2009; **155**: 173–181.
- 6 Van Belle TL, Taylor P, von Herrath MG: Mouse models for type 1 diabetes. *Drug Discov Today Dis Models* 2009; **6**: 41–45.
- 7 Tang Q, Bluestone JA: Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* 2006; **212**: 217–237.
- 8 Eizirik DL, Darville MI: Beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; **50** (Suppl 1): S64–S69.
- 9 von Herrath M: Diabetes: a virus-gene collaboration. *Nature* 2009; **459**: 518–519.
- 10 Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M *et al*: Infections and autoimmunity – friends or foes? *Trends Immunol* 2009; **30**: 409–414.
- 11 Bach JF: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; **347**: 911–920.
- 12 Zinkernagel RM: Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; **345**: 1331–1335.
- 13 Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ *et al*: The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 2009; **52**: 1143–1151.
- 14 Oikarinen S, Martiskainen M, Tauriainen S *et al*: Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; **60**: 276–279.
- 15 Stene LC, Oikarinen S, Hyöty H *et al*: Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes* 2010; **59**: 3174–3180.
- 16 Staeva-Vieira T, Peakman M, von Herrath M: Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2007; **148**: 17–31.
- 17 Bingley PJ, Williams AJ, Gale EA: Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. Implications for future intervention trials. *Diabetes Care* 1999; **22**: 1796–1801.
- 18 Achenbach P, Bonifacio E, Ziegler AG: Predicting type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2005; **5**: 98–103.

- 19 Cinek O, Kolousková S, Snajderova M *et al*: HLA class II genetic association of type 1 diabetes mellitus in Czech children. *Pediatr Diabetes* 2001; **2**: 98–102.
- 20 CODIS (Combined DNA Index System), <http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis/codis>.
- 21 Vrabelova Z, Kolouskova S, Bohmova K *et al*: Protein microarray analysis as a tool for monitoring cellular autoreactivity in type 1 diabetes patients and their relatives. *Pediatr Diabetes* 2007; **8**: 252–260.
- 22 Horvath R, Budinsky V, Kayserova J *et al*: Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin Immunol* 2009; **131**: 60–69.
- 23 Parazzini F, Villa A, Moroni S *et al*: The epidemiology of multiple pregnancies. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1994; **43**: 17–23.
- 24 Eisenbarth GS: Molecular aspects of the etiology of type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1993; **7**: 142–150.
- 25 von Herrath M: Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. *Diabetes* 2009; **58**: 2–11.
- 26 Notkins AL: On the track of viruses. *Nature* 1984; **311**: 209–210.
- 27 Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME: Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 2011; **342**: d35. doi: 10.1136/bmj.d35.
- 28 Kawai T, Akira S: TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; **19**: 24–32.
- 29 Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; **11**: 373–384.
- 30 Seya T, Oshiumi H, Sasai M *et al*: TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adaptors that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 524–529.
- 31 Siren J, Pirhonen J, Julkunen I *et al*: IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol* 2005; **174**: 1932–1937.
- 32 von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MB: How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity* 1994; **1**: 231–242.
- 33 Kato H, Takeuchi O, Sato S *et al*: Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; **441**: 101–105.
- 34 Meylan E, Tschopp J, Karin M: Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; **442**: 39–44.
- 35 Nejentsev S, Walker N, Riches D *et al*: Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 2009; **324**: 387–389.
- 36 Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R *et al*: IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *J Immunol* 2009; **183**: 2435–2443.
- 37 Nowak EC, Weaver CT, Turner H *et al*: IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* 2009; **206**: 1653–1660.
- 38 Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C *et al*: IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 12885–12890.
- 39 Vrabelova Z, Hrotekova Z, Hladikova Z *et al*: CD 127- and FoxP3+ expression on CD25+CD4+ T regulatory cells upon specific diabetogenic stimulation in high-risk relatives of type 1 diabetes mellitus patients. *Scand J Immunol* 2008; **67**: 404–410.
- 40 Ryden A, Stechova K, Durilova M *et al*: Switch from a dominant Th1-associated immune profile during the pre-diabetic phase in favour of a temporary increase of a Th3-associated and inflammatory immune profile at the onset of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; **25**: 335–343.
- 41 Stechova K, Bohmova K, Vrabelova Z *et al*: High T-helper-1 cytokines but low T-helper-3 cytokines, inflammatory cytokines and chemokines in children with high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; **23**: 462–471.
- 42 Salminen K, Sadeharju K, Lönnrot M *et al*: Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol* 2003; **69**: 91–98.
- 43 HA Guideline on Enteroviral Infection, 2nd revision [www.ha.org.hk/cInguide/ev71v2.htm](http://www.ha.org.hk/cInguide/ev71v2.htm).
- 44 Stechova K, Kolar M, Blatny R *et al*: Healthy first degree relatives of patients with type 1 diabetes exhibit significant differences in basal gene expression pattern of immunocompetent cells compared to controls: expression pattern as predeterminant of autoimmune diabetes. *Scand J Immunol* 2011; e-pub ahead of print 16 September 2011; doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02637.x.
- 45 Knip M: Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends. *Horm Res Paediatr* 2011; **76** (Suppl 1): 57–64.
- 46 Redondo MJ, Yu L, Hawa M *et al*: Heterogeneity of type 1 diabetes. Analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 2001; **44**: 354–362.
- 47 Oates NA, van Vliet J, Duffy DL *et al*: Increased DNA methylation at the AXIN1 gene in a monozygotic twin from a pair discordant for a caudal duplication anomaly. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 155–162.
- 48 von Herrath MG, Fujinami RS, Whitton JL: Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nat Rev Microbiol* 2003; **1**: 151–157.

Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)



## 9 Závěr

Imunitní systém je soubor mnoha typů buněk a jejich působků, který vznikl jako hlavní obranný mechanismus organismů před infekcemi. Imunitní systém je schopen rozeznávat vlastní a cizí antigeny a přispívá k homeostáze organismu.

Alergická i autoimunitní onemocnění jsou způsobena nepřiměřenou imunitní odpovědí na antigeny tělu vlastní i cizí, na které běžně vytváří toleranci. Tyto imunopatologické stavy jsou výsledkem kombinace genetických i zevních faktorů. Atopická dermatitida a bronchiální astma jsou považovány převážně za Th2-mediované onemocnění, v případě diabetu mellitu 1. typu jsou patognomické převážně Th1 lymfocyty. Tato imunitní reakce vede k zánětu až destrukci cílové tkáně a ke vzniku onemocnění. V případě alergií se jedná o hypersenzitivní reakci na alergen a u autoimunit na antigeny tělu vlastní.

Alergická i autoimunitní onemocnění vznikají na podkladě komplexní poruchy regulace imunitní odpovědi, a to jak mechanismů vrozené imunity, tak i specifických složek. U obou patologií nacházíme poruchy na buněčné úrovni i v humorálních částech imunity. Intenzivně jsou studovány regulační imunitní mechanismy, zapojení jednotlivých imunitních složek a vzájemný vztah vrozené i adaptivní imunity v patogenezi alergií i autoimunit.

Studium některých vybraných regulačních mechanismů zapojených do imunopatogeneze vybraných onemocnění - atopické dermatitidy, bronchiálního astmatu a diabetu mellitu 1. typu, bylo hlavním předmětem této disertační práce.

V první části věnované atopické dermatitidě byla zkoumána asociace polymorfismů genů pro cytokiny s atopickou dermatitidou a s vývojem atopického pochodu v průběhu prvních let života pacientů s AD. Prokázali jsme asociaci mezi polymorfismy IL-10 a IL-4R s rozvojem alergické rhinitidy a se senzibilizací na inhalační alergeny, které by mohly sloužit jako možný prediktivní faktor inhalační alergie.

Závažnost projevů atopické dermatitidy koreluje s hladinou volných lehkých řetězců (FLC) v séru. FLC by mohl sloužit jako další diagnostický laboratorní známka aktivity onemocnění nezávislý na celkovém IgE.

I přes zvýšenou hladinu celkového IgE a/nebo specifických IgE u pacientů s atopickou dermatitidou, jsme u 2 pacientů s těžkou formou atopické dermatitidy pozorovali pouze krátkodobé zlepšení klinického stavu po podání rituximabu.

Tyto výsledky by mohly pomoci k dalšímu pochopení patogeneze AD a přinést nové možnosti diagnostiky a léčby těžké formy AD.

Ve druhé části práce byla studována role přirozené imunity, zejména dendritických buněk a roli infekce u bronchiálního astmatu a diabetu mellitu 1. typu (T1D). V současnosti

je velmi dobře známá i role dendritických buněk jako klíčových buněk vrozené imunity pro iniciaci a polarizaci imunitní odpovědi, a také poruchy specifické imunity na úrovni T i B lymfocytů. Na jednu stranu hrají tyto buňky roli v obraně proti infekcím nebo nádorům, na druhou stranu jsou schopny vyvolat toleranci k vlastním i běžným cizím antigenům nebo autoimunitní reakci.

