

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

Einfluss des Integrins α_E (CD103) auf das allergische Kontaktekzem bei Mäusen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Fiona Brunnert

aus

Bremerhaven

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	Prof. Dr. med. M. P. Schön
Ko-Referent:	Prof. Dr. rer. nat. L. Walter
Promotor:	Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 20.07.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Einfluss des Integrins αE (CD103) auf das allergische Kontaktekzem bei Mäusen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Braun A, Dewert N, Brunnert F, Schnabel V, Hardenberg JH, Richter B, Zachmann K, Cording S, Claßen A, Brans R et al. (2015): Integrin αE (CD103) is involved in regulatory T-cell function in allergic contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 135, 2982–2991

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das allergische Kontaktekzem	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klinik	2
1.1.3 Pathogenese.....	3
1.1.3.1 Dendritische Zellen.....	4
1.1.3.2 T-Zellen.....	5
1.1.3.3 Interaktion	6
1.1.4 Diagnostik.....	7
1.1.5 Therapie	7
1.2 Das Integrin α_E (CD103).....	8
1.2.1 Funktion als Adhäsionsmolekül.....	9
1.2.2 Expression durch T-Lymphozyten.....	9
1.2.3 Expression durch dendritische Zellen	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3 Chemikalien	14
2.1.4 Puffer/Lösungen/Medium.....	16
2.1.5 Antikörper für Immunhistochemie	17
2.1.6 Antikörper für gewebespezifische Rekrutierung und Reifung.....	17
2.1.7 Antikörper für Funktionelle Experimente	18
2.1.8 Tiere.....	19
2.1.9 Software	20
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Behandlung der Mäuse im CHS-Modell.....	20
2.2.2 Organpräparation und Zellisolation	20
2.2.2.1 Ohrepidermis	20
2.2.2.2 Lymphknoten.....	21
2.2.2.3 Dendritische Zellen des Knochenmarks	21
2.2.2.4 Epidermale dendritische Zellen	22
2.2.2.5 T-Zellen.....	23
2.2.3 Durchflusszytometrie.....	23
2.2.4 Funktionelle Experimente.....	24
2.2.4.1 Stimulation von BMDC und epidermalen DZ.....	24

2.2.4.2	Co-Kultur.....	25
2.2.5	Immunhistochemie	26
2.2.6	Mäuse.....	26
2.2.7	Statistische Auswertung.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Normale Funktion der dendritischen Zellen bei CD103-Defizienz	28
3.1.1	CD103-defiziente dendritische Zellen unterscheiden sich nicht in ihrer Anzahl und Morphologie während der Auswanderung aus der Epidermis	28
3.1.2	Dendritische Zellen beider Mauslinien weisen eine ähnliche Dynamik in der Migration zum Lymphknoten auf	31
3.1.2.1	Die Migration der DZ ist auf die drainierenden Lymphknoten beschränkt.....	31
3.1.3	Ausgereifte dendritische Zellen weisen gleichen Phänotyp auf.....	34
3.1.3.1	Die meisten eingewanderten DZ der Wildtypmäuse sind CD103 negativ	34
3.1.4	CD103-Defizienz hat <i>in vitro</i> keine Auswirkung auf die T-Zell-Aktivierung.....	36
3.1.4.1	BMDC beider Mauslinien weisen gleichen Phänotyp auf.....	41
3.2	Gesteigerte T-Zell-Antwort bei CD103-Defizienz.....	43
3.2.1	BMDC-vermittelte Ag-spezifische T-Zell-Antwort ist bei CD8 ⁺ CD103 ⁻ Zellen gesteigert	43
3.2.2	Gleiche Ag-spezifische T-Zell-Antwort durch epidermale DZ.....	45
3.2.2.1	Epidermale dendritische Zellen tragen kein CD103.....	47
4	Diskussion.....	49
4.1	CD103 ⁻ dendritische Zellen können Kontakthypersensibilisierung auslösen	49
4.2	CD8 ⁺ CD103 ⁻ T-Lymphozyten proliferieren stärker	53
4.2.1	Gesteigerte Proliferation versus wegfallende Hemmung.....	53
4.3	Welche Limitierungen gab es?.....	55
5	Zusammenfassung.....	56
6	Anhang	58
7	Literaturverzeichnis	59
	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Danksagung	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CD103 ⁻ DZ weisen in Anzahl und Morphologie keine Unterschiede während der Auswanderung aus der Epidermis auf.....	30
Abbildung 2: CD103 ⁻ DZ weisen in Anzahl und Dynamik keine Unterschiede während der Migration in die drainierenden Lymphknoten auf.....	32
Abbildung 3: CD103 ⁻ DZ weisen prozentual niedrigeren Anteil an FITC auf mit jedoch höherer Fluoreszenzintensität.....	33
Abbildung 4: CD103 ⁻ und wt-DZ weisen gleichen Phänotyp auf.....	35
Abbildung 5: Zellsortierung für funktionelle Versuche.	38
Abbildung 6: Gleiche <i>Priming</i> -Kapazität von wt- und CD103 ⁻ BMDC bei Stimulation mit DNBS	39
Abbildung 7: Gleiche <i>Priming</i> -Kapazität von wt- und CD103 ⁻ BMDC bei Stimulation mit OVA.....	40
Abbildung 8: Gleicher Phänotyp der BMDC beider Mauslinien.....	42
Abbildung 9: Gesteigerte BMDC-vermittelte T-Zell-Antwort bei CD103 ^{-/-} -Mäusen.	44
Abbildung 10: Keine gesteigerte T-Zell-Antwort bei CD103 ^{-/-} -Mäusen durch Stimulation mit epidermalen DZ.....	46
Abbildung 11: Epidermale DZ tragen kein CD103.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	12
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 3: Chemikalien.....	14
Tabelle 4: Puffer/Lösungen/Medium.....	16
Tabelle 5: Antikörper Immunhistochemie	17
Tabelle 6: Antikörper gewebespezifische Rekrutierung und Reifung	17
Tabelle 7: Antikörper funktionelle Experimente.....	18
Tabelle 8: Tiere.....	19
Tabelle 9: Software	20

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cell</i> (Dendritische Zelle des Knochenmarks)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
DZ	Dendritische Zelle
dDZ	dermale dendritische Zelle
DNBS	2,4-Dinitrobenzonsulfonsäure
DNFB	1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> (Hanks Salzlösung)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfon)-Säure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF α	Interferon-alpha
INF γ	Interferon-gamma
LZ	Langerhans-Zelle
MACS	<i>magnetic cell separation</i> (Magnetische Zellseparierung)
Med	Medium
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> (Mittlere Fluoreszenzintensität)
MHC	<i>major-histocompatibility-complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NEAA	<i>non-essential amino acid</i> (Nicht-essenzielle Aminosäuren)

Oxa	Oxazolon (4-Ethoxymethylen-2-Phenyl-2-Oxazolin-5-on)
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
Tc-Zelle	Zytotoxische T-Zelle
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das allergische Kontaktekzem

1.1.1 Epidemiologie

Das allergische Kontaktekzem ist in Deutschland mit einer Prävalenz von circa 8% der Erwachsenen und 5,6% der Kinder und Jugendlichen eine häufige Krankheit (Hermann-Kunz 2000; Schnuch und Mahler 2015). Etwa 15-20% der Menschen sind gegen mindestens ein Kontaktallergen sensibilisiert (Schnuch und Mahler 2015). In einzelnen Bevölkerungs- und Berufsgruppen zeigen sich aber deutliche Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz (Smit et al. 1993; Schnuch et al. 2012). So sind Kontaktekzeme die häufigste Ursache für Berufskrankheiten der Haut (Fritsch 2009). Das allergische Kontaktekzem betrifft alle Altersgruppen und kann prinzipiell bei jedem Menschen auftreten, der eine Sensibilisierung gegen mindestens ein Allergen aufweist (Thyssen et al. 2007; Nosbaum et al. 2009).

Kontaktallergene kommen in vielen Bereichen vor. Im Haushalt oder in der Freizeit kommt man mit Stoffen in Berührung, die eine allergische Reaktion auf der Haut hervorrufen können. Enthalten sind Kontaktallergene oft in Kosmetik- und medizinischen Produkten sowie in Schmuck und Textilien, aber auch im Schuhwerk (Fritsch 2009). Das häufigste Kontaktallergen in Deutschland war im Jahre 2012 Nickel-II-Sulfat (15,3%), gefolgt von Duftstoffen I (9,1%), Perubalsam (7,2%) und Kobaltchlorid (5,8%) (Mahler et al. 2014).

Verschiedene Risikofaktoren für das Auftreten werden diskutiert. So spielen erworbene Risikofaktoren wie entzündliche Hauterkrankungen, aber auch genetische Disposition, Alter, Geschlecht und ethnische Zugehörigkeit eine Rolle (Peiser et al. 2012).

Zu den inflammatorischen Hauterkrankungen mit erhöhtem Risiko für ein allergisches Kontaktekzem gehören die irritative Kontaktdermatitis (Peiser et al. 2012), vor allem bei älteren Patienten die Stauungsdermatitis (Uter et al. 2002) sowie wahrscheinlich die atopische Dermatitis (Belhadjali et al. 2008; Herro et al. 2011). Auch Polysensibilisierungen, also das Vorliegen von drei oder mehr Sensibilisierungen, stellen ein erhöhtes Risiko dar (Menezes de Pádua et al. 2005; Schnuch und Mahler 2015).

Auf genetischer Ebene sind vor allem Polymorphismen verschiedener Gene (wie N-Acetyltransferase 1 und 2, Gluthation-S-Transferase und Angiotensin-konvertierendes

Enzym) mit einem erhöhten Risiko für eine Kontaktallergie assoziiert. Hierbei sind Polymorphismen von TNF und Interleukin (IL)-16 insbesondere bei polysensibilisierten Patienten von Bedeutung (Schnuch et al. 2011).

Die Prävalenz des allergischen Kontaktekzems ist bei Frauen zwei- bis dreifach höher als bei Männern. Im Allgemeinen ist die Prävalenz aber auch für eine Urtikaria oder eine Nahrungsmittelallergie beim weiblichen Geschlecht höher (Hermann-Kunz 2000).

1.1.2 Klinik

Klinisch treten die Symptome einer Kontaktallergie meist 24 bis 96 Stunden nach Kontakt der Haut mit der auslösenden Substanz auf. Initial ist die Körperstelle des direkten Kontaktes betroffen. Man unterscheidet eine akute von einer chronischen Form. Erstere basiert auf einer episodischen, letztere auf einer andauernden Exposition gegenüber dem Allergen. Beiden gemein ist ein quälender und störender Juckreiz des betroffenen Areals. Im Akutstadium zeigt sich meist eine typisch stadienhaft verlaufende Ekzemreaktion (Leitlinie Kontaktekzem 2013). Sie beginnt üblicherweise mit einem Erythem und Ödem, im Verlauf und je nach Schwere können Papulovesikel beziehungsweise Blasen, gefolgt von Nässen und Verkrustung sowie Schuppen, auftreten. Die Hautveränderungen sind scharf begrenzt, es kann jedoch zu Streureaktionen in die Umgebung kommen. In der Regel heilt ein akutes Kontaktekzem folgenlos ab. Im chronischen Stadium weist die betroffene Haut vornehmlich ekzematöse Plaques mit vermehrter Schuppung und einem eher trockenen Charakter auf. Anfangs noch scharf begrenzt, haben die Plaques im Verlauf eine unscharfe Begrenzung. Durch die Infiltration mit Entzündungszellen sowie anschließenden Umbauvorgängen im Gewebe kommt es zur Verdickung und Vergrößerung der Haut, was als Lichenifikation bezeichnet wird. Hyperkeratosen, Fissuren und Rhagaden sowie Pigmentierungen sind ebenfalls möglich. Im Gegensatz zum Akutstadium kommt es nach längerer Exposition meist zu einer chronisch degenerativen Veränderung der Haut. (Mark und Slavin 2006; Nosbaum et al. 2009).

Am häufigsten finden sich allergische Kontaktekzeme an den Händen. Vor allem der Handrücken und die Seiten der Finger sind betroffen (Aktas und Esin 2016). Das Gesicht, insbesondere periokulär, ist ebenfalls ein häufiger Manifestationsort (Mahler et al. 2014). Oft kann man aus den betreffenden Arealen Rückschlüsse auf die möglichen Auslöser ziehen. So manifestieren sich Allergien gegen Chromat oder Epoxidharze, oft im beruflichen Zusammenhang, meist an den Händen. Sind die Füße betroffen, sollte eine Kontaktallergie gegen Inhaltsstoffe des Schuhwerkes, wie Leder oder Gummi, in Betracht gezogen werden. Ebenso ist darauf zu achten, ob sich das Ekzem an frei getragenen Körperstellen manifestiert.

Dies könnte den Verdacht auf ein durch (UV)-Licht ausgelöstes Ekzem lenken oder ein Hinweis auf aerogene Allergene sein (Fritsch 2009).

1.1.3 Pathogenese

Eine Allergie im Allgemeinen ist eine überschießende Immunreaktion auf eigentlich nicht schädliche, meist körperfremde Substanzen. Obligate Voraussetzung ist die Sensibilisierung gegen das Allergen durch einen primären/ersten Antigenkontakt (Nosbaum et al. 2009). Von der Kontaktallergie abzugrenzen sind irritative Ekzeme. Hierbei ist keine Sensibilisierung vorangegangen. In den meisten Fällen ist die Basis für das allergische Kontaktekzem eine allergische Reaktion vom Spättyp (Typ IV, Einteilung nach Coombs und Gell), seltener vom Soforttyp (Typ I). Die Spättypreaktion ist eine zellvermittelte Immunreaktion, die in zwei Phasen abläuft: die Sensibilisierungs- und die Effektorphase.

Mit dem ersten Allergenkontakt beginnt die Sensibilisierungsphase, auch afferente Phase genannt. In den meisten Fällen sind die auslösenden Substanzen sogenannte Haptene, welche aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer elektrophilen Eigenschaften die Hautbarriere überschreiten können (Fritsch 2009; Honda et al. 2013). Sie sind noch keine vollständigen Antigene (Ag). Sie benötigen in der Regel ein epidermales Trägerprotein mit welchem sie einen Hapten-Protein-Komplex bilden und so als Vollantigen fungieren (Divkovic et al. 2005; Peiser et al. 2012). Dieser Komplex wird von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) in der Epidermis (Langerhans-Zellen) oder Dermis (dermale dendritische Zellen) erkannt und aufgenommen. Danach wandern die APZ über die afferenten Lymphgefäße zu den lokalen drainierenden Lymphknoten (Kripke et al. 1990). Auf dem Weg kommt es zur Reifung der Zellen und zur Prozessierung der Antigene. Im Lymphknoten werden dann die Antigenfragmente über MHC (*major-histocompatibility-complex*)-Rezeptoren den dortigen naiven T-Zellen mit den passenden T-Zell-Rezeptoren (TZR) präsentiert (Macatonia et al. 1987). Haptene, die an extrazelluläre Peptide an den APZ gebunden sind, werden über MHC-II-Moleküle CD4⁺ Zellen präsentiert, wohingegen lösliche Haptenmoleküle eher über MHC-I-Moleküle den CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden. Ebenso ist es möglich, dass sich die Haptene direkt mit präformierten Proteinen in den MHC-Gruben verbinden und sich so beiden T-Zellpopulationen präsentieren können (Saint-Mezard et al. 2004). Es kommt zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen und es entstehen so aus den naiven Zellen Antigen-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ Zellklone, welche im Lymphknoten residieren, aber auch über die Lymphgefäße zurück in die Haut wandern und sich dort anreichern (Sallusto et al. 1999). Voraussetzungen hierfür sind zum einen Adhäsionsmoleküle auf den T-Zellen und zum anderen Interaktionen mit proinflammatorischen Interleukinen wie IL-2, TNF α oder IFN γ . Aufgrund der entstandenen

Gedächtnisfunktion der Immunzellen (T-Gedächtniszellen) ist bei erneutem Allergenkontakt eine schnellere Immunantwort auslösbar.

Die afferente Phase ist klinisch unauffällig und dauert, je nach Stärke des Haptens, zwischen 10 und 15 Tagen beim Menschen und circa 5 bis 7 Tage bei Mäusen (Saint-Mezard et al. 2003).

Kommt es zu erneutem Kontakt mit dem Hapten, läuft die Effektorphase, auch efferente Phase genannt, ab, welche die eigentliche klinische Ekzemsymptomatik hervorruft. Dieses Mal präsentieren die APZ die Antigenfragmente nicht naiven T-Zellen, sondern den bereits Antigen-spezifischen T-Gedächtnis-Zellen und führen zu deren Aktivierung mit darauffolgender Proliferation und Zytokinausschüttung (beispielsweise IL-1, IL-2, TNF α). Antigen-spezifische T-Zellen werden daraufhin aus dem Blut in die Haut rekrutiert. In der frühen Phase werden vor allem zytotoxische CD8⁺ T-Zellen generiert und amplifiziert (Akiba et al. 2002). Zudem kommt es durch Hochregulierung von MHC-Molekülen an den dendritischen Zellen zur Verstärkung der Antigenpräsentation, zur autokrinen Stimulation der T-Zellen sowie zur Induktion von Adhäsionsmolekülen im Endothel und an den Immunzellen zur Anlockung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Nach etwa 4 bis 72 Stunden ist das klinische Korrelat der Immunreaktion auf das einwirkende Allergen, nämlich das Kontaktekzem, auszumachen. Um das Ausmaß der Entzündungsreaktion zu begrenzen, werden in der späten Effektorphase neben den zytotoxischen auch regulatorische CD4⁺ T-Zellen aktiviert. Diese wirken über die Bildung und Ausschüttung von IL-2, -4 und -10 hemmend auf die Ag-Präsentation und proinflammatorische Zytokinproduktion.

1.1.3.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) sind eine heterogene Gruppe Antigen-präsentierender Zellen, welche hauptsächlich in peripheren Geweben residieren, die wiederum Kontakt zur Umwelt haben. Zu letzteren gehören die Haut und die Darmmukosa. Zudem patrouillieren DZ durch das Blut und die Lymphe (Toebak et al. 2009).

Ihre Aufgabe ist es, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, um anschließend durch die afferente Lymphe in die T-Zell-reichen Areale der regionären Lymphknoten zu wandern. Direkt nach dem Haptenkontakt produzieren die DZ, vor allem die Langerhans-Zellen (LZ) aus der Epidermis, IL-1 β . Aus den Keratinozyten wird zeitgleich TNF α freigesetzt (Enk et al. 1993). Beide Zytokine führen letztlich zur Lösung der DZ aus dem Epithel durch Herabregulierung des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, durch welches DZ und Keratinozyten verbunden sind (Tang et al. 1993; Schwarzenberger und Udey 1996; Wang et al. 1997). Während der darauffolgenden Migration kommt es zur Reifung der DZ. Die hohe Kapazität

der Ag-Aufnahme geht verloren, stattdessen erlangen reife DZ die Funktion der Ag-Präsentation an naive T-Zellen. Deutlich wird diese Reifung durch die Expression von Co-Stimulationsfaktoren (CD80, CD86, CD40, CD83), Adhäsionsmolekülen (CD54, CD58) und Chemokinrezeptoren sowie die Hochregulierung von MHC-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche (Saint-Mezard et al. 2004; Toebak et al. 2009). Zu den Chemokinrezeptoren gehören CCR4 und CCR7. Letzteres interagiert mit CCL19 und CCL21 auf Endothelzellen der Lymphgefäße, was zur Erleichterung der Wanderung durch die Lymphgefäße führt (Förster et al. 1999; Caux et al. 2002) Hinzu kommt die Änderung der Morphe. Die DZ verlieren ihre eher runde Form und weisen nun eine verzweigte Form auf, was die Chance erhöht, an T-Zellen zu stoßen und ihnen das Ag zu präsentieren (Toebak et al. 2009). Reife dendritische Zellen sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Hierzu zählen IL-12, TNF α , IL-1 β und IL-6, welche notwendig sind, um die T-Zell-Aktivierung und damit die Immunantwort auszulösen (Lutz und Schuler 2002).

In der Haut finden sich hauptsächlich zwei Populationen: epidermale Langerhans-Zellen und dermale dendritische Zellen. Langerhans-Zellen (LZ) wurden von Paul Langerhans im Jahre 1886 entdeckt als dendritische Zellen, die in der Epidermis residieren und sich dort in regelmäßiger Form verteilen. Im Menschen exprimieren sie CD1a und besitzen ein markantes Organell, das Birbeck-Granulum. Der typische Marker für LZ ist das C-Typ-Lektin Langerin (CD207) (Valladeau et al. 2002; Stoitzner et al. 2003). Dermale dendritische Zellen (dDZ) lokalisieren sich vornehmlich an den Kapillaren und finden sich in höherer Anzahl im *Stratum reticulare* (Tse und Cooper 1990; Ruedl et al. 2000). Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie nur wenig bis kein Langerin, fast 90% der dDZ sind Langerin-negativ (Stoitzner et al. 2003; Honda et al. 2013).

Beide Subpopulationen sind in der Lage, eine Kontakthypersensibilisierung auszulösen. Lange galten die LZ hierfür als essentiell, dennoch ist es möglich, dass dDZ eine Kontaktsensibilisierung vermitteln (Ruedl et al. 2000; Bennett et al. 2007). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine LZ-Defizienz in Mäusen zwar eine ineffiziente Ag-Präsentation zur Folge hatte, dennoch aber eine kontaktallergische Reaktion bei den Tieren zu detektieren war (Bennett et al. 2007).

1.1.3.2 T-Zellen

An der Entstehung des allergischen Kontaktekzems sind sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen beteiligt. Beide Populationen sind für die Produktion von Zytokinen verantwortlich und können dementsprechend eingeteilt werden. Sogenannte zytotoxische Tc1-Zellen produzieren vorwiegend Typ-1-Zytokine wie IFN γ und TNF α und spielen eine wichtige Rolle

in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen und Tumoren. Zytotoxische Tc2 Zellen sind hingegen für die Produktion von Typ-2-Zytokinen wie IL-4, -10, -13 und -15 zuständig (Sad et al. 1995; Saint-Mezard et al. 2004). Tc1- und Tc2-Zellen können sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ sein.

