

**Funktionelle Charakterisierung
MyD88-abhängiger Signalwege
bei der atopischen Dermatitis im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sonja Teresa Didović

aus Düsseldorf

Düsseldorf, im Mai 2013

aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF),
Arbeitsgruppe angeborene Immunität und extrinsische Hautalterung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

und dem Life and Medical Sciences-Institut (LIMES),
Arbeitsgruppe Immunologie und Umwelt
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Frau Professor Dr. Irmgard Förster
Abteilung Immunologie und Umwelt, LIMES-Institut
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Korreferent: Herr Professor Dr. Peter Westhoff
Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2013

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen und habe diese Dissertation in vorliegender oder ähnlicher Form in keiner anderen Institution eingereicht.

Sonja Didović, im Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
<i>Summary</i>	5
1 Einleitung	6
1.1 Das Immunsystem	6
1.1.1 Angeborene Immunität	7
1.1.2 <i>Toll-like</i> Rezeptoren und das Signalmolekül MyD88	9
1.1.3 Erworbene / adaptive Immunität:	12
1.2 Haut und Umwelt	14
1.2.1 Epidermis	14
1.2.2 Dermis	17
1.3 Allergien	18
1.3.1 Atopische Dermatitis	20
1.3.2 Die Rolle von Staphylokokken-Infektionen der Haut bei AD	23
1.4 Ziele der Arbeit	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, Puffer	28
2.1.4 Zellkulturreagenzien und –Stimuli	30
2.1.5 Antikörper für Histologie und Durchflusszytometrie	32
2.1.6 Antikörper für <i>Western Blot</i>	32
2.1.7 <i>ELISA</i> Reagenzien, Antikörper	33
2.1.8 Computerprogramme	35
2.2.1 Generierung Keratinozyten-spezifischer MyD88 ^{knock-in} -Mäuse	36
2.2.2 Genetik der Versuchstiere und Tierhaltung	37
2.2.3 Genotypisierung der Versuchstiere	39
2.3 Ovalbumin-induziertes AD-Modell	40
2.3.1 Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)	42
2.4 Organentnahme und Aufbereitung	43
2.4.1 Blutentnahme	43
2.4.2 Haut	43
2.4.3 Ohren- und Schwanzhaut für Keratinozytenisolierung	43
2.4.4 Lymphknoten	44
2.4.5 Milz	44
2.4.6 Große Röhrenknochen zur Gewinnung von Knochenmarkszellen	44
2.5 Zellkultur	44
2.5.1 Generierung von dendritischen Zellen oder Makrophagen aus dem Knochenmark	45
2.5.2 Isolierung primärer muriner Keratinozyten	45
2.5.3 Magnetische Aufreinigung epidermaler Keratinozyten	46
2.5.4 Kultivierung und Stimulierung primärer Keratinozyten	46
2.5.5 Lymphknotenzellen	47
2.5.6 Proliferations- / Viabilitäts-Test mittels MTT-Farbreaktion	47
2.6 Durchflusszytometrie	48
2.7 Histologie	49

