

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Prof. Dr. med. M. P. Schön)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***Toll-like*-Rezeptoren in der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Emilia Weronika Loewe, geb. Schmid
aus
Słubice (Polen)

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. Brück W.

Referent: Prof. Dr. Schön M. P.

Korreferent: PD Dr. Lühder F.

Promotor-Vertretung: Prof. Dr. Meyer T.

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "**Toll-like-Rezeptoren in der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis**" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 01.04.2021

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die Immunität	1
1.2	Toll-like-Rezeptoren.....	2
1.2.1	Signalübertragung durch TLR3.....	3
1.2.2	Signalübertragung durch MyD88	4
1.3	Die Haut als Immunorgan.....	4
1.4	Das allergische Kontaktekzem	5
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	6
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	Versuchstiere	7
2.2	Material	7
2.2.1	Chemikalien	7
2.2.2	Geräte und Verbrauchsmaterial	8
2.2.3	Antikörper und Isotypkontrollen für FACS.....	10
2.2.4	Software	11
2.3	Methoden	12
2.3.1	<i>In-vivo</i> -Behandlungen	12
2.3.1.1	Narkose	12
2.3.1.2	Rasieren.....	12
2.3.1.3	Ohrdickenmessung	12
2.3.1.4	Euthanasie	13
2.4	Modell der allergischen Kontaktdermatitis.....	13
2.5	Histologie.....	14
2.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	15
2.6	Herstellung der Zell-Suspensionen aus Organen.....	16
2.6.1	Lymphknoten-Suspension	16
2.6.2	Ohr-Suspension.....	16
2.7	Durchflusszytometrie (FACS)	16

2.8	Statistische Auswertung.....	21
3.	ERGEBNISSE	22
3.1	Verminderte TLR- und MyD88-Signalübertragung führt zu geringerer Ohrschwellung bei Kontakthypersensitivität	22
3.2	Verminderte Zellinfiltration in läsionaler Haut von Mäusen mit Störungen in der TLR-Signalübertragung.....	24
3.3	Größte Zellinfiltration in läsionalem Gewebe etwa 36 bis 48 Stunden nach Allergenexposition.....	27
3.4	Unspezifische Immunantwort: Granulozyten-Einwanderung in die entzündete Haut	29
3.5	Spezifische Immunantwort in der Haut weniger ausgeprägt als die unspezifische Reaktion.....	31
3.6	Verdopplung der Zellzahl in den Lymphknoten Oxazolone-behandelter Mäuse.....	36
3.7	Systemische Immunreaktion nach der Allergenexposition	38
4.	DISKUSSION	56
4.1	Toll-like-Rezeptoren bei nichtinfektiösen Entzündungen	56
4.2	Die Kontakthypersensitivität in Mäusen ist MyD88-abhängig	59
4.3	Zelluläre Mechanismen.....	61
5.	ZUSAMMENFASSUNG	64
6.	LITERATURVERZEICHNIS	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP	Antimikrobielle Peptide
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BCAP	B-Zell-Adapter für Phosphoinositid-3-Kinase (<i>B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DAMP	Schaden-assoziierte molekulare Strukturen (<i>damage associated molecular pattern</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DKO	Doppel-Defizienz (<i>double knockout</i>)
ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
IL	Interleukin
IL-12p40	<i>Interleukin-12 subunit beta</i>
IP-10	<i>Interferon-gamma induced protein of 10 kD</i>
IRF	Interferon-Regulationsfaktor (<i>interferon regulatory factor</i>)
KO	Knockout (<i>knockout</i>)
MAL	<i>MyD88 adaptor-like</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	Natürliche <i>Killer-Zelle</i>
Oxa	Oxazolone

PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PRR	Pathogenerkennungsrezeptoren (<i>pathogen recognition receptors</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
SARM	Sterile α - und Gürteltiermotive (<i>sterile α- and armadillo motif</i>)
SCIMP	Csk-Interaktion- Membranprotein (<i>Csk-interacting membrane protein</i>)
ss	Einzelstrang (<i>single strand</i>)
Tc-Zelle	Zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T cell</i>)
Th-Zelle	T-Helfer Zelle
TICAM	<i>TIR domain-containing adapter molecule</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	TRIF-verwandtes Adaptermolekül (<i>TRIF-related adapter molecule</i>)
Treg	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
WT	Wildtyp

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1 TLR-SIGNALKASKADE.....	3
ABBILDUNG 2 BEHANDLUNGSSCHEMA DES KONTAKTHYPERSENSITIVÄTSMODELLS..	14
ABBILDUNG 3 DIE OHRDICKENDIFFERENZ BEI DER KONTAKTHYPERSENSITIVÄT IN WILDTYP(WT)- SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	23
ABBILDUNG 4 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG DER OHRSCHNITTE VON WILDTYP(WT)- MÄUSEN SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN	26
ABBILDUNG 5 MITTLERE GESAMTZELLZAHL DER OHREN (IN 10 ⁶) PRO 1 ML ZELLSUSPENSION IM VERLAUF DER BEHANDLUNG MIT OXAZOLON BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN, MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN	27
ABBILDUNG 6 CD11b+ GR1+ ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-, MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN	29
ABBILDUNG 7 CD11b+ F4/80+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN	30
ABBILDUNG 8 CD11c+ F4/80+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN	31
ABBILDUNG 9 CD11c+ CD11b+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	31
ABBILDUNG 10 CD8+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	32
ABBILDUNG 11 CD3+ CD8+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	33

ABBILDUNG 12 CD4+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	34
ABBILDUNG 13 CD4+ CD25+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	34
ABBILDUNG 14 CD3+ TCR $\gamma\delta$ + ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	35
ABBILDUNG 15 CD103+ TCR $\gamma\delta$ + ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	35
ABBILDUNG 16 CD103+ CD3+ ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	36
ABBILDUNG 17 CD3+ TCR $\alpha\beta$ + ZELLEN IN VEHIKEL- UND OXAZOLON-BEHANDELTEN OHREN DER VIER MAUSLINIEN.....	36
ABBILDUNG 18 MITTLERE GESAMTZELLZAHL IN DEN AURIKULÄREN LYMPHKNOTEN IM VERLAUF DER BEHANDLUNG MIT OXAZOLON BEI DEN WILDTYPE(WT)-, MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN....	37
ABBILDUNG 19 CD4+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYPE(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	38
ABBILDUNG 20 CD4+ CD69+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYPE(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	39
ABBILDUNG 21 CD8+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYPE(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	40
ABBILDUNG 22 CD8+ CD69+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYPE(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	40
ABBILDUNG 23 CD4+ CD25+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYPE(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	41

ABBILDUNG 24 CD4+ CD25+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI DEN MAUSLINIEN WILDTYP(WT), MYD88-KO, TLR3-KO UND MYD88/TLR3-DKO.....	42
ABBILDUNG 25 CD4+, CD25+ UND CD69+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88- , TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	42
ABBILDUNG 26 CD4+ CD44- UND CD62L+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88- , TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	43
ABBILDUNG 27 CD8+, CD44- UND CD62L+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88- , TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	44
ABBILDUNG 28 CD4+, CD44- UND CD62L+ ZELLEN BEI DEN MAUSLINIEN WILDTYP(WT), MYD88-KO, TLR3-KO UND MYD88/TLR3-DKO.....	45
ABBILDUNG 29 CD8+, CD44- UND CD62L+ ZELLEN BEI DEN MAUSLINIEN WILDTYP(WT), MYD88-KO, TLR3-KO UND MYD88/TLR3-DKO.....	45
ABBILDUNG 30 CD4+, CD44+ UND CD62L- LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88- , TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	46
ABBILDUNG 31 CD8+, CD44+ UND CD62L- LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88- , TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	47
ABBILDUNG 32 CD4+, CD44+ UND CD62L- ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-, MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN....	47
ABBILDUNG 33 CD8+, CD44+ UND CD62L- ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-, MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN....	48
ABBILDUNG 34 CD4+, CD44+ UND CD62L+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88- , TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	48

ABBILDUNG 35 CD8+, CD44+ UND CD62L+ LYMPHKNOTEN-ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-, TLR3- UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	49
ABBILDUNG 36 CD4+/CD44+/CD62L ⁺ -ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-, MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN....	50
ABBILDUNG 37 CD8 ⁺ /CD44 ⁺ /CD62L ⁺ -ZELLEN BEI WILDTYP(WT)-, MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN....	50
ABBILDUNG 38 CD3 ⁺ ZELLEN IN AURIKULÄREN LYMPHKNOTEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	51
ABBILDUNG 39 TCRAB ⁺ ZELLEN IN AURIKULÄREN LYMPHKNOTEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	52
ABBILDUNG 40 CD3 ⁺ TCRAB ⁺ ZELLEN BEI DEN MAUSLINIEN WILDTYP(WT), MYD88-KO, TLR3-KO UND MYD88/TLR3-DKO.....	52
ABBILDUNG 41 CD3 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ ZELLEN BEI DEN MAUSLINIEN WILDTYP(WT), MYD88-KO, TLR3-KO UND MYD88/TLR3-DKO.....	54
ABBILDUNG 42 CD103 ⁺ ZELLEN IN AURIKULÄREN LYMPHKNOTEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	54
ABBILDUNG 43 CD103 ⁺ TCRAB ⁺ ZELLEN IN AURIKULÄREN LYMPHKNOTEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	55
ABBILDUNG 44 CD103 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ ZELLEN IN AURIKULÄREN LYMPHKNOTEN BEI WILDTYP(WT)-MÄUSEN SOWIE MYD88-DEFIZIENTEN, TLR3-DEFIZIENTEN UND MYD88/TLR3-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	55

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1 CHEMIKALIEN	7
TABELLE 2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	8
TABELLE 3 ANTIKÖRPER UND ISOTYPKONTROLLEN FÜR FACS	10
TABELLE 4 SOFTWARE.....	11
TABELLE 5 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	15
TABELLE 6 PIPETTIERSHEMA FÜR LYMPHKNOTEN-SUSPENSION 1. FÄRBUNG	18
TABELLE 7 PIPETTIERSHEMA FÜR LYMPHKNOTEN-SUSPENSION 2. FÄRBUNG	18
TABELLE 8 PIPETTIERSHEMA FÜR LYMPHKNOTEN-SUSPENSION 3. FÄRBUNG	19
TABELLE 9 PIPETTIERSHEMA FÜR OHR-SUSPENSION 1. FÄRBUNG.....	19
TABELLE 10 PIPETTIERSHEMA FÜR OHR-SUSPENSION 2. FÄRBUNG	20
TABELLE 11 PIPETTIERSHEMA FÜR OHR-SUSPENSION 3. FÄRBUNG	20

1. EINLEITUNG

1.1 Die Immunität

Der Begriff „Immunität“ bezeichnet die Fähigkeit eines Organismus, Krankheitserreger (Pathogene) zu erkennen und zu bekämpfen. Die Immunabwehr bei Wirbeltieren wird durch adaptive (erworbene) sowie angeborene (*innate*) Mechanismen gewährleistet (Saint-Mezard 2004). Zur erworbenen Immunität gehören spezifische zelluläre und humorale Abwehrmechanismen, die sich gezielt gegen bestimmte Moleküle (oft Proteine) eines Mikroorganismus (Antigene) richten. Diese Art der Immunabwehr wird neben den antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie den dendritischen Zellen vor allem durch die T- und B- Lymphozyten ermöglicht (Schütt und Bröker 2006). Überdies werden nach einer Infektion spezifische Antikörper und Gedächtniszellen gebildet, die bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Pathogen eine zeitnahe und angemessene Abwehrreaktion vermitteln (Kehren et al. 1999). Die angeborene Immunität beinhaltet ebenfalls sekretorische und zelluläre Komponenten. Krankheitserreger können dabei von Pathogen-Erkennungsrezeptoren (PRR, *pathogen recognition receptors*) als potentiell krankmachend identifiziert werden (Akira und Kawai 2010).

Die PRRs auf der Oberfläche oder in Vesikeln der Zellen erkennen sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Dadurch werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, welche zur Transkription von Genen, die inflammatorische und parallel entzündungshemmende Zytokine kodieren, führen. Im Weiteren wird der Krankheitserreger durch zelluläre (Makrophagen, Granulozyten, natürliche *Killer*(NK)-Zellen) sowie sezernierte (antimikrobielle Peptide (AMPs) und Komplementfaktoren) Komponenten der angeborenen Immunabwehr eliminiert (Gaspari und Katz 1991).

1.2 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind transmembrane Glykoproteine, welche zu den bekanntesten PRRs zählen. TLR werden von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems, sowie auch von einigen Nicht-Immunzellen exprimiert. Wie bereits erwähnt, dienen die PRRs und damit auch die TLR der Erkennung von PAMPs (Kumagai und Akira 2010). Dieser Prozess führt zur Aktivierung komplexer angeborener und adaptiver Immunreaktionen. Überdies können TLR auch Gefahren im Inneren erkennen wie zum Beispiel im Rahmen eines Gewebeschadens (Seong und Matzinger 2004). Bei einer solchen Reaktion binden körpereigene Moleküle, die DAMPs (*damage associated molecular pattern*), die TLR. Allgemein werden zur weiteren Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden Adaptermoleküle wie MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), MAL/TIRAP (*MyD88 adaptor-like/Toll/interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein*) und TRAM (*TRIF-related adapter molecule*) benötigt (Luo et al. 2019; McKnight et al. 1995).

Abbildung 1 skizziert die TLR-induzierte Signalkaskade sowie wichtige aktivierende Liganden einzelner TLR. Nach der Ligandenbindung folgt die Signalweiterleitung durch Adaptermoleküle. Alle TLR außer TLR3 signalisieren über das Adaptermolekül MyD88. Das TLR4-Signal wird sowohl durch MyD88 als auch unabhängig davon durch TRIF übertragen. Zunächst bindet MyD88 an die zytoplasmatische TLR-Domäne. Als Folge kommt es zur Rekrutierung der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK). Über weitere Einzelschritte werden dann der Transkriptionsfaktor NF- κ B, c-Jun N-terminale Kinasen (JNK), p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen sowie Interferon-Regulationsfaktoren (IRF3, IRF7) aktiviert. Das Resultat der Kaskade äußert sich in der Sekretion inflammatorischer Zytokine (Zhou et al. 2008).

Die zentrale Rolle von MyD88 erklärt, warum man durch Manipulation dieses Moleküls die TLR-Funktion, mit Ausnahme von TLR3, insgesamt gut erforschen kann.

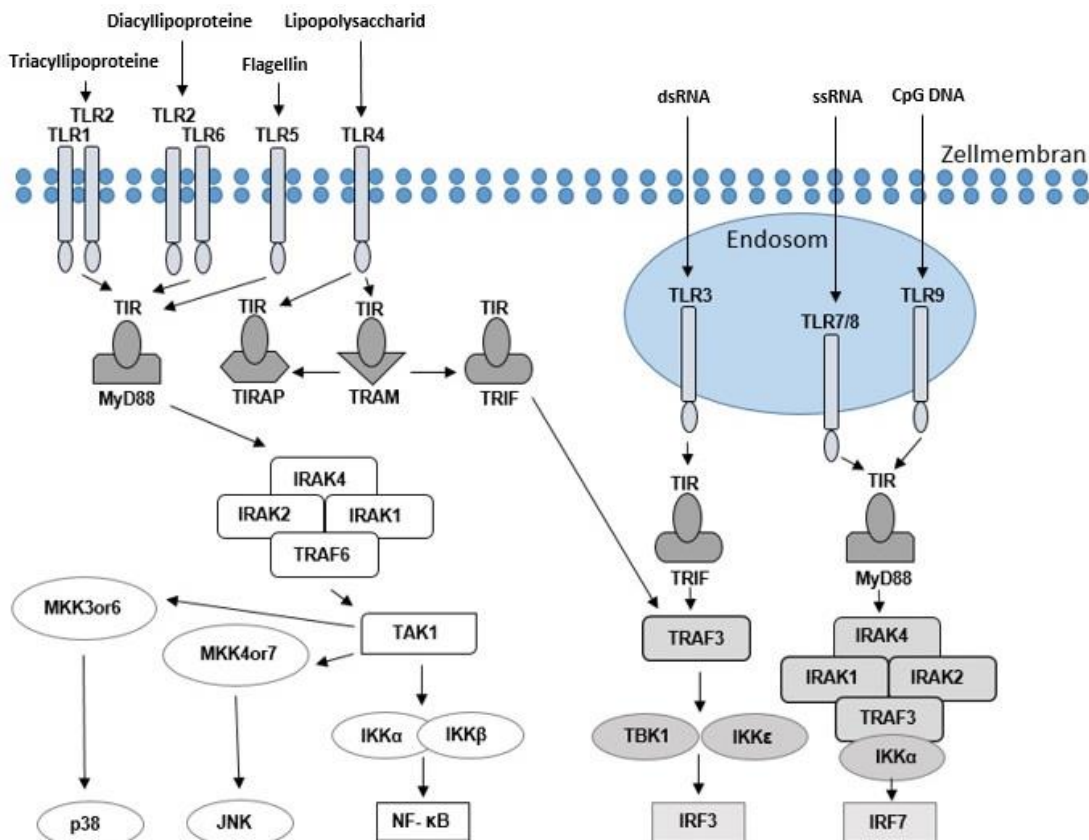


Abbildung 1 TLR-Signalkaskade. Während einige TLR auf der Zellmembran exprimiert werden, finden sich andere an endosomalen Membranen. Nach Bindung der Liganden, von denen in der Abbildung einige exemplarisch genannt sind, erfolgt – mit Ausnahme von TLR3 – die Signalübermittlung durch das Adapterprotein MyD88.

1.2.1 Signalübertragung durch TLR3

TLR3 wird von dendritischen Zellen exprimiert. Der Rezeptor erkennt nicht nur infektiöse Agenzien durch Bindung doppelsträngiger RNA (dsRNA), die meist viralen Ursprungs ist, sondern auch nicht-infektiöse Immun- und

Entzündungsreaktionen (Yasuike et al. 2017). Die TLR3-Signalübertragung ist daher beispielsweise mit der Pathogenese der allergischen und irritativen Kontaktdermatitis assoziiert (Nakamura et al. 2015). Durch Phosphorylierung von *Interferon regulatory factor* (IRF) 3 und IRF7 kommt es zur Induktion von Interferon β . Über eine weitere Signalkaskade wird auch NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) aktiviert, was zur Sekretion inflammatorischer Zytokine führt (Gordon und Taylor 2005). TLR3 spielt somit eine wesentliche Rolle bei der Pathogen-Erkennung und bei der Induktion einer Immunantwort.

1.2.2 Signalübertragung durch MyD88

Die Signalübertragung durch TLR wird an mehreren Stellen moduliert. Sie erfolgt mit Hilfe von Korezeptoren, akzessorischen Proteinen sowie auch Adapterproteinen, wie MyD88 (Netea et al. 2012). Letzteres liegt im Zytosol der Zelle vor und besteht aus zwei Domänen: einer TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*)-Domäne und einer Todesdomäne (*death domain*) (Avbelj et al. 2011). MyD88 ist für die Initiierung des sogenannten „MyD88-abhängigen Signalwegs“ verantwortlich. TLRs können durch diesen über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 (*activator protein 1*) und IRF5 (*interferon regulatory factor 5*) inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-12 und IL-23 induzieren (Warner und Nunez 2013).

1.3 Die Haut als Immunorgan

Die Haut ist funktionell vielseitig. Sie dient unter anderem dem Schutz vor äußeren Einflüssen, der Aufnahme von Sinnesreizen und der Erhaltung der Homöostase. Außerdem übernimmt sie wichtige immunologische Funktionen und verfügt über vielfältige Anpassungsmechanismen (McFadden et al. 2012). Morphologisch unterscheidet man drei Schichten. Von außen nach innen

besteht die Haut aus der Epidermis und der Dermis, welche durch die Basallamina voneinander getrennt werden, sowie aus der Subkutis. Jede Schicht besteht aus verschiedenen Zelltypen, welche spezialisierte Funktionen erfüllen (Kupper und Fuhlbrigge 2004).

Suprabasal in der Epidermis, vor allem im *Stratum spinosum*, befinden sich die Antigen-präsentierenden Zellen, die sogenannten Langerhans-Zellen. Diese Zellen sind inaktive dendritische Zellen (Krasteva et al. 1998). Die Aktivierung und Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen erfolgt erst nach der Antigen-Aufnahme. Eine wesentliche Funktion der Langerhans-Zellen ist die Aktivierung von T-Helferzellen und damit die Initiierung einer Immunantwort (Janeway und Medzhitov 2002). Neben den Langerhans-Zellen befinden sich im *Stratum spinosum* weitere immunkompetente Zellen wie CD8⁺ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen. Die CD8⁺ Zellen werden dem adaptiven Immunsystem zugeordnet. Langerhans-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen bilden eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (Ariotti et al. 2012). Zum angeborenen Immunsystem gehören auch der Säureschutzmantel der Haut, das Komplementsystem sowie das Phagozytensystem (Blauvelt et al. 2003).