Primäre Effektorzellen bei der Sensibilisierung mit einem starken Hapten sind Ag-spezifische zytotoxische CD8⁺ Typ-1-Zellen. Diese produzieren IFN γ und IL-17 (Xu et al. 1996; Braun et al. 2015), welche nach der Bindung des TZR an MHC-Moleküle freigesetzt werden, und haben die Aufgabe, potentiell gefährliche Zellen zu eliminieren. Die Zytotoxizität führt in der Epidermis zur Apoptose von Keratinozyten, welche das Hauptziel der Attacke darstellen. Dadurch wird die Hautbarriere geschädigt und das Eindringen weiterer Haptene in die Epidermis wird erleichtert, was die Entzündung verstärkt (Traidl et al. 2000; Trautmann et al. 2001; Akiba et al. 2002). Ohne CD8⁺ T-Zellen ist eine Kontakthypersensibilisierung nicht möglich (Kehren et al. 1999).

CD4⁺ T-Zellen haben vorwiegend Rollen als Helferzellen (T_H) oder regulatorische Zellen (T_{reg}). Ohne sie ist das allergische Kontaktekzem verstärkt und verlängert (Bour et al. 1995; Xu et al. 1996). Die regulatorische Funktion der T-Zellen hat zwei Phasen. In der zentralen Phase wird vor allem die Expansion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen kontrolliert. Hierfür sind wohl CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verantwortlich. Die periphere Phase limitiert im Gegenzug dazu die Inflammation direkt in der Haut (Gorbachev und Fairchild 2001; Dubois et al. 2003).

Auch CD4⁺ Zellen produzieren Zytokine, hauptsächlich vom Typ 2. Vor allem wird die Kontakthypersensibilisierung durch IL-10 moduliert, welches anti-inflammatorisch wirkt und zudem die B-Zell-Proliferation anregt (Braun et al. 2015).

1.1.3.3 Interaktion

Damit es zur Aktivierung der T-Zellen kommen kann, sind zwei Dinge erforderlich: Erstens die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptoren und den MHC-Peptid-Komplexen, zweitens co-stimulatorische Moleküle und die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen durch DZ (Saint-Mezard et al. 2004).

Ersteres wird durch physikalischen Kontakt von DZ und T-Zellen in TZR-MHC-Komplexen gewährleistet. Zu den Co-Faktoren, welche von dendritischen Zellen exprimiert werden, gehören CD80 und CD86, deren Ligand CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen präsentiert wird. Die Bindung von CD80/86 und CD28 ist essentiell für die Entwicklung der Kontakthypersensibilisierung (CHS, *contact hypersensitivity*) bei Mäusen (Kondo et al. 1996). Sie führt zur Steigerung der IL-2-Produktion und dadurch zur Proliferation und Aktivierung von

T-Zellen. Außerdem bietet es über die Aktivierung von AP-1 und NF- κ b den T-Zellen Schutz vor apoptotischen Signalen.

Die Interaktion der DZ und T-Zellen über CD40 und seinen Liganden CD40L führt zur Hochregulation von OX40-L auf der Oberfläche der DZ, welches wiederum an OX40 auf T-Zellen bindet. Diese Bindung führt zu erhöhter Expression von CD80/86 und folglich zu gesteigerter T-Zell-Aktivierung (Chen et al. 1999).

1.1.4 Diagnostik

Wegweisend in der Diagnostik des allergischen Kontaktekzems ist die genaue Anamnese der Patienten. Wichtig zu erfahren sind: Zeitpunkt des Auftretens des Ekzems, Exposition zu Allergenen, Berufs- und Freizeitanamnese sowie atopische Vorerkrankungen in Eigen- und Familienanamnese. Ergibt sich der klinische Verdacht auf ein allergisches Kontaktekzem, folgt diagnostisch im Sinne einer Provokationstestung der Epikutantest. Es ist der einzige verlässliche Test zum Nachweis einer Sensibilisierung. Er wird im erscheinungsfreien Intervall durchgeführt. Verschiedene Testreihen stehen hierfür zur Verfügung. In den meisten Fällen werden die Standardreihe und die Allergene, mit denen der Patient in Kontakt gekommen sein könnte, getestet. In Fällen, in denen die klinischen Symptome eher untypisch oder nicht eindeutig sind, kann eine histopathologische Untersuchung einer Hautbiopsie zusätzlich in Erwägung gezogen werden (Dirschka et al. 2010; Leitlinie Dermatologie 2013). Der histologische Ekzemenachweis liefert allerdings keinen Hinweis auf das auslösende Allergen.

1.1.5 Therapie

Um das allergische Kontaktekzem ursächlich zu behandeln, ist die einzige Maßnahme das vollständige Meiden des auslösenden Allergens. Dies ist der symptomatischen lokalen und systemischen Therapie eindeutig überlegen. Auch ist die Aufklärung des Patienten über seine Mitarbeit und allgemeine Pflege- und Schutzmaßnahmen der Haut essentiell für den Behandlungserfolg (Leitlinie Kontaktekzem 2013).

Topisch sind Glukokortikoide Mittel der Wahl zur symptomatischen Behandlung des akuten Kontaktekzems. Vor allem Klasse II- und III-Steroide finden Anwendung, in schweren Fällen auch Klasse-IV-Präparate. Die Präparate sind nach Anwendungsort und Schweregrad des Ekzems sorgfältig auszuwählen und Nebenwirkungen, wie die Hautatrophie, gilt es durch zeitliche Begrenzung der Anwendung zu vermeiden (Levin und Maibach 2000; Saary et al. 2005). Eine Kortison-sparende Therapie mit Calcineurininhibitoren ist möglich (Meingassner

et al. 2003; Saripalli et al. 2003). Aktuell sind diese Präparate aber in Deutschland nur für die atopische Dermatitis zugelassen (Leitlinie Neurodermitis 2015).

Äußerlich kann zusätzlich eine UV-Therapie angewendet werden. Wirksam sind, vor allem beim chronischen Handekzem, UVB und PUVA. Ebenfalls möglich sind eine UVA1- und eine Schmalspektrum-UVB-Therapie (Leitlinie Kontaktekzem 2013).

Die Anwendung anderer Externa wie Teerpräparate und Antiseptika oder die Indikation zur Iontophorese müssen immer im Einzelfall und passend zu Verlauf und vorherrschender Symptomatik des Kontaktekzems geprüft werden (Leitlinie Kontaktekzem 2013).

Sollte die topische Therapie nicht ausreichen, kann eine systemische Therapie indiziert sein. Diese kann für einen begrenzten Zeitraum durch orale Gabe von Glukokortikoiden erfolgen. Aber auch andere immunsupprimierende Medikamente finden hier nach eingehender Prüfung der Indikation ihre Anwendung, unter anderem Alitretonin, Ciclosporin oder Azathioprin (Leitlinie Kontaktekzem 2013).

In der Zukunft wird das Ziel sein, therapeutisch spezifischer in die Pathogenese des allergischen Kontaktekzems einzugreifen. So sind denkbare immunmodulatorische Optionen, die Entzündungszellen an ihrer Rekrutierung zu hindern oder die Interaktion mit Zytokinen zu inhibieren. Auch könnten anti-inflammatorische Peptide oder *Nonsense*-Oligonukleotide ihre Anwendung finden.

1.2 Das Integrin α_E (CD103)

Integrine sind Glykoproteine auf Zelloberflächen und fungieren als transmembrane Adhäsionsmoleküle. Sie bestehen aus zwei miteinander assoziierten Ketten (α - und β -Kette), die für die Bindung des Integrins mit seinem Liganden verantwortlich sind, sodass Zellen mit benachbarten Zellen oder der Extrazellulärmatrix in Verbindung treten können (Jenkinson et al. 2011; Rink et al. 2015).

CD103 bezeichnet die α_E -Kette des Integrins $\alpha_E\beta_7$. Es wird von verschiedenen Zellen exprimiert, vor allem auf intraepithelialen Lymphozyten des Darms, der Lunge und der Haut sowie von Mastzellen und dendritischen Zellen (Kilshaw 1999; Schön et al. 2002; Pribila et al. 2004; Jenkinson et al. 2011). Die Transkription der α -Kette wird durch TGF β induziert (Robinson et al. 2001; Jenkinson et al. 2011).

Erstmals wurde CD103 als Antigen auf Lymphozyten im intestinalen Epithel von Menschen und Mäusen entdeckt. Zu über 90% sind es die intestinalen intraepithelialen T-Lymphozyten, die dieses Integrin exprimieren, aber auch in der Lamina propria des Darms können CD103⁺

T-Zellen nachgewiesen werden (Cerf-Bensussan et al. 1987; Kilshaw und Baker 1988; Kilshaw und Murant 1990).

1.2.1 Funktion als Adhäsionsmolekül

Der einzige bisher bekannte Ligand von $\alpha_E\beta_7$ ist E-Cadherin, welches von Epithelzellen, wie Keratinozyten und Langerhans-Zellen, exprimiert wird (Tang et al. 1993; Cepek et al. 1994; Hermiston und Gordon 1995; Karecla et al. 1995; Kilshaw 1999). E-Cadherin ist ein kalziumabhängiges Adhäsionsmolekül, welches an der Erhaltung der epithelialen Integrität und der Lokalisation und Retention von Lymphozyten im Gewebe mitwirkt (Rink et al. 2015; Cepek et al. 1994). Andere Liganden werden zur Zeit noch diskutiert (Strauch et al. 2001; Jenkinson et al. 2011).

In seiner Rolle als Adhäsionsrezeptor ist das Integrin CD103 an der Lokalisation bestimmter T-Zellen im Epithel beteiligt (Hardenberg et al. 2018). Durch die Bindung an E-Cadherin vermittelt es die Adhäsion von T-Zellen an Epithelzellen (Cepek et al. 1993; Kilshaw und Higgins 2002). So konnte in CD103^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CD103 die Zahl intestinaler und vaginaler intraepithelialer T-Zellen verringert war (Schön et al. 1999). Neben der Retention von T-Zellen im Epithel beeinflusst CD103 auch Motilität und Morphe einiger Lymphozyten (Schlickum et al. 2008).

CD103 wird vornehmlich in Geweben mit hohem TGF β -Gehalt exprimiert, wie bei chronischen Entzündungen (Kilshaw und Higgins 2002). CD103⁺ Zellen wurden in Läsionen atopischer Dermatitis und Lichen planus nachgewiesen (de Vries et al. 1997; Walton et al. 1997). Weitere Erkrankungen, bei denen CD103 eine Rolle zu spielen scheint, sind Sjögren-Syndrom, Lupus erythematodes, kutane T-Zell-Lymphome sowie Psoriasis (Dietz et al. 1996; Fujihara et al. 1997; Kroneld et al. 1998; Pang et al. 1998).

1.2.2 Expression durch T-Lymphozyten

Innerhalb der T-Zell-Populationen scheint CD103 hauptsächlich von CD8⁺ Zellen exprimiert zu werden und damit für deren epidermale Lokalisation und Rekrutierung während der inflammatorischen Reaktion verantwortlich zu sein, besonders nach deren Eintritt ins Epithel (Russell et al. 1994; Pauls et al. 2001; Ericsson et al. 2004; Uss et al. 2006). Auch mit der zytotoxischen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen bei Abstoßungsreaktionen ist CD103 assoziiert (Feng et al. 2002; El-Asady et al. 2005; Yuan et al. 2005). Viele Studien zeigen, dass $\alpha_E\beta_7$ für die Retention und Funktion regulatorischer CD4⁺/CD25⁺ T_{reg} im Gewebe verantwortlich ist und dass es in deren Abwesenheit zu gesteigerter Immunantwort kommt (Lehmann et al. 2002;

Siegmund et al. 2005; Suffia et al. 2005). So wurde auch in der Haut bei CD103^{-/-} Mäusen das spontane Auftreten inflammatorischer Läsionen beobachtet, was darauf schließen lässt, dass die Abwesenheit dieses Integrins ein Risikofaktor für die Entstehung von inflammatorischen Hauterkrankungen sein kann (Schön et al. 2000).

Auch murine dendritische epidermale T-Zellen (DETZ) exprimieren CD103, denn in der Epidermis defizienter Mäusen waren diese in signifikant vermindert (Schön et al. 2002).

1.2.3 Expression durch dendritische Zellen

Nicht nur Lymphozyten können CD103 exprimieren. So wurde das Integrin auch auf dendritischen Zellen und Mastzellen nachgewiesen (Kilshaw 1993; McLellan et al. 2002; Edwards et al. 2003; Pribila et al. 2004). Auch hier scheinen die Aufgaben vielfältig zu sein: Neben der Antigenpräsentation durch CD103⁺ DZ (del Rio et al. 2007), erfolgt durch sie auch die Stimulation von CD8⁺ Effektorzellen im Darm (Johansson-Lindbom et al. 2005). Auf der anderen Seite wurden aber auch CD103⁺ dendritische Zellen beschrieben, die vornehmlich für die Entwicklung von T_{reg} verantwortlich sind (Coombes et al. 2007). Der CD103-Expression auf DZ wird demnach auch die Rolle zugesprochen, das Gleichgewicht von Effektorzellen und T_{reg} im Gewebe aufrecht zu erhalten und eine essentielle Rolle in der Immunregulation zu spielen (Annacker et al. 2005).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Trotz vieler Studien ist noch unklar, wie das Integrin α_E (CD103) in die Pathogenese des allergischen Kontaktekzems involviert ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, inwieweit CD103-defiziente dendritische Zellen und Lymphozyten die Entzündung bei der allergischen Kontaktdermatitis beeinflussen. Im Detail soll bestimmt werden, welchen Einfluss sie während der Sensibilisierungs- sowie der Effektorphase haben. Bezüglich der DZ wird zum einen ihre Rolle im Ruhezustand und der Sensibilisierungsphase (Migration und Maturation) untersucht, zum anderen aber auch ihre Aufgaben während der Effektorphase: Gibt es funktionelle Unterschiede? Ist ihre Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren, verändert?

Außerdem wird die Aktivierbarkeit von T Zellen nach der Sensibilisierung – also in der Effektorphase – untersucht. Hier wird nochmals unterschieden zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und deren eventuell veränderten Funktionen und Eigenschaften.

Für die experimentelle Untersuchung der allergischen Kontaktdermatitis wurde das CHS-Maus-Modell eingesetzt. Dieses weit verbreitete Tiermodell ermöglicht es, die immunologischen Mechanismen der allergischen Kontaktdermatitis genauer zu untersuchen und teilt sich auch in die afferente und efferente Phase auf. Zuerst wird den Mäusen epikutan ein Hapten appliziert, vornehmlich am unteren Rücken. Nach fünf Tagen werden die Tiere mit dem Hapten re-exponiert und im Anschluss die Entzündungsreaktion gemessen. Zur Re-Applikation wird meist das Ohr verwendet, da sich als Surrogat-Parameter für die Hautentzündung die Messung der Ohrdicke etabliert hat (Christensen und Haase 2012; Allen 2013; Martin 2013). In dieser Arbeit wurden potente Haptene für das CHS-Modell verwendet, darunter Oxazolon, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzene (DNFB).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Bezugsquelle
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Brutschrank HERAccl 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühl- und Gefrierschränke +4°C; -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Mono-Mixer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Pipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Reinstwasserpumpe arium® 611VF	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler	Grant Instruments, Cambridge, UK
Ultraschall-Bad	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex Genie-2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellkulturbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

s.Tab.1ff.

Zentrifuge Megafuge 1.0 Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Megafuge 16	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Rotina 35	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
6-, 12-, 24-, 48- <i>Well</i> Platten	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
96- <i>Well</i> -Platten U bottom	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
<i>Cell strainer</i> 70 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACS- <i>Falcons</i> 5 ml	Corning Inc, Corning, NY, USA
FACS- <i>Falcons</i> 50 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Glaspipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kanülen 17G, 20G	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
MACS MS <i>Columns</i> , LS <i>Columns</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Petrischale Nunc 140 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Petrischale 92x16 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen Cellstar 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Reagenzröhrchen 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

s.Tab 2ff.

SuperFrost Plus Mikroskopobjektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
AEC (Amino-Ethylcarbazol) + <i>High Sensitivity Substrat Chromogene</i>	Dako, Carpinteria, CA, USA
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumthiocyanat (NH ₄ SCN)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Blocklösung aus TSA Biotin System	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
CFSE	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dibutylphthalat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dispase	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DNBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNFB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA <i>ultra pure</i>	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS <i>Clean solution</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS <i>Shutdown Solution</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Faramount <i>Aqueous Mounting Medium</i>	Dako, Carpinteria, CA, USA

s. Tab. 3ff.

Fetales Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
FTTC Isomer I	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
GM-CSF	Laboreigen
HBSS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HEPES	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Isofluran	Abbott, Chicago, IL, USA
L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol (CH ₃ OH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NEAA	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oxazonon	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS	Lonza Group, Basel, Schweiz
Penicillin + Streptomycin	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RPMI-1640 Medium	Lonza Group, Basel, Schweiz
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Puffer/Lösungen/Medium

Tabelle 4: Puffer/Lösungen/Medium

Erythrozyten-Lysepuffer 10x (1 l)	
80,2 g	NH ₄ Cl
8,4 g	NaHCO ₃
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1 L	aqua dest.

PBS 10x (5 l)	
400 g	NaCl
10 g	KCl
72 g	Na ₂ HPO ₄ + 2H ₂ O
10 g	KH ₂ PO ₄
ad 5 l	aqua bidest, pH 7.2

BMDC Kulturmedium (560,5 ml) = RPMI-10%	
500 ml	RMPI 1640 w/ L-Glutamin
500 µl	50 mM β-Mercaptoethanol
50 ml	FCS
5 ml	200 mM L-Glutamin
5 ml	10.000 U Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin

T-Zell Kulturmedium (523,7 ml) = RPMI-complete	
500 ml	BMDC Kulturmedium
12.5 ml	1 M HEPES
5.6 ml	10 mM NEAA
5.6 ml	100 mM Natriumpyruvat

MACS Puffer (500 ml)	
495,5 ml	PBS
2,5 ml	FCS
2 ml	0,5 M EDTA pH 8.0

2.1.5 Antikörper für Immunhistochemie

Tabelle 5: Antikörper Immunhistochemie

Antikörper	Ursprung	Isotyp	Markierung	Hersteller
MHC-II	Ratte	IgG2a κ	<i>purified</i>	eBioscience, San Diego, CA, USA
Sekundär-AK	Kaninchen	IgG	Biotin	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Streptavidin-Peroxidase			HRP	Vector Laboratories

2.1.6 Antikörper für gewebespezifische Rekrutierung und Reifung

Tabelle 6: Antikörper gewebespezifische Rekrutierung und Reifung

Antikörper	Ursprung	Isotyp	Markierung	Hersteller
CD16/32	Ratte	IgG2b κ	<i>purified</i>	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
MHC-II	Ratte	IgG2b κ	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11c	Hamster	IgG	APC/Cy7	BioLegend
CD86	Ratte	IgG2a κ	PE	BD Pharmingen

s. Tab. 6ff.

CD40	Ratte	IgG2aκ	PE	BD Pharmingen
CCR7	Ratte	IgG2aκ	PE	Biolegend
CD62L	Ratte	IgG2a	APC	Immunotools, Friesoyte, Deutschland
CD83	Ratte	IgG1κ	PE	BioLegend
CD103	Hamster	IgG	PE	BioLegend
7-AAD			PerCP/Cy5.5	BD Pharmingen
Isotyp	Ratte	IgG2bκ	PE	Immunotools
Isotyp	Hamster	IgG	PE	BioLegend
Isotyp	Ratte	IgG2aκ	PE/Cy7	BioLegend
Isotyp	Hamster	IgG	APC/Cy7	BioLegend
Isotyp	Ratte	IgG2aκ	APC	Immunotools

2.1.7 Antikörper für Funktionelle Experimente

Tabelle 7: Antikörper funktionelle Experimente

Antikörper	Ursprung	Isotyp	Markierung	Hersteller
FcBlock	Ratte	IgG2bκ	<i>purified</i>	BD Pharmingen
MHC-II	Ratte	IgG2bκ	FITC	BioLegend
CD11c	Hamster	IgG	APC/Cy7	BioLegend
CD40	Ratte	IgG2aκ	APC	BioLegend
CD86	Ratte	IgG2aκ	PE/Cy7	BioLegend
CD103	Hamster	IgG	PE	BioLegend
CD3	Hamster	IgG	APC/Cy7	BioLegend
CD4	Ratte	IgG2bκ	APC	Biolegend
CD8a	Ratte	IgG	PE	Immunotools

s. Tab. 7ff.

MHC-II	Ratte	IgG2b κ	PE/Cy7	BioLegend
CD8a-(Ly-2) MicroBeads	Ratte	IgG2a		Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4-(L3T4) MicroBeads	Ratte	IgG2b		Miltenyi Biotec
MHCII- MicroBeads	Ratte	IgG2b		Miltenyi Biotec
CD3 ϵ	Hamster	IgG		eBioscience
CD28	Maus	IgG1		Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Isotyp	Ratte	IgG2b κ	PE	Immunotools
Isotyp	Hamster	IgG	PE	BioLegend
Isotyp	Hamster	IgG	APC/Cy7	BioLegend
Isotyp	Ratte	IgG2b κ	FITC	BioLegend
Isotyp	Ratte	IgG2a κ	APC	BioLegend
Isotyp	Ratte	IgG2a κ	PE/Cy7	BioLegend
7-AAD			PerCP/Cy5.5	BioLegend

2.1.8 Tiere

Tabelle 8: Tiere

Maus	Bezugsquelle
C57BL/6J	Charles River Laboratory, Wilmington, MA, USA
CD103 ^{-/-} /B6J	Schön et al, 1999
OT-I	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
OT-II	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

2.1.9 Software

Tabelle 9: Software

Software	Bezugsquelle
Axiovision Rel 4.7	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
FACS DIVA <i>software</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office 2010, 2013 und 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung der Mäuse im CHS-Modell

Die allergische Kontaktdermatitis wurde im CHS-Modell untersucht. Hierfür wurden den Tieren zur Sensibilisierung unterschiedliche epikutan Haptene appliziert. Zum einen dienten als Applikationsort die Ohren: Hierfür wurden die Mäuse unter Isofluran-Narkose am rechten Ohr entweder mit 10 µl 3%iger Oxazolonyl-Lösung, behandelt, oder aber mit 10 µl einer 1%igen FITC-Lösung. Als Vehikelkontrolle wurden 10 µl EtOH beziehungsweise 10 µl Aceton:DBP (1:1) am linken Ohr aufgetragen. An beiden Ohren wurde jeweils nur die Dorsalseite sensibilisiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (4, 12, 24, 48, 72 h) erfolgte die Präparation der Ohren, um diese für immunhistochemische Färbungen zu verwenden.

