

알레르기 환자에서 TLR9 ligand인 CpG-ODN 자극에 의한 IFN- α 분비와 TLR9 발현

차 의과학대학교 소아과학교실, 내과학교실*, 연세대학교 의과대학 소아과학교실[†]

한만용 · 지혜미 · 김형윤 · 이초애 · 조효진* · 황성규* · 김규연[†]

= Abstract =

Toll-like receptor 9 expression and interferon- α secretion upon CpG-ODN stimulation in allergic subjects

Man Yong Han, M.D., Hye Mi Jee, M.D., Hyeong Yoon Kim, M.D., Cho Ae Lee, M.D., Hyo-Jin Cho, B.D.*, Seong-Gyu Hwang, M.D., Ph.D.* and Kyu-Earn Kim, M.D., Ph.D.[†]

Departments of Pediatrics, Internal Medicine*, CHA University School of Medicine, Seongnam, Korea
Department of Pediatrics[†], Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : The aim of this study is to explore the effect of the Toll-like receptor 9 (TLR9) expressed in plasmacytoid dendritic cells (pDCs) that respond to antigen to Th2 immune deviation in allergic patients.

Methods : Subjects consisted of 19 allergic patients and 17 healthy volunteers. Skin prick tests and nasal provocation tests were performed for the two groups. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from subjects and analyzed for the Lineage Cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) (-), HLA-DR (+), and CD123 (+) using flow cytometry. In addition, we analyzed TLR9 mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The level of interferon- α (IFN- α) of the PBMCs following stimulation with the TLR9 ligand CpG-ODN 2216 was also evaluated.

Results : Analyses of CD123 (+) revealed a nearly similar distribution for the classical pDC markers in the allergic group (0.1%±0.04%) and in the controls (0.25%±0.23%). The mRNA levels of TLR9 on PBMCs were not different between the allergic group and the controls (1.29±0.41 vs. 1.25±0.23, respectively). Additionally, the level of IFN- α in PBMCs exposed to stimuli of the TLR9 ligand CpG-ODN 2216 was not significantly different between the two groups (911±829 vs. 1,095±888 pg/mL, respectively).

Conclusion : We found no evidence that TLR9-dependent immune responses in human pDCs are associated with allergic status. (Korean J Pediatr 2009;52:1015-1020)

Key Words : Allergy, Toll-like receptor 9, Plasmacytoid dendritic cell, Interferon-alpha

서 론

알레르기 반응이 T helper (Th) 2 반응에 의해 유도된다는 사실이 알려진 후 Th1/Th2 조절 기전 중 무엇이 Th2 분화를 유도하는가에 대한 의문점은 항상 있어왔다. 초기에는 IL-4와 같은 미세환경을 조절하는 사이토카인의 되먹임 기전에 의해 설명되었으나¹⁾ 1990년대 말부터 이런 미세환경을 조절하는 변수로서 조절 T세

포(regulatory T cell, Treg)와 수지상세포(Dendritic cell, DC)가 주목을 받게 되었다. 과거 5년간 이러한 복잡한 면역반응에 대한 이해의 폭이 상당히 넓어졌다.

병원체나 알레르겐과 같은 다양한 외부 자극이 체내에 들어오면 1차적으로 내재면역반응(innate immune reaction)이 일어난다. 모든 개체에 존재하는 이 내재면역반응은 과립구, 대식세포와 수지상세포가 관장하며 병원체와 싸우는데 있어 미리 기억할 필요 없이 바로 동원될 수 있기 때문에 초기 병원체의 공격에 대한 방어작용과 더불어 적응면역계에 병원체 침입을 알리는 신호전달작용을 하게 된다. 내재면역반응에서 적응면역계로의 신호전달 과정은 식물을 비롯한 모든 생명체가 가지고 있는 고전적인 신호전달 경로인 Toll 경로로 이루어지며, 이와 비슷한 역할을 하는 Toll like receptors (TLRs)가 마우스와 인간에서 확인되었다²⁾.