1.4 Das allergische Kontaktekzem

Das allergische Kontaktekzem zählt zu den häufigsten Dermatosen; seine Lebenszeitprävalenz bei Erwachsenen in Deutschland beträgt etwa 15 % (Chu et al. 2011). Es handelt sich dabei um eine akute oder chronische nichtinfektiöse Entzündungsreaktion der Haut, die auf Überempfindlichkeit gegenüber einem von bislang 4350 identifizierten, potentiellen Allergenen beruht (Martin et al. 2011). Die Entzündung entsteht durch eine Immunreaktion vom Spättyp (Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell), welche als spezifische Antwort auf ein äußerlich wirkendes Kontaktallergen ausgelöst wird. Die Kontaktallergene (Haptene) sind unvollständige Antigene, welche erst nach

Bindung an ein Trägerprotein als Antigen eine immunologische Reaktion auslösen. Grundsätzlich läuft diese Reaktion in zwei Phasen ab. Man unterscheidet die afferente Sensibilisierungs- oder Induktionsphase sowie die efferente Auslöse- oder Effektorphase. Bei der Sensibilisierung wird das Antigen nach dem Eindringen in die Epidermis durch antigenpräsentierende Zellen aufgenommen und zum regionalen Lymphknoten transportiert. Hier erfolgt die Antigen-Präsentation an CD4-tragende T-Lymphozyten, welche zu antigenspezifischen T-Gedächtniszellen differenzieren und in den Kreislauf sowie auch in periphere Organe wie die Haut auswandern (Lonsdorf und Enk 2009). Die Sensibilisierungsphase ist klinisch nicht zu erkennen. Erst nach dem zweiten Eindringen des gleichen Allergens kommt es zur Effektorphase, welche durch die Freisetzung zahlreicher Entzündungsmediatoren und die Rekrutierung verschiedener Zellen des angeborenen Immunsystems charakterisiert ist. Klinisch entsteht ein Ekzem (Gaspari und Katz 1991). Die Effloreszenzen treten in Mausversuchen zwischen 24 und 48 Stunden nach erneuter Allergenexposition auf. Bei Menschen dauert dieser Vorgang manchmal bis zu 72 Stunden oder selten sogar noch länger (Saint-Mezard 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Modell der Kontakthypersensitivität ist eine Methode zur Untersuchung der Kontaktallergie in Mäusen. Die vorliegende Arbeit analysiert immunologische Vorgänge bei vier Mauslinien (C57BL/6-Wildtyp-Mäuse, MyD88-defiziente, TLR3-defiziente und MyD88/TLR3-doppeldefiziente Mäuse) und vergleicht deren kontaktallergische Immunantworten miteinander. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, wie die bestehenden Gendefekte, die durch ein obligates Kontaktallergen ausgelösten immunologischen Vorgänge beeinflussen sowie ob und welche Unterschiede in den Abläufen der Immunantwort sich zwischen den einfach- und den doppelt-defizienten Mauslinien zeigen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (Nr. 12/836). Die Versuche wurden an vier Mauslinien durchgeführt: MyD88-defizienten, TLR3-defizienten, MyD88/TLR3-doppeldefizienten sowie Wildtyp C57BL/6-Mäusen. Die Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen (SPF = *specific pathogen free*) in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Sie unterlagen einem 12- Stunden Tag- und Nacht-Rhythmus und wurden mit Wasser und Trockenfutter *ad libitum* versorgt. In allen Versuchen waren die Mäuse zwischen acht und zwölf Wochen alt. Männliche und weibliche Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip für die Experimente ausgewählt.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Tabelle 1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Biotin Blocking System	Dako, Glostrup, Dänemark
DNase I 1%	Roche Diagnostics, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin Y	Merck, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS Flow™-Lösung	BD Biosciences, USA
FACS Shut down™-Lösung	BD Biosciences, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich

Tabelle 2 Chemikalien

Forene® (1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether) (Isofluran)	Abbott, Deutschland
Haematoxylin	Merck, Deutschland
Liberase TL	Roche Diagnostics, Deutschland
Oxazolon (4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	Merck Deutschland
PBS	PAA, Pasching, Österreich
RPMI-1640	PAA, Pasching, Österreich
Tissue-Tek Einbettmedium (OCT)	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Absaugsystem Vacusafe Comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Anästhesie Kompaktsystem	VisualSonics, USA
Autoklav	Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan
Brutschrank HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Deckgläser	Gerhard Menzel, Braunschweig
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen-Gefäße 0,5 ml; 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACSCanto II	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS- Rörchen 5 ml	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Tabelle 4 Geräte und Verbrauchsmaterial

50 µm Filcon	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Inverses Mikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kamera am Mikroskop (AxioCam MRc)	Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA
Kühl- und Gefrierschränke +4°C; -20°C; -80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikrohomogenator	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop (Axioskop 2)	Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA
Mikrotom Leica EG 1150C	Leica, Wetzlar, Deutschland
Multipette	Brand, Wertheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Objekträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe PipetBoy accu	IBS Integra Biosciences Fernwald, Deutschland
Präzisionsmessgerät Elektronische Schieblehre	Kroeplin, Schlüchtern, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Rasierer ER1411s	Panasonic, Hamburg, Deutschland
Schere, anatomisch	Hammacher, Solingen, Deutschland
Schüttler	Grant-bio, Cambridge, UK
Tischzentrifuge Heraeus Pico17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortex Mixer L-46	Labinco, Breda, Niederlande
Zellkultur-Platten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Multifuge 1S-R Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Rotina 35	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.2.3 Antikörper und Isotypkontrollen für FACS

Tabelle 5 Antikörper und Isotypkontrollen für FACS

Antigen (murin)	Klon	Ursprungsspezies	Markierung	Hersteller
CD3 ϵ	145-2C11	Hamster	APC-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4	H129.19	Ratte	PE	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
CD8a	53-6.7	Ratte	FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b	M1/70	Ratte	PE	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
CD11c	N418	Hamster	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD16/CD32 (Truostain Fc-Block)	93	Ratte		BioLegend, San Diego, CA, USA
CD25	PC 61	Ratte	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD44	IM7	Ratte	APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD62L	MEL-14	Ratte	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD69	H1.2F3	Hamster	APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD103	M290	Ratte	Alexa Fluor 647	BioLegend, San Diego, CA, USA
F4/80	BM8	Ratte	FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Gr1	RB6-8C5	Ratte	APC	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
TCR $\alpha\beta$	H57-597	Hamster	FITC	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
TCR $\gamma\delta$	GL-3	Hamster	PE	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
IgG2b	TBE15	Ratte	FITC	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
IgG2b	TBE15	Ratte	PE	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
IgG2 α_k	RTK2758	Ratte	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG	HTK888	Hamster	APC-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 6 Antikörper und Isotypkontrollen für FACS

IgG	HTK888	Hamster	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG2b	TBE15	Ratte	APC	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
IgG	HTK888	Hamster	PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG2a _κ	RTK2758	Ratte	APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG1 _κ	RTK4530	Ratte	Alexa Fluor 488	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG	eBio299Arm	Hamster	APC	eBioscience, San Diego, CA, USA

2.2.4 Software

Tabelle 7 Software

Software	Bezugsquelle
AxioVision Rel 4.7	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FACS Diva Software	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
R (Programmiersprache)	R Foundation, Wien, Österreich

2.3 Methoden

2.3.1 *In-vivo*-Behandlungen

2.3.1.1 Narkose

Die Narkose wurde in einer Inhalationskammer durchgeführt. Als volatiles Anästhetikum wurde Isofluran (Forene®) verwendet. Die Mäuse wurden nacheinander laut Käfiganordnung narkotisiert und erst unter vollständiger Anästhesie behandelt.

2.3.1.2 Rasieren

Die Mäuse wurden zwei Tage vor der Sensibilisierung am unteren Rücken sorgfältig mit einem elektrischen Rasierer unter Narkose rasiert.

2.3.1.3 Ohrdickenmessung

Die Messung der Ohrdicken erfolgte kurz vor der erneuten Allergenexposition sowie zwölf bis sechsundneunzig Stunden danach. Die Messung erfolgte zu jedem Zeitpunkt unter Narkose jeweils standardisiert an drei Stellen am rechten und am linken Ohr mit einer elektronischen Schieblehre. Es wurde stets ein Mausohr mit Oxazonol behandelt, während das andere Ohr mit dem Vehikel (Ethanol) behandelt wurde. Um den Einfluss der Behandlung zu messen, wurde die Differenz zwischen dem mit Oxazonol behandelten und dem mit Vehikel behandelten Ohr bestimmt, und zwar für jede Maus und jeden Zeitpunkt. Basierend auf diesen Daten wurden für alle Zeitpunkte und alle Mauslinien die mittleren Ohrdickendifferenzen und die zugehörigen Standardfehler berechnet.

2.3.1.4 Euthanasie

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte schmerzfrei in einer CO₂-Kammer. Dafür wurden die Mäuse narkotisiert und erst bei Bewusstlosigkeit für mindestens 2 min in die CO₂-Kammer gelegt. Vor der Präparation wurde immer die Schmerzreaktion an den sensibelsten Stellen, am Mund und an den Pfoten, getestet.

2.4 Modell der allergischen Kontaktdermatitis

Die Sensibilisierung wurde mit 3%iger Oxazolol-Lösung (in Ethanol) durchgeführt. Jeder Maus wurden unter Narkose auf den zwei Tage zuvor rasierten Rücken 100 µl der Lösung gleichmäßig aufgetragen.

Die erneute Allergenexposition erfolgte am fünften Tag nach der Sensibilisierung. Dafür wurde eine 1%ige Oxazolol-Lösung (in Ethanol) verwendet. Es wurden jeweils 20 µl der Lösung auf das rechte Mausohr gleichmäßig appliziert. Auf das linke Ohr wurden bei jeder behandelten Maus 20 µl Ethanol (Vehikel) aufgetragen.

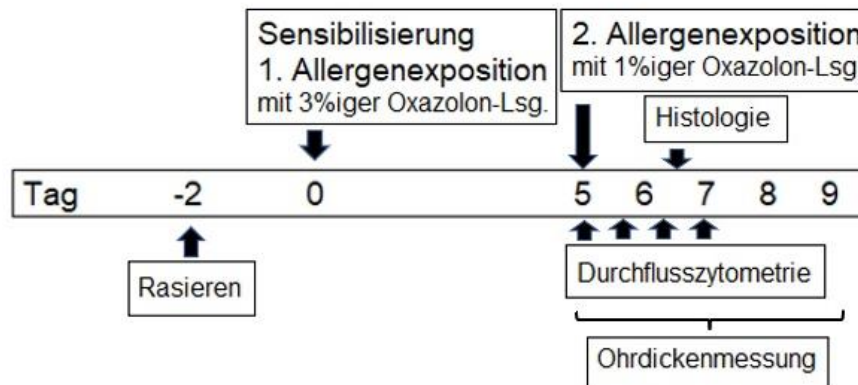


Abbildung 2 Behandlungsschema des Kontakthypersensitivitätsmodells. Die Mäuse werden am unteren Rücken rasiert und zwei Tage später an der rasierten Stelle mit 3%iger Oxazolone-Lösung sensibilisiert. Fünf Tage nach der Sensibilisierung erfolgt die erneute Allergenexposition mit 1%iger Oxazolone-Lösung. Zur Auswertung werden die Ohrdicken (als klinisches Korrelat der Hautentzündung) gemessen sowie durchflusszytometrische und histologische Untersuchungen durchgeführt.

2.5 Histologie

36 Stunden nach der Allergenexposition wurden die Mäuse in einer CO₂-Kammer schmerzlos getötet. Die Ohren wurden abgeschnitten und über Nacht in 4%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (in PBS pH 7,4) bei Raumtemperatur fixiert, in einer Alkoholreihe sowie Xylol dehydriert und in Paraffin eingebettet. Nach Aushärten der Blöcke wurden diese auf einer Kühlplatte mindestens eine Stunde gekühlt. Mit einem Mikrotom wurden 3 µm dünne Serienschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Glasobjektträger aufgezogen und bei 37°C über Nacht getrocknet. Um das auf den Objektträger aufgetragene Gewebe zu färben, erfolgte mit Hilfe von Xylol und Ethanol die Entparaffinierung.

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung macht Gewebestrukturen durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin und den Plasmafarbstoff Eosin sichtbar. Die Paraffin-Präparate wurden für eine Stunde auf eine Kühlplatte gelegt. Mit einem Mikrotom wurden 3 µm dünne Schnitte angefertigt, nach Streckung im Warmwasserbad auf Objektträger gezogen wurden. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte nach dem Protokoll in Tabelle 5.

Tabelle 8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nr.	Art.-Nr.	Lösung	Dauer (min)	Vorgang
1.	11070	Xylol	5	Entparaffinieren
2.	11070	Xylol	5	Entparaffinieren
3.	11470	Ethanol 96 %, vergällt	2	Wässern
4.	11579	Ethanol 80 %, vergällt	2	Wässern
5.	12089	Ethanol 70 %, vergällt	2	Wässern
6.	12503	Ethanol 60 %, vergällt	2	Wässern
7.	R00337	Aqua entmin.	2	Wässern
8.	10231	Hämatoxylin, sauer nach Mayer	5	Färben der Kerne
9.	R00525	Aqua entmin.	12	Spülen
10.	10177	Eosin 1%ig, wässrig	5	Färben d. Gewebe
11.	R00525	Aqua entmin.	5	Spülen
12.	11583	Ethanol 80 %, unvergällt	1	Differenzieren
13.	11470	Ethanol 96 %, vergällt	2	Entwässern
14.	11470	Ethanol 96 %, vergällt	2	Entwässern
15.	11365	2-Propanol (Isopropanol)	2	Entwässern
16.	11070	Xylol	5	Entwässern
17.	11070	Xylol	5	Entwässern
18.	12318	Eindeckmittel (xylolhaltig)	-	Eindecken

2.6 Herstellung der Zell-Suspensionen aus Organen

2.6.1 Lymphknoten-Suspension

Für die Untersuchung der Lymphknoten sowie für die Entnahme der Ohren wurden die Mäuse in der CO₂-Kammer getötet (siehe 2.2.1.6). Es wurden jeweils rechts und links die aurikulären Lymphknoten entnommen und separat in jeweils 0,5 ml PBS auf Eis aufbewahrt. Danach wurden die Lymphknoten manuell homogenisiert und durch ein 50 µm *Falcon* filtriert. Um die Zellzahl pro Gefäß zu bestimmen, wurden die Suspensionen 1:10 mit Trypanblau-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.6.2 Ohr-Suspension

Die abgeschnittenen Ohren wurden mittels Pinzetten in dorsale und ventrale Hälften geteilt, in 0,5 ml Liberase-Lösung (0,5 mg/ml Liberase TL, 0,05 % DNase I in RPMI) pro Ohrhälfte verbracht und mit einer kleinen Schere in sehr kleine Teile (ca. 1 mm²) geschnitten. Nach 90 Minuten Inkubation bei 5 % CO₂ und 37°C wurde die weitere enzymatische Reaktion durch Zugabe von je 50 µl fötalem Kälberserum (FCS) gestoppt. Anschließend wurde jede Probe mindestens fünfzigmal mit einer Pipette homogenisiert, über ein 50 µm *Falcon* filtriert, mit 2 x 0,5 ml RPMI nachgespült, und danach 7 Minuten bei 1300 rpm (300 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment jeweils in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau im Mischungsverhältnis 1:2 bestimmt.

2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) ist eine quantitative lasergestützte Technik zur Bestimmung der Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen und anderen Partikeln in Suspension. Mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper (oder anderer Reagenzien) werden die Zellen nach ihren physikalischen Eigenschaften sortiert und damit bestimmten Populationen zugeordnet. Die Antikörper sind gegen Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene gerichtet. Die Eigenschaften der Zellen werden durch Messung des Emissionsspektrums sowie der Fluoreszenzintensität untersucht, während diese einzeln nacheinander durch eine dünne Messkammer (*flow cell*) fließen. Das Laserlicht wird beim Passieren der Zelle gestreut. Menge und Richtung des gestreuten Lichts korrelieren mit Größe und Struktur der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) definiert die Beugung des Lichts, welche vom Volumen der Zelle abhängig ist. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts. Die Brechung hängt von vielen Parametern wie Granularität der Zelle, Größe und Struktur des Zellkerns sowie Menge der Vesikel ab. In den Versuchen wurden das BD FACS Canto II und die Software BD Diva verwendet.

Zur Färbung für die Durchflusszytometrie wurden jeweils 100.000 Zellen/FACS-Röhrchen eingesetzt. Danach erfolgte die Zugabe von CD16/CD32 Block je 0,5 µl/Röhrchen (0,1 µg). Nach 5 Minuten Inkubation bei +4°C erfolgte die Antikörperzugabe ohne vorheriges Waschen. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 4°C inkubiert, mit PBS einmalig gewaschen und 7 Minuten lang bei 1300 rpm (= 300 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt und das Sediment jeweils in 0,25 ml PBS-Lösung resuspendiert. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Messung auf Eis gelagert. Die Pipettierschemata für die Lymphknoten-Suspension sind in den Tabellen 6-8 zusammengefasst, die für die Ohr-Suspension in den Tabellen 9-11. Die Antikörpermengen gelten jeweils für 100.000 Zellen in 100 µl.

Tabelle 9 Pipettierschema für Lymphknoten-Suspension 1. Färbung

Kondition	Proben					
	CD8a FITC	CD4 PE	7-AAD	CD62L PECy7	CD44 APC	CD3e APC-Cy7
Kontrolle (nicht gefärbt)	-	-	-	-	-	-
CD8 FITC 0,1 µg	Isotyp	+	+	+	+	+
CD4 PE 0,1 µg	+	Isotyp	+	+	+	+
7-AAD 0,025 µg (10 min vor Messung)	+	+	-	+	+	+
CD62 PE-Cy7 0,025 µg	+	+	+	Isotyp	+	+
CD44 APC 0,025 µg	+	+	+	+	Isotyp	+
CD3e APC/Cy7 0,05 µg	+	+	+	+	+	Isotyp

Tabelle 10 Pipettierschema für Lymphknoten-Suspension 2. Färbung

Kondition	Proben					
	CD8a FITC	CD4 PE	7-AAD	CD25 PECy7	CD69 APC	CD3e APC-Cy7
CD8 FITC 0,1 µg	Isotyp	+	+	+	+	+
CD4 PE 0,1 µg	+	Isotyp	+	+	+	+
7-AAD 0,025 µg (10 min vor Messung)	+	+	-	+	+	+
CD25 PE/Cy7 0,1 µg	+	+	+	Isotyp	+	+
CD69 APC 0,125 µg	+	+	+	+	Isotyp	+
CD3e APC/Cy7 0,05 µg	+	+	+	+	+	Isotyp

Tabelle 11 Pipettierschema für Lymphknoten-Suspension 3. Färbung

Proben					
Kondition	TCR $\alpha\beta$ FITC	TCR $\gamma\delta$ PE	7-AAD	CD103 APC	CD3e APC-Cy7
TCR β FITC 0,1 μ g	Isotyp	+	+	+	+
TCR $\gamma\delta$ PE 0,5 μ l	+	Isotyp	+	+	+
7-AAD 0,025 μ g (10 min vor Messung)	+	+	--	+	+
CD103 Alexa Fluor 647 0,1 μ g	+	+	+	Isotyp	+
CD3e APC/Cy7 0,05 μ g	+	+	+	+	Isotyp

Tabelle 12 Pipettierschema für Ohr-Suspension 1. Färbung

Proben						
Kondition	CD8a FITC	CD4 PE	7-AAD	CD25 PECy7	CD44 APC	CD3e APC-Cy7
Kontrolle (nicht gefärbt)	-	-	-	-	-	-
CD8 FITC 0,1 μ g	Isotyp	+	+	+	+	+
CD4 PE 0,1 μ g	+	Isotyp	+	+	+	+
7-AAD 0,025 μ g (10 min vor Messung)	+	+	--	+	+	+
CD25 PE/Cy7 0,1 μ g	+	+	+	Isotyp	+	+
CD103 Alexa Fluor 647 0,1 μ g	+	+	+	+	Isotyp	+
CD3e APC/Cy7 0,05 μ g	+	+	+	+	+	Isotyp

Tabelle 13 Pipettierschema für Ohr-Suspension 2. Färbung

Proben	F4/80 FITC	CD11b PE	7-AAD	CD11c PE-Cy7	Gr1 APC
Kondition					
F4/80 FITC 0,01 µg	Isotyp	+	+	+	+
CD11b PE 0,02 µg	+	Isotyp	+	+	+
7-AAD 0,025 µg (10 min vor Messung)	+	+	--	+	+
CD11c PE-Cy7 0,025 µg	+	+	+	Isotyp	+
Gr1 APC 0,5 µl	+	+	+	+	Isotyp

Tabelle 14. Pipettierschema für Ohr-Suspension 3. Färbung

Proben	TCRαβ FITC	TCRγδ PE	7-AAD	CD103 APC	CD3e APC-Cy7
Kondition					
TCRβ FITC 0,1 µg	Isotyp	+	+	+	+
TCRγδ PE 0,5 µl	+	Isotyp	+	+	+
7-AAD 0,025 µg (10 min vor Messung)	+	+	--	+	+
CD103 Alexa Fluor 647 0,1 µg	+	+	+	Isotyp	+
CD3e APC/Cy7 0,05 µg	+	+	+	+	Isotyp

2.8 Statistische Auswertung

Die Ohrdicken wurden standardisiert an drei Stellen gemessen und die Mittelwerte der Differenz der mit Oxazolone und der mit Vehikel behandelten Seiten wurden bestimmt (Netto-Ohrdickenschwellung). Aus den Differenzen wurde jeweils der Standardfehler berechnet.

Die Signifikanz im Versuch 3.1 wurde mithilfe des Programmes R mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde im Vergleich zur Wildtyp-Linie wie folgt gewählt: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

Die FACS-Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel mit dem zweiseitigen t-Test statistisch ausgewertet. Die Signifikanzen beziehen sich auf MyD88-defiziente, TLR3-defiziente und MyD88-defiziente Mäuse jeweils im Vergleich zum Wildtyp. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt gewählt: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

3. ERGEBNISSE

3.1 Verminderte TLR- und MyD88-Signalübertragung führt zu geringerer Ohrschwellung bei Kontakthypersensitivität

In dieser Arbeit wurde die kutane Immunantwort bei Kontaktsensibilisierung gegen das obligate Allergen Oxazolon untersucht. MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defiziente Mäuse wurden dem Wildtyp(WT) gegenübergestellt (Abbildung 3). Die Zahl der Mäuse pro Zeitpunkt und Mauslinie betrug zwischen 16 und 32. Es wurde jeweils getestet, ob es signifikante Unterschiede in der Ohrdickendifferenz zwischen Wildtyp- und den drei mutierten Mauslinien gibt. Zur statistischen Berechnung wurde ein nichtparametrischer Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben verwendet.

Die erneute Exposition mit Oxazolon induzierte eine deutliche Entzündung mit Rötung (*rubor*), Schwellung (*tumor*) und Überwärmung (*calor*). Die Schwellung wurde als Indikator der Immunreaktion gemessen.