Ein weiterer Applikationsort war der Rücken. Die Mäuse wurden ebenso mit Isofluran narkotisiert und am unteren Rücken rasiert. Einmalig wurden die Tiere mit 200 µl 1%igem FITC in Aceton:DBP (1:1) sensibilisiert. Zu festgelegten Zeitpunkten (12, 24, 48, 72 h) wurden dann die drainierenden inguinalen Lymphknoten entnommen, auf Eis gekühlt und weiter aufgearbeitet.

2.2.2 Organpräparation und Zellisolation

2.2.2.1 Ohrepidermis

Verschiedene Organe der Mäuse wurden für die Experimente präpariert und daraus die zu verwendeten Zellen isoliert. Für immunhistochemische Experimente wurde die Ohrepidermis verwendet. Zur Präparation wurden die Ohren der Maus mit einer Schere abgeschnitten und mit Hilfe einer Pinzette in eine ventrale und eine dorsale Hälfte gespalten. Die dorsale Hälfte wurde mit der Epidermis nach oben in eine 12-Well-Platte überführt und für 45 Minuten bei

37°C in 0,5%igem Ammoniumthiocyanat inkubiert. Anschließend wurden die Ohrhälften in PBS überführt, mit Hilfe von zwei feinen Pinzetten konnte die Epidermis abgezogen werden. Diese wurde anschließend mit Methanol bei -20°C für 10 Minuten fixiert. Bis zur Färbung wurden die Präparate bei 4°C in PBS aufbewahrt.

2.2.2.2 Lymphknoten

Insbesondere für die Durchflusszytometrie wurden die drainierenden sowie naiven Lymphknoten verwendet. Nach Sensibilisierung an der Rückenpartie wurden die Lymphknoten mittels Schere und Pinzette präpariert. Um eine homogene Zellsuspension herzustellen, wurden die Lymphknoten in 500 µl PBS aufgenommen, mit einem Stempel homogenisiert, filtriert und in insgesamt 1 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Pro FACS-Röhrchen wurden 100.000 Zellen/µl beziehungsweise 500.000 Zellen/µl verwendet. Unspezifische Bindungen wurden durch die Inkubation der Zellsuspension mit einem gegen CD16/32 gerichteten Antikörper inhibiert (4°C für 5 min, Verdünnung 1:20, 10 µl/100.000 Zellen).

2.2.2.3 Dendritische Zellen des Knochenmarks

Für funktionelle Experimente wurden die dendritischen Zellen des Knochenmarks (BMDC, *bone marrow derived dendritic cells*) benötigt. Die Generierung der BMDC wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Lutz et al. 1999; Braun et al. 2010). An Tag 0 wurden pro Maus zwei Femur- und zwei Tibiaknochen präpariert und das Knochenmark mit Hilfe von BMDC-Kulturmedium ausgewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 4°C mit 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in Lysepuffer resuspendiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu entfernen. Die Lyse wurde nach 6 min mit Medium abgestoppt und die restlichen Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen, durch ein Zellsieb filtriert und in 10 ml Medium aufgenommen. Zur Zellzählung wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und unter dem Mikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. 2×10^6 Zellen wurden pro Petrischale in 10 ml Medium mit 10% GM-CSF ausgesät und für insgesamt 8 Tage bei 37°C inkubiert. An Tag 3 und 6 wurde Medium hinzugefügt oder ein Medienwechsel vorgenommen, sodass ein Endvolumen von 20 ml vorlag mit 10% GM-CSF. An Tag 8 konnten die DZ geerntet werden. Hierfür wurden nicht-adhärente und leicht abzulösende Zellen aus den Petrischalen mit einer Glaspipette aufgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit BMDC-Kulturmedium wurden die Zellsuspensionen zusammengeführt und erneut unter dem Mikroskop gezählt. Die geerntete Population setzte sich aus reifen und unreifen DZ zusammen (Lutz et al. 1999). Im Anschluss

konnten diese nun für funktionelle Experimente, wie die T-Zell-Proliferation, verwendet werden.

2.2.2.4 Epidermale dendritische Zellen

Für funktionelle Experimente wurden auch epidermale DZ verwendet. Zu deren Gewinnung wurden die Ohren der Mäuse präpariert. Diese wurden an Tag 0 abgeschnitten und als Ganzes in 70%igem EtOH in einer Petrischale gesammelt. Anschließend wurden die Ohren mit Hilfe feiner Pinzetten in eine ventrale und eine dorsale Hälfte gespalten und zum Trocknen auf den Rand der Petrischale gehängt. Zum Verdau der Ohrhälften wurden diese mit der Epidermisseite nach oben zeigend für 60 min bei 37°C in Petrischalen mit Dispase-Lösung (2 U/ml in HBSS) überführt. Anschließend konnten nach einem Waschvorgang mit PBS die Ohrhälften mit Pinzetten vorsichtig in Epidermis und Dermis getrennt werden. Die Dermis wurde verworfen, die Epidermis wurde in 12-Well-Platten überführt und mit T-Zell-Kulturmedium in Anwesenheit von 10% GM-CSF für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurden die Zellen geerntet, welche aus der Epidermis ins Medium ausgewandert waren. Hierfür wurden die Kulturplatten für 30 min zunächst auf Eis gestellt, anschließend die Zellsuspensionen abpipettiert und für 5 min bei 4°C mit 1200 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in MACS-Puffer resuspendiert und die Zellen wurden unter dem Mikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Aufreinigung der MHC-II-positiven Zellen durch magnetische Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS). Die Zellen wurden in der Suspension mit magnetischen Antikörpern beladen und anschließend mit Hilfe eines Magneten selektiert. Es wurde nach dem Protokoll der Firma Miltenyi vorgegangen: Nach dem Zentrifugieren mit 1300 rpm für 10 min wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment in 90 µl entgastem MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Es wurden 10 µl der Anti-MHC-II-MicroBeads pro 10⁷ Zellen hinzugegeben und bei 4°C für 15 min inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 1 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen gewaschen, zentrifugiert und in 500 µl Puffer resuspendiert. Es folgte die eigentliche magnetische Separation, für die eine Säule auf dem MACS-Separator platziert und die Zellsuspension auf die Säule gegeben wurde. Nicht beladene Zellen flossen durch und wurden als negative Zellen gesammelt. Magnetisch beladene Zellen blieben in der Säule hängen. Nach Entfernen der Säule vom Separator konnten diese mit 1 ml MACS-Puffer ausgespült und als positive Zellen gesammelt werden. Anschließend wurden sowohl die positiven als auch die negativen Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch gezählt. Die Bestimmung der Reinheit (Anteil an MHC-II-positiven Zellen) erfolgte durchflusszytometrisch. Die

epidermalen MHC-II-positiven Zellen konnten nun für funktionelle Experimente verwendet werden.

2.2.2.5 T-Zellen

Für die Gewinnung Ag-spezifischer T-Zellen wurden an Tag 4 Mäuse *in vivo* mit 0,3%igem DNFB am zuvor rasierten unteren Rücken sensibilisiert. DNFB wird *in vivo* anstelle des *in vitro* genutzten DNBS verwendet. Nach 5 Tagen der Sensibilisierung wurden an Tag 9 die Mäuse getötet, die drainierenden inguinalen Lymphknoten entnommen und in gekühltem PBS gesammelt. Unter der Sterilbank wurden die Lymphknoten mit einem Stempel homogenisiert und filtriert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch gezählt. Um in der Suspension enthaltene DZ zu eliminieren, wurden 1×10^7 Zellen/Petrischale in T-Zell-Kulturmedium mit 5%igem FCS-Gehalt für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Dendritischen Zellen heften sich in dieser Zeit an die Petrischale, sodass sich im Medium dann bevorzugt Lymphozyten befinden. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren geerntet. Die Zellen wurden einmal gewaschen, mit 1200 rpm bei 4°C zentrifugiert und in PBS resuspendiert, anschließend wurden sie gezählt.

Für bestimmte Experimente wurden zusätzlich noch CD4⁺ und CD8⁺ Populationen durch MACS isoliert. In einem weiteren Versuchsaufbau wurden OVA-stimulierte BMDC zum *Priming* der T-Zellen *in vitro* verwendet. Als T-Zellen wurden hierfür OT-I beziehungsweise OT-II Mäuse verwendet. Eine weitere Sensibilisierung *in vivo* war nicht nötig. An Tag 9 erfolgte die positive magnetische Selektion in CD8 (OT-I) beziehungsweise CD4 (OT-II) positive Zellen.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) differenziert Zellen anhand ihrer Lichtbrechung. Hierfür werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern beladen. Im Durchflusszytometer passieren sie einen Laserstrahl, was zur Entstehung von Streulicht führt, welches Rückschlüsse auf Volumen und Granularität der Zellen zulässt. Zusätzlich werden die Fluoreszenzfarbstoffe detektiert, die durch Antikörper an zelluläre Moleküle gebunden sind.

Um die Rekrutierung der DZ zu den drainierenden Lymphknoten zu untersuchen und nachzuweisen, wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle gefärbt. Hierzu zählen das murine MHC-II (IA-IE) und CD11c. Pro 100.000 Zellen wurden 2 µl der angesetzten Verdünnungen verwendet (Tabelle 5).

Um die Reifung zu untersuchen, wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen folgende Oberflächenmoleküle gefärbt: CD86, CD40, CD62L, CCR7, CD83 und CD103. Zusätzlich erfolgte die Färbung mit Isotyp-gleichen Kontrollen in gleicher Konzentration. Folgende Mengen wurden von den Antikörpern pro 100.000 Zellen verwendet:

Anti-CD86: 5 µl; anti-CD40: 10 µl; anti-CD62L: 0,5 µl; anti-CCR7: 1 µl; anti-CD83: 2 µl; anti-CD103: 0,5 µl. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte für 30 min bei 4°C. Anschließend wurde pro Röhrchen 1,25 ml PBS hinzugefügt und für 7 min mit 1300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Sediment in 250 µl PBS resuspendiert. 10 min vor der FACS-Messung wurden 10 µl/100.000 Zellen 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) hinzugefügt. Dieses Peptid interkaliert mit der DNA von nicht-viablen Zellen, so dass hiermit tote Zellen und Zellreste markiert werden können.

Als Kontrolle dafür, dass die FITC-sensibilisierten Zellen in die inguinalen Lymphknoten einwandern, wurden in einem Versuch zusätzlich mesenteriale Lymphknoten sowie Milzen präpariert und zu einer Zellsuspension aufgearbeitet. Die Detektion der Zellen erfolgte mit dem BD FACSCantoTMII, zur Auswertung wurde die FACSDiva Software verwendet.

2.2.4 Funktionelle Experimente

2.2.4.1 Stimulation von BMDC und epidermalen DZ

An Tag 8 wurden die noch semi-reifen DZ geerntet. Für die funktionellen Experimente wie das *Priming* der DZ sowie die T-Zell-Proliferation mussten die Zellen zuvor noch sensibilisiert werden und die Reifung abschließen. Hierfür wurden die Zellen auf 6-*well*-Platten (2x10⁶ Zellen/*well*) verteilt und mit 0,5 mM DNBS stimuliert. Für ein anderes Allergen-Modell wurde Ovalbumin verwendet. Anstelle von DNBS erfolgte hier die *In-vitro*-Stimulation der DZ mit Ovalbumin (Konzentration 100 µg/ml). Für 24 Stunden wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Für die Stimulation der epidermalen DZ wurden an Tag 2 127.000 – 180.000 Zellen/*well* verteilt und ebenfalls mit 0,5 mM DNBS inkubiert. Als Kontrollansatz wurden Zellen nur mit BMDC-Kulturmedium inkubiert. An Tag 9 beziehungsweise Tag 3 wurden die nun reifen DZ geerntet, mit 1200 rpm bei 4°C für 5 min zentrifugiert, und das Sediment in T-Zell-Kulturmedium resuspendiert. Der Phänotyp und damit die Reifung der DZ wurden durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen CD103, CD11c, CD40, CD86 und MHC-II sowie deren Isotyp-Kontrollen bestimmt.

2.2.4.2 Co-Kultur

Nun wurden T-Zellen und die DZ *in vitro* zusammengeführt, um die T-Zell-Proliferation sowie das *Priming* zu untersuchen. Damit die T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch nachvollzogen werden konnte, wurden die Zellen mit CFSE beladen. Hierfür wurde die Zellsuspension für 8 min bei 30°C im Dunkeln mit 2,5 µM CFSE gefärbt. CFDA-SE ist ein intrazellulärer Farbstoff zur Detektion der Zellteilung. Es ist zellpermeabel und wird von den Zellen aufgenommen. Intrazellulär wird durch Esterasen die Acetatgruppe abgespalten, sodass der fluoreszierende Farbstoff CFSE entsteht. Dieser bindet kovalent mit seiner Succinimidyl-Gruppe an intrazelluläre Moleküle und bleibt im Zytoplasma präsent. Mit jeder Zellteilung wird der Farbstoff und damit die Fluoreszenzintensität auf die Tochterzellen aufgeteilt, sodass in der Durchflusszytometrie die Anzahl der Zellteilungen sichtbar gemacht werden kann. Anschließend wurden die Zellen mit FCS und mit T-Zell-Kulturmedium gewaschen und erneut gezählt. Auf einer 96-well-Platte wurden pro well 1×10^5 T-Zellen in 200 µl T-Zell-Kulturmedium ausgesät. Hinzu kamen die DZ (Verhältnis DZ:T 1:3, 1:10, 1:30). Um zu untersuchen, ob ein Unterschied im *Priming* der DZ vorliegt, wurden aus Wildtypmäusen Ag-spezifische T-Zellen generiert und zusammen mit BMDC aus Wildtyp- und CD103-defizienten Mäusen kultiviert.

Eine andere Konstellation wurde gewählt, um die T-Zell-Proliferation zwischen den Mauslinien zu vergleichen. Hierfür wurden T-Zellen aus Wildtyp- und CD103-defizienten Mäusen zusammen mit BMDC oder epidermalen DZ nur aus Wildtypmäusen kultiviert.

Als Negativkontrollen wurden ungefärbte T-Zellen (T-Zellen in Medium) sowie unstimulierte DZ (BMDC oder epidermale DZ in Medium) verwendet. Für die Positivkontrolle wurden T-Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen CD3 (Konzentration 1 µl/ml) und CD28 (Konzentration 1 µg/ml) stimuliert. Für 72 Stunden bei 37°C wurden die Zellen nun co-kultiviert. Zur Auswertung wurde die CFSE-Fluoreszenz der T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden aus den wells die Überstände abpipettiert, die am Boden haftenden Zellen wurden in PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren bei 1300 rpm bei 4°C für 7 min wurde der Überstand abgesaugt und jedes Röhrchen mit 10 µl Anti-CD16/CD32 für 10 min bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden je 10 µl der Antikörper gegen CD3, CD4 und CD8 beziehungsweise deren Isotyp-Kontrollen hinzugefügt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen und direkt vor der Messung mit 10 µl 7-AAD als Marker für tote Zellen versetzt.

2.2.5 Immunhistochemie

Zur Detektion der nach Sensibilisierung mit Oxazolon oder FITC in der Epidermis verbliebenen DZ wurden Epidermis-Präparate von Mausohren immunhistochemisch für MHC-II gefärbt.

Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurde die Ohrepidermis nach mehrmaligem Waschen in PBS für 10 min in 0,3%iges Wasserstoffperoxid überführt und erneut mit PBS gewaschen. Danach wurde mit 0,5%iger Blocklösung in PBS aus dem TSA (*Tyramide Signal Amplification*)-Kit für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Nach Abpipettieren der Blocklösung erfolgte die Färbung mit dem gegen MHC-II gerichteten Primärantikörper mit 250 $\mu\text{l/well}$. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Gleichzeitig wurden Isotyp-Kontrollen durchgeführt. Am nächsten Tag wurde nach einem Waschgang der biotinmarkierte Sekundärantikörper hinzugefügt (250 $\mu\text{l/well}$) und bei Raumtemperatur für 40-50 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden 250 $\mu\text{l/well}$ der Streptavidin-Meerrettichperoxidase zur Signalverstärkung hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 40 min auf dem Schüttler inkubiert. Wieder erfolgte ein Waschgang, danach wurden die Proben mit einigen Tropfen des Chromogens AEC (Amino-Ethylcarbazol) im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min auf dem Schüttler gefärbt. Zuletzt wurde die Epidermis mit Leitungswasser gespült und mit Hilfe eines Pinsels auf Objektträger gebracht, in wässriger Lösung (*Faramount Aqueous Mounting Medium*) eingebettet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach dem Trocknen konnten die Proben mikroskopisch evaluiert werden. Zellen wurden in mindestens drei Ausschnitten je Objektträger mit einer 10-fachen Vergrößerung gezählt und fotografiert.

2.2.6 Mäuse

C57BL/6J Mäuse (Wildtyp, CD103^{+/+}) und Integrin- αE (CD103)-defiziente Mäuse (CD103^{-/-}) (auf C57BL/6J-Hintergrund) wurden unter pathogenfreien Bedingungen in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet und aufgezogen. Für die Experimente wurden Mäuse beider Geschlechter im Alter von acht bis zwölf Wochen verwendet. Die Experimente wurden vom Bundesland Niedersachsen genehmigt und gemäß den gesetzlichen Vorschriften durchgeführt (Aktenzeichen 12/0836).

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel Software. Der Mittelwert und Standardfehler wurden hiermit berechnet. Zur Signifikanzberechnung wurde der zweiseitige Student's T-Test verwendet. P-Werte von $<0,05$ (entsprechend einem Konfidenzintervall von 95%) wurden als signifikant angesehen. Ausnahmen sind an entsprechender Stelle gesondert gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Normale Funktion der dendritischen Zellen bei CD103-Defizienz

3.1.1 CD103-defiziente dendritische Zellen unterscheiden sich nicht in ihrer Anzahl und Morphologie während der Auswanderung aus der Epidermis

Als erster Schritt der Kontakthypersensibilisierung erfolgt die Auswanderung der mit einem Allergen sensibilisierten DZ aus der Epidermis in die regional drainierenden Lymphknoten, um dort auf T-Lymphozyten zu treffen und diese zu aktivieren. Um diese Wanderung der DZ zu erfassen, wurden Anzahl und Morphologie der DZ in epidermalen Ohrpräparaten beider Mauslinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 4, 12, 24, 48 h) immunhistochemisch untersucht und verglichen.

Hierzu wurden Wildtyp- (wt) sowie CD103-defiziente Mäuse wahlweise mit 1%iger FITC-Lösung (n = 3) oder 3%iger Oxazolone-Lösung (n = 3) an einem Ohr *in vivo* einmalig sensibilisiert. Das andere Ohr jedes Tieres diente als Vehikel-Kontrolle. Über eine Zeitspanne von 0 h (unbehandelte Mäuse) bis 48 h wurde die Epidermis präpariert und in Methanol fixiert. DZ wurden anhand ihrer MHC-II-Expression detektiert.

Beim Ausgangswert von 0 h waren keine nennenswerten Unterschiede in der Zellzahl zu erkennen. Im Mittel lag die Anzahl der DZ bei wt-Mäusen bei 408,57 (SEM \pm 19,09), bei CD103^{-/-}-Mäusen waren es 400,43 (SEM \pm 11,86) pro 0,6 mm² Ohrepiidermis. Auch morphologisch zeigten sich keine Unterschiede (Abb. 1a), sodass für beide Mauslinien ein vergleichbarer Ruhezustand als Grundlage für die folgenden Sensibilisierungszeitreihen angenommen wurde.

Zur Beurteilung wurde die Zahl der MHC-II⁺-Zellen aus den sensibilisierten Ohren in Prozent der jeweiligen Vehikel-Kontrolle dargestellt (Abb. 1b und c). Bei den Oxazolone-sensibilisierten Mäusen ließ sich eine Dynamik der Auswanderung der MHC-II⁺-Zellen in beiden Mauslinien erkennen. Bis zum Zeitpunkt 48 h nahm der prozentuale Anteil der in der Epidermis verbliebenen DZ bei den wt-Mäusen konstant ab (Mittelwert 4 h: 106,88% SEM \pm 10,09; 48 h: 95,91% SEM \pm 3,28). Die CD103-negativen Zellen nahmen bis zum Zeitpunkt 12 h ab (Mittelwert 89,77% SEM \pm 2,91), danach kam es bis zum Zeitpunkt 48 h erneut zu einer leichten Zunahme (Mittelwert 95,72% SEM \pm 2,25). Zu allen Zeitpunkten befanden sich prozentual weniger MHC-II⁺-Zellen in der Epidermis CD103-defizienter Mäuse; der Unterschied war nach 12 Stunden signifikant. (wt-Mäuse: 105,24% SEM \pm 2,80, CD103^{-/-}

Mäuse: $89,77\% \text{ SEM} \pm 2,91$; Abb. 1b). Allerdings schwankten die absoluten Zellzahlen zwischen den einzelnen Mäusen deutlich (Abb. 1d und e).

In der Zeitreihe der FITC-sensibilisierten Mäuse waren, unabhängig von der Mauslinie, hohe Schwankungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten zu erkennen. Bei den wt-Mäusen befanden sich zu allen Zeitpunkten prozentual mehr MHC-II⁺-Zellen in der Epidermis als bei CD103^{-/-}-Mäusen. Ein klarer signifikanter Unterschied bestand nicht (Abb. 1c).

Morphologische Unterschiede wurden sowohl bei den FITC- als auch bei den Oxazolonsensibilisierten Tieren zu keinem Zeitpunkt gesehen.

Insgesamt fanden sich somit keine klaren Hinweise darauf, dass CD103 eine Rolle bei der Auswanderung der DZ aus der Epidermis spielt.

