

# **Expression of Toll-like Receptor 2 and CD14 on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Infants and Children with Atopic dermatitis**

## **THESIS**

Submitted for partial fulfillment of  
Master Degree in Pediatric

Presented By

**Amany Kamel Eid Ramadan**

M.B.,B.Ch.,

Ain Shams University 1997

Under the supervision of

**Prof. Dr. Mohamed Ashraf Abdelwahed**

Professor of Pediatrics

Faculty of Medicine, Ain Shams University

**Dr. Ghada Ibrahim Gad**

Lecturer of Pediatrics

Faculty of Medicine, Ain Shams University

**Dr. Shereen Fawzy Hafez**

Professor of Microbiology and Immunology

Faculty of Medicine, Ain Shams University

Faculty of Medicine  
Ain Shams University

2009

# ACKNOWLEDGMENT

*First of all and above of all, greatest thanks to ALLAH " The Most Merciful " whose blessing on me can not be counted.*

*My deep gratitude and appreciation to Professor Dr. Mohamed Ashraf Abdelwahed, Professor of pediatrics, Ain Shams University, for his care in advising and helping me as well as for always having time for me. His inspiring guidance, wise comments, interest in the progress and performance of this work and continuous encouragement has helped me throughout this study.*

*I am very grateful to Dr. Ghada Ibrahim Gad, Lecturer of pediatrics, Ain Shams University, for being an excellent supervisor of this work, for submitting her effort and help to me, her constructive comments on this study, valuable suggestions and revision of the text.*

*I wish to express my deep gratitude to Prof. Dr. Shereen Fawzy Hafez, Professor of Microbiology and Immunology, Ain Shams University for her kind supervision, valuable directions and her great efforts.*

# **Expression of Toll-like Receptor 2 and CD14 on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Infants and Children with Atopic dermatitis**

## **THESIS**

Submitted for partial fulfillment of  
Master Degree in Pediatric

Presented By

**Amany Kamel Eid Ramadan**

M.B.,B.Ch.,

Ain Shams University 1997

Under the supervision of

**Prof. Dr. Mohamed Ashraf Abdelwahed**

Professor of Pediatrics

Faculty of Medicine, Ain Shams University

**Dr. Ghada Ibrahim Gad**

Lecturer of Pediatrics

Faculty of Medicine, Ain Shams University

**Dr. Shereen Fawzy Hafez**

Professor of Microbiology and Immunology

Faculty of Medicine, Ain Shams University

Faculty of Medicine

Ain Shams University

2007

The prevalence of atopic dermatitis has been steadily increased and in most countries it affects more than 10% of children at some point during childhood (**Williams et al.,1999**). The inverse association of microbial load and Th2-disorder has led to the formation of the hygienic hypothesis (**Yazdanbakhsh et al.,2002**). This hypothesis postulates that limited exposure to bacterial and viral pathogens during early childhood results in an insufficient stimulation of Th1 cells, which in turn cannot counterbalance the expansion of Th2 cells and results in a predisposition to allergy. On the other hand, constant Th1 triggering balance the immune system (**Holt et al., 2002**). According to this theory, exposure to microorganisms lead to stimulation of innate immune responses, and this helps the immune system to develop in such a way as to inhibit Th2-type responses that lead to allergies and atopic dermatitis.

Innate immune responses are triggered through binding of conserved bacterial components to receptors such as Toll-like receptors (TLRs) and CD14 leading to production of factors such as IL-12 and interferon gamma which are crucial elements required for selective activation of T cells (**Lammas et al., 2000**).

TLRs are a family of proteins that are involved in the initial phase of host defense against invading pathogens. These receptors are abundantly expressed on innate immune cells, such as macrophages and dendritic cells (DCs) and they recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs) (**Janssen and Beyaert, 2003**). So far, 13 receptors have been identified. One of the members of the TLRs, TLR2, has been shown to act as a receptor for diverse bacteria and their products, particularly Gram-positive bacteria (**Aliprantis et al., 1999**).