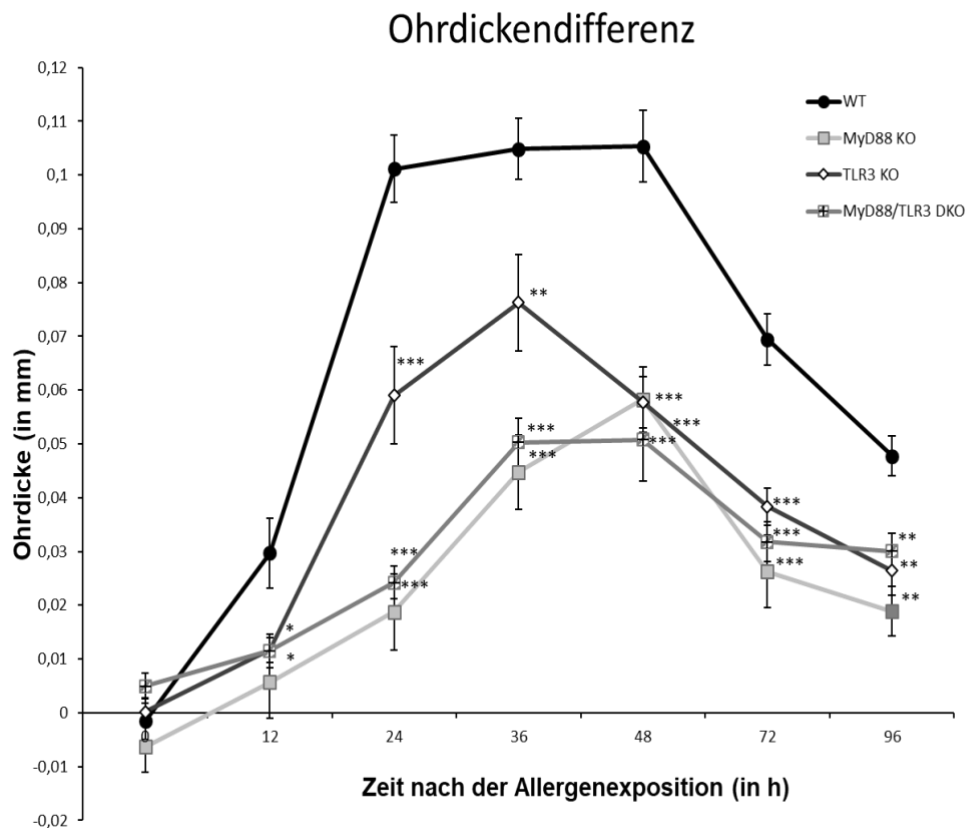


Abbildung 3 Die Ohrdickendifferenz bei der Kontakthypersensitivität in Wildtyp(WT) und in MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie im Verlauf der nächsten 96 Stunden nach Allergenexposition.

Die Entzündung der Ohren nach Behandlung mit Oxazolone verlief in den vier Mauslinien mit einer ähnlichen Dynamik. Bereits nach wenigen Stunden nahm die Ohrdicke zu, zwischen 36 und 48 Stunden wurde der Höhepunkt erreicht, danach nahm die Ohrschwellung ab. Die Reaktion fiel beim Wildtyp signifikant stärker aus als bei den mutierten Mäusen, wobei zwischen MyD88- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen kein Unterschied bestand. Die Schwellung der Ohrdicken bei TLR3-defizienten Mäusen war schwächer als beim Wildtyp, jedoch stärker als bei MyD88- und MyD88/TLR3-defizienten Tieren. Rhagaden, Vesikulationen, Schuppung oder Erosionen wurden nicht beobachtet.

Der erste signifikante Unterschied zum Wildtyp trat bereits nach 12 h auf. Dieser Unterschied war bei MyD88- ($p = 0,034$) sowie MyD88/TLR3-defizienten Mäusen ($p = 0,0367$) signifikant. Die mittlere Ohrdickendifferenz betrug zu diesem Zeitpunkt beim Wildtyp 0,029 mm, bei TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen 0,011 mm und bei MyD88-defizienten Mäusen 0,005 mm. Nach 24 h waren die Unterschiede zwischen dem Wildtyp und jeder der drei mutierten Linien hochsignifikant (TLR3-defizient: $p = 9,146e-05$; MyD88-defizient: $p = 4,21e-06$; MyD88/TLR3-defizient: $p = 5,306e-09$). Zwischen 36 und 48 h nach Allergenexposition waren die Unterschiede am größten. Die Ohrdickendifferenz MyD88- und MyD88/TLR3-defizienter Mäuse war 36 und 48 h nach Allergenexposition jeweils dreifach signifikant kleiner als die des Wildtyps (MyD88 36 h: $p = 2,259e-05$, 48 h: $p = 0,0008$; MyD88/TLR3 36 h: $p = 1,893e-07$, 48h: $p = 0,0002$). Die Entzündung bei TLR3-defizienten Mäusen verlief stärker als bei den beiden anderen mutierten Mauslinien und war 36 h zweifach signifikant kleiner ($p = 0,0012$) und 48 h nach Allergenexposition dreifach signifikant kleiner ($p = 1,852e-05$) als beim Wildtyp. Nach 36 beziehungsweise 48 h ging die Schwellung zurück. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt waren die Ohrdickendifferenzen der mutierten Linien weiterhin zweifach signifikant kleiner als bei dem Wildtyp (TLR3-KO: $p = 0,0024$; MyD88-KO: $p = 0,0022$; MyD88/TLR3: $p = 0,0084$), allerdings näherten sich die Werte an.

3.2 Verminderte Zellinfiltration in läSIONALER Haut von Mäusen mit Störungen in der TLR-Signalübertragung

Da 36 h nach Allergenexposition sowohl die Ohrschwellung in allen vier Mauslinien als auch die diesbezüglichen Unterschiede zwischen Wildtyp- und mutierten Mäusen sehr stark ausgeprägt waren, wurde die läSIONALE Haut zu diesem Zeitpunkt histologisch untersucht. Die Färbung der Ohren mit Hämatoxylin und Eosin bestätigte die Unterschiede, die bei der Messung der Ohrdicken zwischen den einzelnen Mauslinien beobachtet wurden (Abb. 4).

Die Allergenexposition bewirkte in allen Mäusen Ödembildung, Akanthose, ein Infiltrat aus Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten sowie Kapillarproliferation. Die mit Vehikel behandelte Haut zeigte diese Veränderungen hingegen nicht.

Beim direkten Vergleich der mutierten Mauslinien mit dem Wildtyp zeigte die Behandlung mit Oxazolone den stärksten Effekt bei Wildtyp-Mäusen, weniger bei TLR3-defizienten und den schwächsten bei MyD88- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen (Abb. 4).

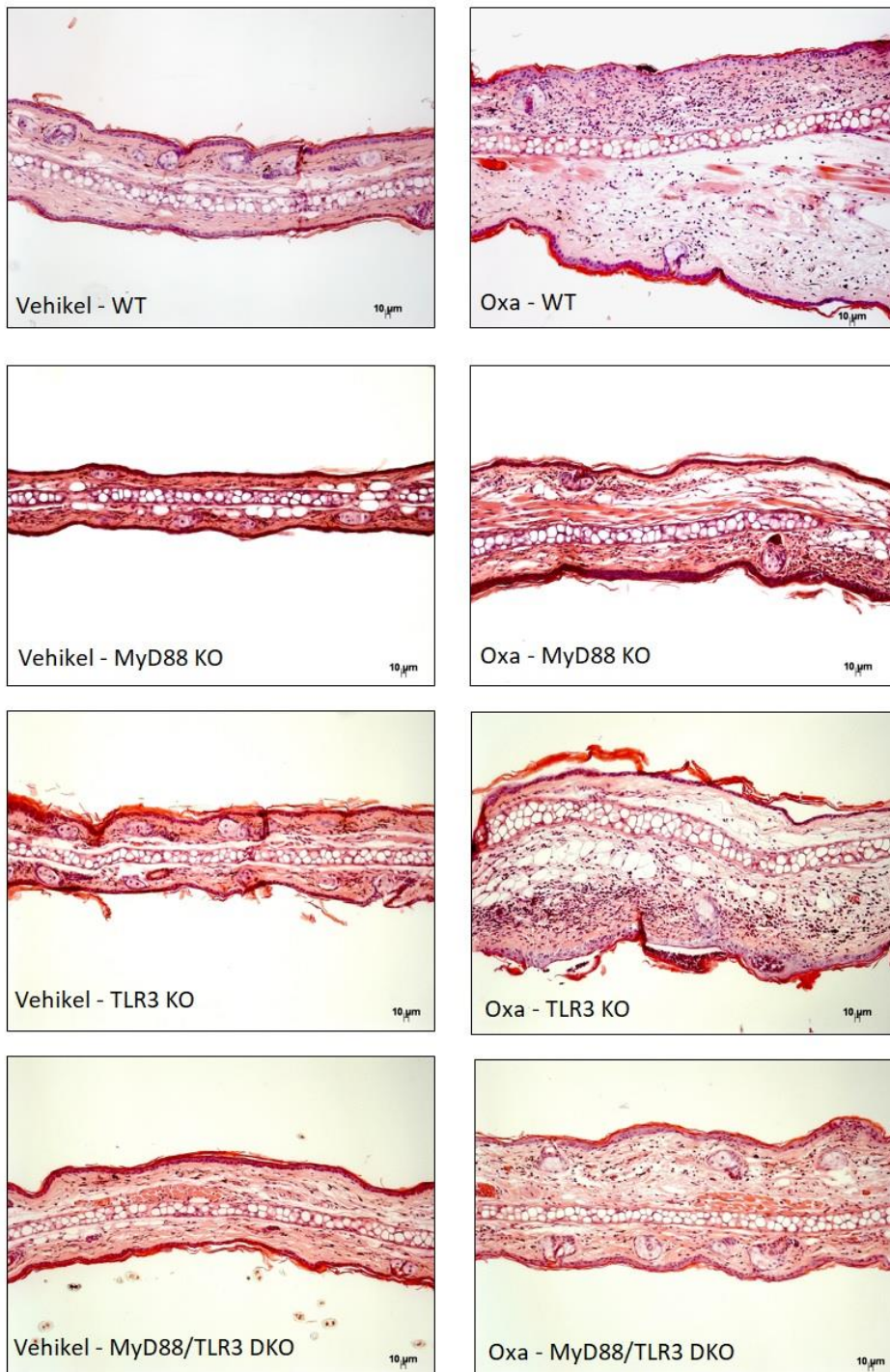


Abbildung 4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Ohrschnitte von Wildtyp-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen. Links: Vehikel-behandelten Ohren, rechts: Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Vergrößerung 100x, Längenmaßstab 10 µm.

3.3 Größte Zellinfiltration in läSIONalem Gewebe etwa 36 bis 48 Stunden nach Allergenexposition

Zellsuspensionen aus Ohren und aurikulären Lymphknoten wurden standardisiert in gleichen Volumina hergestellt. Dieser Schritt ermöglichte eine quantitative Aussage über die anschließend untersuchten Zellen. Da die Organe zu vier verschiedenen Zeitpunkten entnommen und untersucht wurden, ergab sich ein messbarer Verlauf der Gesamtzellzahl nach Allergenexposition für die Ohren und für die Lymphknoten (Abb. 5).

Sowohl makroskopisch als auch histologisch sah man signifikante Unterschiede der Ohrentzündung nach Behandlung mit Oxazolone zwischen mutierten und Wildtyp-Mäusen. Außerdem trat in den mit Oxazolone behandelten Ohren etwa 36 bis 48 Stunden nach der Allergenexposition die größte Zellinfiltration und die stärkste Zunahme der Ohrdicken auf. Zur genaueren Charakterisierung der allergischen Entzündung wurden zunächst die Zellen in den Ohren quantifiziert. Hierzu wurden Mittelwerte und Standardfehler jeweils für alle Messzeitpunkte und alle Mauslinien berechnet (jeweils 5 bis 8 Mäuse pro Linie und Zeitpunkt).

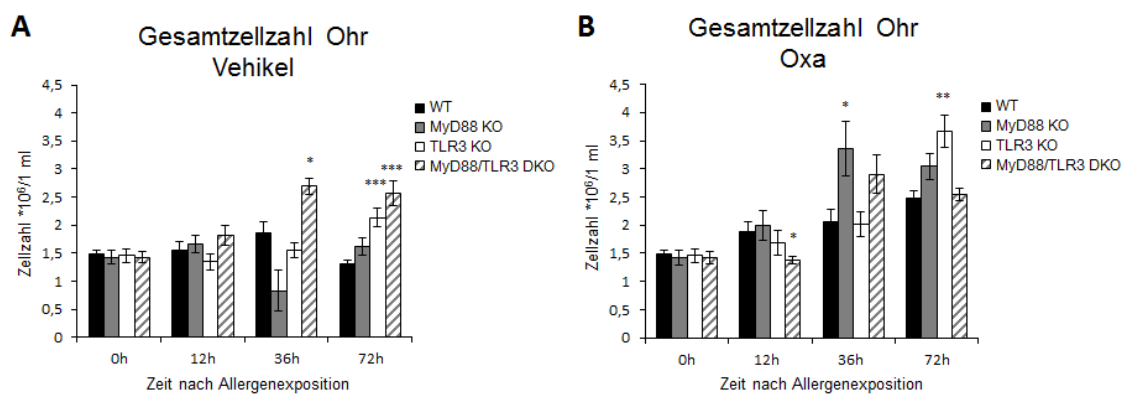


Abbildung 5 Mittlere Gesamtzellzahl der Ohren (in 10^6) pro 1 ml Zellsuspension im Verlauf der Behandlung mit Oxazolone bei Wildtyp-Mäusen, MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Allergenexposition. Gesamtzellzahl des A) Vehikel-Ohrs und Gesamtzellzahl des B) mit Oxazolone behandelten Ohrs.

Die Zellzahl in der Haut war 36 h nach Allergenexposition (Oxa) bei MyD88- sowie MyD88/TLR3-defizienten Mäusen am größten. Zu diesem Zeitpunkt betrug die mittlere Zellzahl bei MyD88-defizienten Tieren $3,36 \cdot 10^6/\text{ml}$ und war somit signifikant größer als beim Wildtyp ($p = 0,029$). Die Zellzahl des behandelten Ohrs nahm beim Wildtyp im Zeitverlauf zu. Bei TLR3-defizienten Mäusen war die maximale Zellzahl erst 72 h nach Allergenexposition erreicht ($3,66 \cdot 10^6/\text{ml}$; $p = 0,003$ im Vergleich zum Wildtyp). MyD88/TLR3-defiziente Mäuse erreichten den maximalen Wert 36 h nach Allergenexposition ($2,9 \cdot 10^6/\text{ml}$; nicht signifikant im Vergleich zum Wildtyp bei einem Signifikanzniveau von 5 %, $p = 0,062$). Wählt man ein vertretbares Signifikanzniveau von 10 % so kann man auf einen signifikanten Unterschied schließen.

Bei der Vehikel-Seite wurden ebenfalls Veränderungen der Zellzahl im Zeitverlauf beobachtet. Besonders auffällig sind die beiden letzten Messwerte bei der MyD88/TLR3-defizienten Mauslinie. Die Zellzahl betrug 36 Stunden nach der Allergenexposition $2,69 \cdot 10^6/\text{ml}$ und weitere 36 Stunden später $2,34 \cdot 10^6/\text{ml}$. In beiden Fällen waren diese Werte signifikant größer als beim Wildtyp (nach 36 h: $p = 0,01$; nach 72 h: $p = 0,0002$). Die Zellzahl dieser Mauslinie war beim mit Oxazolol behandelten Ohr größer als beim Vehikel-Ohr.

Zusammenfassend bestand in der mit Oxazolol behandelten Haut eine eindeutige Zellvermehrung. Diese ist 72 Stunden nach Allergenexposition für nahezu alle Mauslinien am größten. Die Behandlung mit Ethanol führte ebenfalls zu einer gewissen Zunahme. Diese Zunahme war jedoch grundsätzlich wesentlich geringer als in der mit Oxazolol behandelten Haut.

3.4 Unspezifische Immunantwort: Granulozyten-Einwanderung in die entzündete Haut

Zur unspezifischen Immunantwort gehört die Phagozytose durch Makrophagen, Monozyten, polymorphkernige Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und natürliche *Killer*-Zellen (Schütt und Bröker 2006). Zur Unterscheidung der verschiedenen Populationen werden Differenzierungsmarker (CD, *cluster of differentiation*) auf der Oberfläche der Immunzellen benutzt.

CD11b (Integrin alpha M) befindet sich auf mehreren Zellen des Immunsystems, vor allem auf Makrophagen/Monozyten, aber auch auf Granulozyten, natürlichen *Killer*-Zellen und einer Untergruppe der B-Lymphozyten (De La Hera et al. 1988). Expression von CD11b und Gr1 charakterisiert vor allem Monozyten und myeloide Zellen (Bronte et al. 1998).

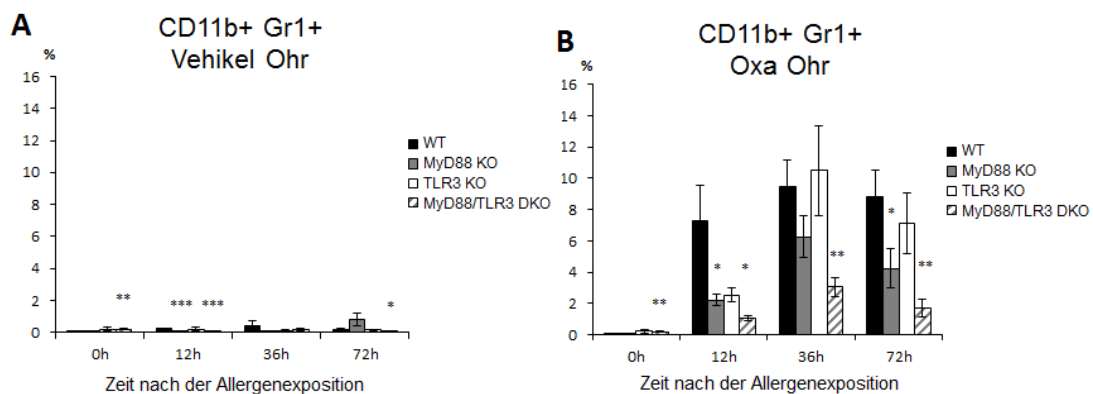


Abbildung 6 CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen bei Wildtyp(WT)-, MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach der Allergenexposition. Zellzahl des A) mit Vehikel und des B) mit Oxazol behandelten Ohrs.

Die Behandlung mit Oxazol führte im Vergleich zu Vehikel eindeutig zu einem Anstieg der CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen (Abb. 6A). Bei allen Mauslinien gab es einen deutlichen Anstieg 12 h nach Allergenexposition, ein Maximum nach 36 h und einen leichten Abfall zum letzten gemessenen Zeitpunkt.

Den schnellsten Anstieg der CD11b⁺ Gr1⁺ Zellen nach der Oxazolone-Behandlung wies der Wildtyp auf, bei dem schon nach 12 h der maximale Wert erreicht wurde. Die einfach defizienten Mauslinien verhielten sich sehr ähnlich und wiesen eine langsamere Reaktion auf als der Wildtyp. Noch schwächer verlief die Reaktion bei den Doppelmutanten, die im Vergleich zum Wildtyp zu jedem Zeitpunkt eine signifikant geringere Reaktion auf die Behandlung zeigte.

CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen sind hauptsächlich murine Makrophagen (McKnight et al. 1995). Die Zahl der CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen blieb auf der Vehikel-Seite ungefähr konstant (Abb. 7). Lediglich bei der MyD88/TLR3-defizienten Linie konnte man nach 72 h eine deutlich kleinere Konzentration als zuvor beobachten. Bei den mit Oxazolone behandelten Ohren trat bei allen vier Mauslinien ein deutlicher Anstieg der markierten Zellen auf. Dabei wurde insbesondere ein starkes Anwachsen zwischen 12 und 36 h nach der Allergenexposition registriert. Bei MyD88- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen sanken die Zahlen nach 36 h, besonders rapide bei MyD88/TLR3-defizienten Tieren.

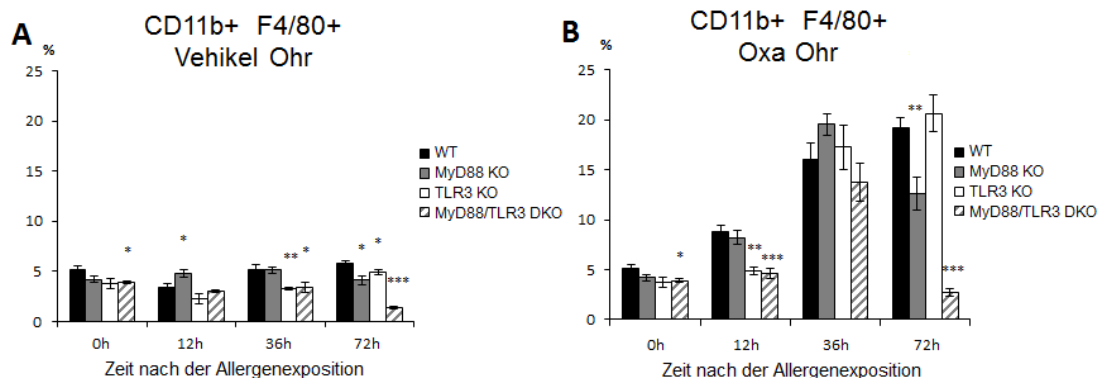


Abbildung 7 CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

CD11c⁺ F4/80⁺ Zellen (Abb. 8) waren im Vergleich zu den oben beschriebenen Populationen bis zu sechsmal weniger zahlreich. CD11c ist charakteristisch für dendritische Zellen, wobei der Antikörper F4/80 auch mit einer Untergruppe dendritischer Zellen reagiert (Poltorak und Schraml 2015). MyD88/TLR3-

defiziente Mäuse zeigten eine nahezu konstant hohe Anzahl der Zellen auf beiden Ohrseiten. Sowohl in behandelten als auch unbehandelten Ohren war die Zahl dieser Zellen 72 Stunden nach der Allergenexposition am größten.

Eine andere Gruppe dendritischer Zellen kann man mit Antikörpern gegen CD11c und CD11b identifizieren (Li et al. 2016). Die Beobachtungen sind in Abb. 9 wiedergegeben. Die Ergebnisse korrelierten mit denen der CD11c F4/80-Färbung.