TLR 중에서 골수계 수지상세포(myeloid dendritic cell,

Received : 22 June 2009, Revised : 14 August 2009,

Accepted : 22 August 2009

Address for correspondence : Kyu-Earn Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine,

712 Eonjuro, Gangnam-gu, Seoul, 135-720, Korea

Tel : +82.2-2019-3350, Fax : +82.2-3461-9473

E-mail : kekim@yuhs.ac

mDC)에 존재하는 TLR4는 naive T세포를 Th1으로 분화되도록 유도하고, 이와 달리 형질세포양 수지상세포(plasmacytoid dendritic cell, pDC)는 Th2로 분화유도시킨다는 것이 연구를 통해 많이 알려져 있다³⁾. TLR9 또한 B 임파구와 특화된 수지상세포에서 주로 발현되며 IFN- α 를 분비하여 TLR4와 더불어 천식 유발물과의 관련성이 가장 많이 제기된 수용체임에도 불구하고 아직 그 생물학적 의미에 관한 보고는 제한적이다⁴⁾.

본 연구는 알레르기 환자와 정상인에서 형질세포양 수지상세포에 발현되어 있는 TLR9를 자극하였을 때 Th1 사이토카인 중 하나인 IFN- α 의 분비능에 차이가 있는지 알아보고자 하였다. 또한 이를 통하여 TLR9이 알레르기 질환의 발생에 어떠한 역할을 하는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상자 선정

연구 동의서를 제출한 20세에서 40세의 성인 36명을 대상으로 연구를 진행하였다. 모든 연구대상군은 피부단자시험을 시행하였다. 사용된 알레르겐은 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der f), *Dermatophagoides farinae* (Der f), Cat, Dog과 Cockroach (Allergopharma, Hamburg, Germany) 등 5종이었다. 매 검사마다 양성 대조액으로 히스타민 1 mg/mL을, 음성 대조액으로 생리식염수를 사용하였으며 알레르겐에 의한 팽진의 크기가 3 mm 이상일 때를 양성으로 판정하였다. 비강 유발검사는 피부시험검사서 양성인 대상군에서 시행하였다. 알레르겐 추출액(single-dose pump spray, Allergopharma, Germany)을 사용하여 대조용액인 생리식염수와 15분의 간격을 두고 양쪽 비강에 0.04-0.05 mL 씩 분무하였다. 알레르겐 분무 후 15분간 발생한 재채기 횟수(0-2= 0점, 3-4=1점, 5회 이상=3점), 소양증(코, 구개, 귀 각각 1점씩), 콧물(0-3점), 코막힘(1-3점), 안와중상(1점)을 점수화하고 합산 점수가 5점 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

연구군으로 선택한 알레르기 환자는, 문진에서 의사에 의해 기관지 천식이나 알레르기 비염을 진단받은 과거력이 있으면서 피부 시험검사서 한 종류 이상 알레르겐에 양성소견을 보이고 동일 알레르겐을 이용한 비강유발검사서 양성소견을 보일 때로 정의하였다. 대조군은 건강한 성인으로 과거력에서 특이 소견이 없고 5종류로 시행한 알레르기 피부시험에 음성인 경우로 하였다. 두 군 모두 최근 한 달 이내에 급성 질환력이나 알레르기 이외의 만성 질환이 있는 환자는 제외하였다. 본 연구는 의학연구 윤리심의위원회를 통과한 후 서면으로 동의서를 받은 후 검체를 얻었다.

2. 말초혈액단핵세포 채취와 배양

채취한 혈액을 24시간 내에 Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)로 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리하였다. 이를 간

단히 기술하면, 전혈을 Phosphate buffered saline (Gibco, Cergy Pontoies, France)로 1:1로 희석시킨 후 같은 용량의 Ficoll을 이용하여 900 g 25분간 20도에서 원심분리하였다. 혈소판을 제거하기 위하여 PBS를 넣고 300 g 15분간 원심분리한 후 이를 1회 반복하였다. 이후 분리한 PBMC를 -180°C 질소탱크에 보관한 후, 녹여서 연구에 사용하였다.

3. 말초혈액단핵세포 내 수지상세포 분포

형질세포양 수지상세포의 분포를 확인하기 위해 CD123을 확인하였고, 이는 상업회사(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Ca, USA)에서 제공하는 프로토콜에 따라 세포분포를 확인하였다. 이를 짧게 기술하면, 채취한 1×10^5 개의 말초혈액단핵세포에 Lin 1 FITC, CD123 PE, HLA-DR PerCP, CD11c APC를 넣고 20분간 배양한 후 fixation buffer로 고정시킨 후 유세포분석기(Becton Dickinson, Mountain View, NJ, USA)를 통해 분석하고 각각 isotype의 대조군을 만들었다^{5, 6)}.