2.7.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	49
2.7.2 Toluidinfärbung	50
2.7.3 Immunfluoreszenz-Färbungen	50
2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	51
2.8.1 Referenzseren für die Quantifizierung Antigen-spezifischer Immunglobuline	51
2.8.2 Herstellung eines Epidermislysates für die Detektion von Autoimmun-Antikörpern	52
2.9 Western Blot	52
2.10 Auswertungen und Statistik	54
3 Ergebnisse	55
3.1 Der Phänotyp von MyD88LSL-Mäusen	55
3.2 Die Rolle von MyD88 bei der Antigen-Erkennung der verwendeten Allergene	56
3.3 Der Immunstatus von naiven MyD88-defizienten Mäusen	58
3.4 Ova-induzierte AD in MyD88-defizienten Mäusen	60
3.4.1 AD-Symptome in der Haut	60
3.4.2 AD-induzierte Immunantwort in Haut-drainierenden Lymphknoten	66
3.4.3 Systemische Immunabwehr und Immunglobulinspiegel nach AD-Induktion	70
3.4.4 Zusammenfassung MyD88-abhängige AD-Induktion	73
3.5 MyD88-abhängige Verstärkung der AD-Symptome durch Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	73
3.5.1 Hautentzündung nach SEB-Sensibilisierung	74
3.5.2 Immunantwort in den Haut-drainierenden Lymphknoten nach SEB-Sensibilisierung	77
3.5.3 Systemische Immunreaktion und Immunglobulinspiegel nach SEB-Sensibilisierung	81
3.5.4 Zusammenfassung MyD88-abhängige SEB-Sensibilisierung bei AD	84
3.4 Keratinozyten-spezifische Rolle von MyD88 bei AD	85
3.4.1 Keratinozyten-spezifische MyD88 ^{knock-in} -Mäuse	85
3.4.2 Ausschluss eines zytotoxischen Effekts der Cre-Rekombinase auf Keratinozyten bei K5 ^{ind} MyD88-Mäusen	87
3.4.3 AD in Keratinozyten-spezifischen MyD88 ^{knock-in} -Mäusen	89
3.4.4 Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch primäre murine Keratinozyten <i>in vitro</i>	93
3.4.5 Primäre Keratinozyten aus nicht-betroffener Haut von AD-behandelten Mäusen	97
3.4.6 Anti-epidermale Autoimmun-Antikörper in MyD88-defizienten Mäusen vor und nach AD-Induktion	100
3.4.7 Zusammenfassung der MyD88-abhängigen Rolle von Keratinozyten bei der AD	103
4 Diskussion	104
4.1 Genetik und Immunsystem der Versuchstiere	104
4.1.1 Genetik von MyD88LSL-Mäusen	105
4.1.2 Zuchtschema und Reproduktionserfolg von MyD88-defizienten und -profizienten Tieren	106
4.1.3 Erhöhte IgE-Spiegel in naiven MyD88-defizienten Mäusen	107
4.2 Die Rolle von MyD88 bei der Pathogenese von AD im Mausmodell	108
4.3 Die Rolle von MyD88 bei der Progression von AD durch Co-Administration des Superantigens SEB	113
4.4 MyD88-induzierte Signalwege in murinen Keratinozyten	116
4.4.1 AD-Induktion in K5 ^{ind} MyD88-Mäusen	117

4.4.2 <i>Ex vivo</i> kultivierte primäre Keratinozyten	118
4.4.3 Keratinozyten von AD-behandelten Mäusen	120
4.4.4 TSLP	121
4.4.5 Die Korrelation von MyD88-Defizienz, TSLP-Expression und Autoimmunität ..	124
4.5 Klinische Relevanz und Ausblick	127
Literaturverzeichnis.....	129
Abkürzungsverzeichnis	143
Abbildungsverzeichnis	146
Tabellenverzeichnis.....	147
Danksagung	148

Zusammenfassung

Myeloid Differentiation Primary Response Gene (MyD) 88 ist ein wichtiges Signalmolekül für die Pathogen-Erkennung durch Mustererkennungsrezeptoren und die Induktion entzündlicher Abwehrreaktionen. Auch sterile Gefahrensignale bei nicht-infektiösen Entzündungsreaktionen können von MyD88-abhängigen Rezeptoren erkannt werden. Atopische Dermatitis (AD) ist eine allergische Erkrankung, bei der es durch Störung der Hautbarriere zur verstärkten Invasion von Umweltantigenen in die Haut kommt. Die Abwehr von Hautinfektionen ist vermindert, was auf eine Störung der Immunabwehr zurückgeführt wird. Insbesondere das Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) ist an der Progression der Erkrankung beteiligt.