CD14 is a 55-kDa glycoprotein also essential for the recognition of lipo-polysaccharide (LPS), a major component of Gram-negative bacteria (**Van-Amersfoort et al., 2003**).

Th1- inducing stimuli resulting from engagement of TLR2 and/or CD14 could drive the response to allergen in the direction of Th1 responses and reduce Th2 cytokine production. This could decrease IgE production and eosinophilic influx and prevent allergic inflammation and Airway hyperresponsiveness (AHR).

These observations give a hope that allergic diseases could be prevented via antagonizing Th2 responses by triggering the immune system with TLR2 and CD14 agonists.

### ***AIM OF WORK:***

The aim of this work to study CD14 and TLR2 expression on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in infants and children with atopic dermatitis in order to clarify their potential role in AD and univeil any possible association between the number of PBMCs expressing TLR2/CD14 and the total IgE level.

### ***SUBJECTS AND METHODS:***

The study will include 45 infants and children, divided into 2 groups:

- Patients group: Including atopic dermatitis
- Control group: Including apparently normal, healthy non allergic children, with negative family history of atopy, matched for age and sex with the patient group.

## ***The following will be done for all children:***

### *1- history taking*

A thorough history will be taken emphasizing on history of atopy (infantile eczema, allergic rhinitis, clinical suspicion of cow-milk or other food allergies, family history of atopy), recurrent infections, antibiotic intake, breast feeding, vaccines received and residence.

The frequency and severity of atopic dermatitis attacks, onset of diagnosis of atopic dermatitis and medications received will be taken into consideration.

### *2- Clinical examinations*

General, cardiac, chest, abdominal examinations.

### *3- Complete blood counts, with absolute eosinophilic counts.*

### *4- Determination of serum IgE level*

Commercially available IgE antibodies immunoassay will be used as quantitative sandwich enzyme immunoassay (EIA) technique for measuring IgE antibodies levels in serum of patients and healthy controls.

### *5- Flowcytometric Analysis*

Expression of CD14 and TLR2 on PBMCs will be determined by flowcytometry.

Heparinized blood sample (one sample per patient) will be collected by peripheral venipuncture and incubated with stained monoclonal antibodies; a combination of anti CD14 Alexa-Fluor conjugated and anti TLR2 PE (phycoerythrin) conjugated. Flowcytometry will be performed on a FACS- Caliber with cell Quest software.

## **REFERENCES:**

- 1- **Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett SD, Evaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A.** (1999): Cell activation and bacterial lipoproteins through toll like receptor 2. *Science*; 285,736-739.
- 2- **Holla AD, Roy SR, Liu AH.** (2002): Endotoxin, atopy and asthma. *Curr opin allergy Clin Immunol*; 2:141-145.
- 3- **Janssen S, Beyaert R.** (2003): Role of Toll like receptor in the pathogen recognition. *Clin Microbial Rev*; 16: 637-646.
- 4- **Lammas DA, Casanova JL, Kumararatne DS.** (2000): Clinical consequences of defect in the IL-12 dependent interferone-gamma (IFN-gamma) pathway. *Clin Exp Immunol*; 121:417-125.
- 5- **Van-Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J.** (2003): Receptor, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbial Rev*; 16:379-414.
- 6- **Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, et al.** (1999): Worldwide variation in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the international study of asthma and Allergies in childhood. *J Allergy. Clin Immunol*; 103: 125-38.
- 7- **Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, Van Ree R.** (2002): Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. *Science*; 296:490-494.