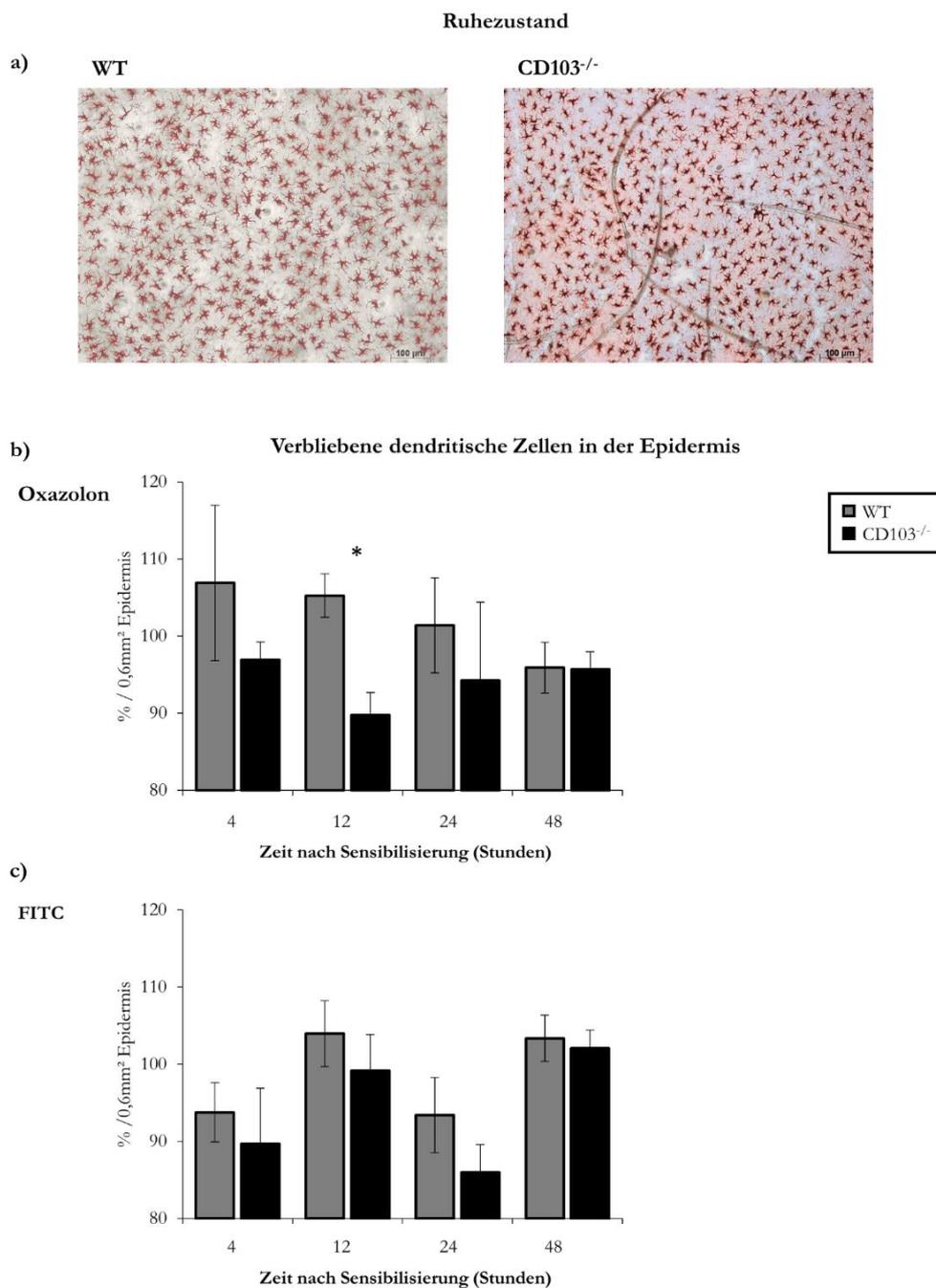


Abbildung 1: CD103^{-/-} DZ weisen in Anzahl und Morphologie keine Unterschiede während der Auswanderung aus der Epidermis auf.

a) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von MHC-II⁺-Zellen in der Ohrepidermis naiver Mäuse. b und c) Nach einmaliger Sensibilisierung mit Oxazolone bzw. FITC am Ohr wurden zu den Zeitpunkten 12, 24, und 48 h Epidermispräparate angefertigt und die residenten Zellen durch monoklonale Antikörper gegen MHC-II markiert. Zur Auswertung wurden pro Maus drei bis vier Ausschnitte aus der Epidermis mikroskopiert und die MHC-II⁺-Zellen gezählt. Dargestellt sind die epidermalen MHC-II⁺-Zellen im Verhältnis zur Vehikelkontrolle in Prozent pro 0,6 mm² Epidermis (n = 3; Mittelwert ± Standardfehler) für wt- (graue Balken) und CD103^{-/-}-Mäuse (schwarze Balken).

3.1.2 Dendritische Zellen beider Mauslinien weisen eine ähnliche Dynamik in der Migration zum Lymphknoten auf

Um die Migration in die drainierenden Lymphknoten während der Sensibilisierungsphase zu untersuchen, wurden Mäuse beider Linien *in vivo* am unteren Rücken mit 1%iger FITC-Lösung sensibilisiert. Nach 0 h, 12 h, 24 h, 48 h sowie 72 h wurden die inguinalen Lymphknoten präpariert, die Zellen isoliert und in Suspension gebracht. Anschließend wurden MHC-II und CD11c angefärbt (2.2.3). Diese Oberflächenantigene werden auf dendritischen Zellen stark exprimiert. Anschließend wurde die Zahl FITC-aufnehmender MHC-II⁺CD11c⁺-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (n = 3-13).

Sowohl bei wt- als auch bei CD103^{-/-}-Mäusen stiegen die Zellzahlen in den drainierenden inguinalen Lymphknoten bis 72 h (Endpunkt der Messungen) konstant an. Die Anzahl der eingewanderten Zellen stieg im Mittel von $9,45 \times 10^6$ (SEM $\pm 3,52$) auf $42,47 \times 10^6$ (SEM $\pm 3,41$) Zellen pro Lymphknoten bei den wt-Mäusen, und von $14,93 \times 10^6$ (SEM $\pm 2,22$) auf $39,73 \times 10^6$ (SEM $\pm 3,08$) Zellen pro Lymphknoten bei den CD103^{-/-} Mäusen (Abb. 2a). Damit konnten diese Experimente belegen, dass bei beiden Mauslinien eine Immunantwort abgelaufen war. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien bestanden nicht.

Alle FITC⁺-Zellen exprimierten MHC-II⁺ und CD11c⁺, sodass diese die aus der Epidermis eingewanderten DZ waren.

In der mittleren Fluoreszenzintensität (Mfi, *mean fluorescence intensity*) für FITC innerhalb der MHC-II⁺CD11c⁺ Zellen unterschieden sich die wt- und die CD103^{-/-}-Mäuse deutlich. Zwischen 12 bis 48 h war die Mfi der CD103^{-/-} Zellen stets höher als die der wt-Zellen (Abb. 3b). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zeigten sich bei 12 h (wt: 13162,33 SEM $\pm 2077,11$; CD103^{-/-} 34987,0 SEM $\pm 2295,02$) und 48 h (wt: 17633,33 SEM $\pm 3351,72$; CD103^{-/-} 39782,33 SEM $\pm 2990,76$). Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass die CD103^{-/-} DZ mehr Hapten aufgenommen hatten und eventuell eine bessere *Priming*-Kapazität aufwiesen. Dieser Frage wurde zu einem späteren Zeitpunkt weiter nachgegangen (vgl. Abschnitt 3.4).

3.1.2.1 Die Migration der DZ ist auf die drainierenden Lymphknoten beschränkt

Um nachzuweisen, dass es sich bei den DZ um spezifische FITC-enthaltende Zellen aus der Haut handelte, wurden Zellen aus nicht-drainierenden Lymphknoten (mesenteriale Lymphknoten) sowie Splenozyten auf FITC-positive Zellen untersucht (n = 2). Sowohl in der Milz als auch in den nicht-drainierenden Lymphknoten ließen sich durchflusszytometrisch keine positiven Zellen detektieren (Abb. 3c). Diese Experimente belegten, dass sich die Migration der DZ aus der Haut auf die jeweils drainierenden Lymphknoten beschränkte.

Die Experimente belegten in ihrer Zusammenschau, dass die Einwanderung der DZ in die drainierenden Lymphknoten nach der Sensibilisierung nicht von ihrer CD103-Expression abhing. Bei beiden Mauslinien lief eine Immunantwort ab, hinsichtlich der Dynamik der Einwanderung und der Anzahl der migrierten Zellen zeigten sich jedoch keine Unterschiede. Allerdings waren signifikante Unterschiede bei der Menge des aufgenommenen Haptens auszumachen. Bei den CD103⁻ Zellen kam es zu einer Mehraufnahme von FITC in die einzelnen Zellen.

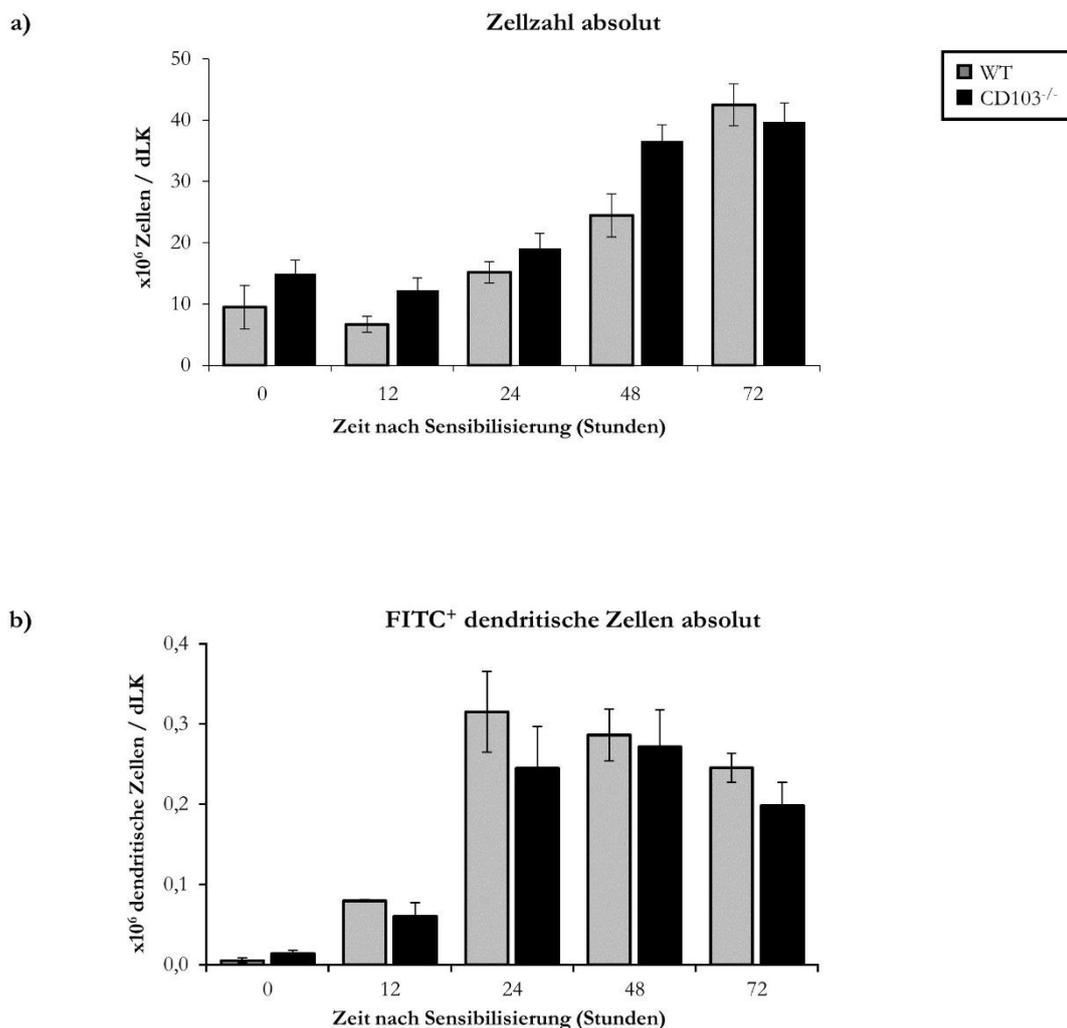


Abbildung 2: CD103⁻ DZ weisen in Anzahl und Dynamik keine Unterschiede während der Migration in die drainierenden Lymphknoten auf.

Nach einmaliger Sensibilisierung mit 1% FITC am unteren Rücken wurden zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 48 und 72 h die beiden inguinalen Lymphknoten einer Maus entnommen. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt.

a) Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen beider Lymphknoten einer Maus (n = 3, außer 24 h: n = 13; Mittelwert \pm Standardfehler) für Wildtyp- (graue Balken) und CD103^{-/-}-Mäuse (schwarze Balken).
 b) Als Marker für DZ wurden MHC-II und CD11c durchflusszytometrisch detektiert.

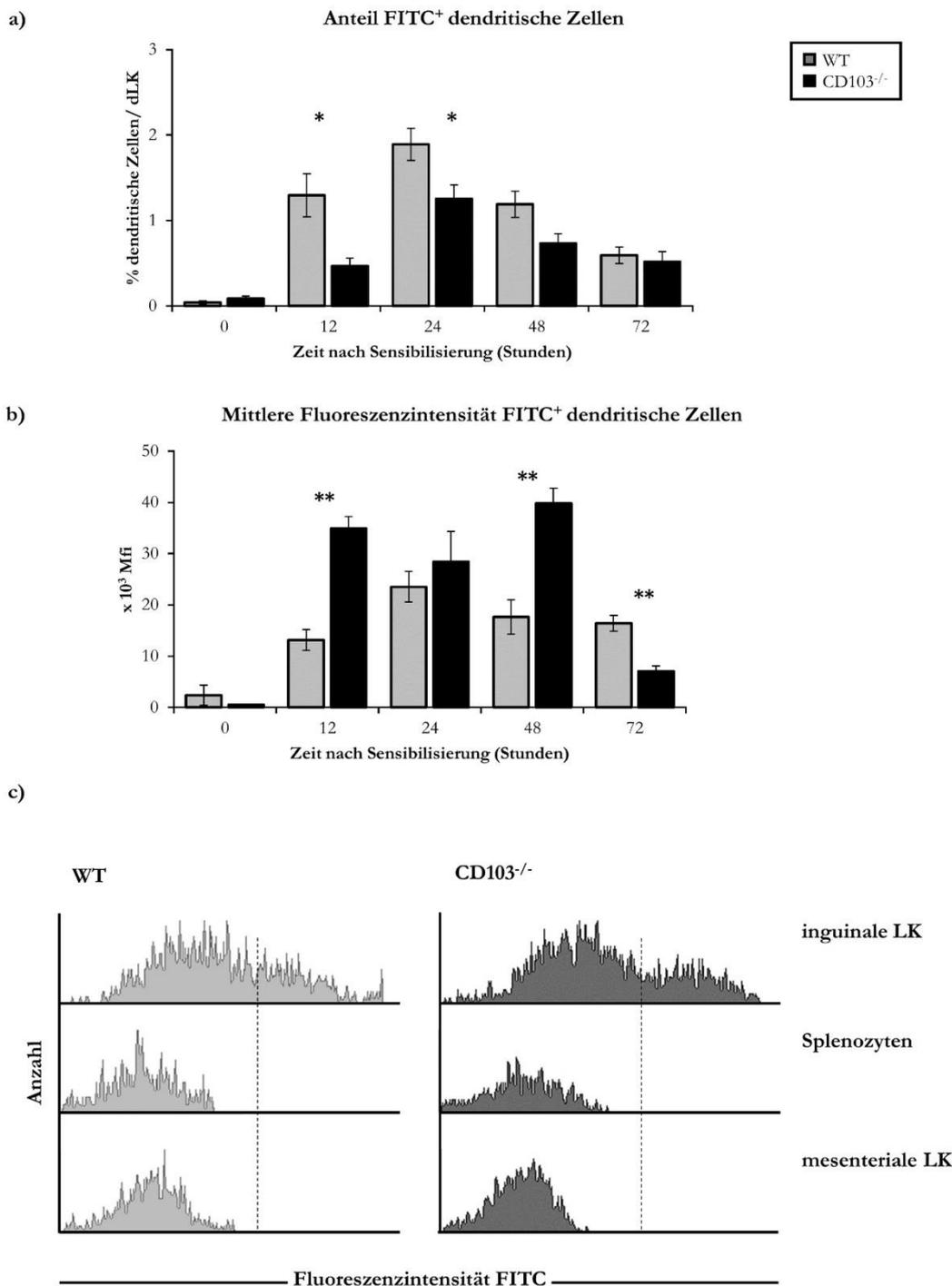


Abbildung 3: CD103^{-/-} DZ weisen prozentual niedrigeren Anteil an FITC auf mit jedoch höherer Fluoreszenzintensität.

a) und b) Die Zellen aus den inguinalen Lymphknoten wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC-II und CD11c markiert. Zur Auswertung wurde je eine Zellsuspension pro Maus und Zeitpunkt durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind der prozentuale Anteil an FITC⁺ DZ sowie die mittlere Fluoreszenzintensität des Haptens FITC (n = 3, außer 24 h: n = 11; Mittelwert ± Standardfehler) für wt- und CD103^{-/-}-Mäuse. c) Repräsentative Histogramme der Fluoreszenzintensität für FITC in inguinalen und mesenterialen Lymphknoten sowie in Splenozyten 24 h nach der Sensibilisierung mit dem Haptens am unteren Rücken. Dargestellt sind Histogramme von wt- (hellgrau) und CD103^{-/-}-Mäusen (dunkelgrau). * p<0,05; ** p<0,01.

3.1.3 Ausgereifte dendritische Zellen weisen gleichen Phänotyp auf

Um die Reifung der DZ auf ihrem Weg in die drainierenden Lymphknoten nachzuvollziehen, wurden Zellen inguinaler Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert ($n = 5$). Als Marker für DZ dienten wieder MHC-II und CD11c. Hinzu kamen CD40, CD83 und CD86 als kostimulierende Moleküle bei der T Zell-Aktivierung, CCR7 (Chemokinrezeptor), der die Rekrutierung der DZ aus der Haut in sekundäre lymphatische Gewebe reguliert, sowie CD62L, ein *Homing*-Rezeptor für Lymphozyten. Die Untersuchung erfolgte 24 h nach Sensibilisierung mit 1%iger FITC-Lösung, da in vorangegangenen Experimenten zu diesem Zeitpunkt prozentual die meisten FITC⁺ DZ in die Lymphknoten gewandert waren (Abb. 3). DZ beider Mauslinien erreichten ausgereift die drainierenden Lymphknoten. FITC aufnehmende dendritische Zellen (MHC-II⁺ CD11c⁺ FITC⁺) waren für jeden Reifungsmarker zu circa 80% positiv (Abb. 4a). Die MFI aller Reifungsmarker war in wt- und CD103⁻ DZ nahezu gleich (Abb. 4b).

3.1.3.1 Die meisten eingewanderten DZ der Wildtypmäuse sind CD103 negativ

Bei Wildtypmäusen wurde der Anteil an FITC⁺ CD103⁺ DZ in den drainierenden Lymphknoten durchflusszytometrisch bestimmt ($n = 5$). Ebenso wurde mit MHC-II⁺-Zellen aus verschiedenen Ohr-Hautschnitten (epidermal, dermal, komplett) von wt-Mäusen verfahren ($n = 1-6$). Hierfür wurden Hautexplantate *in vitro* verdaut und in Medium inkubiert, um Zellen aus dem Gewebe wandern zu lassen. Anschließend wurden die emigrierten Zellen in einer Suspension gesammelt und durchflusszytometrisch untersucht.

In den inguinalen Lymphknoten waren über 80% der Zellen für das Oberflächenmolekül CD103 negativ (MHC-II⁺ CD11c⁺ FITC⁺ CD103⁺: 12,16% SEM \pm 2,07).

Auch die MHC-II⁺-Zellen aus den epidermalen und dermalen Hautschnitten wiesen kaum CD103 auf ihrer Oberfläche auf (epidermal 0,3% SEM \pm 0,11; dermal 0,2%). In den kompletten Hautexplantaten waren im Gegensatz dazu 4,3% MHC-II⁺ CD103⁺.

DZ der Wildtypmäuse exprimierten mehrheitlich kein CD103, sowohl in der Haut (Start-Gewebe) als auch im Lymphknoten (Ziel-Gewebe).