MyD88-defiziente Mäuse wiesen erhöhte Immunglobulin E (IgE)-Spiegel auf, was auf die Ausbildung stärkerer Allergie-Symptome hindeuten könnte. Im Ovalbumin-abhängigen Mausmodell für AD wurde dagegen festgestellt, dass MyD88-abhängige Signalwege für die Induktion der allergischen Entzündungsreaktionen notwendig waren. Dazu gehörten eine Verdickung der Epidermis durch Hyperproliferation der Keratinozyten, die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis, der Influx von Makrophagen in die Dermis, die Zytokinproduktion von Antigen-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten, sowie die Produktion von Antikörpern. Auch bei der AD-Progression durch Co-Administration von SEB spielten MyD88-abhängige Signalwege eine Rolle.

Die Funktion von MyD88 in Keratinozyten wurde mithilfe Zelltyp-spezifischer Re-Expression von MyD88 im MyD88-defizienten Organismus untersucht. Im AD-Modell war MyD88 in Keratinozyten nicht ausreichend, um die Allergen-abhängige Verdickung der Epidermis zu induzieren, förderte aber die Langerhanszell-Migration und verminderte den Influx von T-Zellen in die Dermis. In primären murinen Keratinozyten war MyD88 für die Produktion von Entzündungsmediatoren notwendig, die Migration von Langerhanszellen fördern, wie IL-1 α und GM-CSF. Hingegen wurde das Zytokin TSLP von MyD88-defizienten Zellen deutlich stärker produziert als von MyD88-profizienten Zellen. TSLP könnte an der gehemmten Langerhanszell-Migration und verstärkten T-Zell-Rekrutierung in MyD88-defizienten Mäusen beteiligt sein. Demnach sind MyD88-abhängige Signalwege bei der Interaktion von Keratinozyten und anderen Zelltypen für die Induktion und den Verlauf von AD notwendig.

In weiteren Studien könnte die Funktion von TSLP, sowie die Rolle von MyD88 in Keratinozyten bei Autoimmunreaktionen näher untersucht werden.

Summary

Myeloid Differentiation Primary Response Gene (MyD) 88 is a key molecule for pathogen recognition and the induction of inflammatory defense reactions by receptors of the innate immune system. MyD88-dependent receptors can also sense sterile danger signals in non-infectious inflammatory responses. Atopic dermatitis (AD) is a chronic allergic skin disease, possibly caused by skin barrier damage which leads to enhanced invasion of environmental antigens into the skin. The clearance of skin infections is also diminished in AD, which is attributed to a disturbed immune defense. Especially Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) is involved in progression of the disease.

Naïve MyD88-deficient mice exhibited elevated immunoglobulin E (IgE) levels, possibly pointing to enhanced allergy symptoms. However, in an Ova-dependent AD mouse model, MyD88-dependent signaling pathways were necessary for the induction of allergic inflammatory reactions. These included epidermal thickening due to keratinocyte hyperproliferation, Langerhans cell emigration from the epidermis, dermal influx of macrophages, cytokine production of antigen-specific lymph node T cells and the production of antibodies. MyD88-dependent signaling pathways were also involved in AD progression through co-administration of Ova+SEB.

The function of MyD88 in keratinocytes was analyzed by cre-loxP-mediated cell type-specific re-expression of MyD88 in MyD88-deficient mice. MyD88-induced signal transduction in keratinocytes was not sufficient to induce allergen-dependent epidermal thickening in the AD model. However it did promote Langerhans cell migration and reduced T cell infiltration into the dermis. In primary murine keratinocytes MyD88 was necessary for the production of inflammatory mediators which can promote Langerhans cell migration, such as IL-1 α and GM-CSF. In contrast, the cytokine TSLP was produced in much larger amounts by MyD88-deficient cells compared to MyD88-proficient cells. TSLP might be involved in the diminished Langerhans cell migration and enhanced T cell recruitment seen in MyD88-deficient mice. Thus, MyD88-dependent signaling pathways are required for the interaction between keratinocytes and other cell types during the induction and course of AD.