Byla propracována metodika detekce subpopulace DC v BAL-u a periferní krvi pomocí mnohobarevné cytometrie. Bylo ukázáno, že u pacientů s astmatem nacházíme zvýšené zastoupení BDCA-3+ DC a MR+ DC v bronchoalveolární laváži v porovnání se zdravými kontrolami a ve srovnání s jejich zastoupením v periferní krvi. Nalezena zvýšená exprese C-lectinů, jako možných receptorů pro alergeny u astmatiků, by mohla přispět k rozvoji imunopatologické reakce geneticky predisponovaných jedinců.

V závěrečné části práce byl na dvou studiích dokumentován možný vliv genetických a infekčních faktorů v patogenezi T1D. Kazuistika jednovaječných čtyřčat ukázala možný rozdílný čas vzniku T1D u geneticky identických jedinců. Zároveň byl popsán rozdílný genový expresní profil mezi nemocnými a zdravými dětmi, nejvíce v signalizačních drahách protivirové reakce a interferonové cesty. Tyto data získaná na mRNA úrovni podpořily i výsledky na proteinové a buněčné úrovni. Pacienti s T1D a jejich prvostupňoví příbuzní v riziku vzniku T1D (s pozitivními autoprotilátkami) měli signifikantně snížené množství mDC i pDC v periferní krvi, i přes tento deficit produkovali ale vysoké množství IFN- $\alpha$  po stimulaci ligandem TLR9. Tyto výsledky podporují důležitou roli pDC a IFN- $\alpha$  v patogeneze T1D a v budoucnosti by mohly přispět k lepší predikci diabetu u rizikových skupin, případně novým terapeutickým možnostem.

## 10 Použitá literatura

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." *Nature* 383(6603): 787-93.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, et al. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." *Nat Immunol* 8(9): 942-9.
- Agis, H., M. T. Krauth, et al. (2006). "Identification of basogranulin (BB1) as a novel immunohistochemical marker of basophils in normal bone marrow and patients with myeloproliferative disorders." *Am J Clin Pathol* 125(2): 273-81.
- Akdis, C. A., T. Blesken, et al. (1998). "Role of interleukin 10 in specific immunotherapy." *J Clin Invest* 102(1): 98-106.
- Akdis, M., J. Verhagen, et al. (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." *J Exp Med* 199(11): 1567-75.
- Akerblom, H. K., J. Krischer, et al. (2011). "The Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR) study: recruitment, intervention and follow-up." *Diabetologia* 54(3): 627-33.
- Akimoto, T., F. Numata, et al. (1998). "Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice." *J Exp Med* 187(9): 1537-42.
- Akira, S. (2009). "Pathogen recognition by innate immunity and its signaling." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(4): 143-56.
- Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." *Nat Immunol* 2(8): 675-80.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124(4): 783-801.
- Alenius, H., D. Laouini, et al. (2002). "Mast cells regulate IFN-gamma expression in the skin and circulating IgE levels in allergen-induced skin inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 109(1): 106-13.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* 413(6857): 732-8.
- Alizadeh, B. Z. and B. P. Koeleman (2008). "Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes." *Clin Chim Acta* 387(1-2): 9-17.
- Allen, J. S., K. Pang, et al. (2009). "Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture." *Diabetes* 58(1): 138-45.
- Amsen, D., J. M. Blander, et al. (2004). "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells." *Cell* 117(4): 515-26.
- Anders, H. J., D. Zecher, et al. (2005). "Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection." *Arthritis Res Ther* 7(5): 215-24.
- Anderson, M. S. and J. A. Bluestone (2005). "The NOD mouse: a model of immune dysregulation." *Annu Rev Immunol* 23: 447-85.
- Arif, S., F. Moore, et al. (2011). "Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death." *Diabetes* 60(8): 2112-9.
- Arif, S., T. I. Tree, et al. (2004). "Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health." *J Clin Invest* 113(3): 451-63.

- Baeke, F., E. van Etten, et al. (2008). "Vitamin D signaling in immune-mediated disorders: Evolving insights and therapeutic opportunities." *Mol Aspects Med* 29(6): 376-87.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-52.
- Barker, J. M., K. J. Barriga, et al. (2004). "Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)." *J Clin Endocrinol Metab* 89(8): 3896-902.
- Barnes, K. C. (2010). "An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009." *J Allergy Clin Immunol* 125(1): 16-29 e1-11; quiz 30-1.
- Barnes, P. J. (2008). "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease." *Nat Rev Immunol* 8(3): 183-92.
- Barrat, F. J., D. J. Cua, et al. (2002). "In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines." *J Exp Med* 195(5): 603-16.
- Battaglia, M., C. Gianfrani, et al. (2004). "IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance." *Ann N Y Acad Sci* 1029: 142-53.
- Bauer, S., C. J. Kirschning, et al. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9237-42.
- Bending, D., P. Zacccone, et al. (2012). "Inflammation and type one diabetes." *Int Immunol* 24(6): 339-46.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* 441(7090): 235-8.
- Beyer, K., R. Nickel, et al. (2000). "Association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers." *J Invest Dermatol* 115(5): 906-8.
- Bieber, T., H. de la Salle, et al. (1992). "Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI)." *J Exp Med* 175(5): 1285-90.
- Bingley, P. J., E. Bonifacio, et al. (1994). "Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus." *Lancet* 344(8917): 266-7.
- Blanco, P., A. K. Palucka, et al. (2008). "Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases." *Cytokine Growth Factor Rev* 19(1): 41-52.
- Blom, B., S. Ho, et al. (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." *J Exp Med* 192(12): 1785-96.
- Bluestone, J. A. and A. K. Abbas (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." *Nat Rev Immunol* 3(3): 253-7.
- Bogiatzi, S. I., I. Fernandez, et al. (2007). "Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes." *J Immunol* 178(6): 3373-7.
- Bondanza, A., V. S. Zimmermann, et al. (2003). "Cutting edge: dissociation between autoimmune response and clinical disease after vaccination with dendritic cells." *J Immunol* 170(1): 24-7.
- Bonecchi, R., G. Bianchi, et al. (1998). "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." *J Exp Med* 187(1): 129-34.
- Boniface, S., V. Koscher, et al. (2003). "Assessment of T lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: a flow cytometry study." *Clin Exp Allergy* 33(9): 1238-43.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, et al. (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major

- histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance." *J Exp Med* 196(12): 1627-38.
- Bradwell, A. (2006). Serum free light chain analysis. Birmingham, The Binding Site Ltd.
- Bradwell, A. R., H. D. Carr-Smith, et al. (2001). "Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine." *Clin Chem* 47(4): 673-80.
- Brusko, T. M., C. H. Wasserfall, et al. (2005). "Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-cells in type 1 diabetes." *Diabetes* 54(5): 1407-14.
- Burrows, B., F. D. Martinez, et al. (1989). "Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens." *N Engl J Med* 320(5): 271-7.
- Calderon, B., A. Suri, et al. (2008). "Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(16): 6121-6.
- Callard, R. E., R. Hamvas, et al. (2002). "An interaction between the IL-4Ralpha gene and infection is associated with atopic eczema in young children." *Clin Exp Allergy* 32(7): 990-3.
- Cao, W. and Y. J. Liu (2007). "Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells." *Curr Opin Immunol* 19(1): 24-30.
- Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1994). "B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells." *J Exp Med* 180(5): 1841-7.
- Cella, M., A. Engering, et al. (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." *Nature* 388(6644): 782-7.
- Coban, C., K. J. Ishii, et al. (2005). "Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin." *J Exp Med* 201(1): 19-25.
- Coban, C., K. J. Ishii, et al. (2007). "Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria." *Int Immunol* 19(1): 67-79.
- Contreras, J. P., N. P. Ly, et al. (2003). "Allergen-induced cytokine production, atopic disease, IgE, and wheeze in children." *J Allergy Clin Immunol* 112(6): 1072-7.
- Cosmi, L., F. Annunziato, et al. (2000). "CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease." *Eur J Immunol* 30(10): 2972-9.
- D'Ambrosio, D., A. Iellem, et al. (1998). "Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells." *J Immunol* 161(10): 5111-5.
- D'Ambrosio, D., M. Mariani, et al. (2001). "Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation." *Am J Respir Crit Care Med* 164(7): 1266-75.
- D'Souza, W., S. Lewis, et al. (1999). "The prevalence of asthma symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy in New Zealand adults." *N Z Med J* 112(1089): 198-202.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, et al. (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> effector T cells." *Nat Immunol* 9(12): 1347-55.
- Das, A. M., K. G. Vaddi, et al. (2006). "Selective inhibition of eosinophil influx into the lung by small molecule CC chemokine receptor 3 antagonists in mouse models of allergic inflammation." *J Pharmacol Exp Ther* 318(1): 411-7.
- Davidson, T. S., R. J. DiPaolo, et al. (2007). "Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells." *J Immunol* 178(7): 4022-6.
- Davies, J. L., Y. Kawaguchi, et al. (1994). "A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes." *Nature* 371(6493): 130-6.