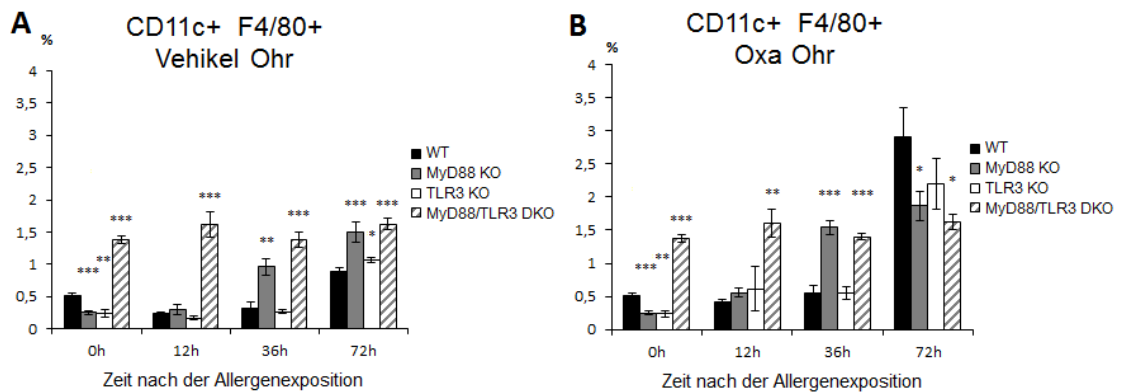


Abbildung 8 CD11c⁺ F4/80⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

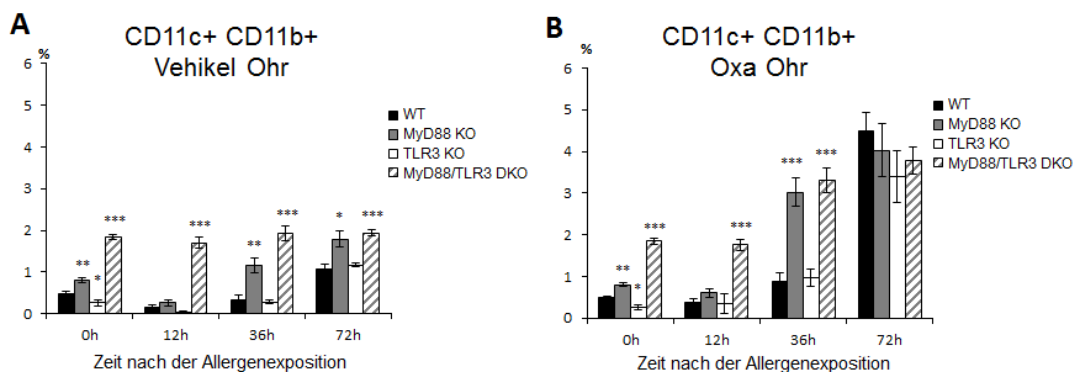


Abbildung 9 CD11c⁺ CD11b⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

3.5 Spezifische Immunantwort in der Haut weniger ausgeprägt als die unspezifische Reaktion.

Die adaptive Immunantwort wird vor allem von T- und B-Lymphozyten vermittelt. Sie ist ein effektiver Abwehrmechanismus, benötigt jedoch Stunden bis Tage, um ihre maximale Effektivität zu erreichen.

Im Vergleich zu den Lymphknoten waren CD8⁺ sowie die CD8⁺ CD3⁺ T-Zellen in der aurikulären Dermis nur in geringer Zahl vorhanden (Abb. 10 und 11). Die CD3⁺ CD8⁺ Zellen in den verarbeiteten Ohren waren eine kleine Population. Es war keine eindeutige Ein- oder Auswanderung der Zellen zu beobachten (Abbildung 11). Die MyD88/TLR3-DKO-Linie wies eine vergleichsweise große Population auf. Signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten auf der behandelten und der unbehandelten Seite waren nicht zu quantifizieren. Bei der MyD88/TLR3-DKO-Mauslinie beobachtete man die prozentual größte Population an CD3- und CD8-positiven Zellen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 11).

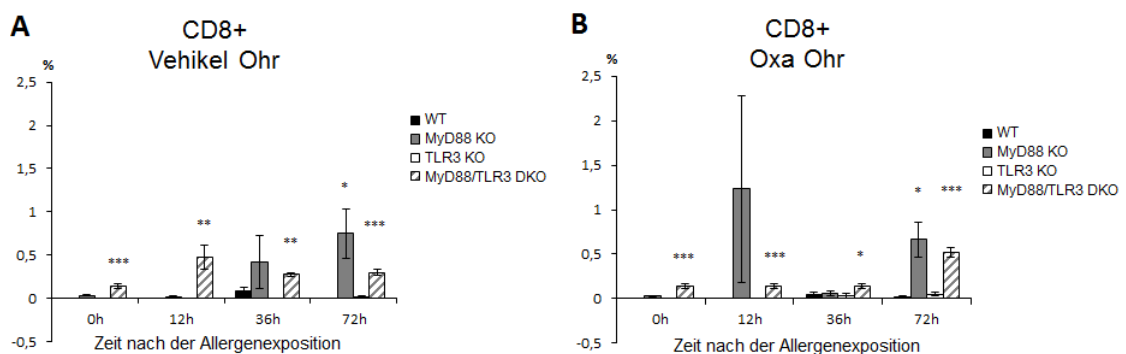


Abbildung 10 CD8⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

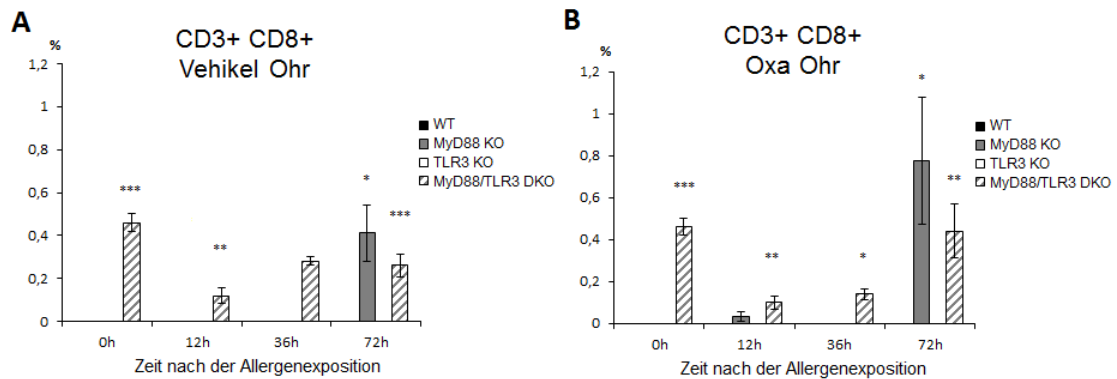


Abbildung 11 CD3⁺ CD8⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

CD4 wurde vermehrt auf der mit Oxazolone-behandelten Seite gemessen. Zusammen mit der Zeit nach der Allergenexposition stieg auch die prozentuale Zellzahl bei allen Mauslinien außer bei MyD88/TLR3-defizienten Mäusen an (Abb. 12). Bei allen Linien war die Zellzahl 72 h nach Oxazolone-Exposition maximal.

Eine ähnliche Dynamik wie CD4⁺ Zellen zeigten CD4⁺ CD25⁺ Zellen (Abb. 13), unter denen sich auch regulatorische T-Zellen befinden. Die höchsten Werte traten nach 72 h auf der Oxazolone-behandelten Seite auf, einige Zellen wanderten jedoch auch in der Vehikel-Seite ein. Die Unterschiede zwischen beiden Seiten waren 72 h nach Allergenexposition signifikant. MyD88/TLR3-defiziente Mäuse zeigten die kleinsten Populationen. Der Anstieg in MyD88-defizienten Mäusen erfolgte schneller als in den anderen Mauslinien.

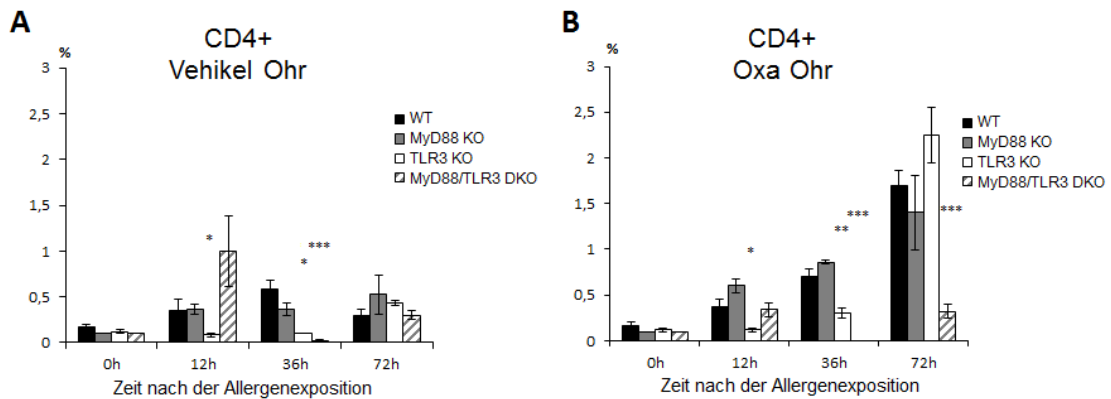


Abbildung 12 CD4⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

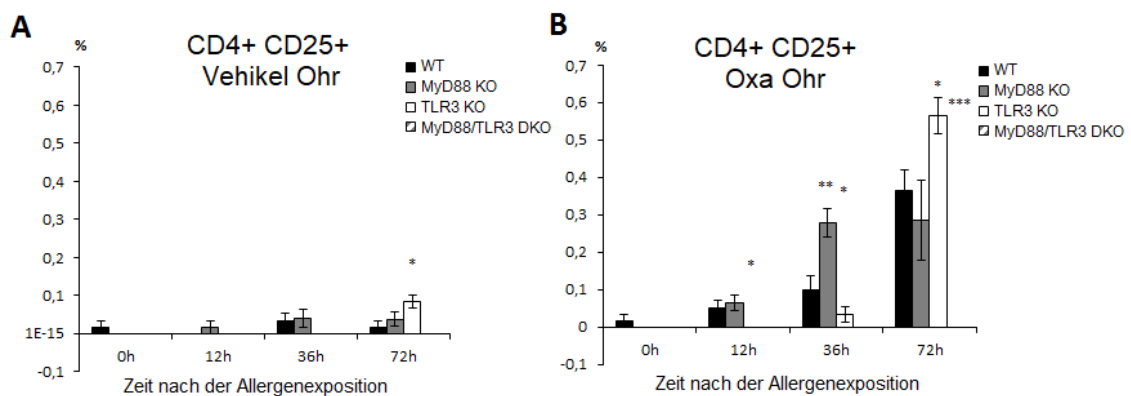


Abbildung 13 CD4⁺ CD25⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

Die $\gamma\delta$ T-Zellen befinden sich in der Maushaut vorwiegend im Epithel (Nanno et al. 2007). Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Ohren zeigten sich daher größere Populationen als in den Lymphknoten. Es fiel auf, dass vergleichbar viele Zellen auf der Vehikel-Seite wie auf der Oxa-Seite zu sehen waren (Abb. 14). Auch bei den CD103⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ (Abb. 15) sowie bei den CD103⁺ CD3⁺ Zellen (Abb. 16) bestanden kaum Unterschiede zwischen Vehikel- und Oxazolone-behandelter Seite. CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen waren in der aurikulären Dermis sehr selten (Abb. 17).

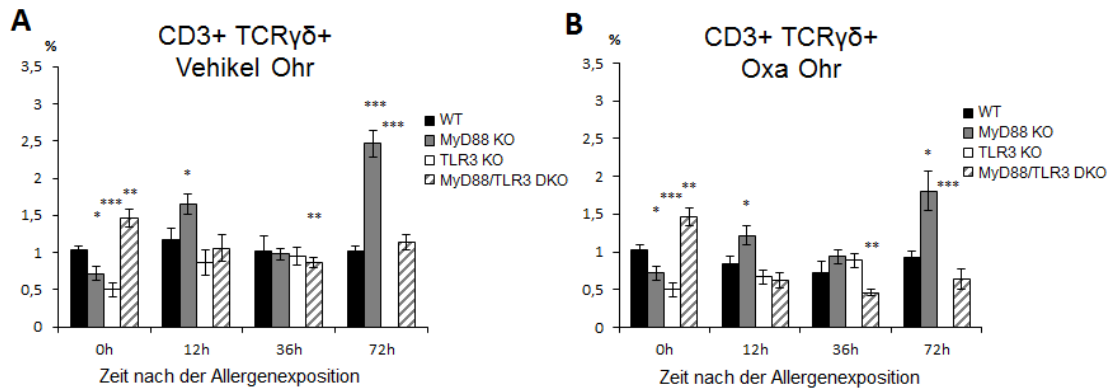


Abbildung 14 CD3⁺ TCRγδ⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

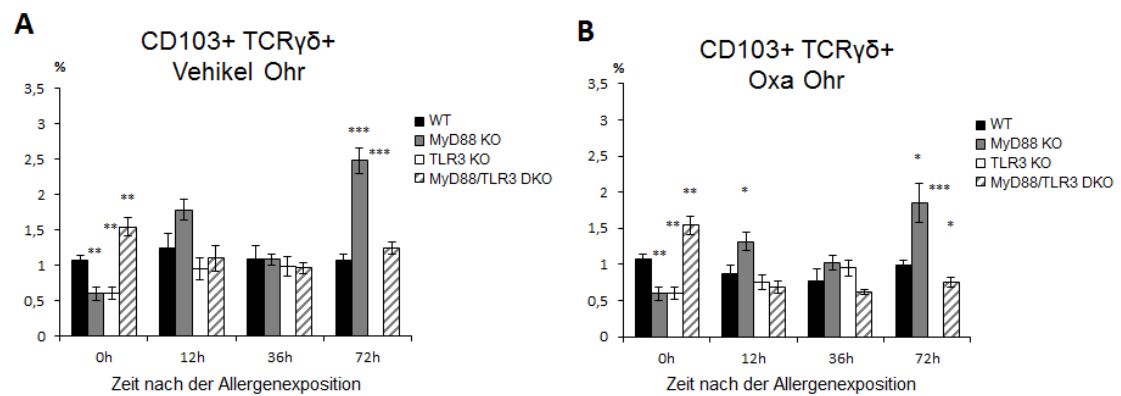


Abbildung 15 CD103⁺ TCRγδ⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

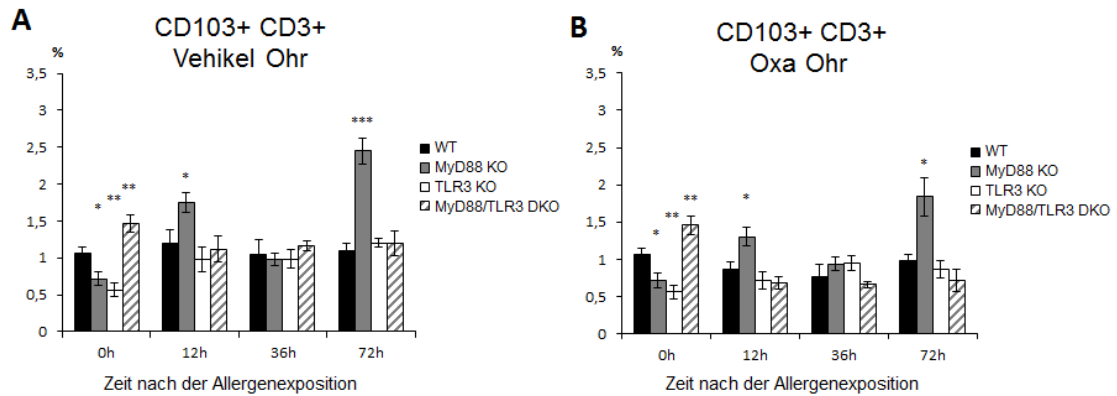


Abbildung 16 CD103⁺ CD3⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

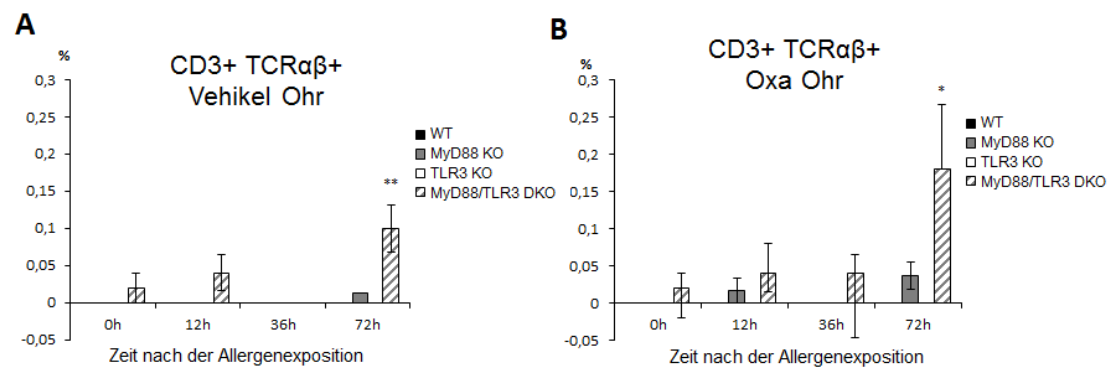


Abbildung 17 CD3⁺ TCRαβ⁺ Zellen in A) Vehikel- und B) Oxazolone-behandelten Ohren der vier Mauslinien. Die Behandlung entspricht der in Abb. 6 beschriebenen.

3.6 Verdopplung der Zellzahl in den Lymphknoten Oxazolone-behandelter Mäuse

Auch in den lokal drainierenden aurikulären Lymphknoten wurden die Zellen in jeder Mauslinie und zu jedem Zeitpunkt gezählt (Abb. 6).

Bereits 12 Stunden nach Allergenexposition kam es in der mit Oxazolone behandelten Seite zu einer deutlichen Zellvermehrung. Da die Kontakthypersensibilisierung eine Migration antigenpräsentierender Zellen zu den regionalen Lymphknoten bewirkt, bestätigte der erwartete Anstieg der Zahl dieser Zellen die erfolgreiche Sensibilisierung.

Am stärksten ausgeprägt waren die Veränderungen bei MyD88/TLR3-defizienten Mäusen. Das Maximum wurde erst zum letzten untersuchten Zeitpunkt gemessen. Die Zellzahl betrug zu diesem Zeitpunkt $19,76 \cdot 10^6/\text{ml}$ und ist damit zweifach signifikant höher als beim Wildtyp ($7,36 \cdot 10^6/\text{ml}$, $p < 0,001$). Die Zahl der LK-Zellen in TLR3-defizienten Mäusen (Oxa) betrug 12 h nach der Oxazolon-Exposition $10,35 \cdot 10^6/\text{ml}$ und blieb somit ungefähr auf dem gleichen Niveau. Bei MyD88-defizienten Mäusen (Oxa) stieg die Zellzahl einmal 12 h nach der Allergenexposition auf $6,8 \cdot 10^6/\text{ml}$ an, sowie zum letzten gemessenen Zeitpunkt auf $12,92 \cdot 10^6/\text{ml}$ ($p = 0,017$ im Vergleich zum Wildtyp).

Insgesamt wurde bei allen Mauslinien auf der mit Oxazolon behandelten Seite mindestens eine Verdopplung der Zellzahl im Zeitverlauf beobachtet (Abb. 18). Mittels des zweiseitigen t-Tests wurde die durchschnittliche Gesamtzellzahl der Mauslinien miteinander verglichen. Die Anzahl der Mäuse pro Zeitpunkt und pro Mauslinie variierte zwischen 5 und 8.

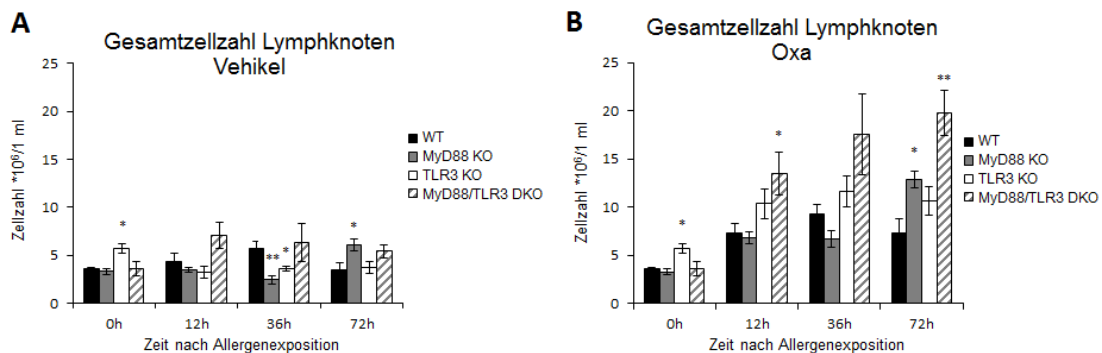


Abbildung 18 Mittlere Gesamtzellzahl in den aurikulären Lymphknoten im Verlauf der Behandlung mit Oxazolon bei den Wildtyp-, MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen (pro Zeitpunkt und Mauslinie jeweils zwischen 5 und 8 Tieren) gemessen direkt vor (0 h) sowie nach 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition. Zellzahl in den aurikulären Lymphknoten auf der A) Vehikel-Seite, Zellzahl in den aurikulären Lymphknoten auf der Seite des B) mit Oxazolon behandelten Ohrs.

3.7 Systemische Immunreaktion nach der Allergenexposition

CD4 wird von T-Helferzellen, einigen Makrophagen und Monozyten exprimiert. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr (Zhu und Paul 2008). Bis zu 40% aller lebenden Immunzellen in den Lymphknoten der Mäuse waren CD4⁺ Zellen (Abb. 19). In den mit Oxazolone behandelten Ohren nahm ihre Zahl 36 Stunden nach Allergenexposition ab, am wenigsten bei Wildtyp-Mäusen.

CD4⁺ Zellen kann man durch weitere Färbungen differenzieren; CD69, ein C-Typ-Lektin, markiert dabei früh aktivierte Lymphozyten. Bei der Doppelmarkierung von CD4 und CD69 (Abb. 20) erkannte man daher die hohe Aktivität der CD4⁺ Zellen 36 Stunden nach Allergenexposition. Zu diesem Zeitpunkt war der Vergleich vom Vehikel- zu Oxazolone- Lymphknoten bei allen Knockout-Linien signifikant (siehe Tab. 26).