Additional studies may focus on the function of TSLP, as well as the role of MyD88 in keratinocytes during autoimmune reactions.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor äußeren Einflüssen, Gewebeschäden und entarteten Zellen. Es ist für die Bekämpfung von Infektionen durch Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen sowie Tumor-bildenden Zellen zuständig und darüber hinaus auch am Schutz vor UV-Strahlung, schädlichen Stoffen und Toxinen sowie der Aufrechterhaltung der Haut- und Schleimhautbarrieren beteiligt (1, 2). Es interagiert mit der kommensalen Flora der Barriereorgane (Haut und Schleimhäute), die ebenfalls zum Schutz vor pathogenen Keimen beiträgt (3, 4), und hat daher im Darm auch eine Funktion bei der Nährstoffaufnahme (5).

Das Knochenmark der großen Röhrenknochen ist der Ort der postnatalen Hämatopoese und damit auch der Ursprung der Immunzellen. Es wird daher auch als primäres lymphatisches Organ bezeichnet, ebenso wie der Thymus, der u. a. für die T-Zell-Entwicklung und -Selektion notwendig ist. T-Zellen mit autoreaktivem oder nicht funktionellem T-Zell-Rezeptor werden dort eliminiert. Die sekundären lymphatischen Organe umfassen die Milz, den Blinddarm, die Lymphknoten, Rachenmandeln und Tonsillen, sowie kleinere lymphatische Gewebe in und an den Schleimhäuten. In diesen Organen wird die Immunabwehr koordiniert (1).

Zum Immunsystem gehören weiterhin zirkulierende zelluläre und lösliche (humorale) Bestandteile. Die meisten spezialisierten Immunzellen gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor (6) (Abb. 1) und werden ein Leben lang ständig erneuert. Gedächtniszellen, die andauernde Immunität nach Infektionen oder Impfungen aufrecht erhalten, können lange Zeiträume ruhend überdauern. Einige Gewebe-residente Immunzellen wie z. B. Langerhanszellen können auch von gewebsständigen Vorläuferzellen nachgebildet werden. Viele Zelltypen, die nicht zu den klassischen Immunzellen gezählt werden, besitzen immunologische Funktionen, wie z. B. die Ausschüttung von Zytokinen durch Keratinozyten (Abschnitt 1.2.1). Überdies exprimiert jede Körperzelle MHC Klasse I-Moleküle zur Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ (1).

Zu den löslichen Bestandteilen zählen Serumproteine wie das Komplement-System und die Antikörper, welche zwar von Zellen produziert und aktiviert werden, jedoch dann frei im Blut zirkulieren und dort zur Immunabwehr beitragen (1).