- de Heer, H. J., H. Hammad, et al. (2004). "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen." *J Exp Med* 200(1): 89-98.
- Deane, J. A. and S. Bolland (2006). "Nucleic acid-sensing TLRs as modifiers of autoimmunity." *J Immunol* 177(10): 6573-8.
- Del Prete, G. F., M. De Carli, et al. (1993). "Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders." *Eur J Immunol* 23(7): 1445-9.
- Demedts, I. K., G. G. Brusselle, et al. (2005). "Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(3): 177-84.
- Dendrou, C. A. and L. S. Wicker (2008). "The IL-2/CD25 pathway determines susceptibility to T1D in humans and NOD mice." *J Clin Immunol* 28(6): 685-96.
- Detournay, O., N. Mazouz, et al. (2005). "IL-6 produced by type I IFN DC controls IFN-gamma production by regulating the suppressive effect of CD4+ CD25+ regulatory T cells." *Hum Immunol* 66(5): 460-8.
- Devos, S., F. Cormont, et al. (2006). "Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13." *Clin Exp Allergy* 36(2): 174-82.
- Dodge, I. L., M. W. Carr, et al. (2003). "IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses." *J Immunol* 170(9): 4457-64.
- Dotta, F., S. Censini, et al. (2007). "Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12): 5115-20.
- Drescher, K. M., K. Kono, et al. (2004). "Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection." *Virology* 329(2): 381-94.
- Dugas, B., J. C. Renaud, et al. (1993). "Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes." *Eur J Immunol* 23(7): 1687-92.
- Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, et al. (2002). "Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen." *J Exp Med* 196(12): 1645-51.
- Eizirik, D. L., M. L. Colli, et al. (2009). "The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes." *Nat Rev Endocrinol* 5(4): 219-26.
- Elshebani, A., A. Olsson, et al. (2007). "Effects on isolated human pancreatic islet cells after infection with strains of enterovirus isolated at clinical presentation of type 1 diabetes." *Virus Res* 124(1-2): 193-203.
- Emamaullee, J. A., J. Davis, et al. (2009). "Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice." *Diabetes* 58(6): 1302-11.
- Eriksson, U., R. Ricci, et al. (2003). "Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity." *Nat Med* 9(12): 1484-90.
- Erpenbeck, V. J., J. M. Hohlfeld, et al. (2003). "Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics." *Chest* 123(3 Suppl): 370S.
- Esensten, J. H., M. R. Lee, et al. (2009). "T-bet-deficient NOD mice are protected from diabetes due to defects in both T cell and innate immune system function." *J Immunol* 183(1): 75-82.

- Filippi, C. M. and M. G. von Herrath (2010). "99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: viruses, autoimmunity and immunoregulation." *Clin Exp Immunol* 160(1): 113-9.
- Flood-Page, P., C. Swenson, et al. (2007). "A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma." *Am J Respir Crit Care Med* 176(11): 1062-71.
- Forster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." *Cell* 99(1): 23-33.
- Foster, P. S., S. P. Hogan, et al. (1997). "Interleukin-4 and interleukin-5 as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation and allergic airways hyperreactivity." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 Suppl 2: 55-61.
- Friedl, P. and J. Storim (2004). "Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse." *Trends Cell Biol* 14(10): 557-67.
- Gangur, V. and J. J. Oppenheim (2000). "Are chemokines essential or secondary participants in allergic responses?" *Ann Allergy Asthma Immunol* 84(6): 569-79; quiz 579-81.
- Gessner, A., K. Mohrs, et al. (2005). "Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production." *J Immunol* 174(2): 1063-72.
- Gilliet, M. and Y. J. Liu (2002). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* 195(6): 695-704.
- Giulietti, A., C. Gysemans, et al. (2004). "Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice." *Diabetologia* 47(3): 451-62.
- Goldberg, E. and I. Krause (2009). "Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword?" *Autoimmun Rev* 8(8): 682-6.
- Gottenberg, J. E., F. Aucouturier, et al. (2007). "Serum immunoglobulin free light chain assessment in rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome." *Ann Rheum Dis* 66(1): 23-7.
- Gottenberg, J. E. and G. Chiochia (2007). "Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity." *Biochimie* 89(6-7): 856-71.
- Gould, H. J. and B. J. Sutton (2008). "IgE in allergy and asthma today." *Nat Rev Immunol* 8(3): 205-17.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* 185(6): 1101-11.
- Hakonarson, H., C. Carter, et al. (1999). "Altered expression and action of the low-affinity IgE receptor FcepsilonRII (CD23) in asthmatic airway smooth muscle." *J Allergy Clin Immunol* 104(3 Pt 1): 575-84.
- Halapi, E. and H. Hakonarson (2004). "Recent development in genomic and proteomic research for asthma." *Curr Opin Pulm Med* 10(1): 22-30.
- Hamid, Q., T. Naseer, et al. (1996). "In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* 98(1): 225-31.
- Hammad, H., M. Chieppa, et al. (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." *Nat Med* 15(4): 410-6.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht (2006). "Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 118(2): 331-6.
- Han, G., R. Wang, et al. (2010). "Interleukin-17-producing gammadelta+ T cells protect NOD mice from type 1 diabetes through a mechanism involving transforming growth factor-beta." *Immunology* 129(2): 197-206.

- Hannam-Harris, A. C. and J. L. Smith (1981). "Free immunoglobulin light chain synthesis by human foetal liver and cord blood lymphocytes." *Immunology* 43(3): 417-23.
- Harada, M., Y. Kishimoto, et al. (1990). "Prevention of overt diabetes and insulinitis in NOD mice by a single BCG vaccination." *Diabetes Res Clin Pract* 8(2): 85-9.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* 6(11): 1123-32.
- Hartl, D., B. Koller, et al. (2007). "Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T cells in pediatric asthma." *J Allergy Clin Immunol* 119(5): 1258-66.
- Hashimoto, L., C. Habita, et al. (1994). "Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q." *Nature* 371(6493): 161-4.
- Hawiger, D., K. Inaba, et al. (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." *J Exp Med* 194(6): 769-79.
- Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* 410(6832): 1099-103.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* 303(5663): 1526-9.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2003). "The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets." *J Immunol* 170(6): 3059-64.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* 408(6813): 740-5.
- Henson, P. M., D. L. Bratton, et al. (2001). "Apoptotic cell removal." *Curr Biol* 11(19): R795-805.
- Hershey, G. K., M. F. Friedrich, et al. (1997). "The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor." *N Engl J Med* 337(24): 1720-5.
- Heufler, C., F. Koch, et al. (1996). "Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells." *Eur J Immunol* 26(3): 659-68.
- Hiemstra, H. S., N. C. Schloot, et al. (2001). "Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 3988-91.
- Hinkmann, C., I. Knerr, et al. (2008). "Reduced frequency of peripheral plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes." *Horm Metab Res* 40(11): 767-71.
- Hirai, H., K. Tanaka, et al. (2001). "Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2." *J Exp Med* 193(2): 255-61.
- Hogan, S. P., A. Koskinen, et al. (1997). "Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice." *Immunol Cell Biol* 75(3): 284-8.
- Holgate, S. T. (2000). "The role of mast cells and basophils in inflammation." *Clin Exp Allergy* 30 Suppl 1: 28-32.
- Holgate, S. T. (2008). "The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma." *Allergol Int* 57(1): 1-10.
- Holgate, S. T. (2008). "Pathogenesis of asthma." *Clin Exp Allergy* 38(6): 872-97.
- Honkanen, J., J. K. Nieminen, et al. (2010). "IL-17 immunity in human type 1 diabetes." *J Immunol* 185(3): 1959-67.