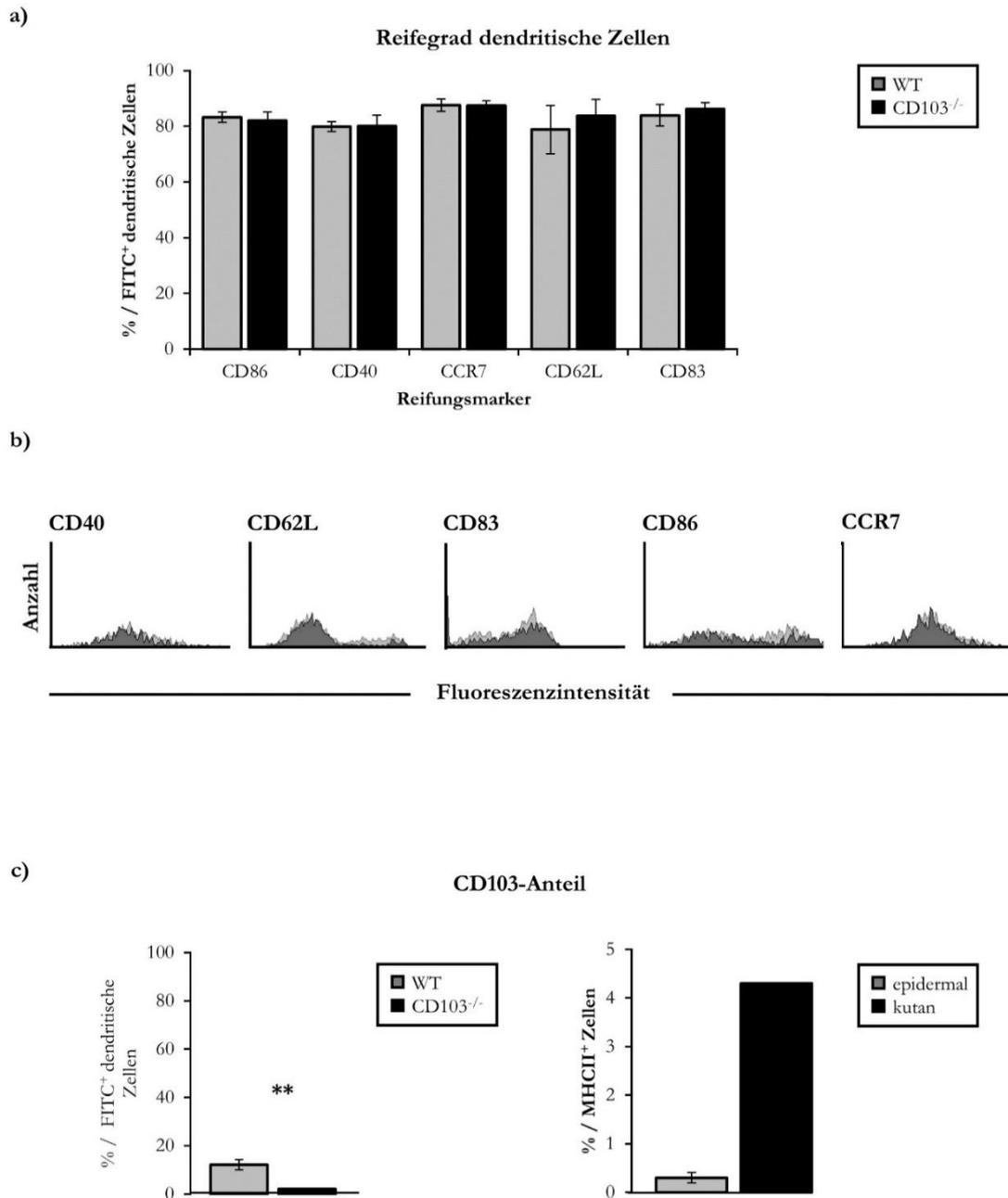


Abbildung 4: CD103^{-/-} und wt-DZ weisen gleichen Phänotyp auf.

a) 24 h nach Sensibilisierung mit 1% FITC wurden die inguinalen Lymphknoten einer Maus entnommen und die Zellsuspensionen für MHC-II und CD11c gefärbt. Hinzu kamen Färbungen für CD86, CD40, CCR7, CD62L und CD83. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt sind die Anteile des jeweiligen Reifungsmarkers in MHC-II⁺ CD11c⁺ FITC⁺ Zellen pro Maus (n = 5; Mittelwert \pm Standardfehler) für Wildtyp- (graue Balken) und CD103^{-/-}-Mäuse (schwarze Balken). b) Repräsentative Histogramme der MFI für die aufgeführten Reifungsmarker in inguinalen Lymphknoten 24 h nach der Sensibilisierung mit FITC. Dargestellt ist die Expression der einzelnen Antigene auf MHC-II⁺ CD11c⁺ FITC⁺ Zellen von Wildtyp- (hellgrau) und CD103^{-/-}-Mäusen (dunkelgrau) (n = 5). c) Anteil von CD103 in MHC-II⁺ CD11c⁺ FITC⁺ Zellen in inguinalen Lymphknoten 24 h nach Sensibilisierung mit FITC (n = 5). Zum Vergleich ist der CD103⁺-Anteil in MHC-II⁺ Zellen aus *skin explants* dargestellt (grau=epidermal; dunkelgrau=dermal; schwarz=komplette Explantate) (n = 1-6). ** p<0,01.

3.1.4 CD103-Defizienz hat *in vitro* keine Auswirkung auf die T-Zell-Aktivierung

Nach der Migration der DZ in die drainierenden Lymphknoten erfolgt dort das *Priming* der T-Zellen auf das präsentierte Antigen. Die *Priming*-Kapazität in beiden Mauslinien wurde in Proliferations-Experimenten untersucht. Naive DZ des Knochenmarks (*bone marrow derived dendritic cells*, BMDC) von Wildtyp- und CD103^{-/-}-Mäusen wurden hierfür für acht Tage kultiviert und anschließend *in vitro* mit DNBS stimuliert. Gleichzeitig wurden wt-Mäuse am unteren Rücken mit DNFB *in vivo* sensibilisiert und nach fünf Tagen die drainierenden inguinalen Lymphknoten isoliert, so dass Antigen (DNFB)-spezifische T Zellen gewonnen und mit CFSE gefärbt wurden. CFSE verbleibt im Zytoplasma der Zellen. Bei jeder Zellteilung halbiert sich die Fluoreszenzintensität in den Tochterzellen, sodass die Anzahl der Zellteilungen sichtbar gemacht werden kann. Danach wurden die nun reifen DZ mit den Ag-spezifischen T Zellen zusammen für 72 h co-kultiviert (n = 3). Die Proliferation der T-Zellen anhand der CFSE-Intensität ausgewertet (Abb. 5).

Hinsichtlich der *Priming*-Kapazität der BMDC beider Mauslinien fielen keine signifikanten Unterschiede auf, sowohl bezüglich der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 6a).

Innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population fiel auf, dass sowohl die mit DNBS stimulierten als auch die unstimulierten BMDC zu einer ähnlich hohen Proliferation der T-Zellen führte. Für die DZ:T-Ratio 1:10 waren beispielsweise bei den wt-Mäusen durch die stimulierten BMDC im Mittel 14,91% (SEM ± 0,66) der T-Zellen proliferiert. Nicht stimulierte BMDC führten im Mittel bei 15,34% (SEM ± 0,88) der T-Zellen zur Proliferation (Abb. 6b).

Bei den CD8⁺ T-Zellen hingegen war ein deutlicher Unterschied zwischen DNBS-Behandlung und Vehikel-Kontrolle zu erkennen. Ohne Stimulation der BMDC kam es bei beiden Mauslinien zu keiner nennenswerten Proliferation der T-Zellen. Hingegen führte die *In-vitro*-Sensibilisierung der BMDC mit DNBS zu einer deutlichen Proliferation. Beispielfhaft bei der DZ:T-Ratio von 1:10 proliferierten bei den wt-Mäusen im Mittel 28,31% (SEM ± 2,48) CD8⁺ T-Zellen durch die Aktivierung von stimulierten BMDC. In der Vehikel-Kontrolle waren es im Mittel nur 7,25% (SEM ± 0,74).

Diese Experimente zeigten, dass es keinen Unterschied zwischen den Mauslinien hinsichtlich der *Priming*-Kapazität der DZ gab. Die Expression von CD103 auf den DZ war nicht notwendig für die Aktivierung der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen.

Um einen weiteren Hinweis auf gleiches *Priming*-Verhalten von Wildtyp- und CD103^{-/-}-Mäusen zu erlangen, wurde mit den BMDC beider Mauslinien und T-Zellen aus OT-1 und OT-2 Mäusen eine weitere Proliferations-Messung durchgeführt (n = 1). Im Unterschied zu den vorangegangenen Experimenten, wurden die BMDC dieses Mal mit Ovalbumin sensibilisiert.

In diesem Experiment zeigte die *Priming*-Kapazität der Wildtyp- und der CD103^{-/-}-Mäuse gegenüber CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen erneut keine Unterschiede. Signifikante Unterschiede bestanden hingegen bei der Aktivierung durch stimulierte oder unstimulierte BMDC. Im Mittel proliferierten die CD4⁺-Zellen um das 9,3fache bei wt-Mäusen (Bsp. DZ:T-Ratio 1:10) (ohne Stimulation: 9,9% SEM \pm 0,6; mit Stimulation 92,1% SEM \pm 2,0) und um das 8,6fache bei CD103^{-/-}-Mäusen (ohne Stimulation: 9,4% SEM \pm 0,6; mit Stimulation 81,7% SEM \pm 2,0). Sehr ähnlich verhielt sich die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 7).

Dieses Experiment belegte erneut, dass CD103 auf DZ nicht notwendig für die Aktivierung der T-Zellen war und ein gleiches *Priming*, unabhängig der Mauslinien, stattfand.

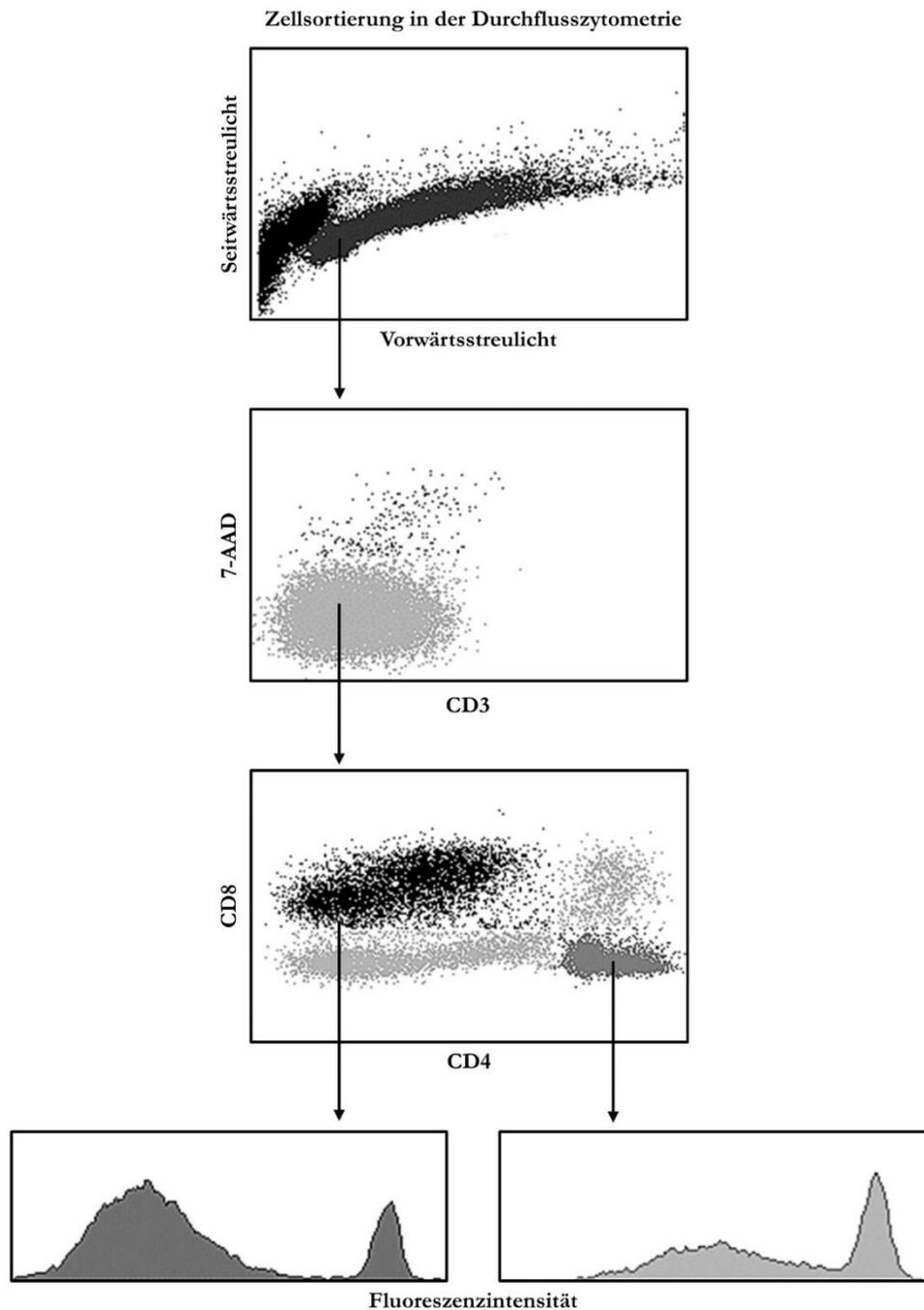


Abbildung 5: Zellsortierung für funktionelle Versuche.

Repräsentative Darstellung der *Plots* zur Auswertung der Zellen in der Durchflusszytometrie. 1. Auftragung des Seitwärts- gegen das Vorwärtsstreulicht zur Markierung der Lymphozyten (dunkelgraue Punkte). 2. Auftragung von 7-AAD, welches durchflusszytometrisch der Detektion von totem Zellmaterial dient, gegen CD3 zur Markierung lebender Zellen (hellgraue Punkte). 3. Auftragung von CD8 gegen CD4 zur Markierung einfach positiver T-Zell-Populationen. 4. Histogramme von CD8⁺ (dunkelgrau) und CD4⁺ Zellen (hellgrau) anhand der Fluoreszenzintensität von CFSE zur Darstellung proliferierter T-Zellen.

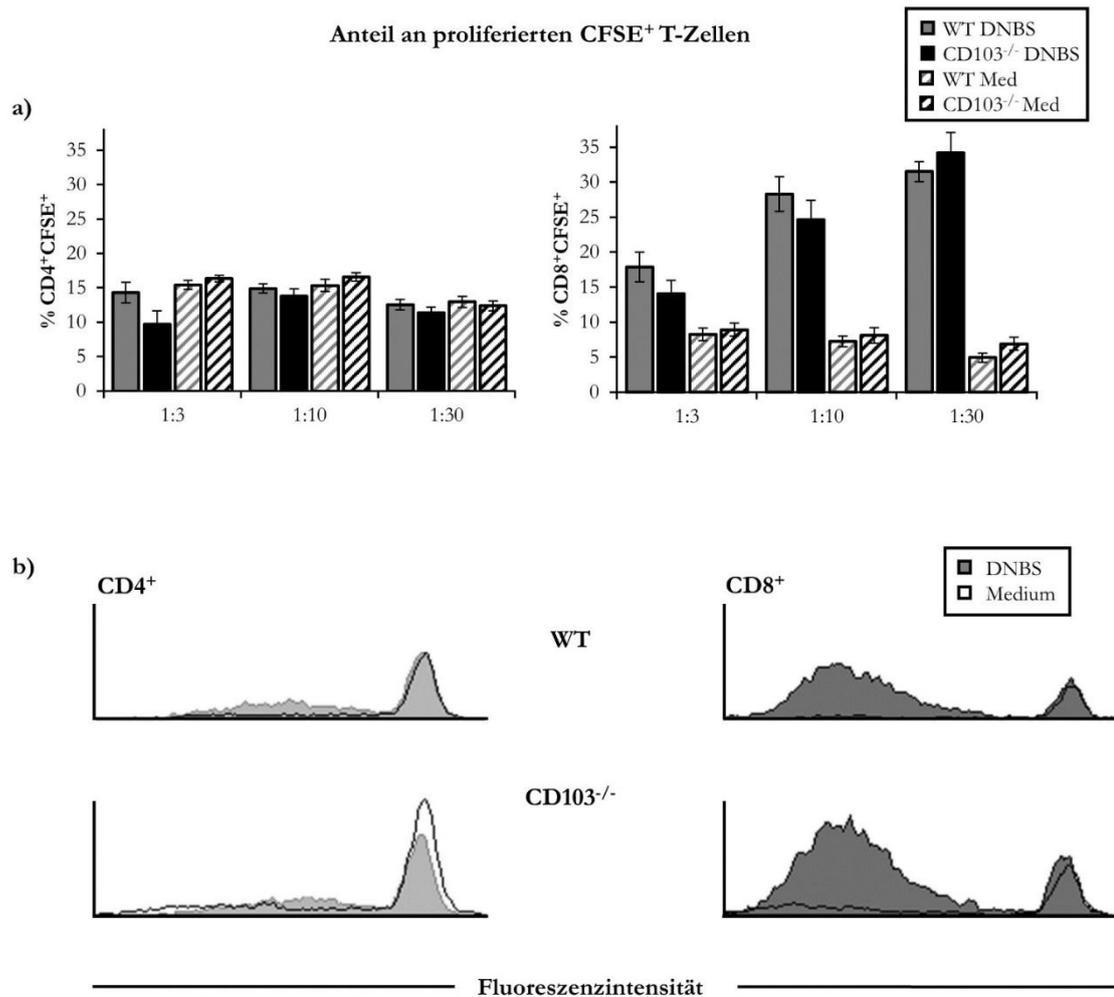


Abbildung 6: Gleiche *Priming*-Kapazität von wt- und CD103^{-/-} BMDC bei Stimulation mit DNBS

a) Um Antigen-spezifische T-Zellen zu generieren, wurden Wt-Mäuse am unteren Rücken mit DNFB sensibilisiert und die Zellen aus den inguinalen Lymphknoten an Tag 5 isoliert. Anschließend erfolgte die Beladung mit CFSE. Diese Zellen wurden mit DNBS-stimulierten BMDC von wt- (graue Balken) oder CD103^{-/-}-Mäusen (schwarze Balken) in den Verhältnissen (DZ:T) 1:3, 1:10 und 1:30 für 72 h kultiviert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil und die mittlere Fluoreszenzintensität der proliferierten CD4⁺ CFSE⁺ und CD8⁺ CFSE⁺ Zellen innerhalb der Lymphozyten-Populationen (% dividing cells) bestimmt (n = 3; Mittelwert + Standardfehler). Als Kontrolle dienten unstimulierte BMDC (gestreift) von wt- und CD103^{-/-}-Mäusen. b) Repräsentative Histogramme der Fluoreszenzintensität für CFSE sind in der Ratio DZ:T 1:30 dargestellt

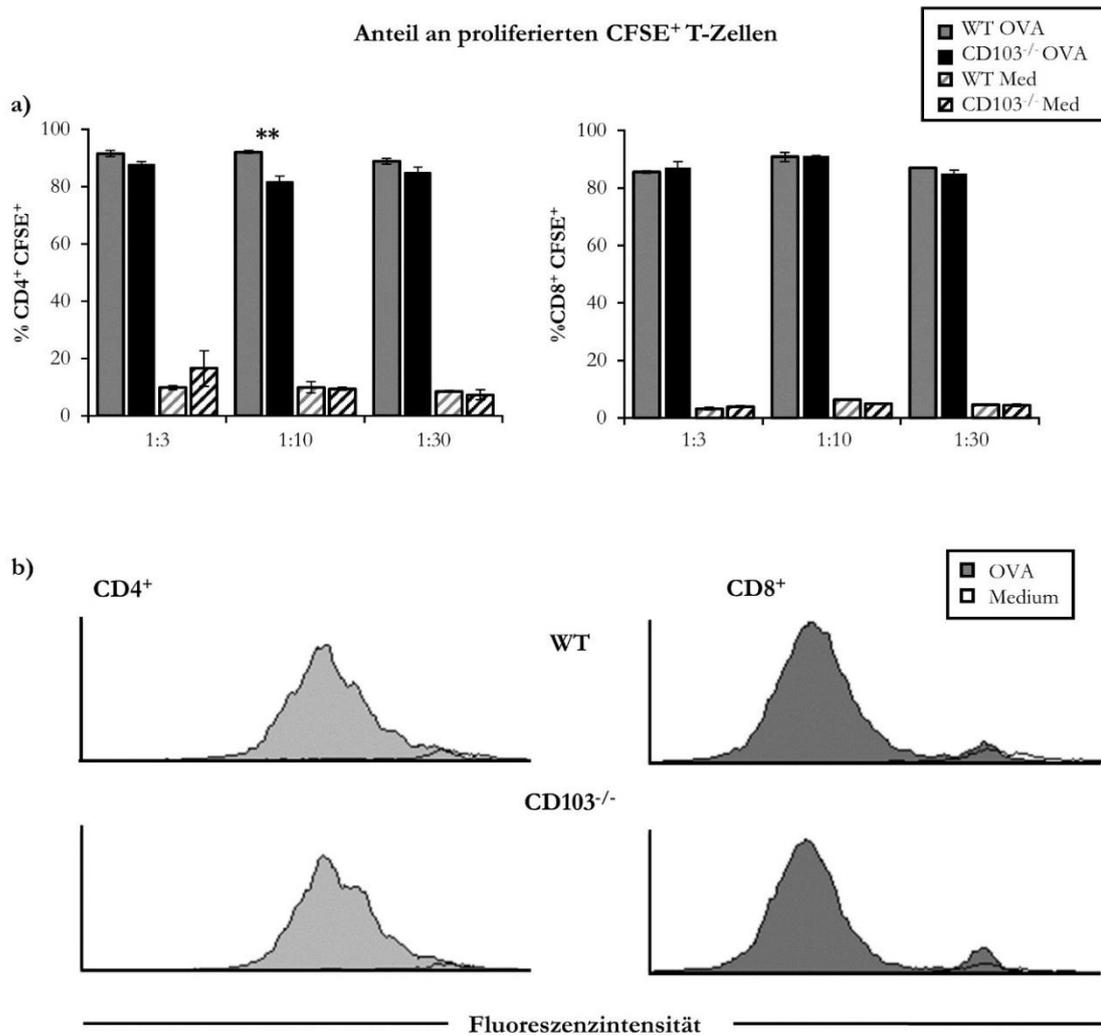


Abbildung 7: Gleiche *Priming*-Kapazität von wt- und CD103^{-/-} BMDC bei Stimulation mit OVA. BMDC beider Mauslinien wurden generiert. An Tag 8 wurden die Zellen mit Ovalbumin *in vitro* stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten in Medium inkubierte DC. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für Co-Kulturen verwendet. CFSE-beladene Zellen aus der Milz sowie aus den axialen, brachialen und inguinalen Lymphknoten von OT-I und OT-II-Mäusen wurden mit OVA-stimulierten BMDC von wt- (graue Balken) oder CD103^{-/-}-Mäusen (schwarze Balken) in den Verhältnissen (DZ:T) 1:3, 1:10 und 1:30 für 72 h kultiviert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der a) prozentuale Anteil und b) die mittlere Fluoreszenzintensität von proliferierten CD4⁺ CFSE⁺ bzw. CD8⁺ CFSE⁺ Zellen innerhalb der Lymphozyten-Populationen (% *dividing cells*) bestimmt (n = 1; Mittelwert ± Standardfehler). Als Kontrolle dienten unstimulierte BMDC (gestreift) von wt- und CD103^{-/-} Mäusen.

3.1.4.1 BMDC beider Mauslinien weisen gleichen Phänotyp auf

Die Phänotypen der reifen BMDC aus wt- und CD103^{-/-}-Mäusen waren gleich. Hierfür wurden auf CD11c⁺ Zellen durchflusszytometrisch MHC-II (zur Markierung der DZ), CD86 und CD40 (Co-Stimulatoren für die T-Zell-Aktivierung) verglichen (n = 3). Bei beiden Linien waren die BMDC gereift und konnten für die Proliferations-Experimente verwendet werden. Die DNBS-Stimulation hatte keine Auswirkung auf die Reifung der DZ (Abb. 8).

Wie die aus der Haut in die regionalen Lymphknoten eingewanderten dendritischen Zellen exprimierten auch die Wildtyp-BMDC nur zu einem kleinen Teil CD103 (7,9% der CD11c⁺ Zellen (SEM \pm 2,95) bei stimulierten DZ und 8,87% (SEM \pm 2,20) bei Vehikelkontrollen).