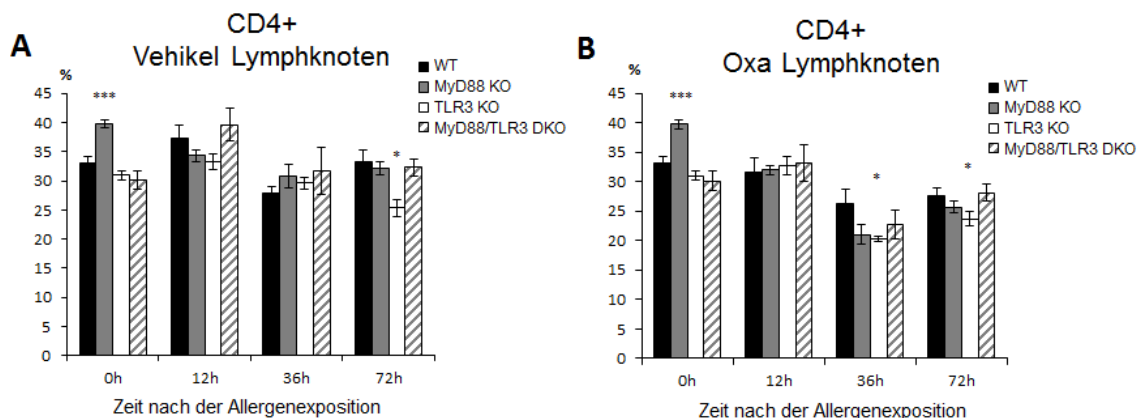


Abbildung 19 CD4⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

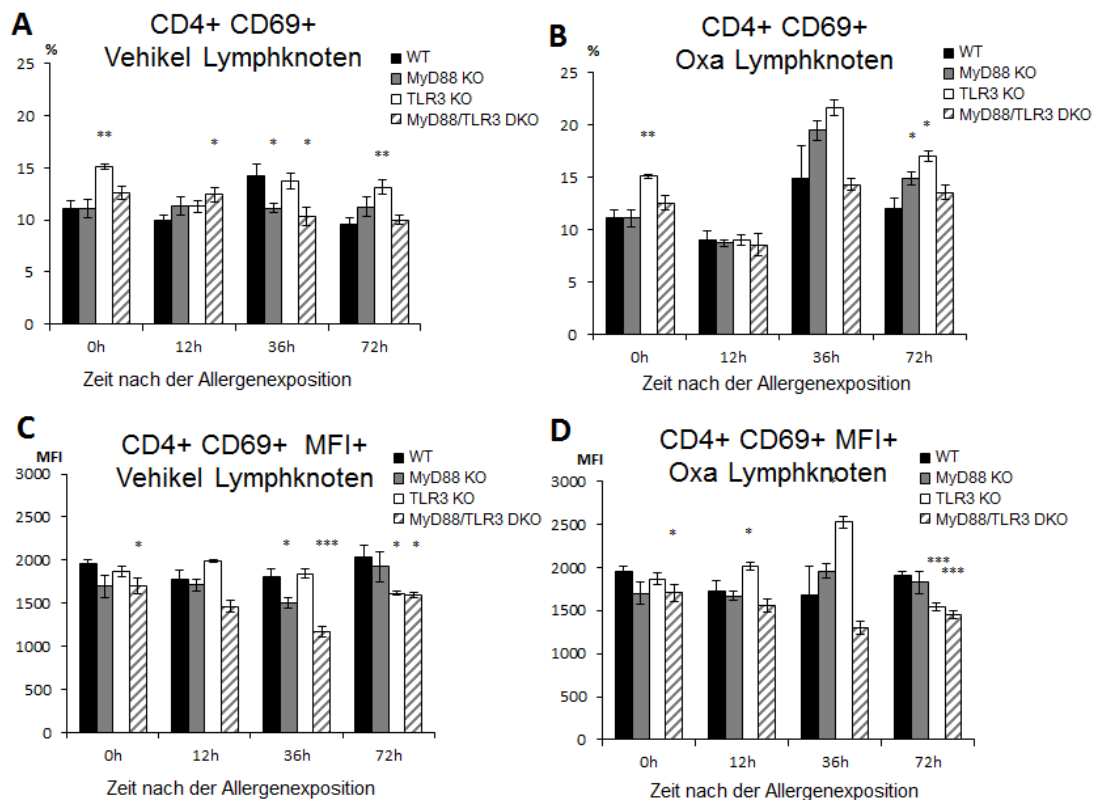


Abbildung 20 CD4⁺ CD69⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazolonexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite. C) und D) zeigen die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten (MFI).

CD8⁺ T-Zellen spielen bei der Kontaktsensibilisierung eine große Rolle (Kehren et al. 1999). Im Vergleich zu CD4⁺ Zellen waren sie zwar weniger zahlreich, machten allerdings immer noch bis zu einem Drittel aller lebenden Immunzellen in den Lymphknoten aus (Vergleich zur Vehikel-Seite). Im Zeitverlauf war die Reduzierung an CD8⁺ Zellen in den mit Oxazolone behandelten Lymphknoten vergleichbar mit dem Verhalten bei den CD4⁺ Zellen. Die CD8⁺ Lymphozyten wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer CD69-Expression näher charakterisiert (Abb. 22). Der zeitliche Verlauf war ähnlich wie bei den CD4⁺ CD69⁺-Zellen.

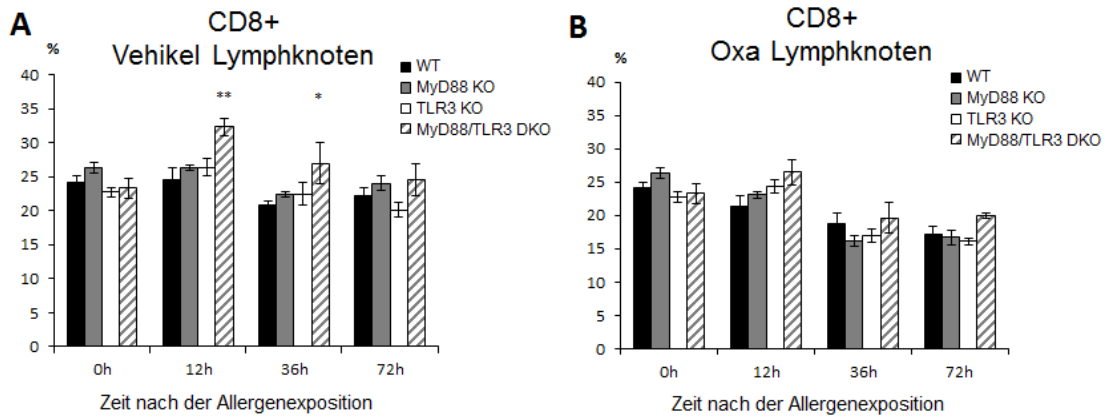


Abbildung 21 CD8⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

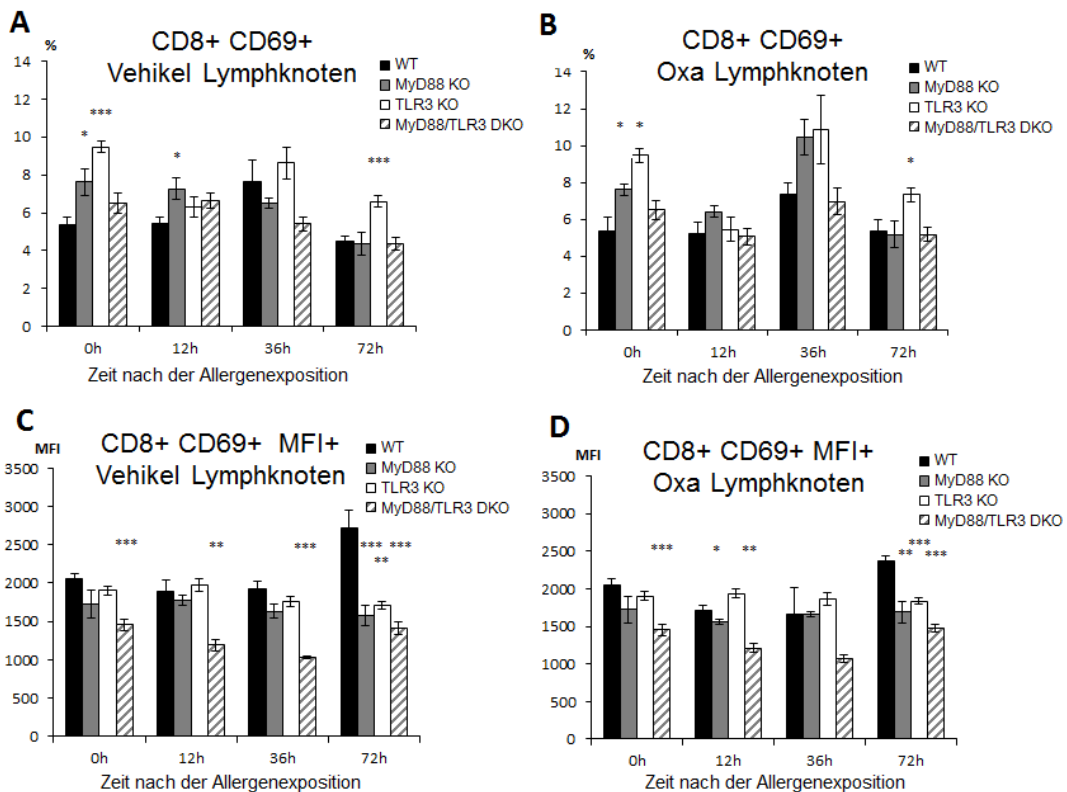


Abbildung 22 CD8⁺ CD69⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite. C) und D) zeigen die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten (MFI).

Im nächsten Schritt wurden regulatorische T-Zellen (Tregs) anhand ihrer CD4- und CD25-Expression identifiziert (Abb. 23). Tregs blockieren die Funktion verschiedener Immunzellen und modulieren die protektive Immunität, die den Verlauf allergischer Erkrankungen beeinflusst (Stock et al. 2008). Es traten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den mit Oxazolone und den mit Vehikel behandelten Mäusen auf. Der Verlauf war auf beiden Seiten ähnlich, allerdings hatten TLR3-defiziente Mäuse zum Zeitpunkt 0 h signifikant weniger CD4⁺CD25⁺-Zellen als die anderen Linien. Daher wurden auch nicht-sensibilisierte Mäuse (naiv) untersucht, bei denen signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und MyD88-defizienten Tieren bestanden (Abb. 24).

Tregs wurden ebenfalls auch gegen CD69 gefärbt (Abb. 25). An den früh aktivierten Lymphozyten wurde 12 Stunden nach der Allergenexposition in den mit Oxazolone behandelten Lymphknoten für jede Mauslinie eine kleinere Zahl dieser Zellen gemessen. 36 Stunden nach der Allergenexposition kam es bei den einzelnen defizienten Linien auf der mit Oxazolone behandelten Seite zu einem leichten Anstieg.

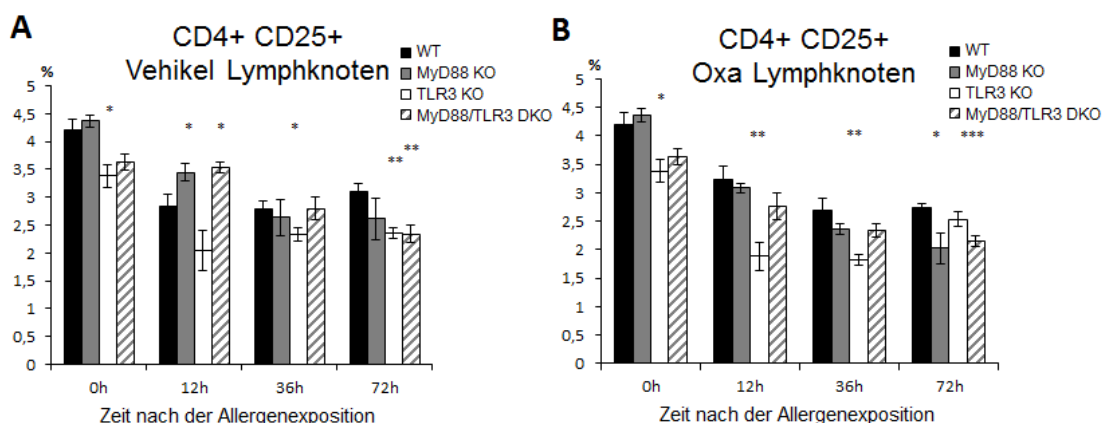


Abbildung 23 CD4⁺ CD25⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

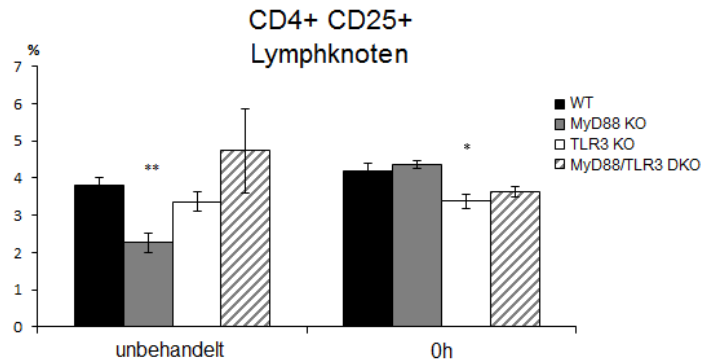


Abbildung 24 CD4⁺ CD25⁺ Lymphknoten-Zellen bei den Mauslinien Wildtyp(WT), MyD88-KO, TLR3-KO und MyD88/TLR3-DKO. Es wurden aurikuläre Lymphknoten von nicht vorbehandelten Mäusen (3 Mäuse pro Mauslinie) gegenüber den sensibilisierten Mäusen (6 Mäuse pro Mauslinie) dargestellt.

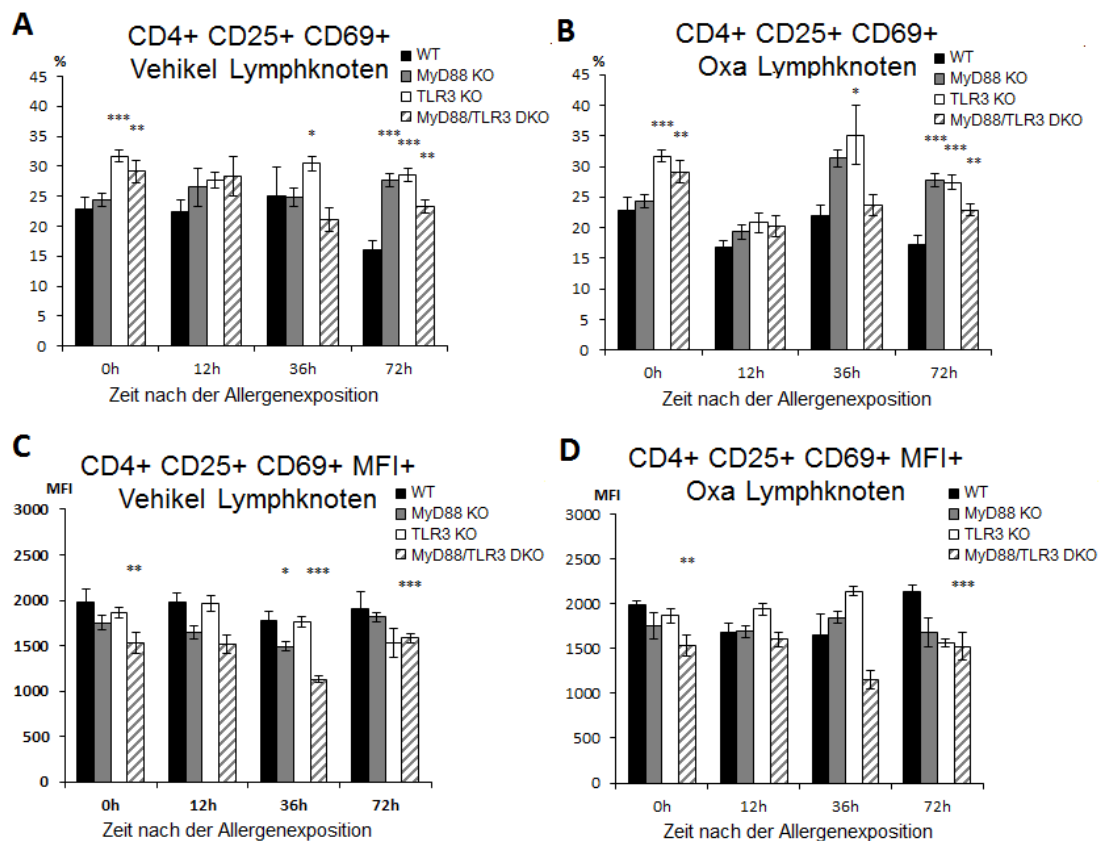


Abbildung 25 CD4⁺, CD25⁺ und CD69⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazolonexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolol behandelte Seite. C) und D) zeigen die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten (MFI).

T-Gedächtniszellen wurden anhand ihrer Expression der Adhäsionsmoleküle CD44 und CD62L identifiziert (Abb. 26). Aktivierte T-Zellen regulieren die CD44-Expression in der frühen Phase der klonalen Expansion und halten diese auf hohem Niveau aufrecht (Klekotka et al. 2010). CD62L (L-Selektin) befindet sich auf den meisten Leukozyten und vermittelt das Rollen auf Endothelzellen (Lonsdorf und Enk 2009). Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Gedächtniszellen Zellen fungieren als Effektorzellen im CHS-Modell (Kelly et al. 2007).

Naive (ungeprägte) Lymphozyten sind reife Immunzellen, die noch keinen Antigen-Kontakt hatten. Sie exprimieren viel CD62L und wenig CD44. Die Behandlung mit Oxazolone beeinflusste die Anzahl der naiven Lymphozyten, vor allem bei Wildtyp-Mäusen. Die zeitliche Dynamik war in Lymphknoten der Oxazolone- und der Vehikel-behandelten Seite ähnlich. Die Zahl der CD62L^{high}/CD44^{low}-Zellen war in MyD88/TLR3-defizienten Mäusen geringer als bei den anderen Linien. Dies gilt sowohl für die behandelte als auch unbehandelte Seite. TLR3-defiziente und Wildtyp-Mäuse wiesen ähnliche Zellzahlen auf.

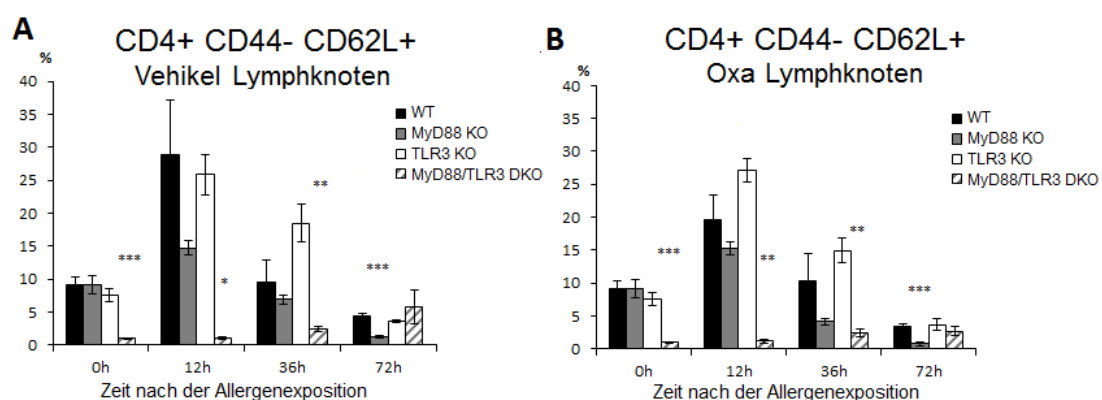


Abbildung 26 CD4⁺ CD44⁻ und CD62L⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88⁻, TLR3⁻ und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

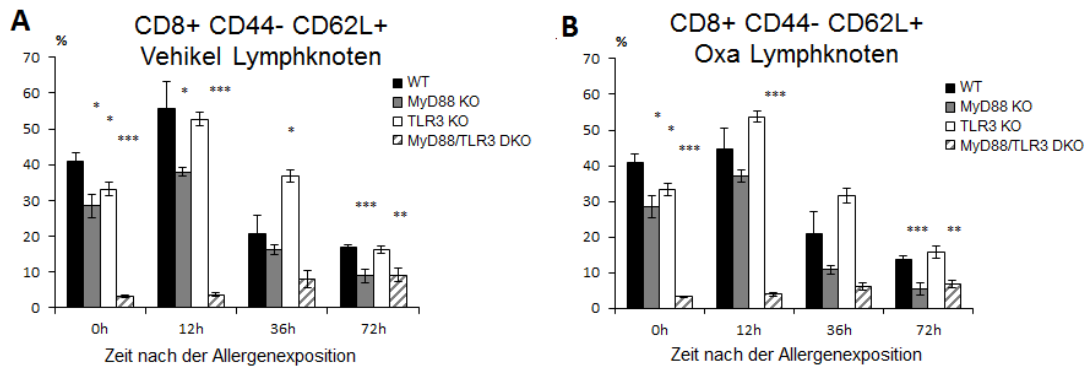


Abbildung 27 CD8⁺, CD4⁻ und CD62L⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88⁻, TLR3⁻ und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

Die Lymphknoten-Zellzahl wurde danach zwischen sensibilisierten Mäusen zum Zeitpunkt 0 h und nicht sensibilisierten Mäusen verglichen (Abb. 28). In den Lymphknoten der naiven Mäuse wurden mit Ausnahme der Doppel-Knockout-Linie signifikant weniger CD4⁺/CD44⁻/CD62L⁺ Zellen gemessen. Die Anzahl dieser Lymphozyten ist bei der MyD88/TLR3-defizienten Mäusen signifikant kleiner als beim Wildtyp und vergleichbar mit dem Wert bei den sensibilisierten Mäusen. Genauso wie beim Wildtyp war auch die Zahl der CD8⁺ CD4⁻ CD62L⁺ Zellen der naiven Lymphknoten signifikant kleiner als bei den sensibilisierten Mäusen. Der Anteil dieser Zellen bei der MyD88-KO-Linie war jedoch circa dreifach so hoch wie beim Wildtyp.