- Hopper, J. E. and E. Papagiannes (1986). "Evidence by radioimmunoassay that mitogen-activated human blood mononuclear cells secrete significant amounts of light chain Ig unassociated with heavy chain." *Cell Immunol* 101(1): 122-31.
- Horwitz, M. S., A. Ilic, et al. (2004). "Coxsackieviral-mediated diabetes: induction requires antigen-presenting cells and is accompanied by phagocytosis of beta cells." *Clin Immunol* 110(2): 134-44.
- Hoshino, K., O. Takeuchi, et al. (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(7): 3749-52.
- Hultgren, B., X. Huang, et al. (1996). "Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice." *Diabetes* 45(6): 812-7.
- Humbles, A. A., B. Lu, et al. (2002). "The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1479-84.
- Hutchison, C. A., P. Cockwell, et al. (2008). "Quantitative assessment of serum and urinary polyclonal free light chains in patients with type II diabetes: an early marker of diabetic kidney disease?" *Expert Opin Ther Targets* 12(6): 667-76.
- Hyoty, H., M. Hiltunen, et al. (1995). "A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group." *Diabetes* 44(6): 652-7.
- Chen, X., L. H. Makala, et al. (2008). "Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood." *Clin Immunol* 129(3): 413-8.
- Cheng, G., M. Arima, et al. (2002). "Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model." *Am J Respir Crit Care Med* 166(3): 409-16.
- Cho, S. H., L. A. Stanciu, et al. (2005). "Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma." *Am J Respir Crit Care Med* 171(3): 224-30.
- Inaba, K., S. Turley, et al. (2000). "The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli." *J Exp Med* 191(6): 927-36.
- Infante-Duarte, C., H. F. Horton, et al. (2000). "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells." *J Immunol* 165(11): 6107-15.
- Isaksen, D. E., H. Baumann, et al. (2002). "Uncoupling of proliferation and Stat5 activation in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction." *J Immunol* 168(7): 3288-94.
- Ishida, T., T. Ishii, et al. (2006). "The CCR4 as a novel-specific molecular target for immunotherapy in Hodgkin lymphoma." *Leukemia* 20(12): 2162-8.
- Ishii, K. J., C. Coban, et al. (2006). "A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA." *Nat Immunol* 7(1): 40-8.
- Ito, T., Y. H. Wang, et al. (2005). "TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand." *J Exp Med* 202(9): 1213-23.
- Ito, T., M. Yang, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand." *J Exp Med* 204(1): 105-15.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* 126(6): 1121-33.
- Jahnsen, F. L., E. Gran, et al. (2004). "Human nasal mucosa contains antigen-presenting cells of strikingly different functional phenotypes." *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(1): 31-7.

- Jain, R., D. M. Tartar, et al. (2008). "Innocuous IFN $\gamma$  induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production." *J Exp Med* 205(1): 207-18.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "The priming of helper T cells." *Semin Immunol* 1(1): 13-20.
- Jego, G., A. K. Palucka, et al. (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." *Immunity* 19(2): 225-34.
- Johansson, A. K., S. Sergejeva, et al. (2004). "Allergen-induced traffic of bone marrow eosinophils, neutrophils and lymphocytes to airways." *Eur J Immunol* 34(11): 3135-45.
- Jokiranta, T. S., A. Solomon, et al. (1999). "Nephritogenic lambda light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H." *J Immunol* 163(8): 4590-6.
- Jutel, M., M. Akdis, et al. (2003). "IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy." *Eur J Immunol* 33(5): 1205-14.
- Kabesch, M., M. Schedel, et al. (2006). "IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma." *J Allergy Clin Immunol* 117(2): 269-74.
- Kao, C. Y., F. Huang, et al. (2005). "Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathway." *J Immunol* 175(10): 6676-85.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* 3(12): 984-93.
- Katz, J. D., C. Benoist, et al. (1995). "T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes." *Science* 268(5214): 1185-8.
- Kaur, D., R. Saunders, et al. (2006). "Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma." *Am J Respir Crit Care Med* 174(11): 1179-88.
- Kearley, J., J. E. Barker, et al. (2005). "Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent." *J Exp Med* 202(11): 1539-47.
- Kelly-Welch, A. E., E. M. Hanson, et al. (2003). "Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps." *Science* 300(5625): 1527-8.
- Kim, H. S. and M. S. Lee (2009). "Role of innate immunity in triggering and tuning of autoimmune diabetes." *Curr Mol Med* 9(1): 30-44.
- Kimpimaki, T., A. Kupila, et al. (2001). "The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study." *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 4782-8.
- King, M. L., A. Shaikh, et al. (1983). "Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus." *Lancet* 1(8339): 1397-9.
- Kips, J. C., B. J. O'Connor, et al. (2003). "Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study." *Am J Respir Crit Care Med* 167(12): 1655-9.
- Kisselgof, A. B. and H. C. Oettgen (1998). "The expression of murine B cell CD23, in vivo, is regulated by its ligand, IgE." *Int Immunol* 10(9): 1377-84.
- KleinJan, A., J. G. Vinke, et al. (2000). "Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients." *Eur Respir J* 15(3): 491-7.
- Kobayashi, Y., N. Kondo, et al. (1994). "Predictive values of cord blood IgE and cord blood lymphocyte responses to food antigens in allergic disorders during infancy." *J Allergy Clin Immunol* 94(5): 907-16.

- Kolb-Maurer, A., M. Wilhelm, et al. (2002). "Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens." *Blood* 100(10): 3703-9.
- Kraneveld, A. D., M. Kool, et al. (2005). "Elicitation of allergic asthma by immunoglobulin free light chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5): 1578-83.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, et al. (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." *Nat Immunol* 6(12): 1219-27.
- Krug, A., S. Rothenfusser, et al. (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* 31(7): 2154-63.
- Krug, N., J. Madden, et al. (1996). "T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma." *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(4): 319-26.
- Kumagai, Y., O. Takeuchi, et al. (2008). "Pathogen recognition by innate receptors." *J Infect Chemother* 14(2): 86-92.
- Kung, T. T., B. Luo, et al. (2001). "Effect of anti-mIL-9 antibody on the development of pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(5): 600-5.
- Kuperman, D. A., X. Huang, et al. (2002). "Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma." *Nat Med* 8(8): 885-9.
- Kuwata, S., M. Yanagisawa, et al. (1994). "Polymorphisms of transporter associated with antigen processing genes in atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* 94(3 Pt 2): 565-74.
- Laan, M., L. Palmberg, et al. (2002). "Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways." *Eur Respir J* 19(3): 534-7.
- Lafaille, J. J. (1998). "The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases." *Cytokine Growth Factor Rev* 9(2): 139-51.
- Lambrecht, B. N., M. De Veerman, et al. (2000). "Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation." *J Clin Invest* 106(4): 551-9.
- Lambrecht, B. N., B. Salomon, et al. (1998). "Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice." *J Immunol* 160(8): 4090-7.
- Lang, K. S., M. Recher, et al. (2005). "Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease." *Nat Med* 11(2): 138-45.
- Lange, J., G. Ngoumou, et al. (2003). "High interleukin-13 production by phytohaemagglutinin- and Der p 1-stimulated cord blood mononuclear cells is associated with the subsequent development of atopic dermatitis at the age of 3 years." *Clin Exp Allergy* 33(11): 1537-43.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* 201(2): 233-40.
- Lawson, J. M., J. Tremble, et al. (2008). "Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* 154(3): 353-9.
- Leckie, M. J., A. ten Brinke, et al. (2000). "Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response." *Lancet* 356(9248): 2144-8.
- Lee, H. J., S. J. Ha, et al. (2001). "Distribution of HLA-A, B alleles and polymorphisms of TAP and LMP genes in Korean patients with atopic dermatitis." *Clin Exp Allergy* 31(12): 1867-74.