4. TLR 리간드 자극

TLR9 리간드인 ODN 2216 (5'-ggG GGA CGA TCG TCg ggg gg-3')와 이의 non-CpG variant인 ODN 2206 (5'-ggG GGA GCA TGC TGg ggg gc-3') {대문자는 phosphodiester, 소문자는 nuclease-resistant phosphothioates} (Bioneer, Seoul, Korea)을 구입하였다.

먼저 CpG-ODN 2206으로 자극하는 것을 음성대조액으로, NF- κ B 자극제인 phytohemagglutinin 2 μ g/mL 자극을 양성 대조액으로 사용하였다. 각 well 당 2×10^5 의 말초혈액단핵세포를 넣고 이에 TLR9 리간드로 자극을 준 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 모든 자극은 duplicate로 하였다. 각 자극 농도는 CpG-ODN 2216은 0.5, 5, 50, 100 μ g/mL로 titration 하였고, 이후 50 μ g/mL 농도에서 두 군간의 분비능을 확인하였다.

5. 사이토카인 분석

24시간동안 배양한 상층액을 -20°C 냉장고에 보관하였다가 ELISA kit (R & D System, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 IFN- α 의 농도를 측정하였다. 검사 kit의 민감도는 10 pg/mL 이었다.

6. Real-time RT PCR

Total RNA를 $3-10 \times 10^5$ 말초혈액단핵세포에서 Qiagen Rneasy Mini 키트를 사용하여 추출하였다. 이후 cDNA를 Qiagen QuantiTect Reverse Transcription 키트를 사용하여 상업회사에서 제시한 프로토콜에 따라 만들었다. Real-time RT PCR을 위해 TLR9 특이 primer와 FAM-labeled probe를 구입하였다. Forward primer는 5'-GGACCTCTGGTACTGCTTCCA-3' 이며, reverse primer는 5'-AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT-3' 이며, probe는 5'-FAM-CTGCAGGTGCTAGACCTGTCCCGC-TAMRA-3' 로 하였다. Internal 대조 유전자로는 hypo-

xanthin phosphoribosyltransferase (HPRT)의 forward primer 5'-CGGCCGGCTCCGTTA-3'으로, reverse primer 5'-TTAGGTATGCAAAATAAATCAAGGTCAT-3'으로, probe는 5'-FAM-CCGCAGCCCTGGCGTCGT-TAMRA-3'로 하여 표준화를 하였다.

7. 정량적 역전사 분석

증폭시킨 후 같은 역치의 서로 다른 실험결과에서 Ct 값을 유도하여 분석하였다. 즉, 각 샘플에서 평균 Ct 값을 대응하는 Ct 값으로 ΔCt (Ctexperimental gene - Ctcontrol gene)를 계산하였다. TLR9 리간드인 CpG-ODN 2216 자극에 대한 반응과 non-CpG variant인 ODN 2206 자극의 반응도의 유전자 발현의 차이를 알아보기 위해서 각 자극제의 차이값을 $\Delta\Delta Ct$ 로 계산하였는데 이는 두 군간의 mRNA 정도를 비율로 나타낸 것이다.

8. 통계

결과치의 통계처리는 SPSS ver. 10.0을 이용하였고 대상군의 특성비교 중 성별은 Fisher's exact test를 시행하였고, 대상군과 정상군의 나이, CD 123분포, IFN- α 분비량의 평균치 비교, TLR9 mRNA 상대적 양의 비교는 Mann-Whitney 검정을 시행하였다. P 값이 5% 미만일 때를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 연구 대상군의 특징

기관지 천식, 알레르기 비염을 비롯한 알레르기 질환력과 5종류

의 알레르기 피부시험, 비강유발 검사에서 양성소견을 보인 연구 대상군의 평균 연령은 31 ± 3.4 (남/녀 = 9명/10명)세 이었다. 문진에서 알레르기의 과거력이 없으면서 피부시험 검사에서 음성 소견을 보인 대조군의 평균 연령은 28 ± 3.5 (남/녀 = 9명/8명)세 이었다. 두 군간의 성별, 연령별 통계적 차이는 없었다.