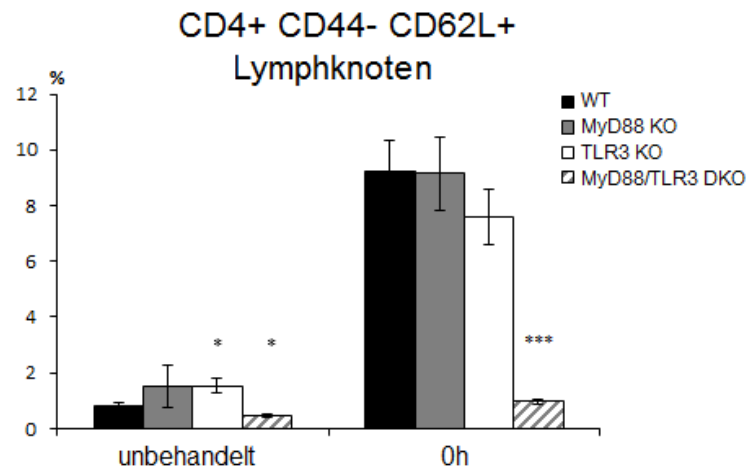


Abbildung 28 CD4⁺, CD44⁻ und CD62L⁺ Zellen bei den Mauslinien Wildtyp(WT), MyD88-KO, TLR3-KO und MyD88/TLR3-DKO. Es wurden aurikuläre Lymphknoten von nicht vorbehandelten Mäusen (3 Mäuse pro Mauslinie) gegenüber den sensibilisierten Mäusen (6 Mäuse pro Mauslinie) dargestellt.

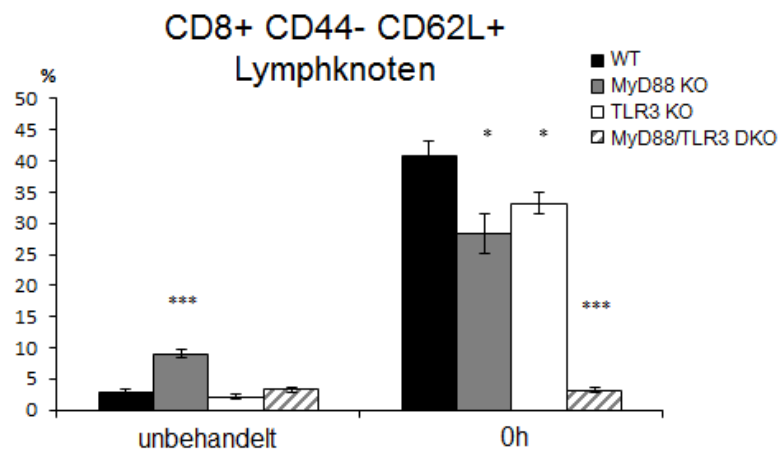


Abbildung 29 CD8⁺, CD44⁻ und CD62L⁺ Zellen bei den Mauslinien Wildtyp(WT), MyD88-KO, TLR3-KO und MyD88/TLR3-DKO. Es wurden aurikuläre Lymphknoten von nicht vorbehandelten Mäusen (3 Mäuse pro Mauslinie) gegenüber den sensibilisierten Mäusen (6 Mäuse pro Mauslinie) dargestellt.

Funktionell werden Effektor-Gedächtnis-T-Zellen und zentrale Gedächtnis-T-Zellen unterschieden. Effektor-Gedächtnis-T-Zellen exprimieren CD44 und kein

CD62L. Die zentrale Gedächtnis-T-Zellen sind durch CD62L und durch die Hochregulation von CD44 zu erkennen (Sallusto und Lanzavecchia 2009).

Die Analyse dieser Zellen vor der Behandlung zeigte einen signifikant höheren Wert bei TLR3-defizienten im Vergleich zu den anderen Mäusen (Abb. 30). Diese hohe Zahl fiel nach 12 h deutlich ab, und zwar sowohl bei den Lymphknoten der Vehikel- als auch denen der Oxazolone-Seite.

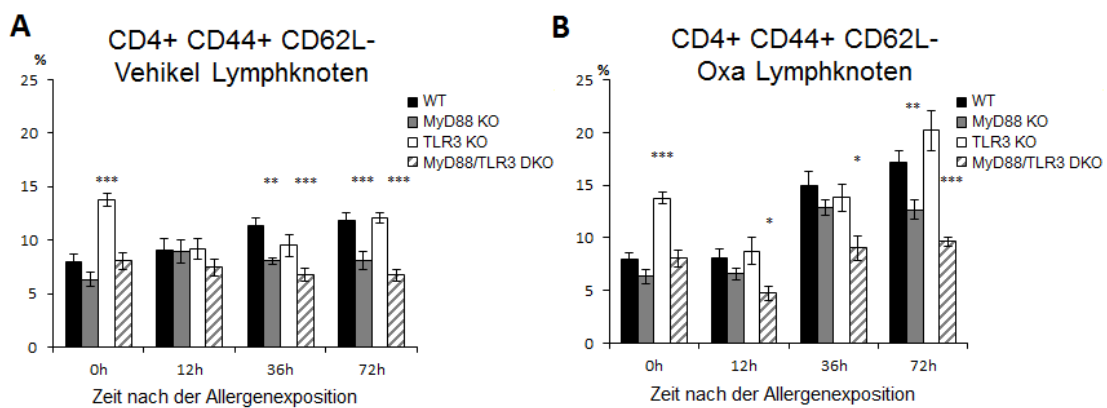


Abbildung 30 CD4⁺, CD44⁺ und CD62L⁻ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88⁻, TLR3⁻ und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

Unter den CD8⁺, CD44⁺ und CD62L⁻ Lymphknotenzellen zeigten 36 Stunden nach der Allergenexposition nur diejenigen der MyD88/TLR3-defizienten Mäuse auf der Oxazolone-Seite einen signifikanten Anstieg. Der 0 h-Wert der TLR3-defizienten Mäuse war genauso wie bei den CD4⁺, CD44⁺ und CD62L⁻ Zellen signifikant höher als beim Wildtyp. Aus diesem Grund wurden diese Zellen auch im nicht sensibilisierten Zustand untersucht (Abb. 31 - 33). Somit schien der signifikant erhöhte prozentuelle Anteil der CD44 und CD62L-exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen eine Folge der Sensibilisierung zu sein.

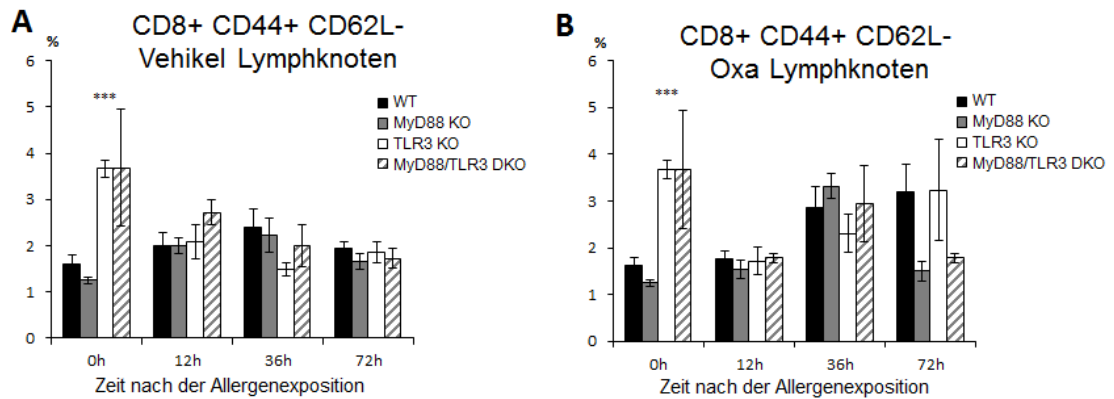


Abbildung 31 CD8⁺, CD44⁺ und CD62L⁻ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88⁻, TLR3⁻ und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazolonexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

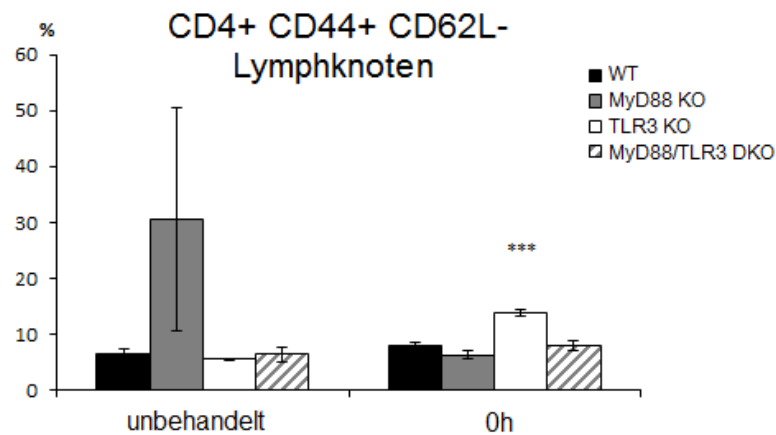


Abbildung 32 CD4⁺, CD44⁺ und CD62L⁻ Zellen bei Wildtyp(WT)-, MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen. Es wurden aurikuläre Lymphknoten von nicht vorbehandelten Mäusen (3 Mäuse pro Mauslinie) gegenüber den sensibilisierten Mäusen (6 Mäuse pro Mauslinie) dargestellt.

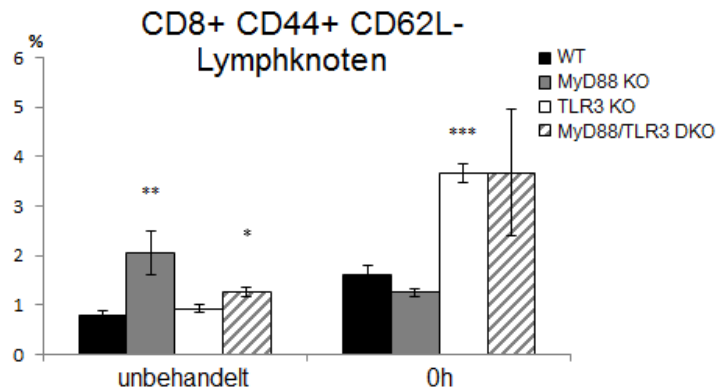


Abbildung 33 CD8⁺, CD44⁺ und CD62L⁻ Zellen bei Wildtyp(WT)-, MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen. Es wurden aurikuläre Lymphknoten von nicht vorbehandelten Mäusen (3 Mäuse pro Mauslinie) gegenüber den sensibilisierten Mäusen (6 Mäuse pro Mauslinie) dargestellt.

Wie bereits erwähnt sind die zentrale Gedächtnis-T-Zellen durch CD62L sowie durch die Hochregulation von CD44 zu erkennen. Dadurch sind diese Zellen leichter zu aktivieren und benötigen weniger Kostimulation als naive Lymphozyten (Saint-Mezard 2004). Die Zahlen der CD4⁺, CD44⁺ und CD62L⁺ Lymphknoten-Zellen waren auf der Vehikel- und auf der Oxa-Seite im Zeitverlauf ähnlich (Abb. 34). Die doppeldefiziente Linie wies über den gesamten Analysezeitraum eine signifikant höhere Zahl dieser Zellen als der Wildtyp auf.

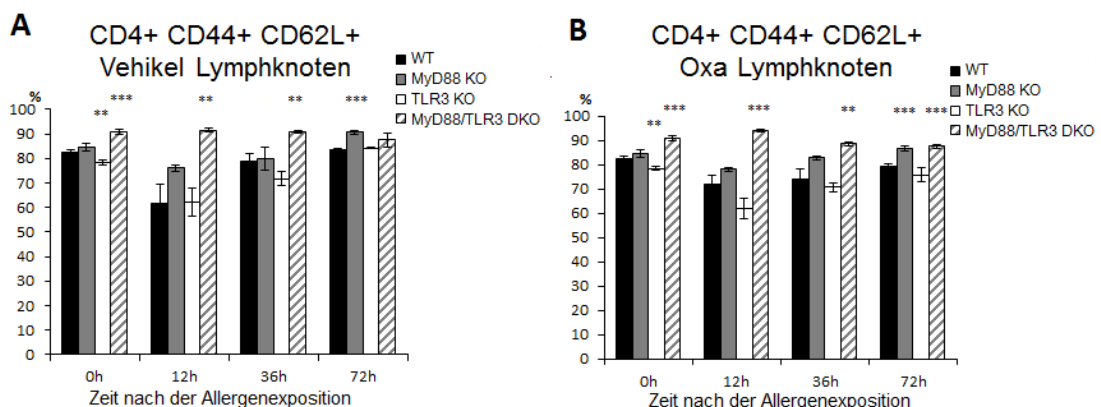


Abbildung 34 CD4⁺, CD44⁺ und CD62L⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-, TLR3- und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36

und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

Die durchflusszytometrische Messung zeigte, dass der Anteil der CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei der doppelt defizienten Mauslinie bereits kurz vor der Allergenexposition um ca. 30% höher war als beim Wildtyp war (Abb. 35). Die Zahl fiel bei der doppelt defizienten Linie im Verlauf in beiden Fällen geringfügig ab. Im Gegensatz dazu wurde sowohl beim Wildtyp als auch bei den einfach defizienten Linien ein Ansteigen nach 12 h beobachtet. Zwischen der Vehikel- und Oxazolone-Seite bestanden keine nennenswerten Unterschiede.

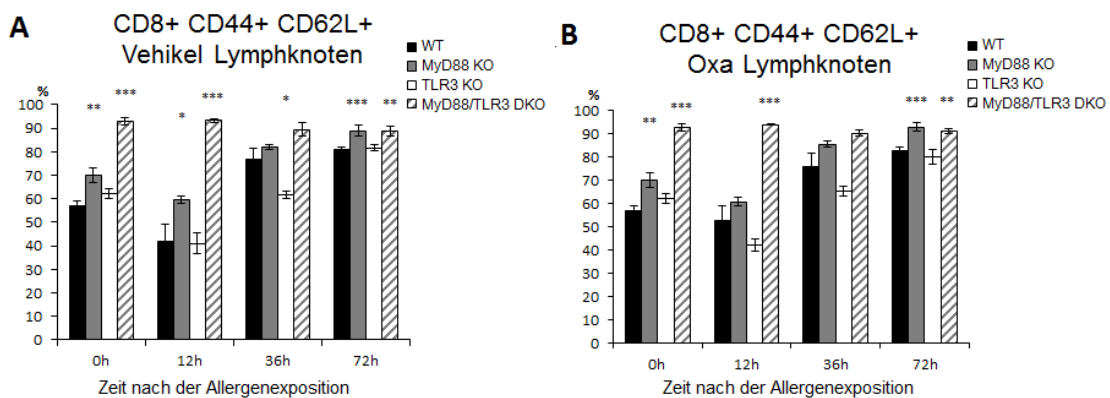


Abbildung 35 CD8⁺, CD44⁺ und CD62L⁺ Lymphknoten-Zellen bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88⁻, TLR3⁻ und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 h nach Oxazoloneexposition. Ergebnisse für die A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelte Seite.

Für diese Antikörper-Kombination wurden ebenfalls die naiven Lymphknoten aller Mauslinien untersucht (Abb. 36 und 37). Der Vergleich mit Abb. 34 und 35 legt nahe, dass sowohl CD4⁺/CD44⁺/CD62L⁺- als auch CD8⁺/CD44⁺/CD62L⁺- Zellen in Folge der Sensibilisierung aus den Lymphknoten auswandern. Dies gilt insbesondere für die letztere Population.

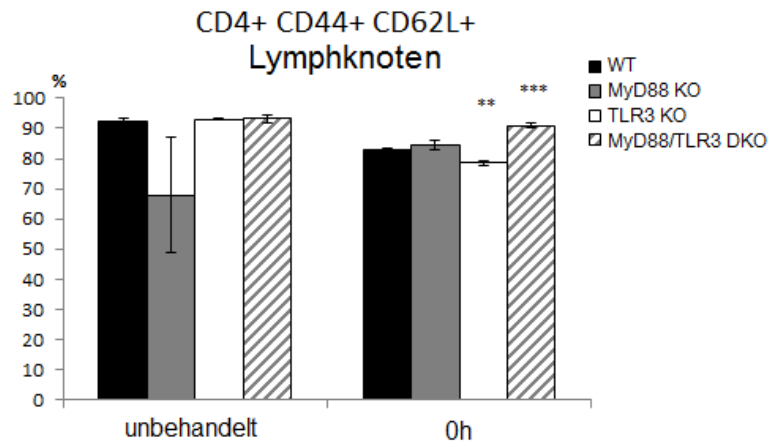


Abbildung 36 CD4⁺/CD44⁺/CD62L⁺-Zellen bei Wildtyp(WT)-, MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen. Es wurden aurikuläre Lymphknoten von nicht vorbehandelten Mäusen (3 Mäuse pro Mauslinie) gegenüber den sensibilisierten Mäusen (6 Mäuse pro Mauslinie) dargestellt.

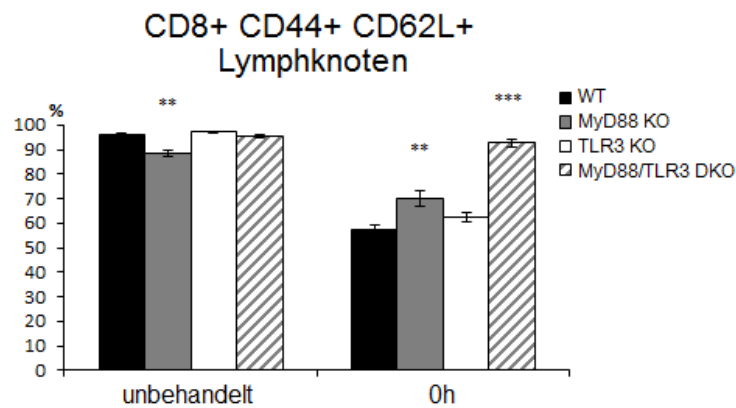


Abbildung 37 CD8⁺/CD44⁺/CD62L⁺-Zellen bei Wildtyp(WT)-, MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen. Es wurden aurikuläre Lymphknoten von nicht vorbehandelten Mäusen (3 Mäuse pro Mauslinie) gegenüber den sensibilisierten Mäusen (6 Mäuse pro Mauslinie) dargestellt.

Der größte Teil der Lymphozyten in aurikulären Lymphknoten waren CD3⁺ T-Zellen, wobei sich die einzelnen Mauslinien nach Oxazolone-Behandlung deutlich unterschieden: Bei Wildtyp-Mäusen blieben CD3⁺-Zellen anteilig nahezu konstant, während sie bei den mutierten Mäusen im Zeitverlauf schwankten (Abb. 38).

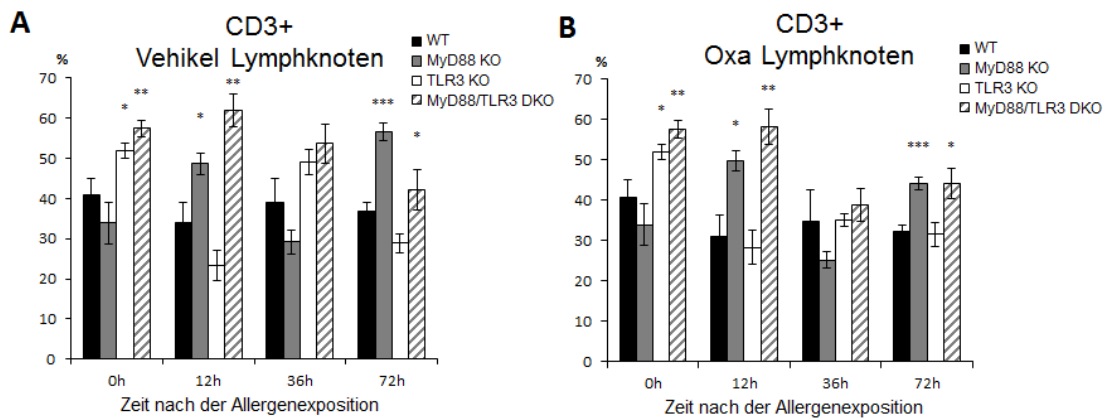


Abbildung 38 CD3⁺ Zellen in aurikulären Lymphknoten bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen; gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition an der A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelten Seite.

Die T-Zellen kann man weiter mit Hilfe des TCR-Komplexes differenzieren. Die meisten T-Zellen in aurikulären Lymphknoten waren TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen. Deren relativer Anteil nahm nach Oxazolone-Behandlung in den einfach defizienten Mäusen ab (Abb. 39: A und B). Nach Umrechnung des relativen Anteils auf die gesamte Lymphknotenzahl ergab sich ein absoluter Anteil dieser Zellen (Abb. 39: C und D). Die Dynamik des Verhaltens der TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen nach der Behandlung mit Oxazolone nach der Umrechnung auf die Lymphknotenzahl zeigte sich vergleichbar zu den relativen Zellzahlen, obwohl die gesamte Zellzahl in den Lymphknoten nach der Behandlung mit Oxazolone anstieg (Abb. 18). Signifikante Unterschiede zwischen der Oxazolone- und Vehikel- Seite sowie zwischen den Knockout- Mäusen und dem Wildtyp wurden nicht beobachtet. Die CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen dienen der Aktivierung von T-Lymphozyten (Kuhns et al. 2006). 36 Stunden nach der Allergenexposition wanderten diese aus den Lymphknoten. Signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Seiten zeigten sich jedoch nicht (vgl. Abbildung 40). Auffällig waren die signifikant höheren Mengen an Zellen bei der doppeldefizienten Linie kurz vor der Allergenexposition sowie 12 Stunden danach.