- Lehuen, A., J. Diana, et al. (2010). "Immune cell crosstalk in type 1 diabetes." *Nat Rev Immunol* 10(7): 501-13.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86(6): 973-83.
- Leung, D. Y., N. Jain, et al. (2003). "New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis." *Curr Opin Immunol* 15(6): 634-8.
- Leung, S., X. Liu, et al. (2010). "The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease." *Cell Mol Immunol* 7(3): 182-9.
- Lewkowich, I. P., N. S. Herman, et al. (2005). "CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function." *J Exp Med* 202(11): 1549-61.
- Li, C. R., B. J. Baaten, et al. (2012). "Harnessing memory adaptive regulatory T cells to control autoimmunity in type 1 diabetes." *J Mol Cell Biol* 4(1): 38-47.
- Li, Q. and H. O. McDevitt (2011). "The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse." *Clin Immunol* 140(1): 3-7.
- Lindley, S., C. M. Dayan, et al. (2005). "Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes." *Diabetes* 54(1): 92-9.
- Ling, E. M., T. Smith, et al. (2004). "Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease." *Lancet* 363(9409): 608-15.
- Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL." *Nat Immunol* 3(9): 822-9.
- Liu, X., T. H. Beaty, et al. (2004). "Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study." *J Allergy Clin Immunol* 113(3): 489-95.
- Lo, J., R. H. Peng, et al. (2006). "Peptide-pulsed immature dendritic cells reduce response to beta cell target antigens and protect NOD recipients from type I diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 1079: 153-6.
- Ludewig, B., B. Odermatt, et al. (1998). "Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue." *J Exp Med* 188(8): 1493-501.
- Luopajarvi, K., E. Savilahti, et al. (2008). "Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood." *Pediatr Diabetes* 9(5): 434-41.
- Ma, W., P. J. Bryce, et al. (2002). "CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation." *J Clin Invest* 109(5): 621-8.
- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, et al. (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." *J Immunol* 154(10): 5071-9.
- Macfarlane, A. J., O. M. Kon, et al. (2000). "Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin." *J Allergy Clin Immunol* 105(1 Pt 1): 99-107.
- MacGlashan, D., Jr., L. M. Lichtenstein, et al. (1999). "Upregulation of FcepsilonRI on human basophils by IgE antibody is mediated by interaction of IgE with FcepsilonRI." *J Allergy Clin Immunol* 104(2 Pt 1): 492-8.
- Maraskovsky, E., E. Daro, et al. (2000). "In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand." *Blood* 96(3): 878-84.
- Marwaha, A. K., S. Q. Crome, et al. (2010). "Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes." *J Immunol* 185(7): 3814-8.

- Mathew, A., J. A. MacLean, et al. (2001). "Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation." *J Exp Med* 193(9): 1087-96.
- Matsui, T., J. E. Connolly, et al. (2009). "CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions." *J Immunol* 182(11): 6815-23.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.
- Matzinger, P. (1998). "An innate sense of danger." *Semin Immunol* 10(5): 399-415.
- McClymont, S. A., A. L. Putnam, et al. (2012). "Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes." *J Immunol* 186(7): 3918-26.
- McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, et al. (2007). "TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology." *Nat Immunol* 8(12): 1390-7.
- McGuire, H. M., S. Walters, et al. (2011). "Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models." *Diabetes* 60(3): 867-75.
- McKenna, H. J., K. L. Stocking, et al. (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." *Blood* 95(11): 3489-97.
- McLane, M. P., A. Haczku, et al. (1998). "Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(5): 713-20.
- McMillan, S. J., B. Bishop, et al. (2002). "The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity." *J Exp Med* 195(1): 51-7.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." *Curr Opin Immunol* 9(1): 4-9.
- Meier, O. and U. F. Greber (2004). "Adenovirus endocytosis." *J Gene Med* 6 Suppl 1: S152-63.
- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* 106(3): 255-8.
- Miao, D., L. Yu, et al. (2007). "Role of autoantibodies in type 1 diabetes." *Front Biosci* 12: 1889-98.
- Min, B. (2008). "Basophils: what they 'can do' versus what they 'actually do'." *Nat Immunol* 9(12): 1333-9.
- Mochizuki, A., A. R. McEuen, et al. (2003). "The release of basogranulin in response to IgE-dependent and IgE-independent stimuli: validity of basogranulin measurement as an indicator of basophil activation." *J Allergy Clin Immunol* 112(1): 102-8.
- Molet, S., Q. Hamid, et al. (2001). "IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines." *J Allergy Clin Immunol* 108(3): 430-8.
- Mora, J. R., M. Iwata, et al. (2008). "Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage." *Nat Rev Immunol* 8(9): 685-98.
- Moser, M. (2003). "Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?" *Immunity* 19(1): 5-8.
- Mueller, R., L. M. Bradley, et al. (1997). "Mechanism underlying counterregulation of autoimmune diabetes by IL-4." *Immunity* 7(3): 411-8.
- Mueller, T. D., J. L. Zhang, et al. (2002). "Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system." *Biochim Biophys Acta* 1592(3): 237-50.

- Nagata, K., H. Hirai, et al. (1999). "CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s)." *FEBS Lett* 459(2): 195-9.
- Nakae, S., Y. Komiyama, et al. (2002). "Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses." *Immunity* 17(3): 375-87.
- Neaville, W. A., C. Tisler, et al. (2003). "Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life." *J Allergy Clin Immunol* 112(4): 740-6.
- Nicoletti, F., P. Zacccone, et al. (1996). "The effects of a nonimmunogenic form of murine soluble interferon-gamma receptor on the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse." *Endocrinology* 137(12): 5567-75.
- Nieminen, J. K., J. Vakkila, et al. (2012). "Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes." *Diabetes Care* 35(11): 2303-10.
- Niess, J. H. and H. C. Reinecker (2005). "Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract." *Curr Opin Gastroenterol* 21(6): 687-91.
- Nikoopour, E., J. A. Schwartz, et al. (2010). "Th17 polarized cells from nonobese diabetic mice following mycobacterial adjuvant immunotherapy delay type 1 diabetes." *J Immunol* 184(9): 4779-88.
- Nishimura, E., K. Mochizuki, et al. (1999). "Recombinant light chain of human monoclonal antibody HB4C5 as a potentially useful lung cancer-targeting vehicle." *Hum Antibodies* 9(2): 111-24.
- Nistala, K., S. Adams, et al. (2010). "Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33): 14751-6.
- Nouri-Aria, K. T., D. Wilson, et al. (2002). "CCR4 in human allergen-induced late responses in the skin and lung." *Eur J Immunol* 32(7): 1933-8.
- Novak, N., J. P. Allam, et al. (2004). "Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* 114(2): 364-70.
- Novak, N., P. Allam, et al. (2002). "Characterization of monocyte subtypes in the allergic form of atopic eczema/dermatitis syndrome." *Allergy* 57(10): 931-5.
- Novak, N. and T. Bieber (2005). "The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis." *J Am Acad Dermatol* 53(2 Suppl 2): S171-6.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, et al. (2002). "Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus." *J Exp Med* 196(10): 1307-19.
- O'Reilly, L. A., P. R. Hutchings, et al. (1991). "Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression." *Eur J Immunol* 21(5): 1171-80.
- Ochi, H., W. M. Hirani, et al. (1999). "T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro." *J Exp Med* 190(2): 267-80.
- Ostroukhova, M., C. Seguin-Devaux, et al. (2004). "Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3." *J Clin Invest* 114(1): 28-38.
- Ouyang, W., S. H. Ranganath, et al. (1998). "Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism." *Immunity* 9(5): 745-55.
- Owerbach, D., A. Lernmark, et al. (1983). "Detection of HLA-D/DR-related DNA polymorphism in HLA-D homozygous typing cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(12): 3758-61.

- Palmer, C. N., A. D. Irvine, et al. (2006). "Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis." *Nat Genet* 38(4): 441-6.
- Palmqvist, C., A. J. Wardlaw, et al. (2007). "Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma." *Br J Pharmacol* 151(6): 725-36.
- Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* 6(11): 1133-41.
- Parronchi, P., R. Manetti, et al. (1991). "Cytokine production by allergen (Der pI)-specific CD4+ T cell clones derived from a patient with severe atopic disease." *Int J Clin Lab Res* 21(2): 186-9.
- Pelkmans, L. and A. Helenius (2003). "Insider information: what viruses tell us about endocytosis." *Curr Opin Cell Biol* 15(4): 414-22.
- Peng, R., Y. Li, et al. (2003). "Abnormal peripheral blood dendritic cell populations in type 1 diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 1005: 222-5.
- Petit-Frere, C., B. Dugas, et al. (1993). "Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes." *Immunology* 79(1): 146-51.
- Pierre, P., S. J. Turley, et al. (1997). "Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells." *Nature* 388(6644): 787-92.
- Pisetsky, D. S. (2008). "The role of innate immunity in the induction of autoimmunity." *Autoimmun Rev* 8(1): 69-72.
- Platts-Mills, T. A. (2002). "The role of allergens in the induction of asthma." *Curr Allergy Asthma Rep* 2(2): 175-80.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282(5396): 2085-8.
- Pope, S. M., N. Zimmermann, et al. (2005). "The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia." *J Immunol* 175(8): 5341-50.
- Pulendran, B., J. Banchereau, et al. (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." *J Immunol* 165(1): 566-72.
- Putnam, A. L., F. Vendrame, et al. (2005). "CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes." *J Autoimmun* 24(1): 55-62.
- Rabinovitch, A. (1994). "Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation?" *Diabetes* 43(5): 613-21.
- Radinger, M., A. K. Johansson, et al. (2004). "Eotaxin-2 regulates newly produced and CD34 airway eosinophils after allergen exposure." *J Allergy Clin Immunol* 113(6): 1109-16.
- Rainbow, D. B., L. Esposito, et al. (2008). "Commonality in the genetic control of Type 1 diabetes in humans and NOD mice: variants of genes in the IL-2 pathway are associated with autoimmune diabetes in both species." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3): 312-5.
- Randolph, D. A., C. J. Carruthers, et al. (1999). "Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma." *J Immunol* 162(4): 2375-83.
- Ravensberg, A. J., F. L. Ricciardolo, et al. (2005). "Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge." *J Allergy Clin Immunol* 115(4): 779-85.
- Ray, A. and L. Cohn (1999). "Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation." *J Clin Invest* 104(8): 985-93.
- Redegeld, F. A. and F. P. Nijkamp (2003). "Immunoglobulin free light chains and mast cells: pivotal role in T-cell-mediated immune reactions?" *Trends Immunol* 24(4): 181-5.