Während der Sensibilisierungsphase konnte der CD103-Expression auf dendritischen Zellen keine Rolle in der Entstehung einer allergischen Reaktion zugewiesen werden. Im nächsten Schritt wurde daher die T-Zell-Antwort untersucht.

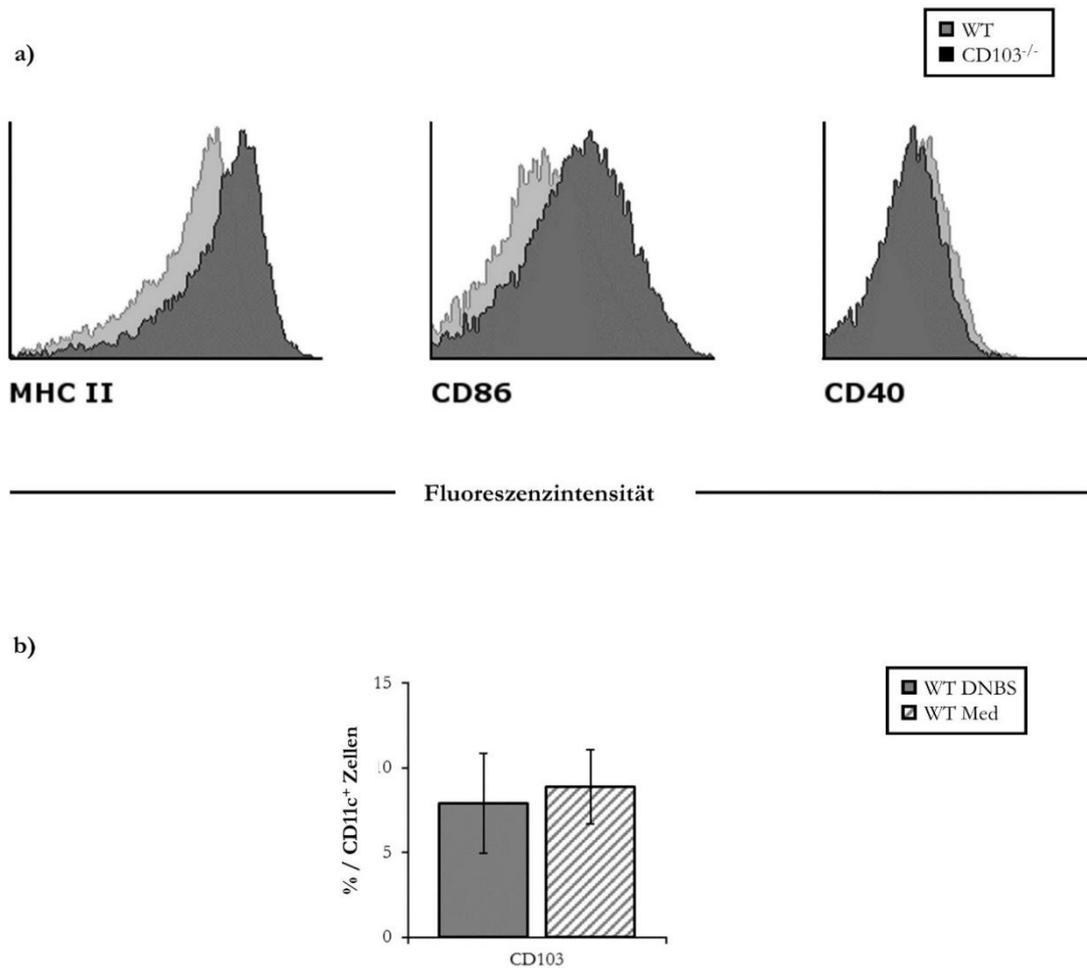


Abbildung 8: Gleicher Phänotyp der BMDC beider Mauslinien.

a) Für funktionelle Versuche wurden BMDC beider Mauslinien generiert. An Tag 8 wurde die Zellen mit 0,5 mM DNBS *in vitro* stimuliert und für 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten in Medium inkubierte DZ. Anschließend wurden die Zellen geerntet und ihr Phänotyp durchflusszytometrisch untersucht, bevor sie für Co-Kulturen verwendet wurden. Hierfür wurden Färbungen mit Antikörpern gegen folgende Antigene vorgenommen: MHC-II, CD40 und CD86. Dargestellt sind die prozentualen Anteile des jeweiligen Reifungsmarkers in CD11c⁺-Zellen pro Maus (n = 3; Mittelwert ± Standardfehler) für Wildtyp- (graue Balken) und CD103^{-/-} BMDC (schwarze Balken), sowohl für die unbehandelten (gestreift) als auch für die stimulierten DZ (unifarben). b) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD103 in CD11c⁺ Zellen pro Maus (n = 3; Mittelwert ± Standardfehler) für stimulierte (grauer Balken) bzw. unstimulierte BMDC (gestreifter Balken) (n = 3).

3.2 Gesteigerte T-Zell-Antwort bei CD103-Defizienz

3.2.1 BMDC-vermittelte Ag-spezifische T-Zell-Antwort ist bei CD8⁺ CD103⁻ Zellen gesteigert

Um die Ag-spezifische T-Zell-Antwort der beiden Mauslinien zu vergleichen, wurde der gleiche experimentelle Versuchsaufbau wie bei den Versuchen zur *Priming*-Kapazität der BMDC genutzt. Im Unterschied dazu wurden hier BMDC nur aus wt-Mäusen und T-Zellen aus wt- und CD103^{-/-}-Mäusen generiert. Die Auswertung erfolgte erneut nach 72 h Co-Kultivierung anhand der CFSE-Intensität der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen (n = 3).

Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen war bei Verwendung von DNBS-stimulierten BMDC und der Vehikel-Kontrolle gleich. Ebenso bestanden keine Unterschiede in der Proliferation zwischen T-Zellen aus Wildtyp- und CD103^{-/-}-Mäusen (Bsp. DZ:T 1:10 : wt-DNBS 13,39% SEM \pm 0,73; wt-Vehikel 16,26% SEM \pm 0,83; CD103^{-/-}-DNBS 11,88% SEM \pm 0,65; CD103^{-/-}-Vehikel 12,12% SEM \pm 0,54) (Abb. 9).

CD103-defiziente CD8⁺ T-Zellen proliferierten dagegen im Vergleich zu den Wildtyp-CD8⁺ T-Zellen stärker. Signifikante Unterschiede zeigten sich beim Verhältnis DZ:T 1:10. Im Mittel proliferierten hier 23,78% (SEM \pm 1,12) der wt-T-Zellen und im Gegensatz dazu 29,62% (SEM \pm 1,43) der CD103⁻ T-Zellen (Abbildung 9).

Ähnlich wie bei den *Priming*-Versuchen war der Unterschied der Proliferation zwischen DNBS-Behandlung und Vehikel-Kontrolle deutlich. (Bsp. DZ:T 1:10 : wt-DNBS 23,78% SEM \pm 1,12; wt-Vehikel 9,48% SEM \pm 1,24; CD103^{-/-}-DNBS 29,62% SEM \pm 1,43; CD103^{-/-}-Vehikel 11,53% SEM \pm 1,73).

In den genannten Experimenten wurden alle Lymphozyten aus den Lymphknoten für die Proliferations-Experimente verwendet und erst durch monoklonale Antikörper gegen CD4⁺ oder CD8⁺ im Durchflusszytometer sortiert. Um sicherzugehen, dass die so durchgeführte Aufreinigung der Ag-spezifischen T-Zellen in ihre Subpopulationen erfolgreich war, wurden in einem Experiment vor der Co-Kultivierung magnetisch die CD4⁺ und CD8⁺-Lymphknoten-Zellen separiert. Auch hier war kein Unterschied in der Proliferation von CD4⁺ Zellen auszumachen. Die CD8⁺ CD103⁻ T-Zellen proliferierten erneut stärker, hier signifikant bei der DC:T-Ratio von 1:30. Im Mittel proliferierten bei den wt-Mäusen 24,38% (SEM \pm 2,38) der CD8⁺ Zellen, bei den CD103^{-/-}-Mäusen hingegen waren es 44,40% (SEM \pm 5,05). Ebenfalls waren deutliche Unterschiede hinsichtlich der Kultivierung mit stimulierten oder nichtstimulierten BMDC zu erkennen (Bsp. DZ:T 1:30 : wt-DNBS 24,38% SEM \pm 2,38; wt-Vehikel 19,01% SEM \pm 0,59; CD103^{-/-} DNBS 44,4% SEM \pm 5,05; CD103^{-/-}-Vehikel 24,79% SEM \pm 1,96).

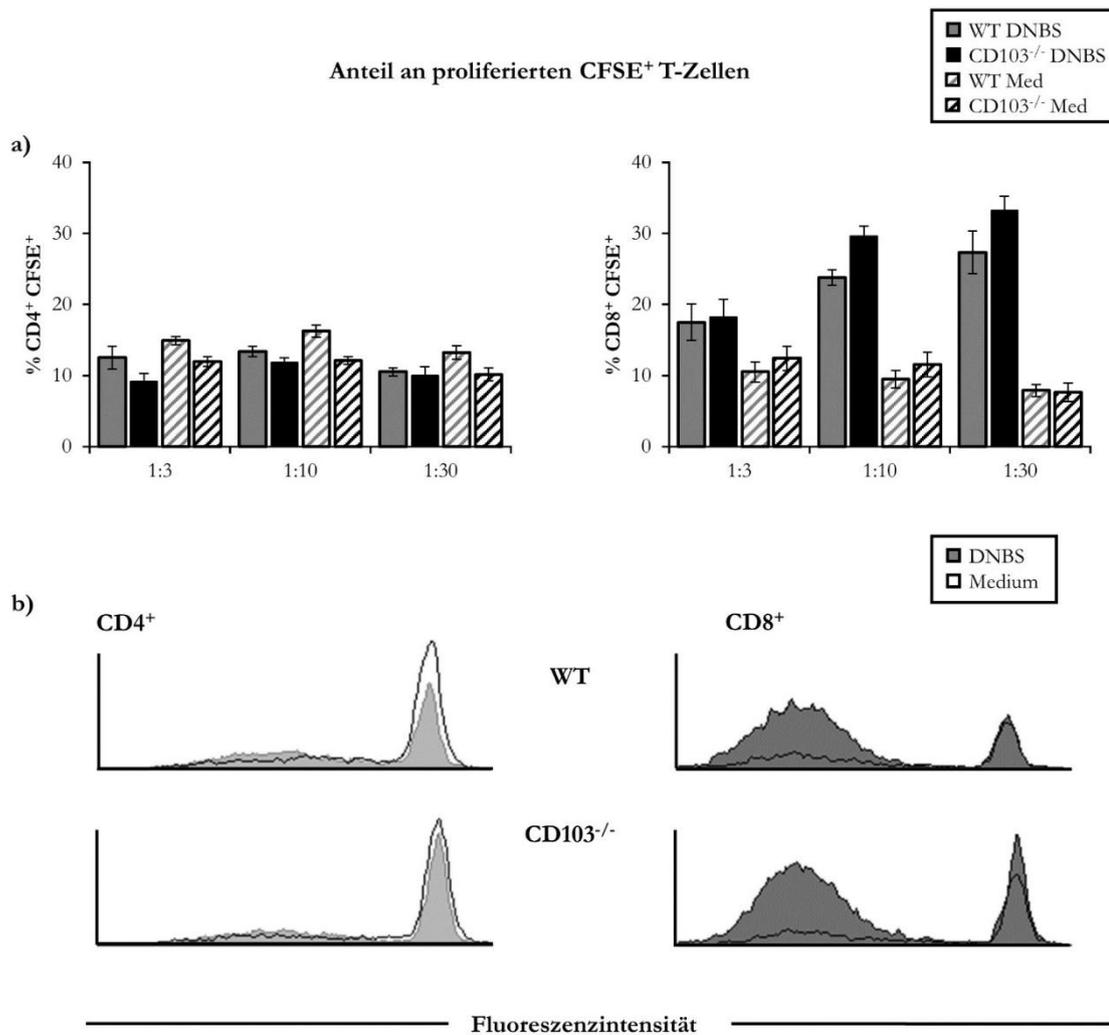


Abbildung 9: Gesteigerte BMDC-vermittelte T-Zell-Antwort bei CD103^{-/-}-Mäusen.

a und b) CFSE-beladene Zellen aus den inguinalen Lymphknoten von DNFB-sensibilisierten wt- (graue Balken) und CD103^{-/-}-Mäusen (schwarze Balken) wurden mit DNBS-stimulierten wt-BMDC in den Verhältnissen (DZ:T) 1:3, 1:10 und 1:30 für 72 h kultiviert. Prozentualer Anteil und MFI proliferierter CD4⁺ CFSE⁺ und CD8⁺ CFSE⁺ Zellen (% *dividing cells*) wurden durchflusszytometrisch bestimmt (n = 3; Mittelwert ± Standardfehler). Als Kontrolle dienten unstimulierte BMDC (gestreift) von wt-Mäusen. Repräsentative Histogramme der Fluoreszenzintensität für CFSE sind in der Ratio 1:30 dargestellt.

3.2.2 Gleiche Ag-spezifische T-Zell-Antwort durch epidermale DZ

Um die T-Zell-Antwort *in vitro* mehr an die Bedingungen *in vivo* anzupassen, wurden in weiteren Versuchen statt BMDC epidermale Dendritische Zellen für die Proliferations-Experimente der T-Zellen verwendet. Dafür wurden Dermis und Epidermis der Ohren naiver Wt-Mäuse durch Dispase getrennt. Die Epidermis wurde für 48 h in Medium inkubiert um DZ ins Medium auswandern zu lassen. Diese wurden durch magnetische Separation nach MHC-II-Expression aufgereinigt und für die Experimente verwendet (n = 3).

Die Ag (DNFB)-spezifischen T-Zellen wurden wie zuvor generiert und magnetisch nach CD8-Expression sortiert. CD4⁺-Zellen wurden aufgrund der vorherigen Ergebnisse nicht weiter betrachtet. Die Co-Kultivierung sowie die Auswertung erfolgten wie zuvor mit dem Unterschied der DZ:T-Ratio von 1:30 und 1:100.

Bei diesen Experimenten zeigten sich keine Unterschiede in der Proliferation der CD8⁺ Zellen zwischen den wt- und CD103^{-/-} Mäusen. Im Mittel proliferierten (DZ:T Ratio 1:30) bei den wt-Mäusen 69,07% (SEM \pm 3,26) der T-Zellen, bei den CD103^{-/-}-Mäusen waren es 67,13% (SEM \pm 3,80) (Abb. 10). In den unstimulierten Kontrollen proliferierten nur 36,06% (SEM \pm 4,97) der wt- und 39,95% (SEM \pm 6,03) der CD103⁻ T-Zellen.

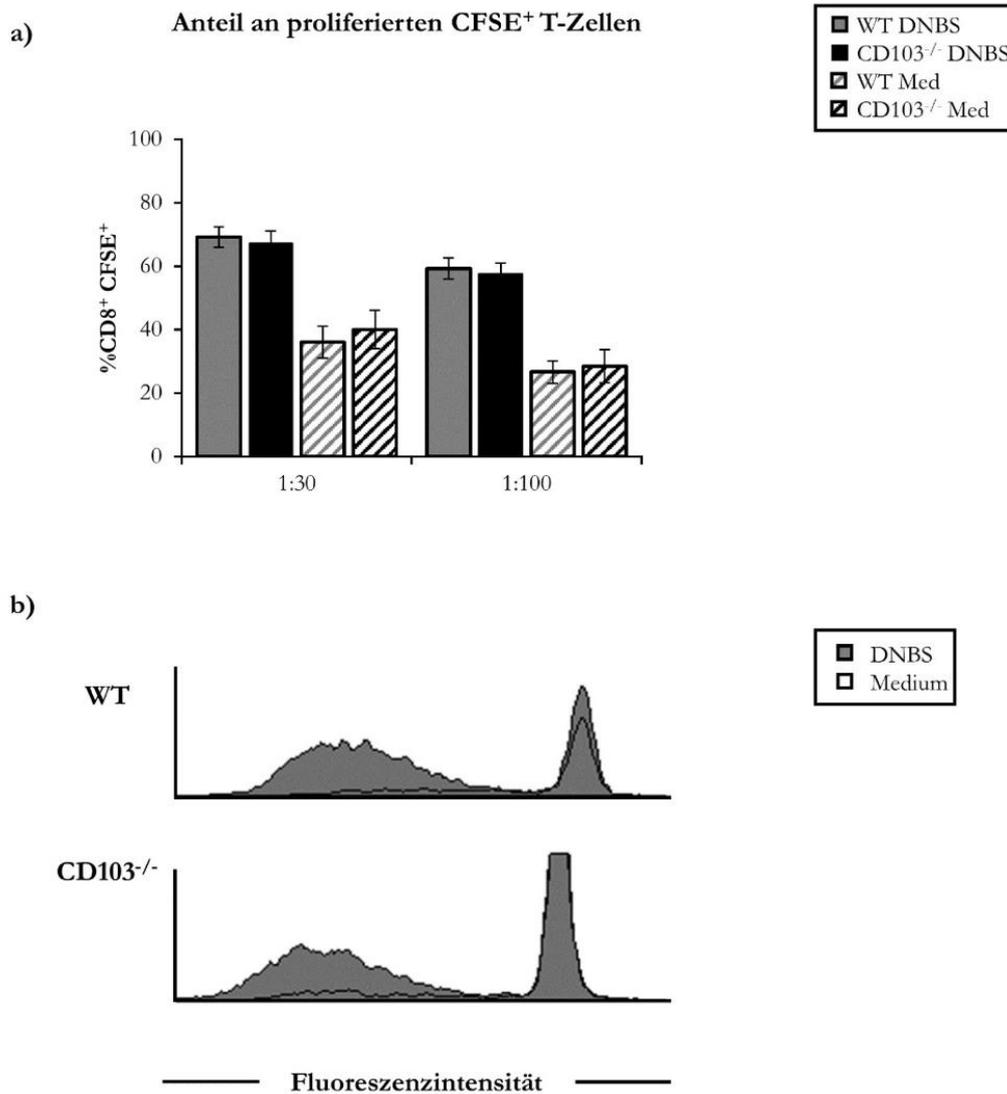


Abbildung 10: Keine gesteigerte T-Zell-Antwort bei CD103^{-/-}-Mäusen durch Stimulation mit epidermalen DZ.

Für funktionelle Versuche wurden epidermale DZ von Wt-Mäusen generiert. *In vitro* wurden die Zellen mit 0,5 mM DNBS stimuliert und für 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten in Medium inkubierte DZ. Anschließend wurden die Zellen für Co-Kulturen verwendet. CFSE-beladene Zellen aus den inguinalen Lymphknoten von DNFB-sensibilisierten wt- (graue Balken) und CD103^{-/-}-Mäusen (schwarze Balken) wurden mit DNBS-stimulierten epidermalen DZ von wt-Mäusen in den Verhältnissen (DZ:T) 1:30 und 1:100 für 72 h kultiviert. Zuvor wurden CD8⁺ Zellen durch MACS aufgereinigt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil und die MFI proliferierter CD8⁺ CFSE⁺ Zellen (% dividing cells) bestimmt (n = 3; Mittelwert ± Standardfehler). Als Kontrolle dienten unstimulierte epidermale DZ (gestreift) von wt-Mäusen. Repräsentative Histogramme der MFI für CFSE sind in der Ratio DZ:T 1:30 dargestellt.

3.2.2.1 Epidermale dendritische Zellen tragen kein CD103

Aufgrund der Ergebnisse der Proliferations-Experimente wurde der Phänotyp der epidermalen Zellen untersucht. Hierfür wurden die MHC-II⁺-Zellen aus der magnetischen Sortierung in der Durchflusszytometrie untersucht. Als Marker für dendritische Zellen diente MHC-II. Hinzu kam ein monoklonaler Antikörper gegen CD103. In der Auswertung zeigte sich, dass der Anteil CD103 positiver epidermaler DZ bei unter 1% lag. Im Mittel waren nur 0,3% (SEM \pm 0,11) der Zellen CD103⁺ (Abb. 11). Diese Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, warum es keinen Unterschied in der T-Zell-Antwort bei Aktivierung durch epidermale DZ gab.

CD103⁻ CD8⁺ T-Zellen zeigten eine stärkere Antwort als T-Zellen von Wildtyp-Mäusen. Dies war der Fall, wenn die Stimulation durch BMDC erfolgte. Wurden die Zellen jedoch mit epidermalen DZ co-kultiviert, so ergaben sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede, da sich auf den epidermalen Zellen der wt-Mäuse kein CD103 befand.

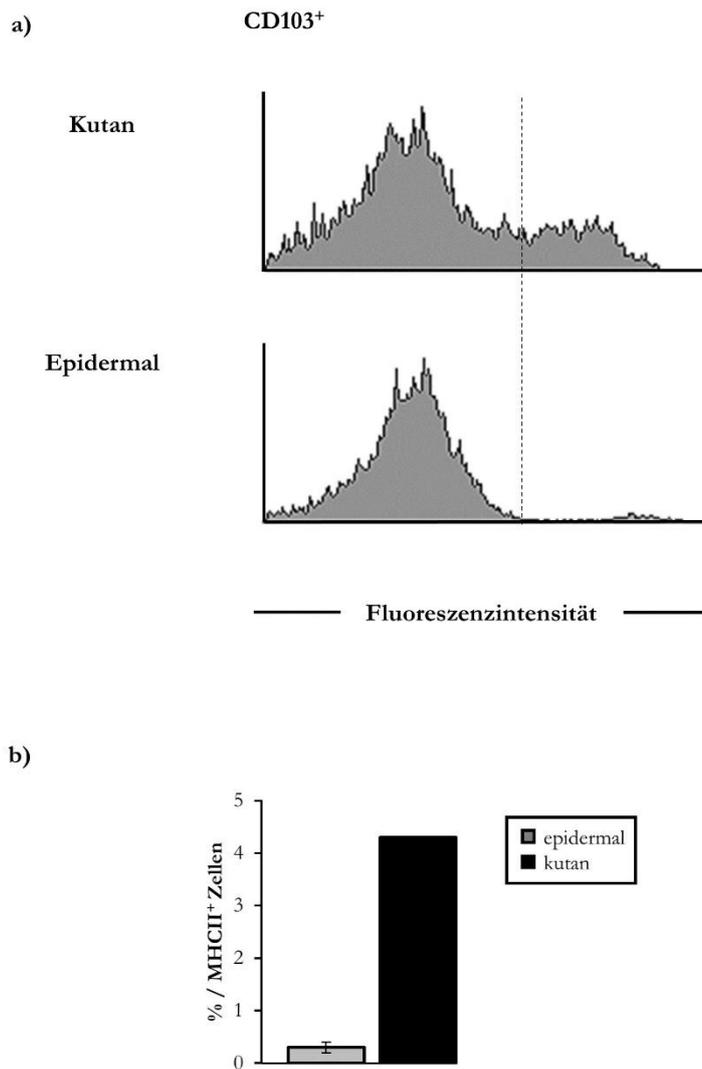


Abbildung 11: Epidermale DZ tragen kein CD103.