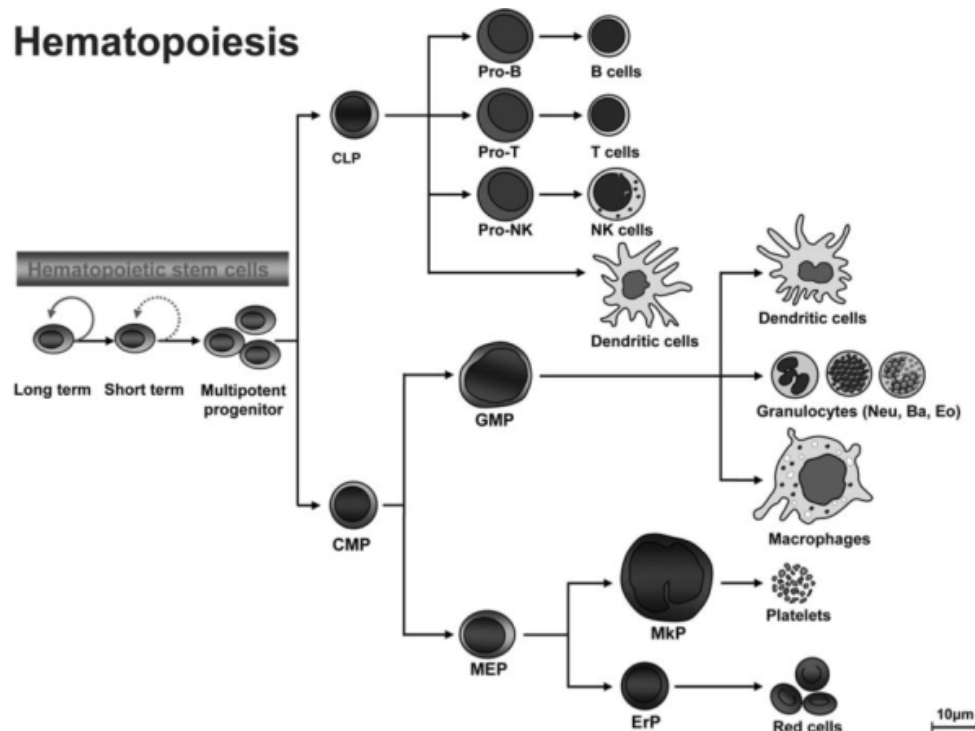


Abb. 1: Schema der Hämatopoese (6). Langlebige hämatopoetische Stammzellen (*Long term hematopoietic stem cells*) im Knochenmark bringen alle Blut-Zelltypen hervor. Über verschiedene Stufen differenzieren sie zu erythroiden (*MEP*), myeloiden (*GMP*) oder lymphoiden (*CLP*) Vorläuferzellen und schließlich zu distinkten spezialisierten Populationen von Blut- und Immunzellen: Erythrozyten, Thrombozyten (*platelets*), Makrophagen, Granulozyten (neutrophile, basophile, eosinophile), myeloide dendritische Zellen, lymphoide dendritische Zellen, NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen.

1.1.1 Angeborene Immunität

Über viele Jahre stand größtenteils das adaptive Immunsystem im Fokus der Forschung. Dies war bedingt durch noch fehlende Erkenntnisse über die Mustererkennung und Antigenpräsentation des angeborenen Immunsystems. Deswegen wurde die angeborene Immunabwehr auch „unspezifisch“ genannt. Seit der Entdeckung der Funktion von *Toll-like* Rezeptoren (TLR) für die Immunabwehr Mitte der 1990er Jahre (7-10) rückte das angeborene Immunsystem wieder verstärkt ins Interesse der Wissenschaft.

Die ersten Beschreibungen über Zellen und Effekte des angeborenen Immunsystems reichen dennoch weit zurück, da viele dieser Zelltypen gut mit klassischen histologischen Färbemethoden darstellbar und definierbar sind, z. B. im manuell erstellten Blutbild oder in Gewebepräparaten und -schnitten. So wurden bereits 1868 die epidermalen Langerhanszellen entdeckt, jedoch nach ihrer Morphologie für Nervenzellen gehalten (11). Mittlerweile weiß man, dass sie eine distinkte Population von dendritischen Zellen darstellen.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind vorwiegend myeloiden Ursprungs (Abb. 1). Sie umfassen Monozyten, welche zu Makrophagen oder (myeloiden) dendritischen Zellen differenzieren können, Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), Mastzellen, aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die lymphatischen Ursprungs sind. Diese grobe Einteilung wurde inzwischen um viele funktionell unterscheidbare Subpopulationen erweitert. Insgesamt sind für Immunzellen (auch adaptive) mehr als 300 Oberflächenantigene beschrieben, die meistens mit CD (*Cluster of Differentiation*) und fortlaufenden Nummern benannt werden (12).

Diese Zellen können rasch auf eindringende Pathogene reagieren, indem sie lokale Entzündungen auslösen, um eine Infektion einzugrenzen und abzuwehren. Dabei können Gewebezellen und Gewebe-residente Immunzellen weitere Entzündungszellen zur Eintrittsstelle rekrutieren. Auch durch die Freisetzung endogener Gefahrensignale nach einem Gewebeschaden werden Immunzellen rekrutiert (13).