ظهور المستقبل شبيه تول رقم 2 ومجموعة التمييز رقم 14 على  
سطح خلايا الدم البيضاء أحادية النواة فى الأطفال والرضع  
المصابين بالآلتهاب الجلدى التحساسى

رسالة

توطئة للحصول على درجة الماجستير فى طب الأطفال

مقدمة من

**الطبيبة /أمانى كامل عيد رمضان**

بكالوريوس الطب والجراحة

جامعة عين شمس/1997

تحت إشراف

**الأستاذ الدكتور/ محمد أشرف عبدالواحد**

أستاذ طب الأطفال

كلية الطب- جامعة عين شمس

**دكتورة/ غادة إبراهيم جاد**

مدرس طب الأطفال

كلية الطب- جامعة عين شمس

**دكتورة/ شيرين فوزى حافظ**

أستاذ البكتريا والمناعة

كلية الطب- جامعة عين شمس

كلية الطب

جامعة عين شمس

2007



إن شيوع مرض التهاب الجلد التحسسى يزداد بصفة ثابتة فى أغلب البلاد ويؤثر على أكثر من 10% من الأطفال فى فترات معينة خلال فترة الطفولة. وقد أوضحت الدراسات الوبائية بأن نقص الخلايا المساعدة 1 (Th1) وزيادة الخلايا المساعدو 2 (Th2) التى تكون مناعة ضد المستضد البروتينى القابل للذوبان والموجود فى البيئة الطبيعية يلعب دورا كبير فى تطور هذا المرض.

وقد أدى وجود علاقة عكسية بين كم التعرض للميكروب واضطرابات الخلايا للمفاوية المناعية المساعدة 2 (Th2) إلى تكوين افتراض صحى، وهذا الافتراض ينص على ان الحد من التعرض للبكتريا والفيروسات خلال فترة الطفولة المبكرة يؤدي إلى قصور فى تنبيه الخلايا المساعدة 1 والتى لا يمكنها ان توازن ازدياد الخلايا المساعدة 2 وينتج عنها زيادة الأستعداد للحساسية ومن ناحية أخرى استمرار تنشيط الخلايا المساعدة 1 يؤدي إلى توازن جهاز المناعة. طبقا لهذه النظرية فأن التعرض للكائنات الدقيقة يؤدي إلى تنبيه المناعة الخلقية وهذا يساعد الجهاز المناعى على تقليل الخلايا المساعدة 2 التى تؤدى إلى الحساسية والألتهاب الجلدى التحسسى.

إن تنبيه المناعة الخلقية يحدث من خلال ارتباط مكونات البكتريا المتواجدة مع المستقبلات مثل المستقبل شبيه تول (TLR) ومجموعة التمييز رقم 14 (CD14) التى تؤدى إلى إنتاج عدة عوامل مثل إنترلوكين 12 (IL-12) والجاما انترفيرون وهما عناصر تنشيط الخلايا المساعدة (T).

المستقبلات شبيهة تول عبارة عن عائلة من البروتينات تعتبر خط الدفاع الأولى ضد غزو الكائن المسبب للمرض. وهذه المستقبلات تعبر عنها خلايا المناعة الخلقية مثل الخلايا البلاعم (macrophages) والخلايا التغصنية (DCs) وهى تتعرف على الطرز الجزيئية المصاحبة للمرض.

وقد تم التعرف على 13 مستقبلا منهم المستقبل شبيه تول رقم 2 والذي يعمل ضد البكتريا ومنتجاتها خاصة البكتريا موجية الجرام. مجموعة التمييز رقم 14 (CD14) عبارة عن 55 كيلو دالتون جليكوبروتين وهى ضرورية جدا فى التعرف على عديد السكريات الشحمية (LPS) والذي يعتبر مكون رئيسى فى البكتريا سالبة الجرام.

وقد أمكن حديثا التوصل إلى تنبيه الخلايا المساعدة 1 الناتج من دمج المستقبلات شبيهة تول (TLRs) و/أو مجموعة التمييز رقم 14 (CD14) تستطيع تغيير مسار الحساسية عن طريق تحفيز الخلايا المساعدة 1 (Th1) ومنع إنتاج السيتوكينات للخلايا المساعدة 2 (Th2 cytokine) وهذا يؤدي إلى نقص الجلوبيولين المناعى E (IgE) ونقص تدفق الخلايا اليوزينية مما يمنع الحساسية. هذه الملاحظات تعطى الأمل بأن الألتهاب الجلدى التحساسى يمكن منعه عن طريق منع تحفيز الخلايا المساعدة 2 عن طريق جهاز المناعة بواسطة المستقبل شبيه تول رقم 2 ومجموعة التمييز رقم 14.