2. CD123 분포 분석

두 군간의 형질세포양 수지상세포의 분포를 CD123 염색을 이

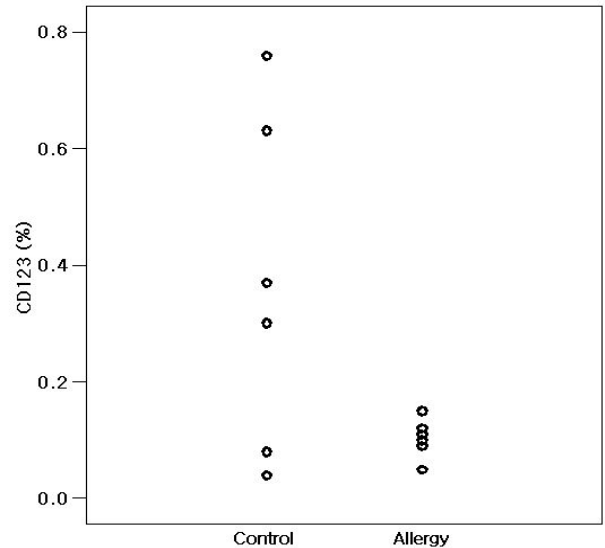


Fig. 2. Peripheral blood mononuclear cells were stimulated by CPG-ODN 2216 for 24 hrs, and the level of interferon- α in the culture supernatants was analyzed by ELISA. There was no significant difference between the allergic and control groups.

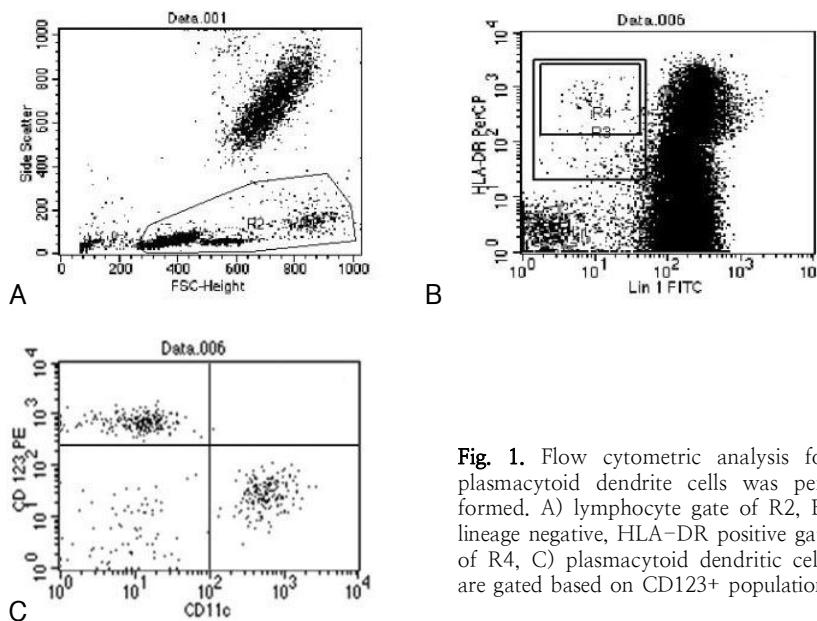


Fig. 1. Flow cytometric analysis for plasmacytoid dendrite cells was performed. A) lymphocyte gate of R2, B) lineage negative, HLA-DR positive gate of R4, C) plasmacytoid dendritic cells are gated based on CD123+ population.