- Redegeld, F. A., M. W. van der Heijden, et al. (2002). "Immunoglobulin-free light chains elicit immediate hypersensitivity-like responses." *Nat Med* 8(7): 694-701.
- Reich, K., G. Westphal, et al. (2003). "Cytokine gene polymorphisms in atopic dermatitis." *Br J Dermatol* 148(6): 1237-41.
- Reis e Sousa, C., A. Sher, et al. (1999). "The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection." *Curr Opin Immunol* 11(4): 392-9.
- Rescigno, M., M. Urbano, et al. (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." *Nat Immunol* 2(4): 361-7.
- Risma, K. A., N. Wang, et al. (2002). "V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function." *J Immunol* 169(3): 1604-10.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." *Science* 283(5405): 1183-6.
- Robinson, D., Q. Hamid, et al. (1993). "Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma." *J Allergy Clin Immunol* 92(2): 313-24.
- Roep, B. O., F. S. Kleijwegt, et al. (2010). "Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* 159(3): 338-43.
- Romagnani, P., A. De Paulis, et al. (1999). "Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines." *Am J Pathol* 155(4): 1195-204.
- Romagnani, S. (1994). "Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy." *Curr Opin Immunol* 6(6): 838-46.
- Rosenwasser, L. J., W. W. Busse, et al. (2003). "Allergic asthma and an anti-CD23 mAb (IDEC-152): results of a phase I, single-dose, dose-escalating clinical trial." *J Allergy Clin Immunol* 112(3): 563-70.
- Rot, A. and U. H. von Andrian (2004). "Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells." *Annu Rev Immunol* 22: 891-928.
- Rothenberg, M. E. and S. P. Hogan (2006). "The eosinophil." *Annu Rev Immunol* 24: 147-74.
- Sadelain, M. W., H. Y. Qin, et al. (1990). "Prevention of type I diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy." *Diabetes* 39(5): 583-9.
- Saeki, H., S. Kuwata, et al. (1994). "HLA and atopic dermatitis with high serum IgE levels." *J Allergy Clin Immunol* 94(3 Pt 2): 575-83.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* 22: 531-62.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, et al. (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." *Nat Rev Immunol* 10(7): 490-500.
- Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi (2005). "Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease." *Int Rev Immunol* 24(3-4): 211-26.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-64.
- Savinov, A. Y., F. S. Wong, et al. (2001). "IFN-gamma affects homing of diabetogenic T cells." *J Immunol* 167(11): 6637-43.
- Sengler, C., S. Lau, et al. (2002). "Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments." *Respir Res* 3: 7.
- Setoguchi, R., S. Hori, et al. (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." *J Exp Med* 201(5): 723-35.



- Shimbara, A., P. Christodouloupoulos, et al. (2000). "IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma." *J Allergy Clin Immunol* 105(1 Pt 1): 108-15.
- Shoenfeld, Y., B. Gilburd, et al. (2008). "The mosaic of autoimmunity: genetic factors involved in autoimmune diseases--2008." *Isr Med Assoc J* 10(1): 3-7.
- Schatz, D. A., D. J. Barrett, et al. (1988). "Polyclonal nature of islet cell antibodies in insulin-dependent diabetes." *Autoimmunity* 1(1): 45-50.
- Schmitz, J., A. Thiel, et al. (1994). "Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells." *J Exp Med* 179(4): 1349-53.
- Schneider, A., M. Rieck, et al. (2008). "The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells." *J Immunol* 181(10): 7350-5.
- Schnyder-Candrian, S., D. Togbe, et al. (2006). "Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma." *J Exp Med* 203(12): 2715-25.
- Schultz Larsen, F. (1993). "Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample." *J Am Acad Dermatol* 28(5 Pt 1): 719-23.
- Soderhall, C., M. Bradley, et al. (2002). "Analysis of association and linkage for the interleukin-4 and interleukin-4 receptor b;alpha; regions in Swedish atopic dermatitis families." *Clin Exp Allergy* 32(8): 1199-202.
- Soderhall, C., I. Marenholz, et al. (2007). "Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis." *PLoS Biol* 5(9): e242.
- Sochorova, K., V. Budinsky, et al. (2009). "Paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) exert potent immunomodulatory effects on dendritic cells and inhibit induction of antigen-specific T cells." *Clin Immunol* 133(1): 69-77.
- Sokol, C. L., N. Q. Chu, et al. (2009). "Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response." *Nat Immunol* 10(7): 713-20.
- Soumelis, V., P. A. Reche, et al. (2002). "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP." *Nat Immunol* 3(7): 673-80.
- Steenwinckel, V., J. Louahed, et al. (2007). "IL-13 mediates in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells." *J Immunol* 178(5): 3244-51.
- Steinman, R. M. (2003). "Some interfaces of dendritic cell biology." *Apmis* 111(7-8): 675-97.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* 137(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.
- Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." *J Exp Med* 191(3): 411-6.
- Stewart, T. A., B. Hultgren, et al. (1993). "Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice." *Science* 260(5116): 1942-6.
- Stockinger, B. and M. Veldhoen (2007). "Differentiation and function of Th17 T cells." *Curr Opin Immunol* 19(3): 281-6.
- Strickland, D. H., P. A. Stumbles, et al. (2006). "Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Exp Med* 203(12): 2649-60.
- Summers, K. L., M. T. Behme, et al. (2003). "Characterization of dendritic cells in humans with type 1 diabetes." *Ann N Y Acad Sci* 1005: 226-9.
- Sung, S., C. E. Rose, et al. (2001). "Intratracheal priming with ovalbumin- and ovalbumin 323-339 peptide-pulsed dendritic cells induces airway hyperresponsiveness, lung eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and inflammation." *J Immunol* 166(2): 1261-71.

- Sutherland, A. P., T. Van Belle, et al. (2009). "Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice." *Diabetes* 58(5): 1144-55.
- Takaoka, A., H. Yanai, et al. (2005). "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors." *Nature* 434(7030): 243-9.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* 11(4): 443-51.
- Takeuchi, O., T. Kawai, et al. (2001). "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." *Int Immunol* 13(7): 933-40.
- Takeuchi, O., S. Sato, et al. (2002). "Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins." *J Immunol* 169(1): 10-4.
- Takeuchi, O., K. Takeda, et al. (2000). "Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades." *Int Immunol* 12(1): 113-7.
- Takiishi, T., C. Gysemans, et al. (2012). "Vitamin D and diabetes." *Rheum Dis Clin North Am* 38(1): 179-206.
- Tang, Q., J. Y. Adams, et al. (2008). "Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction." *Immunity* 28(5): 687-97.
- Tarbell, K. V., S. Yamazaki, et al. (2004). "CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med* 199(11): 1467-77.
- Tarbell, K. V., S. Yamazaki, et al. (2006). "The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity." *Semin Immunol* 18(2): 93-102.
- Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, et al. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." *Annu Rev Immunol* 23: 307-36.
- Thomson, G., A. M. Valdes, et al. (2007). "Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis." *Tissue Antigens* 70(2): 110-27.
- Tisch, R. and B. Wang (2009). "Role of plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes: friend or foe?" *Diabetes* 58(1): 12-3.
- Toda, M., D. Y. Leung, et al. (2003). "Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions." *J Allergy Clin Immunol* 111(4): 875-81.
- Todd, J. A. (2010). "Etiology of type 1 diabetes." *Immunity* 32(4): 457-67.
- TRIGR, s. (2007). "Study design of the Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR)." *Pediatr Diabetes* 8(3): 117-37.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.
- Tsai, S., A. Shameli, et al. (2008). "CD8+ T cells in type 1 diabetes." *Adv Immunol* 100: 79-124.
- Tsicopoulos, A., A. Shimbara, et al. (2004). "Involvement of IL-9 in the bronchial phenotype of patients with nasal polyposis." *J Allergy Clin Immunol* 113(3): 462-9.
- Uematsu, S. and S. Akira (2006). "The role of Toll-like receptors in immune disorders." *Expert Opin Biol Ther* 6(3): 203-14.
- Uematsu, S., M. H. Jang, et al. (2006). "Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells." *Nat Immunol* 7(8): 868-74.
- Ueno, H., E. Klechevsky, et al. (2007). "Dendritic cell subsets in health and disease." *Immunol Rev* 219: 118-42.