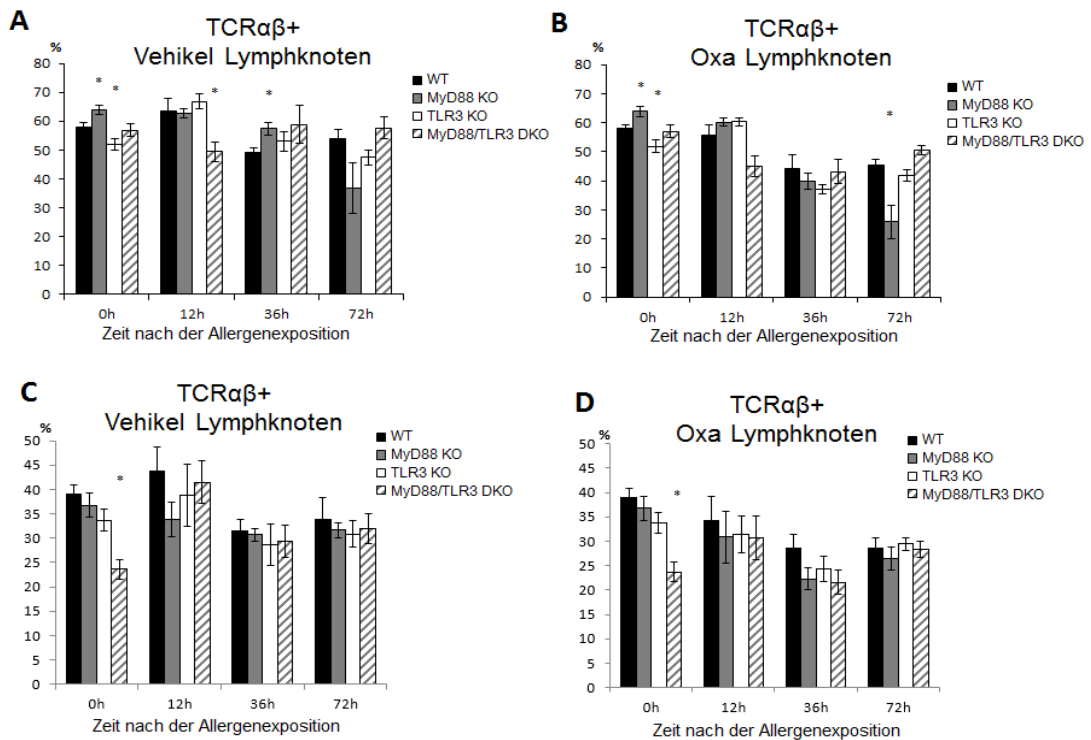


Abbildung 39 TCRαβ⁺ Zellen in aurikulären Lymphknoten bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen; gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition an der A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelten Seite. In A) und B) dargestellt sind die relativen Zellzahlen. C) und D) zeigen die absoluten Zellzahlen.

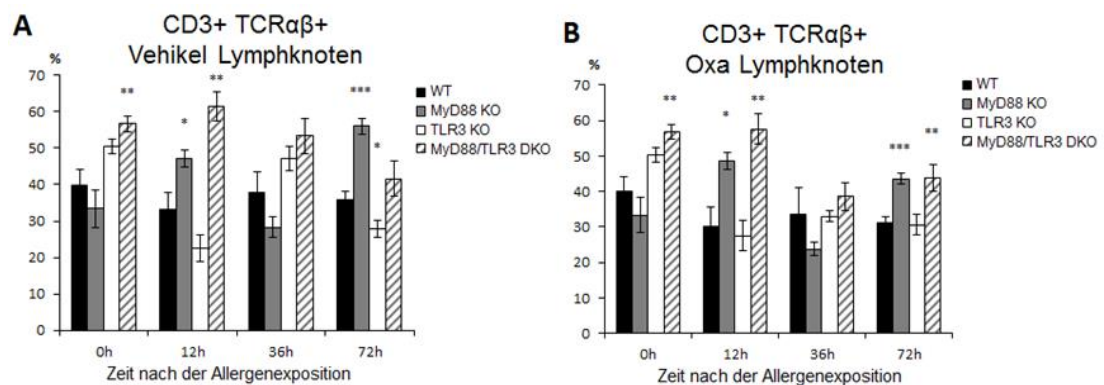


Abbildung 40 CD3⁺ TCRαβ⁺ Zellen bei den Mauslinien Wildtyp(WT), MyD88-KO, TLR3-KO und MyD88/TLR3-DKO gemessen direkt vor (0h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition A) Ergebnisse für die Vehikel-Lymphknoten B) Ergebnisse für das mit Oxazolone behandelte Ohr.

Wie erwartet (Girardi et al. 2001), waren $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich seltener (höchstens ca. 1%). Die nach Allergenexposition beobachteten Schwankungen in den aurikulären Lymphknoten waren daher schwer zu interpretieren (Abb. 41). Ähnliche Unterschiede fand man bei den $CD3^+ TCR\gamma\delta^+$ Zellen bei der doppeldefizienten Linie (siehe Abbildung 42). Hier war die Menge der Zellen kurz vor der Allergenexposition sowie 12 Stunden danach signifikant höher als beim Wildtyp. 36 Stunden nach der Allergenexposition wanderten nur bei der doppeldefizienten Linie die markierten Zellen aus den Lymphknoten. Bei den restlichen Linien kam es zur Erhöhung der Zellmengen zu diesem Zeitpunkt. Diese Populationen waren wesentlich kleiner als die zuvor beschriebenen $CD3^+ TCR\alpha\beta^+$ Zellen. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Seiten waren nicht zu beobachten.

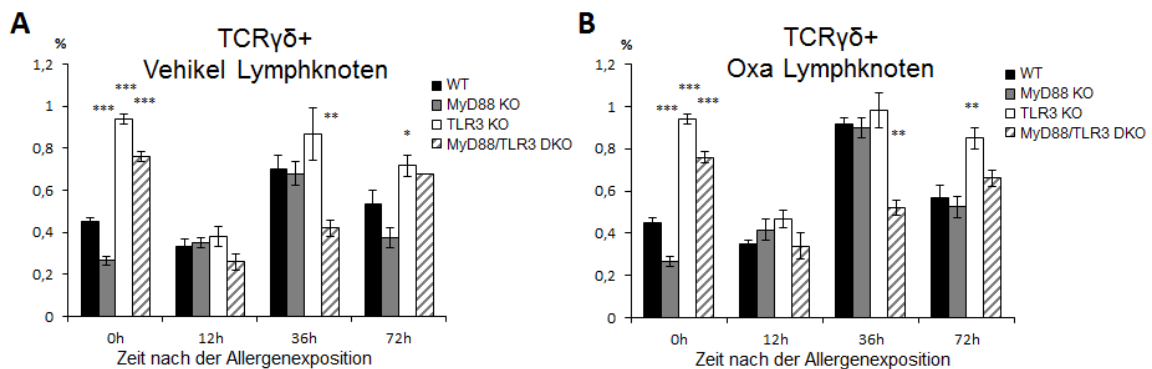


Abbildung 41 TCR $\gamma\delta^+$ Zellen in aurikulären Lymphknoten bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen; gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition an der A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelten Seite.

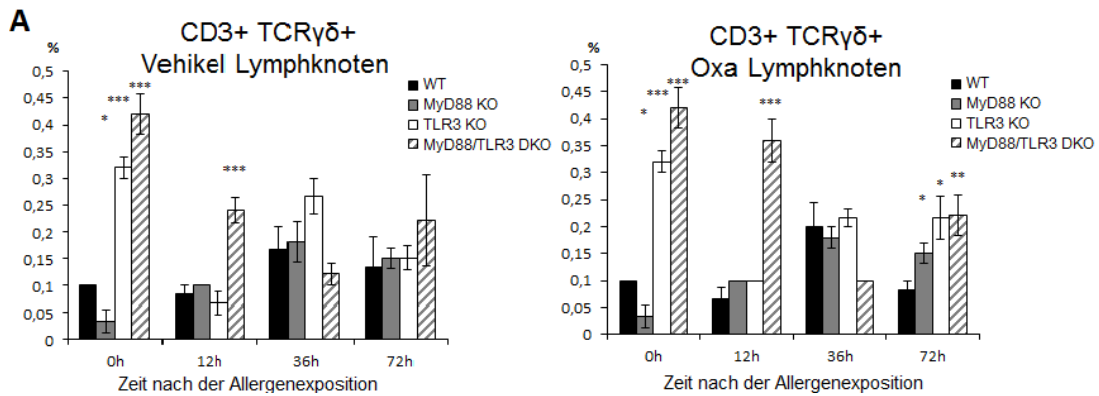


Abbildung 41 CD3⁺ TCRγδ⁺ Zellen bei den Mauslinien Wildtyp(WT), MyD88-KO, TLR3-KO und MyD88/TLR3-DKO gemessen direkt vor (0h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition A) Ergebnisse für die Vehikel-Lymphknoten B) Ergebnisse für das mit Oxazolone behandelte Ohr.

CD 103 (Integrin α_E), ist vor allem auf intraepithelialen Lymphozyten zu finden; nur ca. 2-6% der zirkulierenden T-Zellen exprimieren das Antigen. In den aurikulären Lymphknoten schwankte der Anteil CD103⁺-Zellen erheblich; wesentliche Unterschiede zwischen der mit Vehikel und der mit Oxazolone behandelten Seite wurden nicht gemessen. Die meisten CD103-exprimierenden Zellen waren $\alpha\beta$ T-Zellen, während nur sehr wenige $\gamma\delta$ -T-Zellen gefunden wurden (Abb. 43 - 45).

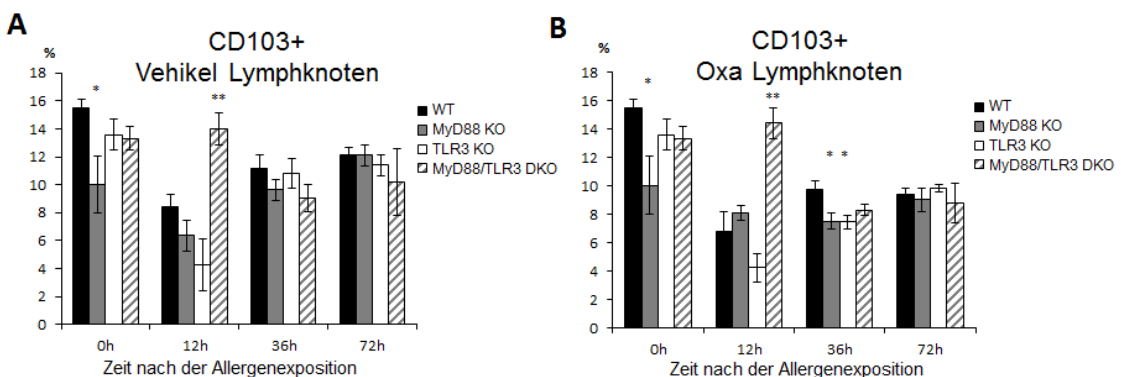


Abbildung 42 CD103⁺ Zellen in aurikulären Lymphknoten bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen; gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition an der A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelten Seite.

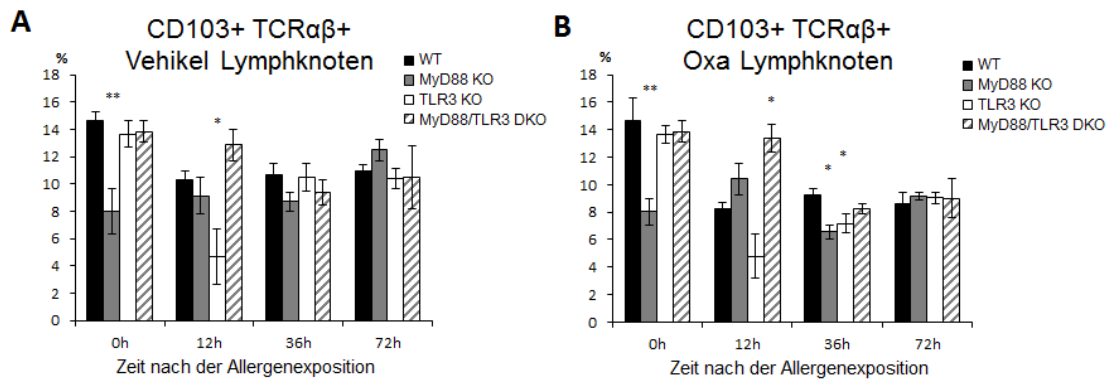


Abbildung 43 CD103⁺ TCRαβ⁺ Zellen in aurikulären Lymphknoten bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen; gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition an der A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelten Seite.

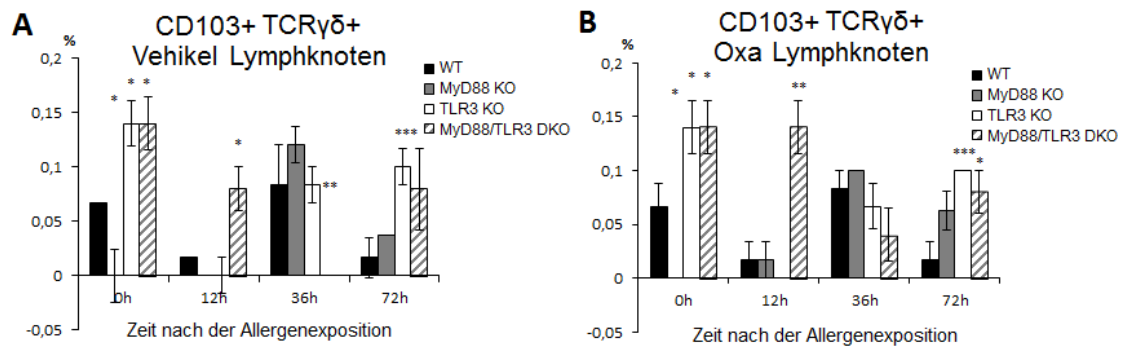


Abbildung 44 CD103⁺ TCRγδ⁺ Zellen in aurikulären Lymphknoten bei Wildtyp(WT)-Mäusen sowie MyD88-defizienten, TLR3-defizienten und MyD88/TLR3-defizienten Mäusen; gemessen direkt vor (0 h) sowie 12, 36 und 72 Stunden nach der Allergenexposition an der A) mit Vehikel und B) mit Oxazolone behandelten Seite.

4. DISKUSSION

4.1 Toll-like-Rezeptoren bei nichtinfektiösen Entzündungen

Kontaktallergien manifestieren sich an der Haut als Ekzem. Sie treten häufig im dermatologischen Alltag auf (Gober und Gaspari 2008). Bei der verzögerten Immunreaktion auf ein von außen einwirkendes Kontaktallergen wird eine komplexe spezifische Reaktion des Organismus erzeugt, an der auch Komponenten des angeborenen Immunsystems beteiligt sind (Martin 2012). Dabei spielen Signaltransduktion vermittelnde PRRs eine wichtige Rolle. Zu den PRRs gehören die Toll-like-Rezeptoren, welche von dendritischen Zellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und T-Zellen (Akira und Kawai 2011; Ishii und Akira 2008; Lebre et al. 2007), exprimiert werden. Über PRR-induzierte Signale kommt es zur Reifung dendritischer Zellen (Akira und Kawai 2010) sowie zu Interferon-gamma-vermittelter Immunaktivierung (Watanabe et al. 2002). Überdies werden weitere inflammatorische Botenstoffe ausgeschüttet, welche eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem herstellen (Wang et al. 1999).

Die Rolle der TLR- Signalübertragung bei nichtinfektiösen Entzündungen wurde erst in den letzten Jahren erkannt. Insbesondere wurde ihre Beteiligung bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen eingehender untersucht. Bei der allergischen Kontaktdermatitis fördert TLR2 via T-Helfer-Zellen vom Typ 1 die Ausschüttung von Interferon- γ aus dendritischen Zellen (Jin et al. 2009). Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Kontakthypersensitivität spielt TLR4, unter anderem durch die Aktivierung dendritischer Zellen sowie natürlicher Killerzellen (Martin et al. 2008; Yokoi et al. 2009). Die Rolle des TLR3 ist aktuell jedoch noch nicht ganz eindeutig. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TLR3 eine Rolle bei der Entstehung der allergischen Kontaktdermatitis in der Effektorphase spielt. Der zeitliche Verlauf der makroskopisch messbaren Entzündung sowie das zelluläre Infiltrat nach Allergenexposition sind in TLR3-

defizienten Mäusen weniger ausgeprägt als bei Wildtyp-Mäusen mit ansonsten gleichem genetischen Hintergrund (C57BL/6). In früheren Studien wurde gezeigt, dass Säuglinge mit allergischen Erkrankungen verstärkte perinatale TLR3-Antworten zeigen (Prescott et al. 2008). Hochregulation von TLR2-, TLR3- und TLR4-Signalübertragung wurde auch bei der allergischen Rhinitis beobachtet (Fransson et al. 2005). Als Risikofaktor für die Entstehung der allergischen Rhinitis wird die Hochregulation der TLR3-Signalkaskade angesehen (Golshiri-Isfahani et al. 2018). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass TLR3 die allergische Konjunktivitis durch Induktion von TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) in Bindehautepithelzellen beeinflusst (Ueta et al. 2009). Die TSLP-Produktion in Keratinozyten kann auch durch eine Zellschädigung oder Behandlung mit TLR3-Liganden induziert werden (Allakhverdi et al. 2007; Kinoshita et al. 2009). Auch bei der chronischen Entzündung bei der atopischen Dermatitis ist ein TLR3- vermittelter Mechanismus an der TSLP- Produktion beteiligt (Kubo et al. 2014).

Alle diese Vorgänge charakterisiert der Verlauf der Immunantwort, welcher in der Auslösephase der Entwicklung des allergischen Kontaktekzems sowohl antigenabhängig als auch antigenunabhängig (Grabbe und Schwarz 1998; Honda et al. 2013; Nakamura et al. 2015) stattfindet. Kontaktallergene können antigenunabhängig direkt die Keratinozyten aktivieren (Honda et al. 2013; Nakamura et al. 2015; Sebastiani et al. 2002). Antigenabhängig findet die Rekrutierung antigenspezifischer Zellen des angeborenen Immunsystems statt, was zur Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren bei erneuter Exposition führt. Zytokine und Chemokine sind als Mediatoren der Auslösephase von großer Bedeutung. Zentrale Rollen bei der Entstehung des allergischen Kontaktekzems spielen beispielsweise $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$ und $IL-1\beta$ (Corsini und Galli 1998; Nakamura et al. 2015; Watanabe et al. 2007). Unsere Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Rekrutierung der T-Zellen in der Auslösephase zwischen den TLR3-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die TLR3-Signalübertragung bei der Kontakthypersensitivität antigenunabhängig abläuft.

Eine Bestätigung dieser Aussage könnte eine Analyse der beteiligten Mediatoren bringen. Darüber hinaus wäre interessant, zu erfahren, welche Zytokine aus den Keratinozyten freigesetzt werden. Es scheint, dass durch TLR3- Signalübertragung die Freisetzung der Chemokine wie IP-10 (*interferon-gamma induced protein 10 kD*) aus Keratinozyten und Fibroblasten die Immunreaktion im Rahmen des Kontakthypersensitivitätsmodell moduliert wird (Nakamura et al. 2015).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt hauptsächlich auf der Analyse des Prozesses nach der Allergenexposition (Effektorphase). Die TLR3-Beteiligung bei der Sensibilisierung ist noch weitgehend unklar. In früheren Studien wurde bereits kein enger Zusammenhang zwischen der Sensibilisierung und TLR3 beobachtet (Nakamura et al. 2015; Yasuike et al. 2017). Ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von TLR3 ergab sich auch in dieser Arbeit nicht. Die Aktivierung von TLR3 führt zur Reifung und Migration dendritischer Zellen sowie zur Expansion antigenspezifischer T-Zellen (Akira et al. 2001). Da TLR3 von Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird (Appelquist et al. 2002), erschien die Beteiligung dieser Zellen an TLR3-abhängigen Mechanismen möglich. Es ist bekannt, dass TLR2 und TLR4 eine Rolle bei der Aktivierung der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sowie für die Funktion dendritischer Zellen in der Sensibilisierungsphase spielen (Martin et al. 2008; Yokoi et al. 2009). Der funktionelle Unterschied zwischen TLR2, 3 und 4 könnte an deren Liganden liegen. Die Lipopolysaccharide, die an TLR2 und TLR4, jedoch nicht an TLR3 binden, erhöhen die Fähigkeit der Migration dendritischer Zellen und beeinflussen damit die Induktion der Kontakthypersensitivität.

4.2 Die Kontakthypersensitivität in Mäusen ist MyD88-abhängig

Die Signalübertragung durch Toll-like-Rezeptoren wird hauptsächlich durch zwei Adaptermoleküle vermittelt: MyD88 und TRIF. Die Signalweiterleitung erfolgt in Kooperation mit anderen Molekülen, wie mit dem MyD88-Adapter-ähnlichen Protein oder dem TRIF-verwandten Adaptermolekül. Die Rekrutierung dieser Adaptermoleküle durch TLR ist wichtig für die Signalübertragung. Außer den oben benannten Adaptermolekülen gibt es noch eine weitere Gruppe von TLR-Verbindungen, welche die Signalweiterleitung modulieren. Dazu gehören sterile α - und Gürteltiermotive (SARM/SARM1), B-Zell-Adapter für Phosphoinositid-3-Kinase (BCAP/PI3K) und das Csk-Interaktion-Membranprotein (SCIMP). Die meisten Adapter sind direkt an TLR gebunden, während SCIMP über eine atypische TIR-non-TIR-Interaktion bindet (Luo et al. 2019).

Bisher wurde beschrieben, dass MyD88-defiziente Mäuse keine adäquate Immunreaktion auf die Behandlung mit Kontaktallergenen aufbauen (Klekotka et al. 2010). Damit wurde gezeigt, dass die Immunantwort MyD88-abhängig, jedoch TRIF unabhängig abläuft (Kaisho und Akira 2006). Es wurde bewiesen, dass MyD88-defiziente Mäuse keine entzündlichen Zytokine, wie TNF- α und IL-12p40, welche für die Entwicklung des allergischen Kontaktekzems von großer Bedeutung sind, produzieren (Hacker et al. 2000; Hayashi et al. 2001; Hemmi et al. 2002; Kawai et al. 1999; Racke und Drew 2009; Schnare et al. 2000; Takeda und Akira 2005; Takeuchi et al. 2000). Interessanterweise wurde eine gewisse Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen mit verzögerter Kinetik auch in MyD88-defizienten Zellen beobachtet (Kawai et al. 2001). Diese Arbeit bestätigt diese Beobachtungen. Die geringste Ohrdickenschwellung nach Kontaktsensibilisierung und erneuter Exposition mit Oxazolon wurde bei MyD88-defizienten Mäusen, dicht gefolgt von MyD88/TLR3-defizienten Mäusen, gemessen. Damit erwies sich MyD88 für die Zytokininduktion durch

TLR als essenziell. Eine schwache Reaktion auf die Behandlung mit Oxazolone wurde trotzdem beobachtet. Diese Antwort ist also MyD88-unabhängig.