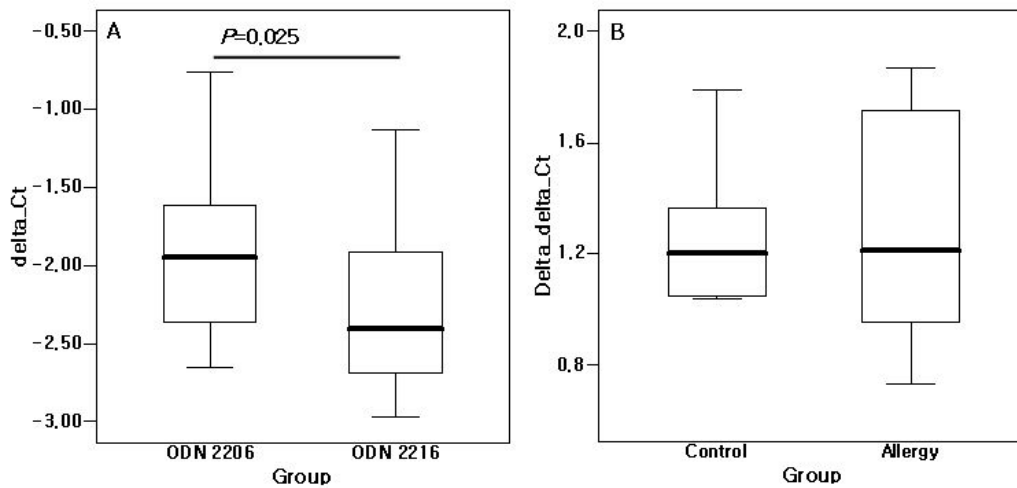


Fig. 3. Specific TLR9 mRNA stimulated with ODN 2206 (negative control) and ODN 2216 (TLR ligand) in peripheral blood mononuclear cells from control (n=12) and allergic patients (n=12) were analyzed by real-time PCR. A) Δ Ct of TLR9 mRNA was significantly higher after stimulation with ODN 2216, B) $\Delta\Delta$ Ct had no difference between the allergic and control groups. Each value represents mean \pm SD.

용하여 비교하였다(Fig. 1). 대조군에서는 평균 $0.25 \pm 0.23\%$ 이었고 연구군에서는 $0.1 \pm 0.04\%$ 이었으며 두 군간의 통계학적인 차이는 없었다(Fig. 2).

3. TLR9 mRNA 표현

말초혈액단핵세포에서 TLR9의 mRNA 발현에 대한 정량적 분석 결과 대조군과 연구군 간의 차이는 없었다. 두 군의 말초혈액단핵세포에 TLR9 리간드인 CpG-ODN 2216과 음성 자극제인 CpG-ODN 2206을 각각 투여한 후 1시간, 4시간, 12시간과 24시간 mRNA 양을 분석하였는데, 예비연구에서 24시간이 경과했을 때 가장 큰 차이를 보임을 확인하였으므로 본 연구에서는 자극 후 24시간의 mRNA양을 비교하였다. CpG-ODN 2206으로 자극한 평균 Δ Ct 값은 -1.9 ± 0.53 이었고 TLR9 리간드로 자극한 후의 Δ Ct 값은 -2.26 ± 0.49 이었다(Fig. 3A). 이를 통해 음성 대조액과 비교하여 CpG-ODN 2216의 자극에 대해서 TLR9 mRNA 표현이 증가된 것을 확인할 수 있었으나(Δ Ct), $\Delta\Delta$ Ct 값은 알레르기 환자에서 1.290 ± 0.41 , 대조군에서는 1.25 ± 0.23 으로 두 군간의 통계적인 차이가 없었다(Fig. 3B).

4. IFN- α 분비능

TLR9 ligand인 CpG-ODN 2216와 음성자극제인 CpG-ODN 2206을 $50 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각각 말초혈액단핵세포에 자극하고 24시간 경과 후 IFN- α 의 농도를 측정하였다. 대조군과 알레르기 환자 모두 CpG-ODN 2216으로 자극하였을 때 CpG-ODN 2206으로 자극하였을 때보다 유의하게 IFN- α 분비가 증가하였다. 그러나 CpG-ODN 2216 자극에 의한 IFN- α 농도는 대조군에서 $1,095 \pm 888 \text{ pg/mL}$, 알레르기 환자에서 $911 \pm 829 \text{ pg/mL}$ 로 두

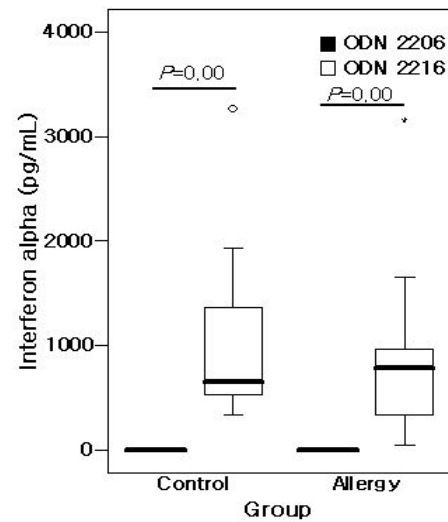


Fig. 4. The level of interferon- α (IFN- α) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from allergic patients was measured by ELISA. PBMCs were stimulated by CPG-ODN 2216 (TLR ligand) or CPG-ODN 2206 (negative control). After 24 hrs, supernatants were harvested, and the level of IFN- α was analyzed in 19 of the allergic patients and 17 of the control group patients.