- Uguccioni, M., C. R. Mackay, et al. (1997). "High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines." *J Clin Invest* 100(5): 1137-43.
- Upham, J. W. (2003). "The role of dendritic cells in immune regulation and allergic airway inflammation." *Respirology* 8(2): 140-8.
- van den Beucken, T., N. van Neer, et al. (2001). "Building novel binding ligands to B7.1 and B7.2 based on human antibody single variable light chain domains." *J Mol Biol* 310(3): 591-601.
- van der Heijden, F. L., E. A. Wierenga, et al. (1991). "High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin." *J Invest Dermatol* 97(3): 389-94.
- van der Heijden, M., A. Kraneveld, et al. (2006). "Free immunoglobulin light chains as target in the treatment of chronic inflammatory diseases." *Eur J Pharmacol* 533(1-3): 319-26.
- van der Werf, N., J. L. Hillebrands, et al. (2003). "Cytomegalovirus infection modulates cellular immunity in an experimental model for autoimmune diabetes." *Clin Dev Immunol* 10(2-4): 153-60.
- Van Eerdewegh, P., R. D. Little, et al. (2002). "Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness." *Nature* 418(6896): 426-30.
- van Houwelingen, A. H., K. Kaczynska, et al. (2007). "Topical application of F991, an immunoglobulin free light chain antagonist, prevents development of contact sensitivity in mice." *Clin Exp Allergy* 37(2): 270-5.
- van Rijt, L. S. and B. N. Lambrecht (2005). "Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization." *Clin Exp Allergy* 35(9): 1125-34.
- van Rijt, L. S., J. B. Prins, et al. (2002). "Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31(hi)Ly-6C(neg) bone marrow precursors in a mouse model of asthma." *Blood* 100(10): 3663-71.
- van Vliet, S. J., J. den Dunnen, et al. (2007). "Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity." *Curr Opin Immunol* 19(4): 435-40.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* 24(2): 179-89.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." *Nat Immunol* 9(12): 1341-6.
- Verhagen, J., K. Blaser, et al. (2006). "Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: T-regulatory cells and more." *Immunol Allergy Clin North Am* 26(2): 207-31, vi.
- Vermaelen, K. Y., D. Cataldo, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma." *J Immunol* 171(2): 1016-22.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* 8(7): 523-32.
- von Herrath, M. G. and M. B. Oldstone (1997). "Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus." *J Exp Med* 185(3): 531-9.
- Vuckovic, S., G. Withers, et al. (2007). "Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children." *Clin Immunol* 123(3): 281-8.
- Walker, C., E. Bode, et al. (1992). "Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage." *Am Rev Respir Dis* 146(1): 109-15.

- Wall, J. S., F. M. Ayoub, et al. (1996). "A study of the interactions of an immunoglobulin light chain with artificial and B-lymphocyte membranes." *Front Biosci* 1: a46-58.
- Wang, B., I. Andre, et al. (1997). "Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13844-9.
- Wang, Z. Y., S. Kusam, et al. (2006). "Regulation of Th2 cytokine expression in NKT cells: unconventional use of Stat6, GATA-3, and NFAT2." *J Immunol* 176(2): 880-8.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, et al. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* 24(6): 677-88.
- Weber, S. E., J. Harbertson, et al. (2006). "Adaptive islet-specific regulatory CD4 T cells control autoimmune diabetes and mediate the disappearance of pathogenic Th1 cells in vivo." *J Immunol* 176(8): 4730-9.
- Weidinger, S., T. Illig, et al. (2006). "Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations." *J Allergy Clin Immunol* 118(1): 214-9.
- Weiner, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." *Immunol Rev* 182: 207-14.
- Wenzel, S. E., S. Balzar, et al. (2003). "Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair." *J Allergy Clin Immunol* 111(6): 1345-52.
- Wicklow, B. A. and S. P. Taback (2006). "Feasibility of a type 1 diabetes primary prevention trial using 2000 IU vitamin D3 in infants from the general population with increased HLA-associated risk." *Ann N Y Acad Sci* 1079: 310-2.
- Willcox, A., S. J. Richardson, et al. (2009). "Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* 155(2): 173-81.
- Wills-Karp, M. (2000). "Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma." *Immunopharmacology* 48(3): 263-8.
- Wills-Karp, M. (2004). "Interleukin-13 in asthma pathogenesis." *Immunol Rev* 202: 175-90.
- Wilson, N. J., K. Boniface, et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nat Immunol* 8(9): 950-7.
- Wing, K., Z. Fehervari, et al. (2006). "Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells." *Int Immunol* 18(7): 991-1000.
- Wollenberg, A., S. Kraft, et al. (1996). "Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema." *J Invest Dermatol* 106(3): 446-53.
- Wollenberg, A., M. Wagner, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases." *J Invest Dermatol* 119(5): 1096-102.
- Wong, F. S., C. Hu, et al. (2010). "To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes." *Curr Opin Immunol* 22(6): 723-31.
- Woodward, A. L., J. M. Spergel, et al. (2001). "An obligate role for T-cell receptor alphabeta+ T cells but not T-cell receptor gammadelta+ T cells, B cells, or CD40/CD40L interactions in a mouse model of atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* 107(2): 359-66.
- Wynn, T. A. (2009). "Basophils trump dendritic cells as APCs for T(H)2 responses." *Nat Immunol* 10(7): 679-81.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." *Science* 301(5633): 640-3.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." *Nature* 420(6913): 324-9.

- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." *Nat Immunol* 4(11): 1144-50.
- Yanagihara, Y., K. Kajiwara, et al. (1998). "Cultured basophils but not cultured mast cells induce human IgE synthesis in B cells after immunologic stimulation." *Clin Exp Immunol* 111(1): 136-43.
- Yang, D., Q. Chen, et al. (2008). "Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses." *J Exp Med* 205(1): 79-90.
- Yang, Z., M. Chen, et al. (2004). "Autoimmune diabetes is blocked in Stat4-deficient mice." *J Autoimmun* 22(3): 191-200.
- Ying, S., B. O'Connor, et al. (2005). "Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity." *J Immunol* 174(12): 8183-90.
- Zaccone, P., Z. Fehervari, et al. (2003). "Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes." *Eur J Immunol* 33(5): 1439-49.
- Zaccone, P., T. Raine, et al. (2004). "Salmonella typhimurium infection halts development of type 1 diabetes in NOD mice." *Eur J Immunol* 34(11): 3246-56.
- Zelensky, A. N. and J. E. Greedy (2005). "The C-type lectin-like domain superfamily." *Febs J* 272(24): 6179-217.
- Zhang, D. H., L. Yang, et al. (1999). "Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3." *Immunity* 11(4): 473-82.
- Zhao, Y., J. Yang, et al. (2010). "Th17 immunity in patients with allergic asthma." *Int Arch Allergy Immunol* 151(4): 297-307.
- Zheng, S. G., J. D. Gray, et al. (2002). "Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors." *J Immunol* 169(8): 4183-9.
- Zheng, W. and R. A. Flavell (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." *Cell* 89(4): 587-96.
- Zhou, X., S. Bailey-Bucktrout, et al. (2009). "Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells." *Curr Opin Immunol* 21(3): 281-5.
- Zipris, D. (2008). "Innate immunity and its role in type 1 diabetes." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15(4): 326-31.