Die Aktivierung von PRRs löst die Expression von IFN-Genen vom Typ I aus. Die Familie der Transkriptionsfaktoren des Interferon-Regulationsfaktors (IRF) ist entscheidend für die Steuerung von PRR-vermittelten Immunantworten (Taniguchi und Honda 2006). Die IRF interagieren mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B. Dieses Zusammenspiel bestimmt Spezifität und Umfang der Transkription. Beim MyD88-abhängigen Weg interagieren IRF4, IRF5 und IRF7 direkt mit MyD88 (Taniguchi und Honda 2006).

Die Rekrutierungsmechanismen von Adapterproteinen sind also nicht für alle TLR identisch. TLR übertragen ihre Signale über das Adapterprotein MyD88 MAL/TIRAP-abhängig oder binden direkt an die Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne (Shah et al. 2020). Das MyD88-Adapter-ähnliche Protein (MAL/TIRAP) kann MyD88 über die Bindung an TLR2 und TLR4 überbrücken (Lin et al. 2012). Hierbei spielen auch weitere TLR und deren Aktivierung wichtige Rollen. Sowohl die Aktivierung des TLR3- wie auch des TLR4-Signalwegs führen zur Induktion von Typ I-Interferonen (Doyle et al. 2002; Hoshino et al. 2002; Takeda und Akira 2005; Toshchakov et al. 2002). Bei MyD88-defizienten Makrophagen wurde eine verspätete Aktivierung von NF- κ B durch TLR4 beobachtet (Kawai et al. 1999). Eine weitere Besonderheit ist die spezifische Anordnung der Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domänen von TLR4, MAL/TIRAP und MyD88 (Lin et al. 2012). Sie trägt möglicherweise zu der außergewöhnlichen Signalübertragung im TLR4-Weg bei. TLR7-, TLR8- und TLR9-Signalwege führen ebenfalls zur Induktion von Typ I-Interferonen. Dabei unterscheiden sich jedoch die Mechanismen der Induktion der TLR3- und TLR4-Wege (Hemmi et al. 2003; Ito et al. 2002; Takeda und Akira 2005). Hier wird die Typ-I-IFN-Geninduktion durch Ligation von TLR7 oder TLR9 ausgelöst (Taniguchi und Honda 2006). Die Aktivierung des TLR3-Signalwegs ist TRIF-vermittelt und MyD88-unabhängig. TRIF interagiert mit der TIR-Domäne, was zur Induktion von NF- κ B und IRF3 führt (Matsumoto et al. 2002). Die Aktivierung von TLR2 und 5 führt wiederum nicht zur Induktion von Typ I-Interferonen

sondern über MyD88 zur Aktivierung von NF- κ B (Doyle et al. 2002; Hoshino et al. 2002; Toshchakov et al. 2002; Ullah et al. 2016).

Diese Arbeit zeigt, dass die zusätzliche TLR3-Defizienz den Schweregrad der durch Oxazololn ausgelösten allergischen Entzündung nicht weiter beeinflusst. Die funktionelle Redundanz der einzelnen TLR reicht nicht aus, um eine adäquate Immunantwort zu generieren. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Signalübertragung durch MyD88 bei der Pathogenese der Kontaktdermatitis eine Schlüsselrolle spielt. Damit bietet sich MyD88 als potenzielles Ziel für die Entwicklung von Therapien gegen MyD88-vermittelte Erkrankungen wie der allergischen Kontaktdermatitis an, aber eventuell auch als therapeutisches Ziel bei Fehlregulation des angeborenen Immunsystems.

4.3 Zelluläre Mechanismen

Die Immunaktivierung führt zur Freisetzung immunologischer Botenstoffe und zu einem entzündlichen Zellinfiltrat in der Haut. Die Ohrdicken-Zunahme korreliert somit mit der Einwanderung der Leukozyten in den Ort der lokalen Effektorreaktion. Diese Reaktion war sowohl bei MyD88- als auch bei MyD88/TLR3-defizienten Mäusen deutlich eingeschränkt. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen wanderten neutrophile Granulozyten bei beiden mutierten Mauslinien zu allen Messzeitpunkten vermindert in die allergenexponierte Haut ein. Die MyD88/TLR3-defiziente Linie wies weitere Unterschiede zu den drei anderen Linien auf. Die Behandlung mit Oxazololn beeinflusst beim Wildtyp die Anzahl der Gedächtniszellen, welche sich durch hohe Expression von CD44 und niedrigere Expression von CD62L auszeichnen. Bei der doppeldefizienten Linie werden diese Zellen signifikant weniger gebildet als beim Wildtyp. Es ist bekannt, dass die Aktivierung der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen über TLR 2 und 4 stattfindet (Martin et al. 2008). Diese Rezeptoren verwenden MyD88 zur Signalübertragung, wobei TLR4 zusätzlich über TRIF Signale weiterleiten kann. Die TRIF-abhängige Aktivierung moduliert die MyD88-abhängige Produktion

inflammatorischer Zytokine (Takeda und Akira 2005). Der Mangel an MyD88 beeinflusst die IL-6-Produktion ebenfalls negativ (Bustamante et al. 2019). Hier könnte man über Experimente nachdenken, in denen Mäuse erneut nach längerer Zeit mit gleichen Kontaktallergenen exponiert werden. Die veränderte Zahl der Gedächtniszellen könnte eine verzögerte oder abgeschwächte Immunantwort bedingen.

Die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stärkere Einwanderung von CD11c⁺ dendritischen Zellen bei MyD88-defizienten-Mäusen wurde kürzlich bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Szczepanik et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte eine ähnliche Reaktion nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der größten Ohrschwellung, also 36 Stunden nach Allergenexposition, war die Anzahl von CD11c⁺/F4/80⁺ Zellen gegenüber Wildtyp-Mäusen sowohl bei MyD88-defizienten als auch bei MyD88/TLR3-defizienten Mäusen dreifach höher. Die gleiche Beobachtung zeigte sich überdies bei den CD11c⁺ CD11b⁺ Zellen. Diese Tatsache wird am ehesten dem Fehlen von MyD88 in den dendritischen Zellen zugeschrieben. Die Mustererkennung durch dendritische Zellen über die Aktivierung der MyD88-abhängigen Signalweiterleitung ist entscheidend für die Induktion geeigneter Immunreaktionen. Die dendritischen Zellen sind Schlüsselregulatoren sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems (Arnold-Schrauf et al. 2015). Es ist bekannt, dass die dendritischen Zellen ein breites Repertoire an Rezeptoren (wie TLR3, TLR9 und TLR10) exprimieren (Collin und Bigley 2018; Mogensen 2009). Es ist denkbar, dass die beobachtete Immunreaktion bei Abwesenheit von MyD88 auf eine veränderte Funktion dendritischer Zellen zurückzuführen ist. MyD88 reguliert die Aktivierung von NF-κB und MAP-Kinasen (Kawai et al. 2001). Verschiedene Chemokine sind funktionell an der Migration dendritischer Zellen in den Lymphknoten während der CHS beteiligt (Castan et al. 2017; Gaffal et al. 2020). Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass MyD88 sowohl die Proliferation der Zellen wie auch die T-Zell-Polarisation reguliert (Arnold-Schrauf et al. 2015; Cheng et al. 2020). Auch die Reifung dendritischer Zellen wird durch MyD88

reguliert (Hemmi et al. 2003). MyD88 in diesen Zellen ist also für die Immunantwort bei der Kontakthypersensitivität von wesentlicher Bedeutung.

Regulatorische T-Zellen (Tregs) unterdrücken durch die Produktion von IL-2 die Funktion von Effektor-T-Zellen in entzündetem Gewebe (Ring et al. 2006; Thornton und Shevach 2000). TLR3-defiziente Mäuse wiesen eine gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant kleinere Population von CD4⁺/CD25⁺ (kennzeichnen Tregs) Lymphknoten-Zellen nach Sensibilisierung sowie nach Allergenexposition auf. TLR können auch von Tregs exprimiert werden (Dai et al. 2009). Die Tregs vermitteln einen wichtigen immunsuppressiven Mechanismus zur Eindämmung der TLR-Hyperaktivität, um etwa Autoimmunerkrankungen zu vermeiden (Josefowicz und Rudensky 2009). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass direkte TLR-Aktivierung auf Tregs die Treg-Funktion blockieren kann, was zu einer verstärkten Immunantwort führt. Das Fehlen der TLR3-Stimulation an CD4⁺/CD25⁺ Zellen verstärkt jedoch nicht die Immunreaktion. Somit beeinflusst der Mangel an TLR3 die Steuerung der Immunantwort bei nicht infektiösen Vorgängen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine prototypische induzierbare pathologische Immunreaktion, bei der Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems eng zusammenwirken. Zahlreiche Aspekte der Feinregulation sind dabei jedoch noch nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Toll-like-Rezeptor (TLR)-vermittelten Signalübertragung in der Effektorphase eines Mausmodells der Kontaktallergie zu untersuchen. Dazu wurden vier verschiedene Mauslinien, C57BL/6-Wildtyp-Mäuse sowie im selben genetischen Hintergrund Mutanten mit Defizienz für TLR3, MyD88 oder beiden, eingesetzt.

Es wurde nachgewiesen, dass die Immunantwort bei muriner Kontakthypersensitivität MyD88-abhängig abläuft. Die Signalübertragung über dieses Adaptermolekül war für die Entstehung des allergischen Kontaktekzems wichtig. Außerdem existieren MyD88-unabhängige Wege der Signalinduktion. Diese können ebenfalls, wenn auch schwächer, eine Immunantwort generieren. Diese Arbeit zeigte insgesamt eine verminderte Ausbildung des Kontaktekzems in TLR3-defizienten Mäusen. Die Immunantwort der MyD88/TLR3-doppeldefizienten Mauslinie war jedoch nicht viel geringer als die der MyD88-defizienten Mäuse. Diese Beobachtung könnte durch das zusätzliche Fehlen der antigenunabhängigen Signalübertragung durch TLR3-Defizienz erklärt werden. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bauten beide Mauslinien keine adäquate Reaktion auf die Behandlung mit dem Kontaktallergen auf.

Die untersuchten Gendefekte beeinflussten die Steuerung immunologischer Vorgänge durch ein obligates Kontaktallergen (Oxazolon). Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass TLR-vermittelte Signale die Entwicklung allergischer Erkrankungen wie der allergischen Kontaktdermatitis modulieren. Dies trägt zum besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen bei und kann der Entwicklung therapeutischer Konzepte dienen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Akira S, Kawai T (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384

Akira S, Kawai T (2011): Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637-650

Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001): Toll like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675–680

Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, Paquette N, Ziegler SF, Sarfati M, Delespesse G (2007): Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 204, 253-258

Appelquist SE, Wallin RPA, Ljunggren HG (2002): Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 14, 1065–1074

Ariotti S, Beltman JB, Chodaczek G, Hoekstra ME, van Beek AE, Gomez-Eerland R, Ritsma L, van Rheenen J, Marée AFM, Zalc T, et al. (2012): Memory CD8 cells in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19739-19744

Arnold-Schrauf C, Berod L, Sparwasser T (2015): Dendritic cell specific targeting of MyD88 signalling pathways in vivo. *Eur J Immunol* 45, 32-39

Avbelj M, Horvat S, Jerala R (2011): The role of intermediary domain of MyD88 in cell activation and therapeutic inhibition of TLRs *J Immunol* 187, 2394-2404

Blauvelt A, Hwang ST, Udey MC (2003): Allergic and immunologic diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol* 111, 560-570

Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, Restifo NP (1998): Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 161, 5313–5320

Bustamante J, Zhang SY, Boisson B, Ciancanelli M, Jouanguy E, Dupuis-Boisson S, Puel A, Picard C, Casanova JL: Immunodeficiencies at the interface of innate and adaptive immunity. In: Rich R, Fleisher T, Shearer W, Schroeder H, Frew A, Weyand C (Hrsg.): *Clinical immunology: principles and practice*. Elsevier, Amsterdam 2019, 509-522

Castan L, Magnan A, Bouchaud G (2017): Chemokine receptors in allergic diseases. *Allergy* 72, 682-690

Cheng Z, Zhu G, Huang Y, Zheng W, Yang S, Lin C, Ye J (2020): MyD88 mediates colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via NFkappaB/AP1 signaling pathway. *Int J Mol Med* 45, 131-140

Chu CC, Di Meglio P, Nestle FO (2011): Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol* 23, 28-41

Collin M, Bigley V (2018): Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3-20

Corsini E, Galli CL (1998): Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett* 102-103, 277-282

Dai J, Liu B, Li Z (2009): Regulatory T cells and Toll-like receptors: what is the missing link? *Int Immunopharmacol* 9, 528-533

Hera ADL, Alvarez-Mon M, Sanchez-Madrid F, Martinez C, Durantez A (1988): Co-expression of Mac1 and p150,95 on CD5⁺ B cells. Structural and functional characterization in a human chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Immunol* 18, 1131-1134

Doyle SE, Dadgostar H, Wu T-T, Vaidya SA, Dempsey PW, Rao G, Haberland ME, Cheng G (2002): IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17, 251-263

Fransson M, Adner M, Erjefalt J, Jansson L, Uddman R, Cardell LO (2005): Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis. *Respir Res* 6, 100

Gaffal E, Kemter AM, Scheu S, Leite Dantas R, Vogt J, Baune B, Tuting T, Zimmer A, Alferink J (2020): Cannabinoid receptor 2 modulates maturation of dendritic cells and their capacity to induce hapten-induced contact hypersensitivity. *Int J Mol Sci* 21, 475

Gaspari AA, Katz SI (1991): Current protocols in immunology. *J Immunol* 147, 4155-4161

Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC (2001): Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-609

- Gober MD, Gaspari AA (2008): Allergic contact dermatitis. *Curr Dir Autoimmun* 10, 1-26
- Golshiri-Isfahani A, Amizadeh M, Arababadi MK (2018): The roles of toll like receptor 3, 7 and 8 in allergic rhinitis pathogenesis. *Allergol Immunopathol* 46, 503-507
- Gordon S, Taylor PR (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964
- Grabbe S, Schwarz T (1998): Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* 19, 37-44
- Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H (2000): Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 192, 595–600
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1110
- Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S (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, 3059-3064
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196–200
- Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K (2013): Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 133, 303-315
- Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S (2002): Differential involvement of IFN- β in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 14, 1225-1231
- Ishii KJ, Akira S: Innate immunity. In: Rich R, Fleisher T, Shearer W, Schroeder H, Frew A, Weyand C (Hrsg.): *Clinical immunology principles and practice*. Elsevier, Philadelphia 2008, 39-51
- Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S (2002): Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195, 1507-1512

Janeway CA, Medzhitov R (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216

Jin H, Kumar L, Mathias C, Zurakowski D, Oettgen H, Gorelik L, Geha R (2009): Toll-like receptor 2 is important for the T(H)1 response to cutaneous sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 123, 875-882

Josefowicz SZ, Rudensky A (2009): Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30, 616-625

Kaisho T, Akira S (2006): Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 117, 979-987

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S (2001): Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167, 5887-5894

Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau M-T, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kägi D, Kaiserlian D, Nicolas JF (1999): Cytotoxicity is mandatory for CD8+ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 189, 779-786

Kelly M, Hwang JM, Kubes P (2007): Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 120, 3-10

Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Vu AT, Ogawa T, Gunawan H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. (2009): Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol* 123, 179-186

Klekotka PA, Yang L, Yokoyama WM (2010): Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 130, 184-191

Krasteva M, Kehren J, Horand F, Akiba H, Choquet G, Ducluzeau MT, Te'done R, Garrigue JL, Kaiserlian D, Nicolas JF (1998): Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* 160, 1181-1190

Kubo T, Kamekura R, Kumagai A, Kawata K, Yamashita K, Mitsunashi Y, Kojima T, Sugimoto K, Yoneta A, Sumikawa Y, et al. (2014): DeltaNp63 controls a TLR3-mediated mechanism that abundantly provides thymic stromal lymphopoietin in atopic dermatitis. *PLoS One* 9, e105498

Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC (2006): Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex *Immunity* 24, 133-139

Kumagai Y, Akira S (2010): Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 125, 985-992

Kupper TS, Fuhlbrigge RC (2004): Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 4, 211-222

Lebre M, Van der Aar A, Van Baarsen L, Van Capel T, Schuitemaker J, Kapsenberg M, De Jong E (2007): Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 127, 331-341

Li H, Zhang G-X, Chen Y, Xu H, Fitzgerald DC, Zhao Z, Rostami A (2016): CD11c+ CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 46, 2454-2466

Lin Z, Lu J, Zhou W, Shen Y (2012): Structural insights into TIR domain specificity of the bridging adaptor Mal in TLR4 signaling. *PLoS One* 7, e34202

Lonsdorf AS, Enk AH (2009): Immunology of allergic contact dermatitis. *Hautarzt* 60, 32-41

Luo L, Lucas RM, Liu L, Stow JL (2019): Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors. *J Cell Sci* 133, jcs239194

Martin SF (2012): Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology. *Exp Dermatol* 21, 382-389

Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Durr C, Heimesaat MM, Bereswill S, Fejer G, Vassileva R, et al. (2008): Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J Exp Med* 205, 2151-2162

Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, Goebeler M (2011): Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 66, 1152-1163

Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T (2002): Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1364–1369

McFadden JP, Puangpet P, Basketter DA, Dearman RJ, Kimber I (2012): Why does allergic contact dermatitis exist. *Br J Dermatol* 168, 692-169

McKnight, Macfarlane AJ, Dri P, Turley L, Willis AC, Gordon S (1995): Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J Biol Chem* 271, 486-489

Mogensen TH (2009): Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22, 240-273

Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Kinoshita S, Katoh N (2015): Toll-like receptor 3 increases allergic and irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 135, 411-417

Nanno M, Shiohara T, Yamamoto H, Kawakami K, Ishikawa H (2007): Gd T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol Rev* 215, 103-113

Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA (2012): Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 13, 535-542

Poltorak MP, Schraml BU (2015): Fate mapping of dendritic cells. *Front Immunol* 6, 00199

Prescott SL, Noakes P, Chow BWY, Breckler L, Thornton CA, Hollams EM, Ali M, Biggelaar AH, Tulic MK (2008): Presymptomatic differences in Toll-like receptor function in infants who have allergy. *J Allergy Clin Immunol* 122, 391-399

Racke MK, Drew PD (2009): Toll-like receptors in multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 336, 155-168

Ring S, Schafer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH (2006): CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol* 36, 2981-2992

Saint-Mezard P (2004): Allergic Contact Dermatitis. *Eur J Dermatol* 14, 284-295

Sallusto F, Lanzavecchia A (2009): Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 39, 2076-2082

- Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2000): Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 10, 1139–1142
- Schütt C, Bröker B (Hrsg.): *Grundwissen Immunologie*. 3. Auflage; Springer Spektrum, Heidelberg 2006
- Sebastiani S, Albanesi C, De PO, Puddu P, Cavani A, Girolomoni G (2002): The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* 293, 552-559
- Seong SY, Matzinger P (2004): Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4, 469-478
- Shah M, Kim GY, Achek A, Cho EY, Baek WY, Choi YS, Lee WH, Kim DJ, Lee SH, Kim W, et al. (2020): The alphaC helix of TIRAP holds therapeutic potential in TLR-mediated autoimmune diseases. *Biomaterials* 245, 119974
- Stock P, Raulf-Heimsoth M, Hamelmann E (2008): Regulatorische T- Zellen als Schutz vor allergischen Erkrankungen. *Allergo J* 17, 156-160
- Szczepanik M, Majewska-Szczepanik M, Wong FS, Kowalczyk P, Pasare C, Wen L (2018): Regulation of contact sensitivity in non-obese diabetic (NOD) mice by innate immunity. *Contact Dermatitis* 79, 197-207
- Takeda K, Akira S (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17, 1-14
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S (2000): Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164, 554-557
- Taniguchi T, Honda K (2006): IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6, 644–658
- Thornton AM, Shevach EM (2000): Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164, 183-190
- Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, et al. (2002): TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3, 392-398

Ueta M, Uematsu S, Akisa S, Kinoshita S (2009): Toll-like receptor 3 enhances latephase reaction of experimental allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1187-1189

Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B (2016): TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J Leukoc Biol* 100, 27-45

Wang B, Amerio P, Sauder DN (1999): Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J Leukoc Biol* 66, 33-39

Warner N, Nunez G (2013): MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol* 190, 3-4

Watanabe H, Gaide O, Petrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, Kummer JA, Tschopp J, French LE (2007): Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 127, 1956-1963

Watanabe H, Unger M, Tuvel B, Wang B, Sauder DN (2002): Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J Interferon Cytokine Res* 22, 407-412

Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Nakamura N, Kinoshita S, Katoh N (2017): The role of toll-like receptor 3 in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *J Dermatol Sci* 88, 184-191

Yokoi S, Niizeki H, Iida H, Asada H, Miyagawa S (2009): Adjuvant effect of lipopolysaccharide on the induction of contact hypersensitivity to haptens in mice. *J Dermatol Sci* 53, 120-128

Zhao S, Zhang Y, Zhang Q, Wang F, Zhang D (2014): Toll-Like Receptors and Prostate Cancer. *Front Immunol* 5, 00352

Zhou S, Ueta H, Xu X-D, Shi C, Matsuno K (2008): Predominant donor CD103⁺CD81⁺ T cell infiltration into the gut epithelium during acute GVHD: a role of gut lymph nodes. *Int Immunol* 20, 385-394

Zhu J, Paul WE (2008): CD 4 cells: fates, functions and faults. *Blood* 112, 1557-1569

DANKSAGUNG

Meinen besonderen Dank möchte ich Prof. Michael Peter Schön für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung, die hilfreichen Diskussionen, für seine Geduld und für stetige Motivation aussprechen.

Ein weiteres Dankeschön geht an Dr. Andrea Braun, die mich in meinem Projekt direkt betreut und unterstützt hat: für konstruktive Problemlösung und hilfreiche Ratschläge.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Schön, die mich freundlich aufgenommen und während der gesamten Durchführung des Projekts unterstützt hat. Insbesondere danke ich Karolin Zachmann für die Einarbeitung und die kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, für ihre Präzision und Zuverlässigkeit und ihre wertvollen Informationen zur FACS-Auswertung.

Dr. Verena Lorenz und Dr. Nadin Dewert danke ich für ihre hilfreichen Anleitungen sowie die inspirierenden Diskussionen. Eugen Koßmann und Fiona Brunnert danke ich für die gute, unkomplizierte und motivierende Zusammenarbeit. Des Weiteren vielen Dank an Anette Bennemann sowie an alle weiteren Labormitarbeiter.

Zudem danke ich besonders meinem Vater, Wolfgang Schmid, für die statistische Beratung und seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.