Für funktionelle Versuche wurden epidermale DZ von Wildtypmäusen generiert. *In vitro* wurden die Zellen mit 0,5 mM DNBS stimuliert und für 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten in Medium inkubierte DZ. Vor der Stimulation wurden die bis dato geernteten Zellen durchflusszytometrisch auf ihre CD103-Expression untersucht. Dargestellt ist der Anteil von CD103 in epidermalen MHC-II⁺ Zellen (n = 6; Mittelwert \pm Standardfehler) sowie in kutanen Hautexplantaten (n = 1).

4 Diskussion

Dem Integrin α_E (CD103) wird eine Rolle in der Entstehung von Immunantworten zugeschrieben. Die genaue Funktion dieses Adhäsionsmoleküls ist dennoch nicht vollständig entschlüsselt. Es wird auf vielen Zellen exprimiert, unter anderem auf dendritischen Zellen und $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (Kilshaw und Higgins 2002). Neben der Aufgabe des Rekrutierens von T-Zellen ist es ebenso beteiligt an intraepithelialer Morphogenese und Motilität mancher Lymphozyten (Pauls et al. 2001; Schlickum et al. 2008). Diese Zellen könnten an der Pathogenese der allergischen Kontaktallergie beteiligt sein. Bei dem hier untersuchten murinen Modell der Kontakthypersensibilisierung (CHS) handelt es sich um eine pathologische, von dendritischen Zellen abhängige adaptive T-Zell-Antwort. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle des Integrins CD103 in diesem Modell, wobei der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Sensibilisierungsphase und den dabei involvierten Zellen lag. Das Ziel war es, herauszufinden, welche Zellen generell an der Kontakthypersensibilisierung beteiligt sind und welche davon CD103 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

In diesem Zusammenhang wurde herausgefunden, dass CD103 auf dendritischen Zellen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielt. Eher erscheint die T-Zell-Funktion durch die CD103-Expression beeinflusst zu sein. Hier wurde gezeigt, dass es vor allem $CD103^- CD8^+$ Zellen sind, welche zu einer gesteigerten Immunantwort beitragen.

4.1 $CD103^-$ dendritische Zellen können Kontakthypersensibilisierung auslösen

Mehrere Typen dendritischer Zellen wurden beschrieben, je nach ihrer Lokalisation im Gewebe und ihrem immunologischen *Armamentarium* nehmen sie unterschiedliche Funktion in der CHS wahr.

Epidermale DZ sind Langerhans-Zellen (LZ). Sie exprimieren Langerin, EpCAM, MHC-II und CD11b (Bursch et al. 2007; Ginhoux et al. 2007; Poulin et al. 2007; Noordegraaf et al. 2010). Im Gegensatz zu Langerin⁺ dermalen DZ (dDZ), welche zum Teil CD103 exprimieren, findet sich dieser Oberflächenmarker bei den Langerhans-Zellen der Epidermis nicht (Kilshaw 1993; Pribila et al. 2004). Auch in dieser Arbeit wurde durchflusszytometrisch bestätigt, dass epidermale DZ kein CD103 tragen.

In der Dermis sind mehrere DZ-Typen zu finden, insgesamt wurden fünf beschrieben (Henri et al. 2010), wobei nur eine kleine Gruppe überhaupt CD103 exprimiert. Ein Typ sind die LZ *in transit*. Früher wurde angenommen, dass die Langerin⁺ Zellen in der Dermis ursprünglich

aus der Epidermis eingewanderte LZ sind. Aber nur eine Minderheit von etwa 10% stammt tatsächlich aus der Epidermis, der Hauptanteil der hier anwesenden Langerin⁺ dDZ ist ortsständig. Früher wurde deswegen Langerin als Unterscheidungsmarker von epidermalen und dermalen DZ genutzt, dies ist aber nach heutigem Kenntnisstand nicht zielführend (Henri et al. 2010).

Die übrigen vier Typen lassen sich zunächst anhand der Expression des Integrins CD11b unterscheiden, das von den meisten (circa 65%) der dDZ exprimiert wird. CD11b⁺ dDZ tragen kein Langerin und kein CD103. Die kleine Gruppe der CD11b⁻ Zellen wird weiter unterteilt in Langerin⁺ und Langerin⁻ dDZ, etwa im Verhältnis 1:3. Die Untergruppe der Langerin⁺ dDZ teilt sich noch auf in CD103⁻ und CD103⁺ Zellen, ungefähr im Verhältnis 1:1 (Henri et al. 2010). Letzterer Subtyp repräsentiert also nur circa 3% der gesamten dermalen DZ. In den *In-vitro*-Experimenten dieser Arbeit wurde diese Verteilung bestätigt. Aus den kompletten Hautexplantaten (Epidermis + Dermis) ausgewanderte MHC-II⁺-Zellen wiesen zu etwa 5% CD103 auf ihrer Oberfläche auf. Dabei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um migrierende dermale CD103⁺ DZ.

Es wurde beschrieben, dass sich von allen epidermalen und dermalen DZ während der Ruhephase die äquivalenten Populationen im Lymphknoten finden lassen (Henri et al. 2010). Sowohl im Ausgangszustand als auch während der Inflammation lassen sich migrierte epidermale LZ und dermale DZ im Lymphknoten nachweisen. Die Langerin⁺ DZ im Lymphknoten im Ruhemodus können unterteilt werden in Lymphknoten-ständige DZ und aus der Haut ausgewanderte DZ. Letztere wiederum lassen sich genau wie in der Kutis in die epidermalen LZ und die Langerin⁺ dDZ einteilen (Poulin et al. 2007; Henri et al. 2010). Dies macht deutlich, dass unter normalen Bedingungen alle kutanen dendritische Zellen die gleiche Fähigkeit zur Migration aufweisen, egal ob epidermaler oder dermaler Herkunft und dementsprechend sowohl CD103⁻ als auch CD103⁺ Zellen.

Auf ihrem Weg in den Lymphknoten entwickeln sich die dendritischen Zellen zu reifen Zellen. Damit einhergehend steigt die Expression von CD40, CD80, CD86 und MHC-II. Dies ist sowohl bei epidermalen LZ als auch bei dermalen DZ der Fall (Bursch et al. 2007).

In Analogie dazu wurde hier gezeigt, dass kutane DZ der wt-Mäuse sowie der CD103^{-/-}-Mäuse nach Auswanderung in die drainierenden Lymphknoten eine vergleichbar gesteigerte Expression der Reifungsmarker CD86, CD40, CCR7, CD62L und CD83 aufwiesen. Die dendritischen Zellen beider Mauslinien waren somit gleichwertig gereift und damit vermutlich gleichermaßen zur Antigenpräsentation an die im Lymphknoten ansässigen T-Zellen befähigt.

Bereits früher wurde gezeigt, dass frühestens 24 Stunden nach Sensibilisierung TRITC-aufnehmende Zellen in den drainierenden Lymphknoten nachweisbar waren (Bursch et al. 2007). Interessant dabei ist, dass zwei Maxima in der Migration auftraten, das erste nach 48 bis 72 Stunden, das zweite nach 96 Stunden. Bei den zum früheren Zeitpunkt eingewanderten Zellen handelte es sich phänotypisch um dermale DZ (Langerin⁺ und Langerin), die epidermalen LZ wanderten erst zum späteren Zeitpunkt ein.

In den in dieser Arbeit untersuchten drainierenden Lymphknoten fanden sich, passend zur Literatur, prozentual die meisten mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC beladenen dendritischen Zellen im Lymphknoten nach 24 Stunden (MHC-II⁺ CD11c⁺ FITC⁺ Zellen), in gleichem Maße bei wt- und CD103^{-/-}-Mäusen. Ebenso fand sich bei beiden Mauslinien ein kontinuierlicher Anstieg der absoluten Zellzahl im Lymphknoten von 24 bis 72 Stunden nach Sensibilisierung.

Wie bereits erwähnt, lassen sich in den drainierenden Lymphknoten alle Subpopulationen kutaner dendritischer Zellen finden, also sowohl CD103⁺ als auch CD103⁻ Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dies ebenfalls. Es wurde deutlich, dass auf die gesamte Population von DZ im drainierenden Lymphknoten gesehen nur eine Minderheit CD103⁺ war. So exprimierten hier nur knapp 20% der FITC⁺ DZ der wt-Mäuse CD103.

Allgemein sind DZ für die Antigenaufnahme in der Haut und deren anschließende Präsentation an T-Zellen im drainierenden Lymphknoten zuständig. Früher wurden Langerhans-Zellen für die einzigen antigenpräsentierenden Zellen der Haut gehalten. Es gibt aber Hinweise darauf, dass auch dDZ hierbei eine wichtige Rolle spielen. In der Literatur zeigen sich bezüglich der Notwendigkeit von Langerhans-Zellen und dDZ zur Initiierung einer Kontakthypersensibilisierung kontroverse Ergebnisse, wie im Folgenden beschrieben:

Zum einen wurde beschrieben, dass, sobald epidermale und dermale DZ fehlen, erwartungsgemäß keine Kontakthypersensibilisierung ausgelöst werden kann (Bursch et al. 2007). Andere Arbeiten zeigten, dass, sobald alle Langerin⁺ DZ, also LZ und Langerin⁺ dDZ fehlten, keine CHS mehr möglich war (Wang et al. 2008; Honda et al. 2010). Es stellt sich nun die Frage, ob alle Langerin⁺ DZ der Haut dieselben Aufgaben haben.

Die Gruppe um Edelson hat bereits herausgefunden, dass allein die LZ ausreichend sind, um eine Immunantwort auszulösen. Dermale CD103⁺ DZ schienen nicht notwendig zu sein. (Edelson et al. 2010). Ebenso wurde bereits untersucht, dass es ohne LZ zu einer geminderten Kontakthypersensibilisierung kommt, da die LZ notwendig erscheinen für eine optimale Sensibilisierungsphase (Bennett et al. 2005). Von anderen Autoren wurde beschrieben, dass sowohl LZ als auch dDZ eine CHS auslösen können (Tse und Cooper 1990) und dass dDZ

prinzipiell ausreichend sind (Kissenpfennig et al. 2005). In der Arbeit von Noordegraaf hingegen wird beschrieben, dass die CHS-Antwort abhängig ist von der Anzahl der dDZ mit Kontakt zum Hapten. So wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von LZ die Immunantwort gemindert war, solange die Sensibilisierung mit einem Hapten in geringer Dosis durchgeführt wurde. Sobald die Hapten-Konzentration erhöht wurde, fiel die Immunantwort nicht mehr gemindert aus (Noordegraaf et al. 2010). Das legt die Vermutung nahe, dass bei ausreichender Dosierung des Haptens dieses auch bis in die Dermis vordringt, es von dermalen DZ dort aufgenommen und anschließend ebenso wie durch die epidermalen LZ eine adäquate Immunantwort ausgelöst werden kann.

Trotz der Fähigkeit von dDZ, eine Immunantwort auszulösen, scheint diese im Gegensatz zu der von Langerhans-Zellen ausgelösten Antwort schwächer zu sein (Bennett et al. 2005). Die Vermutung liegt nahe, dass dermale DZ nicht die primär verantwortlichen Zellen für die CHS sind und bei Abwesenheit von LZ nur eine kompensatorische Rolle übernehmen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die kutanen DZ der wt- als auch die der CD103^{-/-}-Mäuse in der Lage waren, eine adäquate Immunantwort auszulösen. Es fanden sich keine Unterschiede in der Migration und Reifung der Zellen, ebenso wenig im *In-vitro-Priming* von T-Zellen. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Langerhans-Zellen die primär verantwortlichen Zellen sind zur Auslösung einer adäquaten Immunantwort. Insbesondere wurde hier herausgefunden, dass bei den CD103^{-/-}-Mäusen die Gruppe der Langerin⁺ CD103⁺ dDZ fehlte und trotzdem eine Sensibilisierung stattfinden konnte.

Welche Rolle kann dann CD103 zugeschrieben werden? CD103⁺ Zellen finden sich nur in der Subpopulation von Langerin⁺ dDZ. Die wichtigste Aufgabe dieser Zellen scheint die Kreuzpräsentation von Antigenen zu sein (Bedoui et al. 2009; Edelson et al. 2010; Henri et al. 2010). Dabei werden exogen aufgenommene Antigene über MHC-I-Moleküle CD8⁺ T-Zellen präsentiert, welche daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen aktiviert werden. Dies spielt vor allem eine Rolle bei Virusinfektionen, aber auch bei der Abwehr neoplastischer Zellen.

Es wurde bereits zuvor gezeigt, dass nur CD103⁺ Langerin⁺ dDZ das Herpes Simplex Virus Typ 1 an naive CD8⁺ T-Zellen präsentieren konnte. Alle anderen DZ, also LZ und CD103⁻ dDZ, konnten Antigene nur CD4⁺ T-Zellen über MHC-II-Moleküle präsentieren (Bedoui et al. 2009). Auch in der Lunge war die CD8⁺ T-Zell-Antwort auf eine Virusinfektion in Abwesenheit von CD103⁺ DZ insuffizient (Edelson et al. 2010). Bei der Kreuzpräsentation von Antigenen scheint also den CD103⁺ DZ eine besondere Rolle zuzukommen. Vor allem die CD103⁺ dDZ können die von Keratinozyten stammenden Antigene kreuzpräsentieren, unabhängig der Anwesenheit von LZ (Henri et al. 2010).

Insgesamt konnte bisher immer noch nicht vollständig geklärt werden, welche Beiträge Langerhans-Zellen und dDZ im Detail zur Kontakthypersensibilisierung leisten. In den Experimenten konnten die DZ der CD103^{-/-}-Mäuse sowie die der wt-Mäuse eine vergleichbare suffiziente Antigenpräsentation vornehmen. Den CD103^{-/-}-Mäusen fehlte konkret eine Subpopulation der DZ (Langerin⁺ CD103⁺ dDZ) und trotzdem konnte die gleiche CHS-Antwort ausgelöst werden. Die eigenen Ergebnisse legen somit eher nahe, dass dDZ nicht obligat sind in der Antigenpräsentation und im *Priming* der T-Zellen.

Weiterhin ist die Funktion von CD103 auf den DZ noch nicht endgültig geklärt. Am wahrscheinlichsten ist, dass nicht die CD103⁺ DZ ausschlaggebend für die Kontakthypersensibilisierung sind, sondern insgesamt die Langerin⁺ DZ, sowohl epidermaler als auch dermaler Herkunft. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Fehlen von CD103 keine veränderte Funktion der DZ nach sich zieht.

4.2 CD8⁺ CD103⁻ T-Lymphozyten proliferieren stärker

In der Kontakthypersensibilisierung sind verschiedene Subtypen von T-Zellen involviert. Zum einen finden sich hier die Effektorzellen, zum anderen die regulatorischen T-Zellen. Erstere sind vor allem CD8⁺ T-Zellen. Aber auch CD4⁺ T-Zellen können als Effektorzellen fungieren. Dennoch sind die CD4⁺ Lymphozyten in ihrer Mehrheit regulatorische T-Zellen. Vor allem die CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen kontrollieren im Lymphknoten die Expansion der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Fehlen die CD4⁺ Zellen, so zeigt sich eine verlängerte und verstärkte Immunreaktion (Saint-Mezard et al. 2004).

Keratinocyten sind das Hauptziel zytotoxischer CD8⁺ Effektorzellen, sodass letztlich die Epidermis geschädigt wird. Damit wird das weitere Eindringen von Haptenen in die Haut erleichtert. Ohne CD8⁺ Zellen ist die CHS nicht möglich. Im Gegensatz dazu sind für die initiale Phase einer CHS die CD4⁺ Zellen abkömmlich, jedoch an der Regulierung der Immunantwort beteiligt (Saint-Mezard et al. 2004).

4.2.1 Gesteigerte Proliferation versus wegfallende Hemmung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen der CD103^{-/-}-Mäuse stärker *in vitro* proliferierten als die des Wildtyps. Zwei Mechanismen sind hierfür denkbar: (i) Die Funktion der CD8⁺ Effektorzellen an sich ist verändert/gesteigert, oder aber (ii) deren Regulation ist vermindert.

Sowohl auf CD8⁺ als auch auf CD4⁺ Lymphozyten wird CD103 exprimiert. Auf CD8⁺ T-Zellen wird CD103 eher auf einer Subpopulation von Gedächtniszellen und auf naiven Zellen

exprimiert. Auf CD8⁺ Effektorzellen, wie sie bei der CHS zu finden sind, wird eher kein CD103 exprimiert. Es finden sich dennoch einige wenige CD8⁺ CD103⁺ Effektorzellen. Diese haben im Gegensatz zu CD8⁺ CD103⁻ Zellen eine eher niedrige proliferative und zytotoxische Kapazität (Ericsson et al. 2004; Uss et al. 2006; Gebhardt und Mackay 2012).

Aufgrund dessen scheint es unwahrscheinlich, dass die Proliferation von CD8⁺ CD103⁻ Effektorzellen *per se* gesteigert ist. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass es die fehlende Hemmung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen ist, die zur unkontrollierten Proliferation dieser T-Zellen führt. Vor allem wird hierbei der Population der CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) eine äußerst wichtige CD103⁺ Untergruppe zugeordnet.

Es wurde beschrieben, dass CD103⁺ DZ wichtig für die Generierung regulatorischer T-Zellen ist. Sowohl in der Lamina propria als auch in den mesenterialen Lymphknoten induzieren sie die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 auf CD4⁺ T-Zellen. FoxP3 ist der beste bisher bekannte T_{reg}-Marker und ist zuständig für die Regulierung von Reifung und Funktion der T-Zellen (Fontenot et al. 2005). Seine Expression ist eng verknüpft mit der Funktionalität der T_{reg} (Rudensky 2011). CD103⁻ DZ im Intestinum können hingegen keine FoxP3-Expression induzieren (Gavin et al. 2002; Annacker et al. 2005; Coombes et al. 2007; Sun et al. 2007). Regulatorische T-Zellen sind meist CD4⁺ CD25⁺ und supprimieren die Immunantwort. Am potentesten sind diese Zellen, wenn sie CD103 exprimieren. Dann zeichnen sie sich durch besonders hohe suppressive Kapazität aus. Vor allem die Th1-vermittelte Spättypreaktion wird supprimiert (Siegmund et al. 2005). Ohne CD103 ist die suffiziente Suppression der T-Zell-Proliferation nicht möglich (Lehmann et al. 2002; Banz et al. 2003; Siegmund et al. 2005). Die Gruppe um Lehmann zeigte zudem, dass durch CD103⁺CD25⁺ Zellen *in vitro* fast die komplette T-Zell-Proliferation inhibiert werden konnte. CD103⁻CD25⁻ Zellen hingegen zeigten keine suppressive Aktivität. Allerdings konnten CD103⁻ CD25⁺ T_{reg} die Proliferation naiver T-Zellen behindern (Lehmann et al. 2002).

Es liegt so die Annahme nahe, dass die in den hier gezeigten Experimenten die T_{reg} der CD103^{-/-}-Mäuse keine regulatorischen Fähigkeiten mehr besitzen. Es konnte bei CD103-defizienten Mäusen bereits gezeigt werden, dass die FoxP3-Expression auf CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen vermindert und daraufhin die Regulation der CHS nicht mehr gewährleistet war. (Braun et al. 2015). Dazu passen die hier gezeigten Ergebnisse. Die CD8⁺ CD103⁻ T-Zellen proliferierten *in vitro* stärker als die CD8⁺ CD103⁺ T-Zellen der wt-Mäuse. Durch das Fehlen von CD103⁺ T_{reg} kam es zu einer insuffizienten Termination der Immunantwort.

Bisher noch ungeklärt ist die Frage geblieben, warum die CD8⁺ CD103⁻ T-Zellen nur stärker proliferieren, wenn sie mit BMDC co-kultiviert wurden. Im *In-vitro*-Ansatz mit epidermalen

DZ zeigte sich zwischen den T-Zellen der wt- und der CD103^{-/-}-Mäuse kein Unterschied. Die Gruppe um Edelson beschrieb, dass das Fehlen von Langerin⁺ CD103⁺ dendritischen Zellen zu einem gesteigerten *Priming* der T-Zellen und zu einer gesteigerten Th1-Antwort führt (Edelson et al. 2011). Diese Population fehlt nur bei den BMDC der CD103-defizienten Mäuse, jedoch nicht bei den epidermalen DZ. Eventuell könnte dies eine Erklärung sein.

Insgesamt zeigten die Experimente dieser Arbeit, dass die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen gesteigert ist, wenn CD103 fehlt. Am naheliegendsten erscheint die wegfallende Regulation der Inflammation durch das Fehlen von CD103 auf den T_{reg}, letztlich kann aber eine *per se* gesteigerte Proliferationskapazität nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Welche Limitierungen gab es?

Sowohl die dendritischen Zellen als auch die T-Zellen, die für die jeweiligen Experimente generiert wurden, stammten in jedem Versuch von unterschiedlichen Tieren. Interindividuelle Unterschiede können trotz gleicher Aufzucht und Behandlung der Mäuse nicht ausgeschlossen werden. Andererseits wurden die Versuche aus Gründen der Standardisierung und der Begrenzung imponderabler Einflussfaktoren mit einem syngenem Inzucht-Mausstamm durchgeführt. Die natürliche genetische Vielfalt, die auch Immunreaktionen beeinflussen kann, wurde dadurch eingeschränkt.

Parallelen des hier verwendeten murinen Modells der Kontakthypersensibilisierung zum menschlichen Immunsystem sind noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Insofern müsste die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen noch überprüft werden.