### الهدف من البحث:

دراسة ظهور مجموعة التمييز رقم 14 (CD14) والمستقبل شبيه تول رقم 2 (TLR2) على سطح خلايا الدم البيضاء أحادية النواة لتوضيح دورها الكامن فى مرض الألتهاب الجلدى التحساسى لدى الأطفال والرضع. وتوضيح العلاقة المحتملة بين عدد هذه الخلايا ومستوى الجلوبيولين المناعى E (IgE)

## الأفراد موضع الدراسة والطرق المستخدمة في البحث:

سوف تتضمن الدراسة عدد 45 طفل ورضيع، ويتم تقسيم هؤلاء الأطفال إلى مجموعتين:

- مجموعة المرضى: تشمل أطفال مصابين بالأتهاى الجلدى التحساسى
  - مجموعة ضابطة: تشمل أطفال أصحاء متجانسين من ناحية الجنس والسن
- لمجموعة البحث ولا يوجد لديهم تاريخ مرضى أو أسرى لأى أمراض حساسية.

## يتم عمل الأتى للأطفال أثناء البحث:

1. التاريخ المرضى:  
وذلك للتأكد على التاريخ المرضى للحساسية والأعراض الطبية المختلفة لها، تكرار الأمراض المعدية، استخدام المضادات الحيوية، الرضاعة الطبيعية، التطعيم، السكن، تكرار وقوة الألتهاى الجلدى التحساسى وطريقة علاجها ونوع الأدوية المستخدمة.
2. الكشف الأكلينيكي:  
فحص طبى شامل مع الكشف على الصدر والقلب والبطن.
3. صورة دم كاملة مع عد نوعى لخلايا الدم البيضاء ذات الصبغة الحمضية.
4. قياس مستوى الجلوبيولين المناعى E (IgE):  
تستخدم مضادات الجلوبيولين المناعى E (IgE) المتاحة بطريقة شطيرية كمية لقياس المناعة الأنزيمية لمضادات الجلوبيولين المناعى للأطفال موضع الدراسة.
5. تحليل عد الكريات الأنسيابى:

تعبير المستقبل الشبيه بالتول رقم 2 (TLR2) ومجموعة التمييز رقم 14 (CD14) على الخلايا أحادية النواة (PBMCs) تقدر بالعد للكريات الأنسيابى. تجمع عينات دم مضاف إليها هيبارين (عينة من كل مريض) وذلك عن طريق وخز الوريد وتحفظ العينة مع أجسام مضادة أحادية النسيلة مصبوغة عندها سيحدث اتحاد من مضادات Fuor CD14 Alexa المتحد ومضادات عن TLR2 المتحد، ويتم بواسطة جهاز Caliber a FACE مع المواد المعدة للاستخدام.