군 간에 통계적인 차이를 보이지는 않았다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 알레르기 환자의 말초혈액단핵세포 내 형질세포

양 수지상세포에서 분비되는 TLR9의 mRNA 전사 양과 IFN- α 의 분비능이 정상인과 비교하여 차이가 없음을 확인하였다. 그러므로 알레르기 면역반응의 발현과 TLR9을 이용한 신호전달 경로는 관련성이 낮을 것으로 생각된다.

TLR은 면역을 담당하는 세포의 표면에서 발현되어 병원균에서 생성된 lipopolysaccharide (LPS)나 lipopeptide와 작용하여 선천성 면역 기능을 수행하는데 관여한다. 인간에서 발현되는 TLR은 현재까지 11가지 아형이 밝혀져 있는데 이중 TLR9은 수지상세포에서 주로 발현되어 케모카인과 사이토카인의 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다⁷⁾. Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)과 같은 신호전달 물질이 TLR의 신호전달체계를 매개하는데, MyD88 의존형 기전과 MyD88 비의존형 기전으로 나누어지며 이에 관계되는 신호전달 물질로는 IRAK4, TRAF6, TAK1과 IRF5 등이 있다. 이러한 신호전달 물질들은 최종적으로 NF- κ B를 활성화시켜 IL-12를 분비시킨다⁸⁾. 알레르기 환자에서는 이러한 과정 중 어느 부분이 억제되거나 활성화되어 정상인과 달리 IL-12나 IL-10의 분비가 적은 것으로 보고되었다⁹⁾. 이와 같은 결과는 TLR4를 이용한 연구에서 주로 보고되었으나¹⁰⁾ 알레르기 환자가 외부 항원을 받아들이는 통로로서 다양한 TLR을 이용한다는 점을 고려하면 TLR4 만이 아니라 다른 TLR 또한 알레르기 기전에 관여할 것으로 추정할 수 있다. TLR9의 IFN- α 의 분비를 조절하는 신호전달 체계는 TLR4와 마찬가지로 MyD88이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 공통된 신호전달 과정을 통해 TLR4에 의한 알레르기 반응의 유도 기전과 TLR9의 기전이 유사할 것이라 추측할 수 있다.

그러나 본 연구에서는 알레르기 환자와 대조군을 비교하였을 때 IFN- α 의 분비에 차이가 없었다. 이러한 결과는 건강한 성인에서 IgE 차이에 따른 TLR9 자극과 반응에 차이가 없고 TLR9 다형성에서도 의미 있는 차이를 발견하지 못한 기존의 보고¹²⁾와 일치되는 소견이다.

이처럼 TLR4와 TLR9의 반응이 유사한 신호전달체계를 공유함에도 불구하고 mRNA의 발현되는 정도 및 사이토카인의 분비에 차이를 보이는 것은 근본적으로 알레르기 질환이 단순하고 유일한 Th2 반응 체계에 의한 것이 아님을 시사한다. 아토피피부염을 앓고 있는 환자의 형질세포양 수지상세포에는 많은 Fc ϵ RI가 있고 Fc ϵ RI를 활성화시킨 수지상세포에서 IL-12 분비를 유도할 수 있다는 보고¹³⁾는 이러한 가설을 뒷받침 한다. 또한 알레르기 질환에서 TLR4과 달리 TLR9은 질병 경과에 크게 영향을 주지 않는 면역 기전일 가능성도 있다. 한편 최근에 본 연구와 유사한 연구 디자인을 이용한 연구 결과가 보고되었는데¹⁴⁾, 이 보고에 따르면 알레르기 환자와 대조군에서 형질세포양 수지상세포의 분포와 TLR9 분비에 차이가 없었고 이는 본 연구결과와 일치한다. 그러나 이들은 본 연구 결과와 달리 IFN- α 분비가 알레르기 환자에서 대조군에 비해 떨어져 있음을 확인하였다. 이 연구와 본 연구의 차이는, 본 연구가 CpG-ODN을 이용하여 말초혈액단핵세포에 직접 자극을 주었던 것에 비해 이들은 말초혈액단핵세포에서 형질세포양 수

지상세포를 분리하여 분석하였다. 따라서 순수하게 형질세포양 수지상세포에서만 분비하는 IFN- α 의 농도를 확인할 수 있었는데, 이 점이 본 연구 결과와의 차이를 유발했을 가능성이 있다. 그러나 말초혈액단핵세포 내에서도 IFN- α 분비의 거의 대부분이 형질세포양 수지상세포에서 분비된다는 점을 고려하면¹⁵⁾ 이러한 결과의 차이가 단순히 말초혈액단핵세포를 자극할 때와 형질세포양 수지상세포를 자극할 때의 차이로 인해 유발되었다고 추측하는 것은 무리가 있다.