## Seznam zkratk

AD	atopická dermatitida
ADAM33	desintegráza A a metaloproteináza 33
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AIRE	autoimunitní regulátor
ALPS	autoimunitní lymfoproliferativní syndrom
APC	antigen-prezentující buňka
APECED	autoimunitní polyendocrinopatie-kandidóza-ektodermální dystrofie
APS-1	autoimunitní polyglandulární syndrom 1
BAFF	faktor aktivující B lymfocyty
BAL	bronchoalveolární laváž
BDCA	antigen dendritických buněk v krvi
Bet v 1	<i>Betula verrucosa</i> 1 (hlavní alergen břízy)
BP180	hemidesmosomální protein (kolagen XVII)
CpG	okrsky DNA bohaté na cytosin-guanin
CCL	Chemokinový (C-C motiv) ligand
CCR	Chemokinový (C-C motiv) receptor
CD	cluster of differentiation
CMV	cytomegalovirus
CRTH2	chemoattractant receptor for Th2 cells
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CXCR	chemokinový (C-C motiv) receptor
DC	dendritická buňka
DC-SIGN	DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin
DD	„death“ doména
DEC-205	C-lektinový receptor
Der p1	Dermatophagoides pteronyssinus 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvojvláknová RNA
ECP	eozinofilní kationický protein
ELISA	enzyme-linked immunoassay
FAS	transmembránový protein typu I z rodiny TNF receptorů
FcεRI	vysoce afinní Fc-receptor pro IgE

FcεRII	nízko-afinní Fc-receptor pro IgE (CD23)
FLC	volný lehký řetězec
Flt3	Fms-like Tyrosine Kinase-3
FoxP3	forkhead box P3
GAD	dekarboxyláza kyseliny glutamové
GADA	autoprotilátky proti 65kD isoformě dekarboxylázy kyseliny glutamové
GATA-3	transkripční faktor Th2 lymfocytů
GITR	glukokortikoidem indukovaný gen z TNFR rodiny
GM-CSF	granulocyty a monocyty kolonie stimulující faktor
GPI	glycosylphosfatidylinositol
HMGB1	high mobility group box chromosomal protein 1
HLA	hlavní histokompatibilní komplex
HsP	protein tepelného šoku
IA	antigen ostrůvků (pankreatu)
IAA	autoprotilátky proti insulinu
IA-2A	autoprotilátky proti proteintyrosin-fosfatáze IA-2 molekuly
ICA	autoprotilátky proti buňkám ostrůvků
IDEC	zánětlivé dendritické epitelové buňky
IDEC-152	anti-CD23 monoklonální protilátka (lumiliximab)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IL-4Rα	receptor pro IL-4
ILT-7	imunoglobulinu podobný transkript
IPEX	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
iTregs	indukovaný regulační T lymfocyt
kDa	kilo dalton
LC	Langerhansova buňka
LRR	opakované sekvence bohaté na leucin
LPS	lipopolysacharid
LT	leukotrien
LTA	lipoteichová kyselina
MBP	hlavní bazický protein
MCP	monocyte-specific chemokine

MDC	makrofágy-derivovaný chemokin
MGUS	monoklonální gamapatie neurčeného významu
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	metaloproteináza
mRNA	mesengerová RNA
mDC	myeloidních dendritická buňka
MMTV	myší virus tumoru prsu (mouse mammary tumor virus)
MR	manózový receptor
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF-kB	nukleární faktor kB
NKT	natural killer T cells
NLR	NOD-like receptor (nucleotide-binding oligomerization domain)
NOD	non-obese diabetic mice
nTregs	přirozený regulační T lymfocyt
OVA	ovalbumin
OX40L	ligand OX40 receptoru
PAF	destičky aktivující faktor
PAMP	molekulární motivy asociované s patogenem
PBMC	periferní mononukleární buňky
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD-1	programmed cell death 1
pDC	plasmacytoidní dendritická buňka
PG	prostaglandin
PGI <sub>2</sub>	prostacyklin
Phl p 1	<i>Phleum pretensae</i> 1 (hlavní alergen bojínku)
poly I:C	polyinosinová polycytidylová kyselina
PRR	receptory rozeznávající patogenní motivy
PTPN22	protein tyrosine phosphatase non-receptor 22
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RLH	RIG-I-like helikáza (gen indukovaný kyselinou retinovou 1)
RNA	ribonukleová kyselina
RSV	respirační syncytiální virus
RT-PCR	real-time PCR



SAIT	specifická alergenová imunoterapie
SCID	těžký kombinovaný imunodeficit
SCORAD	skórování systém atopické dermatitidy (SCORing Atopic Dermatitis)
SNP	single nukleotide polymorfism
SPINK5	inhibitor serinové proteázy Kazal typ 5
ssRNA	jednovláknová RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
T1D	diabetes mellitus 1. typu
T-bet	transkripční faktor Th1 lymfocytů
TARC	thymus-asociovaný a regulovaný chemokin
Tc	cytotoxická buňka
TCR	T buněčný receptor (T-cell receptor)
TGF	transformujícím růstovém faktoru
Th	pomocný T lymfocyt (helper T lymphocyte)
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR- domain–containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAM	TRIF-related adaptormolecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TSLP	thymický stromální lymfopoeitin
Tr	regulační T lymfocyt
Tregs	regulační T lymfocyty
TRIGR	Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk
TX	tromboxan

## 11 Seznam vlastních publikací

### Zahraniční publikace

1. **Kayserova J.**, Štechová K., Dudková E., Šumník Z., Koloušková S., Hromádková H., Včeláková J., Ulmannová T., Špišek R., Šedivá A., Numerical and functional alterations in dendritic cells subpopulations in patients with type 1 diabetes and their relatives, Clin. Immunol 2013, manuscript in review
2. Liba-Vrabelova Z, **Kayserová J.**, Komarek V. Frequent Incidence of Lyme Neuroborreliosis in Children in the Czech Republic, Ces Slov Neurol Neurochir. 2013;76(1):63-69. (IF = 0,279)
3. **Kayserova, J.** Sismová K., Zentsová-Jaresova, I, Capkova, S, Vernerova, E, Polouckova, A, Malinova, V, Sediva, A., A prospective study in children with severe form of atopic dermatitis: clinical outcome and cytokine gene polymorphisms, J. Invest. Allergol. Clin. Immunol, Vol 22 (2), March-April 2012 (IF = 1,489)
4. **Kayserova J.**, Zentsova I., Budinsky V., Rozkova D., Kopecka J., Skalicka V., Pohunek P., Sediva A.. Selective increase in BDCA-3 positive dendritic cells in bronchoalveolar lavage of allergic patients, Scand J Immunol 2012, Oct 11 (IF = 1,935)
5. Stechova K., Halbhuber Z., Hubackova M., **Kayserova J.**, Petruzelkova L., Filipp D., Kolouskova S., Stavikova V., Ulmannova T., Faresjo M., Spisek R, Sediva, A, Sumnik Z. Case Report: Type-1 diabetes in HLA identical quadruplets, Eur J Hum Genet 2011, accepted (IF = 4,38)
6. **Kayserova, J.** Skalicka A., Capkova S., Vernerová E., Polouckova A., Malinova V., Bartunkova J., Sediva A. Serum immunoglobulin free light chains in severe forms of atopic dermatitis, Scand J Immunol, 2010, 71:312-316. (IF = 2,108)
7. Bartůňková J., **Kayserová J.**, Shoenfeld Y. Allergy and autoimmunity: Parallels and dissimilarity The Yin and Yang of Immunopathology. Autoimmun Rev. 2009 Feb;8(4):302-8 (IF =5,371)

8. Šedivá A., **Kayserová J.**, Vernerová E., Poloučková A., Čapková Š., Špišek R., Bartůňková J. Anti-CD20 (rituximab) treatment for atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jun;121(6):1515-6; author reply 1516-7. **(IF = 9,773)**
9. Horváth R, Budinský V, **Kayserová J.**, Kalina T, Formánková R, Starý J, Bartůňková J, Sedláček P, Špišek R. Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin Immunol.* 2009 Apr;131(1):60-9. **(IF = 3,606)**

### **Domácí publikace**

1. Horváth R., Budinský V., Žlabová A., **Kayserová J.**, Kalina T., Formánková R., Bartůňková J., Sedláček P., Špišek R. Rekonstituce dendritických buněk po myeloablativní alogenní transplantaci kmenových buněk krvetvorby a její poruchy u akutní GVHD, *Alergie*, 2010, 12(4): 264-271
2. Špišek R., Horváth R., **Kayserová J.**, Bartůňková J. Možnosti protinádorové imunoterapie u karcinomu prostaty. *Lékařské listy*, 2010, 6:9-12.
3. Poloučková A., Čapková Š., **Kayserová J.**, Vernerová E., Bartůňková J., Šedivá A. Možnosti celkové léčby závažných forem atopického ekzému u dětí pohledem imunologa-alergologa, *Referátový výběr z dermatovenerologie*, 2008, 50, 1: 26-36
4. Bartůňková J., Šedivá A. **Kayserová J.**: Alergie a autoimunita - jing a jang imunopatologie. *Alergie*, 2006, 2:107-116.
5. **Kayserová J.**, Seeman T. Periferní obrna lícního nervu jako první příznak těžké hypertenze u dítěte. *Postgrad. medicina*, 2010, 12(3):265-266

6. Janda A., Fencel F., Kabelka Z., Hobstová J., Kroča M., **Kayserová J.**, Bláhová K., Hříbal Z., Lázničková T. Tularémie: vzácná příčina horečky a lymfadenopatie v kojeneckém věku, Česko-slovenská pediatrie, 2007, 63(3):137-147.