Die Proliferations-Experimente der T-Zellen wurden als *In-vitro*-Versuche durchgeführt. Insgesamt ist dabei immer von vielen äußeren Einflussfaktoren auszugehen, wie das Zusammenführen von Zellen mehrerer Tiere zur Gewährleistung einer ausreichenden Zellzahl oder aber auch die Kontamination der Kulturen mit Restpopulationen anderer Zellen. Zudem diente hier die Proliferation als Maß der Aktivität der T-Zellen. Es ist zu überdenken, ob nicht die Ausprägung des Kontaktekzems ein besserer Aktivitätsmarker der Zellen wäre. Hierfür könnte zum Beispiel als *In-vivo*-Experiment das Modell des adoptiven Transfers dienen, um unterschiedliche DZ und T-Zellen in unterschiedlicher Kombination zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Das allergische Kontaktekzem ist eine dermatologische Erkrankung, die sowohl Kinder als auch Erwachsene betrifft und aufgrund der Vielfalt an potentiellen Kontaktallergenen eine hohe Prävalenz aufweist. In den meisten Fällen liegt eine allergische Reaktion vom Spättyp zugrunde. Die Spättypreaktion ist eine zellvermittelte Immunreaktion, die in zwei Phasen abläuft: die Sensibilisierungs- und die Effektorphase. Immunologisch spielen hier die dendritischen Zellen als Antigen-präsentierende Zellen, als auch T-Lymphozyten als Effektor- und regulatorische Zellen eine entscheidende Rolle. Bei der Interaktion der Zellen sind Integrine ein wesentlicher Bestandteil. CD103 bezeichnet die α E-Kette des Integrins α E β 7. Es wird vor allem auf intraepithelialen Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Der einzige bisher bekannte Ligand ist E-Cadherin, welches wiederum von Epithelzellen, wie Keratinozyten und Langerhans-Zellen, exprimiert wird. Bisher ist bekannt, dass CD103 in seiner Rolle als Adhäsionsrezeptor an der Lokalisation und Rekrutierung von T-Zellen im Epithel beteiligt ist. Ebenso dient es dazu, das Gleichgewicht von Effektorzellen und Treg im Gewebe aufrecht zu erhalten und damit eine essentielle Rolle in der Immunregulation einzunehmen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle CD103 in den einzelnen Phasen des allergischen Kontaktekzems spielt. Hierfür wurde das CHS-Maus-Modell genutzt und Wildtyp-Mäuse mit CD103-defizienten Mäusen verglichen. Nach *In-vivo*-Sensibilisierung mit einem Hapten wurden zunächst die dendritischen Zellen hinsichtlich ihrer Migration und Maturation *in vitro* untersucht. Hier konnten keine Unterschiede bei der Auswanderung der DZ aus der Epidermis gefunden werden. Zudem wiesen die Zellen beider Mauslinien eine ähnliche Dynamik in der Migration zum Lymphknoten auf. Sowohl die DZ der CD103^{-/-}-Mäuse als auch der Wildtyp-Mäuse waren vollständig gereift. Durch funktionelle *In-vitro*-Versuche konnte zudem gezeigt werden, dass eine CD103-Defizienz der dendritischen Zellen keine Auswirkung auf die T-Zell-Aktivierung hatte.

Weiterführend wurde die Rolle der CD103-Expression auf T-Zellen in der Effektorphase untersucht. *In vitro* zeigten CD103⁻ CD8⁺ T-Zellen eine stärkere Immunantwort als CD8⁺ T-Zellen von Wildtyp-Mäusen. Dies war der Fall, wenn die Stimulation durch BMDC erfolgte. Wurden die Zellen jedoch mit epidermalen DZ co-kultiviert, so ergaben sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede. Die epidermalen Zellen der Wt-Mäuse exprimierten kein CD103. CD103⁺ CD4⁺ und CD103⁻ CD4⁺ T-Zellen wiesen hingegen keinen Unterschied in ihrer Aktivierung auf.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass CD103 auf dendritischen Zellen wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle in der Pathogenese des allergischen Kontaktekzems spielt. Eher erscheint die T-Zell-Funktion durch die CD103-Expression beeinflusst zu sein. Hier ist hervorzuheben, dass durch CD103-defiziente CD8⁺ T-Zellen eine gesteigerte Immunantwort ausgelöst werden konnte.

6 Anhang

Tabelle A1: Absolute Zellzahlen der noch in den Epidermispräparaten befindlichen MHC-II⁺-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei bis vier Ausschnitten der Epidermis pro Maus (n = 3).

<u>Absolute Zellzahlen</u>									
Oxazolone				FITC					
Oxazolone		Vehikel		FITC		Vehikel			
B6J	CD103 ^{-/-}	B6J	CD103 ^{-/-}	B6J	CD103 ^{-/-}	B6J	CD103 ^{-/-}		
0h		469,0	425,0	0h		458,3	396,0		
		373,3	340,0			498,5	441,8		
		345,7	396,0			297,3	393,8		
4h		418,7	468,7	4h		527,8	346,0		
		356,0	348,4			472,8	326,7	494,0	314,3
		614,7	398,0			506,3	295,0	502,3	321,8
12h		424,3	498,7	12h		424,0	499,0		
		352,5	397,3			440,3	436,3	399,0	461,3
		511,3	325,0			422,5	417,5	391,3	452,8
24h		397,7	451,3	24h		457,0	366,8		
		375,0	383,0			434,3	374,0	508,5	445,8
		447,3	314,0			388,3	260,5	369,3	276,0
48h		341,0	400,7	48h		435,8	445,8		
		331,0	373,5			422,0	382,5	413,8	378,7
		407,3	338,3			442,0	443,3	452,0	412,3

7 Literaturverzeichnis

- Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, Krasteva M, Horand F, Kaiserlian D, Kaneko F, Nicolas JF (2002): Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol Baltim Md* 1950 168, 3079–3087
- Aktas E, Esin MN (2016): Skin disease symptoms and related risk factors among young workers in high-risk jobs. *Contact Dermatitis* 75, 96–105
- Allen IC (2013): Contact hypersensitivity models in mice. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1032, 139–144
- Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, Agace WW, Parker CM, Powrie F (2005): Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 202, 1051–1061
- Banz A, Peixoto A, Pontoux C, Cordier C, Rocha B, Papiernik M (2003): A unique subpopulation of CD4+ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur J Immunol* 33, 2419–2428
- Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR et al. (2009): Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 488–495
- Belhadjali H, Mohamed M, Youssef M, Mandhouj S, Chakroun M, Zili J (2008): Contact sensitization in atopic dermatitis: results of a prospective study of 89 cases in Tunisia. *Contact Dermatitis* 58, 188–189
- Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML, Clausen BE (2005): Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169, 569–576
- Bour H, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, Revillard JP, Nicolas JF (1995): Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 25, 3006–3010
- Braun A, Bewersdorff M, Lintelmann J, Matuschek G, Jakob T, Göttlicher M, Schober W, Buters JTM, Behrendt H, Mempel M (2010): Differential impact of diesel particle composition on pro-allergic dendritic cell function. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 113, 85–94
- Braun A, Dewert N, Brunnert F, Schnabel V, Hardenberg JH, Richter B, Zachmann K, Cording S, Claßen A, Brans R et al. (2015): Integrin α E(CD103) is involved in regulatory T-cell function in allergic contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 135, 2982–2991
- Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, Hogquist KA (2007): Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med* 204, 3147–3156
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Ait-Yahia S, Vaure C, Chemin K, Dieu-Nosjean M-C, Vicari A (2002): Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 73, 7-11
- Cepek KL, Parker CM, Madara JL, Brenner MB (1993): Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 150, 3459–3470
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB (1994): Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the α E β 7 integrin. *Nature* 372, 190–193

- Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Grospierre B, Guy-Grand D, Griscelli C (1987): A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 17, 1279–1285
- Chen AI, McAdam AJ, Buhlmann JE, Scott S, Lupper ML, Greenfield EA, Baum PR, Fanslow WC, Calderhead DM, Freeman GJ et al. (1999): Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 11, 689–698
- Christensen AD, Haase C (2012): Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 120, 1–27
- Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F (2007): A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757–1764
- De Vries IJ, Langeveld-Wildschut EG, van Reijnsen FC, Bihari IC, Bruijnzeel-Koomen CA, Thepen T (1997): Nonspecific T-cell homing during inflammation in atopic dermatitis: expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen and integrin alphaE beta7 on skin-infiltrating T cells. *J Allergy Clin Immunol* 100, 694–701
- Del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Förster R (2007): CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 178, 6861–6866
- Dietz SB, Whitaker-Menezes D, Lessin SR (1996): The role of alpha E beta 7 integrin (CD103) and E-cadherin in epidermotropism in cutaneous T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 23, 312–318
- Dirschka T, Hartwig R, Oster-Schmidt C: *Klinikleitfaden Dermatologie: Mit Zugang zur Medizinwelt*. 3. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2010
- Divkovic M, Pease CK, Gerberick GF, Basketter DA (2005): Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* 53, 189–200
- Dubois B, Chapat L, Goubier A, Kaiserlian D (2003): CD4+ CD25+ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol EJD* 13, 111–116
- Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG et al. (2010): Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823–836
- Edelson BT, Bradstreet TR, Kc W, Hildner K, Herzog JW, Sim J, Russell JH, Murphy TL, Unanue ER, Murphy KM (2011): Batf3-dependent CD11b(low/-) peripheral dendritic cells are GM-CSF-independent and are not required for Th cell priming after subcutaneous immunization. *PLoS One* 6(10), e25660
- Edwards AD, Chaussabel D, Tomlinson S, Schulz O, Sher A, Reis e Sousa C (2003): Relationships among murine CD11c(high) dendritic cell subsets as revealed by baseline gene expression patterns. *J Immunol Baltim Md 1950* 171, 47–60
- El-Asady R, Yuan R, Liu K, Wang D, Gress RE, Lucas PJ, Drachenberg CB, Hadley GA (2005): TGF-beta-dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 201, 1647–1657
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI (1993): An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol Baltim Md 1950* 150, 3698–3704

- Ericsson A, Svensson M, Arya A, Agace WW (2004): CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 34, 2720–2729
- Feng Y, Wang D, Yuan R, Parker CM, Farber DL, Hadley GA (2002): CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8(+) T cells. *J Exp Med* 196, 877–886
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY (2005): Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity* 22, 329–341
- Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23–33
- Fritsch P: *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. 2009. 1. Auflage; Springer, Heidelberg 2009
- Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, Abe T, Takeuchi T (1997): Lacrimal gland is destroyed by CD8⁺CD103⁺ T lymphocytes in patients with sjogren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 433
- Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A (2002): Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33–41
- Gebhardt T, Mackay LK (2012): Local immunity by tissue-resident CD8(+) memory T cells. *Front Immunol* 3, 340
- Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, Ochando J, Kissenpfennig A, Malissen B, Grisotto M et al. (2007): Blood-derived dermal langerin⁺ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 204, 3133–3146
- Gorbachev AV, Fairchild RL (2001): Regulatory role of CD4⁺ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol Res* 24, 69–77
- Hardenberg JH, Braun A, Schön MP (2018): A Yin and Yang in Epithelial Immunology: The Roles of the α E(CD103) β 7 Integrin in T Cells. *J Invest Dermatol* 138, 23–31
- Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Guillemins M, de Bovis B, Devilard E, Viret C, Azukizawa H, Kissenpfennig A et al. (2010): CD207⁺ CD103⁺ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207, 189–206
- Hermann-Kunz E (2000): Allergische Krankheiten in Deutschland: Ergebnisse einer repräsentativen Studie. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 43, 400–406
- Hermiston ML, Gordon JI (1995): In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 129, 489–506
- Herro EM, Matiz C, Sullivan K, Hamann C, Jacob SE (2011): Frequency of Contact Allergens in Pediatric Patients with Atopic Dermatitis. *J Clin Aesthetic Dermatol* 4, 39–41
- Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K (2010): Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 125, 1154–1156
- 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

- Jenkinson SE, Whawell SA, Swales BM, Corps EM, Kilshaw PJ, Farthing PM (2011): The α E(CD103) β 7 integrin interacts with oral and skin keratinocytes in an E-cadherin-independent manner*. *Immunology* 132, 188–196
- Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Förster R, Agace WW (2005): Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202, 1063–1073
- Karecla PI, Bowden SJ, Green SJ, Kilshaw PJ (1995): Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 (alpha E beta 7). *Eur J Immunol* 25, 852–856
- Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, 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
- Kilshaw PJ (1993): Expression of the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 by a major subpopulation of dendritic cells in mice. *Eur J Immunol* 23, 3365–3368
- Kilshaw PJ (1999): Alpha E beta 7. *Mol Pathol MP* 52, 203–207
- Kilshaw PJ, Baker KC (1988): A unique surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the mouse. *Immunol Lett* 18, 149–154
- Kilshaw PJ, Murant SJ (1990): A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 20, 2201–2207
- Kilshaw PJ, Higgins JMG (2002): Alpha E: no more rejection? *J Exp Med* 196, 873–875
- Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, et al. (2005): Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22, 643–654
- Kondo S, Kooshesh F, Wang B, Fujisawa H, Sauder DN (1996): Contribution of the CD28 molecule to allergic and irritant-induced skin reactions in CD28 -/- mice. *J Immunol Baltim Md* 157, 4822–4829
- Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C (1990): Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol Baltim Md* 145, 2833–2838
- Kroneld U, Jonsson R, Carlsten H, Bremell T, Johannessen AC, Tarkowski A (1998): Expression of the mucosal lymphocyte integrin alphaEbeta7 and its ligand E-cadherin in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 27, 215–218
- Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A (2002): Expression of the integrin alpha E beta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13031–13036
- Levin C, Maibach HI (2000): An overview of the efficacy of topical corticosteroids in experimental human nickel contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 43, 317–321
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, Schuler G (1999): An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223, 77–92

- Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P (1987): Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* 166, 1654–1667
- Mahler V, Geier J, Schnuch A (2014): Current trends in patch testing - new data from the German Contact Dermatitis Research Group (DKG) and the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK). *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG* 12, 583–592
- Mark BJ, Slavin RG (2006): Allergic contact dermatitis. *Med Clin North Am* 90, 169–185
- Martin SF (2013): Induction of contact hypersensitivity in the mouse model. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 961, 325–335
- McLellan AD, Kapp M, Eggert A, Linden C, Bommhardt U, Bröcker EB, Kämmerer U, Kämpgen E (2002): Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* 99, 2084–2093
- Meingassner JG, Fahrngruber H, Bavandi A (2003): Pimecrolimus inhibits the elicitation phase but does not suppress the sensitization phase in murine contact hypersensitivity, in contrast to tacrolimus and cyclosporine A. *J Invest Dermatol* 121, 77–80
- Menezes de Pádua CA, Schnuch A, Lessmann H, Geier J, Pfahlberg A, Uter W (2005): Contact allergy to neomycin sulfate: results of a multifactorial analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 14, 725–733
- Noordegraaf M, Flacher V, Stoitzner P, Clausen BE (2010): Functional redundancy of Langerhans cells and Langerin+ dermal dendritic cells in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 130, 2752–2759
- Nosbaum A, Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Nicolas JF (2009): Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol EJD* 19, 325–332
- Pang M, Abe T, Fujihara T, Mori S, Tsuzaka K, Amano K, Koide J, Takeuchi T (1998): Up-regulation of alphaEbeta7, a novel integrin adhesion molecule, on T cells from systemic lupus erythematosus patients with specific epithelial involvement. *Arthritis Rheum* 41, 1456–1463
- Pauls K, Schön M, Kubitzka RC, Homey B, Wiesenborn A, Lehmann P, Ruzicka T, Parker CM, Schön MP (2001): Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes. *J Invest Dermatol* 117, 569–575
- Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JHE, Basketter DA, English J, Diepgen TL, Fuhlbrigge RC, Gaspari AA et al. (2012): Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci CMLS* 69, 763–781
- Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A, Malissen B (2007): The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204, 3119–3131
- Pribila JT, Itano AA, Mueller KL, Shimizu Y (2004): The alpha 1 beta 1 and alpha E beta 7 integrins define a subset of dendritic cells in peripheral lymph nodes with unique adhesive and antigen uptake properties. *J Immunol Baltim Md 1950* 172, 282–291
- Rink L, Kruse A, Haase H: *Immunologie für Einsteiger*. 2. Auflage; Springer Spektrum, Berlin u.a. 2015
- Robinson PW, Green SJ, Carter C, Coadwell J, Kilshaw PJ (2001): Studies on transcriptional regulation of the mucosal T-cell integrin alphaEbeta7 (CD103). *Immunology* 103, 146–154

- Rudensky AY (2011): Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241, 260–268
- Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K (2000): Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J Immunol Baltim Md 1950* 165, 4910–4916
- Russell GJ, Parker CM, Cepek KL, Mandelbrot DA, Sood A, Mizoguchi E, Ebert EC, Brenner MB, Bhan AK (1994): Distinct structural and functional epitopes of the alpha E beta 7 integrin. *Eur J Immunol* 24, 2832–2841
- Saary J, Qureshi R, Palda V, DeKoven J, Pratt M, Skotnicki-Grant S, Holness L (2005): A systematic review of contact dermatitis treatment and prevention. *J Am Acad Dermatol* 53, 845
- Sad S, Marcotte R, Mosmann TR (1995): Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2, 271–279
- Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C, Bosset S, Akiba H, Kehren J, Kanitakis J, Kaiserlian D, Nicolas JF, Berard F (2003): Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol* 120, 641–647
- Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF (2004): Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol EJD* 14, 284–295
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712
- Saripalli YV, Gadzia JE, Belsito DV (2003): Tacrolimus ointment 0.1% in the treatment of nickel-induced allergic contact dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 49, 477–482
- Schlickum S, Sennfelder H, Friedrich M, Harms G, Lohse MJ, Kilshaw P, Schön MP (2008): Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion. *Blood* 112, 619–625
- Schnuch A, Mahler V (2015): The public health issue of allergic contact dermatitis. *Hautarzt* 66, 644–645
- Schnuch A, Westphal G, Mössner R, Uter W, Reich K (2011): Genetic factors in contact allergy--review and future goals. *Contact Dermatitis* 64, 2–23
- Schnuch A, Geier J, Lessmann H, Arnold R, Uter W (2012): Surveillance of contact allergies: methods and results of the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK). *Allergy* 67, 847–857
- Schön MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, Marsal J, Donohue JP, Her H, Beier DR et al. (1999): Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol Baltim Md 1950* 162, 6641–6649
- Schön MP, Schön M, Warren HB, Donohue JP, Parker CM (2000): Cutaneous inflammatory disorder in integrin alphaE (CD103)-deficient mice. *J Immunol Baltim Md 1950* 165, 6583–6589
- Schön MP, Schön M, Parker CM, Williams IR (2002): Dendritic epidermal T cells (DETC) are diminished in integrin alphaE(CD103)-deficient mice. *J Invest Dermatol* 119, 190–193
- Schwarzenberger K, Udey MC (1996): Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. *J Invest Dermatol* 106, 553–558

Siegmund K, Feuerer M, Siewert C, Ghani S, Haubold U, Dankof A, Krenn V, Schön MP, Scheffold A, Lowe JB et al. (2005): Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 106, 3097–3104

Smit HA, Burdorf A, Coenraads PJ (1993): Prevalence of hand dermatitis in different occupations. *Int J Epidemiol* 22, 288–293

Stoitzner P, Holzmann S, McLellan AD, Ivarsson L, Stössel H, Kapp M, Kämmerer U, Douillard P, Kämpgen E, Koch F et al. (2003): Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207. *J Invest Dermatol* 120, 266–274

Strauch UG, Mueller RC, Li XY, Cernadas M, Higgins JM, Binion DG, Parker CM (2001): Integrin alpha E(CD103)beta 7 mediates adhesion to intestinal microvascular endothelial cell lines via an E-cadherin-independent interaction. *J Immunol Baltim Md 1950* 166, 3506–3514

Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y (2005): A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania* major infection. *J Immunol Baltim Md 1950* 174, 5444–5455

Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y (2007): Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775–1785

Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC (1993): Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82–85

Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD (2007): The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 57, 287–299

Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T (2009): Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* 60, 2–20

Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, Cavani A (2000): Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 165, 3058–3064

Trautmann A, Akdis M, Bröcker EB, Blaser K, Akdis CA (2001): New insights into the role of T cells in atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Trends Immunol* 22, 530–532

Tse Y, Cooper KD (1990): Cutaneous dermal Ia+ cells are capable of initiating delayed type hypersensitivity responses. *J Invest Dermatol* 94, 267–272

Uss E, Rowshani AT, Hooibrink B, Lardy NM, van Lier RAW, ten Berge IJM (2006): CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 177, 2775–2783

Uter W, Geier J, Pfahlberg A, Effendy I (2002): The spectrum of contact allergy in elderly patients with and without lower leg dermatitis. *Dermatol Basel Switz* 204, 266–272

Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpfennig A, Mattéi M-G, Ait-Yahia S, Bates EEM, Malissen B, Koch F, et al. (2002): Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol Baltim Md 1950* 168, 782–792

Walton LJ, Thornhill MH, Macey MG, Farthing PM (1997): Cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) and alpha e beta 7 integrins are expressed by mononuclear cells in skin and oral lichen planus. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 26, 402–407

Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Kondo S, Shivji GM, Kim CS, Mak TW, Sauder DN (1997): Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J Immunol Baltim Md* 1950 159, 6148–6155

Wang L, Bursch LS, Kissenpfennig A, Malissen B, Jameson SC, Hogquist KA (2008): Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *J Immunol Baltim Md* 1950 180, 4722–4727

Xu H, DiIulio NA, Fairchild RL (1996): T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* 183, 1001–1012

Yuan R, El-Asady R, Liu K, Wang D, Drachenberg CB, Hadley GA (2005): Critical role for CD103+CD8+ effectors in promoting tubular injury following allogeneic renal transplantation. *J Immunol Baltim Md* 1950 175, 2868–2879

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Schön danken für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die fachliche Unterstützung und freundliche Motivation.

Mein Dank geht ebenso an Andrea Braun für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die vielen Hilfestellungen insbesondere in der Etablierung und Ausarbeitung der Experimente, sowie die zahlreichen hilfreichen Diskussionen.

Auch danke ich Nadine Dewert für die vielen wertvollen Ratschläge, wenn es bei der Durchführung der Experimente zu kleinen oder größeren Problemen kam. Auch geht ein großer Dank an Karolin Zachmann und Anette Bennemann, sowie Bianka Dettke und Ulla Unkelbach für die tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung im Laboralltag. Ohne die vielen praktischen Tipps wären noch immer nicht alle Experimente fertig.

Zum Schluss möchte ich mich auch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, namentlich Verena Lorenz, Emilia Schmid, Eugen Koßmann und Katharina Amschler, für die schöne und entspannte, aber auch sehr motivierende Arbeitsatmosphäre bedanken.