# *List of Abbreviations*

Abbrev.	Meaning
<b><math>\alpha</math></b> .....	Alpha
<b><math>\gamma</math></b> .....	Gamma
<b>&lt;</b> .....	Less than
<b>&gt;</b> .....	more than
<b>%</b> .....	Percentage
<b><math>X^2</math></b> .....	Chi-square test
<b><math>\mu\text{g/ ml}</math></b> .....	Microgram per milliliter
<b>IU/ml</b> .....	International unit per milliliter
<b>AD</b> .....	Atopic Dermatitis
<b>AEDES</b> .....	Atopic Eczema/Dermatitis Syndrome
<b>AHR</b> .....	Airway hyperresponsiveness
<b>APCs</b> .....	Antigen Presenting Cells
<b>ARD</b> .....	Allergic Respiratory Disease
<b>CBMC</b> .....	Cord Blood derived Mast Cell
<b>CD</b> .....	Cluster of Differentiation
<b>CD14</b> .....	Cluster of Differentiation 14
<b>SCD14</b> .....	soluble Cluster of Differentiation 14
<b>mCD14</b> .....	membrane Cluster of Differentiation 14
<b>CyA</b> .....	Cyclosporine A
<b>DC</b> .....	Dendritic Cell.
<b>e.g</b> .....	Exempli gratia (latin) = for example
<b>EV</b> .....	Eczema Vaccinatum
<b>EAD</b> .....	Extrinsic Atopic Dermatitis
<b>EASI</b> .....	Eczema Area and Severity Index
<b>Fc<math>\epsilon</math>RI</b> .....	High affinity IgE receptors
<b>GM-CSF</b> .....	Granulocyte/ Monocyte- Colony Stimulating factor
<b>HDM</b> .....	House dust Mite
<b>i.e</b> .....	id est(latin) = that is
<b>Ig</b> .....	Immunoglobulin
<b>IAD</b> .....	Intrinsic Atopic Dermatitis

# *List of Abbreviations* (Cont...)

<b>Abbrev.</b>	<b>Meaning</b>
<b>IGF1</b> .....	Insulin like growth factor 1
<b>IL</b> .....	Interleukin.
<b>IL-4-R</b> .....	Interleukin-4 receptor
<b>IL-5-R</b> .....	Interleukin-5 receptor
<b>IL-12-R</b> .....	Interleukin-12 receptor
<b>IFN<math>\gamma</math></b> .....	Interferon gamma
<b>IDECs</b> .....	Inflammatory Dendritic Epidermal Cells
<b>LC</b> .....	Langerhans Cell
<b>LTA4H</b> .....	Leukotrine A4 Hydrolase
<b>LPS</b> .....	Lipopolysaccharide
<b>LRR</b> .....	Leucine Rich Repeat
<b>M-CSF</b> .....	Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>MGF</b> .....	Mast cell Growth Factor
<b>MRSA</b> .....	Methicillin-Resistant <i>S. aureus</i>
<b>Mg/kg/d</b> .....	Milligram per kilogram per day
<b>Nm</b> .....	Nano meter
<b>N</b> .....	Number
<b>NS</b> .....	Non significant
<b>NF<math>\kappa</math>B</b> .....	Nuclear transcription factor $\kappa$ B
<b>P</b> .....	Probability value= Level of significance
<b>PAMP</b> .....	Pathogen Associated Molecular Pattern
<b>PBS</b> .....	Phosphate Buffered Saline
<b>PGN</b> .....	Peptidoglycan.
<b>PRR</b> .....	Pathogen Recognition Receptor
<b>PUVA</b> .....	Psoralen + Ultraviolet A
<b>R</b> .....	Spearman correlation coefficient
<b>RNA</b> .....	Ribonucleic acid
<b>RSV</b> .....	Respiratory Syncytial Virus
<b>SA-EASI</b> .....	Self-Administrated EASI
<b>S</b> .....	Significant

## *List of Abbreviations* (Cont...)

<b>Abbrev.</b>	<b>Meaning</b>
<b>S. aureus</b> .....	Staphylococcus aureus
<b>STAT 6</b> .....	Signal transducer and activator of transcription 6
<b>SC</b> .....	Stratum Corneum
<b>SD</b> .....	Standard deviation
<b>SSS</b> .....	Simple scoring system
<b>TCS</b> .....	Topical Corticosteroids
<b>TCI</b> .....	Topical Calcieurin Inhibitors
<b>Th</b> .....	T- helper
<b>TLR</b> .....	Toll Like Receptor
<b>TNF</b> .....	Tumor necrosis factor
<b>UV</b> .....	Ultraviolet
<b>UVA</b> .....	Ultraviolet A
<b>UVA1</b> .....	Ultraviolet A 1
<b>UVB</b> .....	Ultraviolet B
<b>VCAM-1</b> .....	Vascular endothelial Cell Adhesion Molecules
<b>WBC</b> .....	White Blood Cell