또한 보다 명확한 분석을 위해서는 동일한 알레르기 질환 또는 동일한 알레르겐에 양성반응을 보인 환자들을 대상으로 수지상세포의 변화를 분석하는 것이 필요할 것이라 여겨진다.

결론적으로, TLR9 자극에 대한 알레르기 환자의 반응은 IFN- α 분비와 형질세포양 수지상세포의 TLR9 mRNA 발현 정량분석에서 정상인과 차이가 없었으므로 외부 항원에 의해 유도되는 TLR9의 발현이 알레르기 면역반응에 큰 역할을 하지는 않는 것으로 보인다. TLR9의 발현기전에 대한 연구가 전세계적으로 여전히 활발하게 진행 중이지만 아직 그 역할이 명확하지 않다는 점을 고려할 때, 향후 TLR9 발현에 관한 다양한 연구를 시도하여 그 생물학적 중요성을 입증하여야 할 것이다.

요 약

목적: 알레르기 환자와 정상인에서 형질세포양 수지상세포의 분포, TLR9 mRNA 양과 IFN- α 의 분비능에 차이가 있는지 알아보고자 하였다.

방법: 19명의 알레르기 환자와 17명의 건강한 성인을 대상으로 하였다. 말초혈액단핵세포를 채취하여 Lineage Cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)음성, HLA-DR 양성 이면서 CD123양성을 유세포 분석기로 분석하였다. 말초혈액단핵세포에 TLR9 작용제(agonists)인 CpG-ODN 2216과 음성 대조를 위해 CpG-ODN 2206으로 자극하고 24시간 후 상청액을 추출하여 IFN- α 의 농도를 측정하였다. 또한 real time RT-PCR을 이용하여 TLR9 mRNA 정량분석을 시행하였다.

결과: 말초혈액단핵세포에서 형질세포양 수지상세포의 분포는 알레르기 환자가 평균 $0.1 \pm 0.04\%$, 대조군이 평균 $0.25 \pm 0.23\%$ 이었다. TLR9 mRNA 상대적인 양을 나타내는 $\Delta\Delta Ct$ 는 알레르기 환자에서 1.29 ± 0.41 이었고 대조군은 1.25 ± 0.23 이었다. TLR9 리간드인 CpG-ODN 2216 자극에 따른 IFN- α 의 분비능은 알레르기 환자에서 911 ± 829 pg/mL 이었고 대조군에서 $1,095 \pm 888$ pg/mL 이었다. 이 세 결과에서 통계적인 차이는 없었다.

결론: TLR9을 통한 신호전달이 알레르기 환자의 면역반응을 대표하지는 않는 것으로 보이며, 향후 더 자세한 TLR9의 역할에 대한 연구가 필요하다.

References

- 1) Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD4⁺ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:1-6.
- 2) Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004;5:975-9.
- 3) Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183-6.
- 4) Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 2003;81:85-91.
- 5) Kim HY, Han MY, Seo JY, Cho HJ, Kim NK, Oh DY, et al. IL-12 production in lipopolysaccharide- and Dermatophagoides pteronyssinus-copulsed monocyte derived-dendritic cells. *J Asthma Allergy Clin Immunol* 2006;26:1-6.
- 6) Deering RP, Orange JS. Development of a clinical assay to evaluate Toll-like receptor function. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:68-76.
- 7) Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 2005;11:5-11.
- 8) Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:979-87.
- 9) Yang IA, Fong KM, Holgate ST, Holloway JW. The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:23-8.
- 10) Reider N, Reider D, Ebner S, Holzmann S, Herold M, Fritsch P, et al. Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:89-95.
- 11) Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, Jenmalm MC, Mai XM, Nilsson L, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12 (p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:561-7.
- 12) Berghofer B, Frommer T, Konig IR, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G, et al. Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1147-54.
- 13) Novak N, Allam JP, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, et al. Characterization of FcεRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:364-70.
- 14) Tversky JR, Le TV, Bieneman AP, Chichester KL, Hamilton RG, Schroeder JT. Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-α via Toll-like receptor 9. *Clin Exp Allergy* 2008;38:781-8.
- 15) Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:3-19.