Wenn die lokale Entzündung nicht ausreicht, um eine Ausbreitung der Erreger zu verhindern, wird mit einer Verzögerung von einigen Tagen das erworbene Immunsystem aktiviert. Den dendritischen Zellen (14) wird dabei eine Schlüsselrolle zugeschrieben, indem sie die Art der erworbenen Immunabwehr beeinflussen können. Zusammen mit den Makrophagen gehören sie zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen.

Dendritische Zellen exprimieren viele Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors, PRR*), welche durch Co-Evolution mit Pathogenen entstanden sind und hochspezifisch an invariante Strukturen von Pathogenen (*Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP*) binden können, sowie auch an endogene Gefahrensignale (*Danger-Associated Molecular Patterns, DAMP*), welche bei Gewebeschäden frei werden (15). Nach Bindung eines *PAMP* oder *DAMP* an den entsprechenden Mustererkennungsrezeptor werden Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert, nehmen verstärkt Antigene auf, wandern durch Lymphgefäße in Lymphknoten ein und präsentieren dort die prozessierten Antigene auf MHC Klasse II-Molekülen (MHCII) den T-Helferzellen. Sie sezernieren gleichzeitig Zytokine, um die Differenzierung der von ihnen aktivierten T-Helferzellen zu steuern (1, 2). Das Muster dieser Zytokine hängt vermutlich von der Art des aufgenommenen Pathogens ab (16).

Dendritische Zellen können Antigene auch nach Aufnahme ins Zytosol auf MHC Klasse I-Molekülen (MHCI) präsentieren und zytotoxische T-Zellen aktivieren. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (17).

1.1.2 *Toll-like* Rezeptoren und das Signalmolekül MyD88

Das am längsten bekannte *PAMP* ist Lipopolysaccharid (LPS), der Hauptbestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Es wurde irrtümlich Endotoxin genannt, da es nur beim Absterben der Bakterien frei wird und daher vermutet wurde, es handle sich um ein intrazelluläres Molekül; der Begriff ist bis heute gebräuchlich. LPS bindet an *Toll-Like*-Rezeptor (TLR) 4, einen der am besten charakterisierten TLRs (18, 19).

TLRs sind eine Gruppe von membranständigen Mustererkennungsrezeptoren, die konservierte Strukturen von Pathogenen erkennen (20). Sie sind wichtig für die Regulation der erworbenen Immunabwehr, aber auch an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt, möglicherweise über die Erkennung von endogenen Gefahrensignalen (21). Ihre Ektodomäne besitzt eine konservierte Struktur, die als *Leucine-rich-repeat* (LRR)-Motiv bezeichnet wird, die zytoplasmatische Domäne wird als *Toll/ Interleukin 1 Receptor* (TIR)-Domäne bezeichnet (22). Abb. 2 zeigt beispielhaft die Struktur von TLR3 nach Aktivierung. TLR1-6 sind auf der Zellmembran lokalisiert, TLR7-9 befinden sich in intrazellulären Vesikeln. Insgesamt sind über 20 TLRs bekannt, davon 13 bei Säugern (23) und zehn beim Menschen (24). TLR10 ist beim Menschen, nicht aber bei der Maus bekannt (25). Aus diesen Gründen sind TLR1-9 am besten untersucht, sie kommen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus vor.

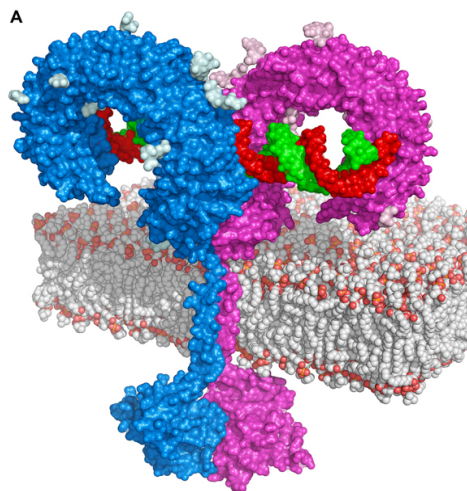
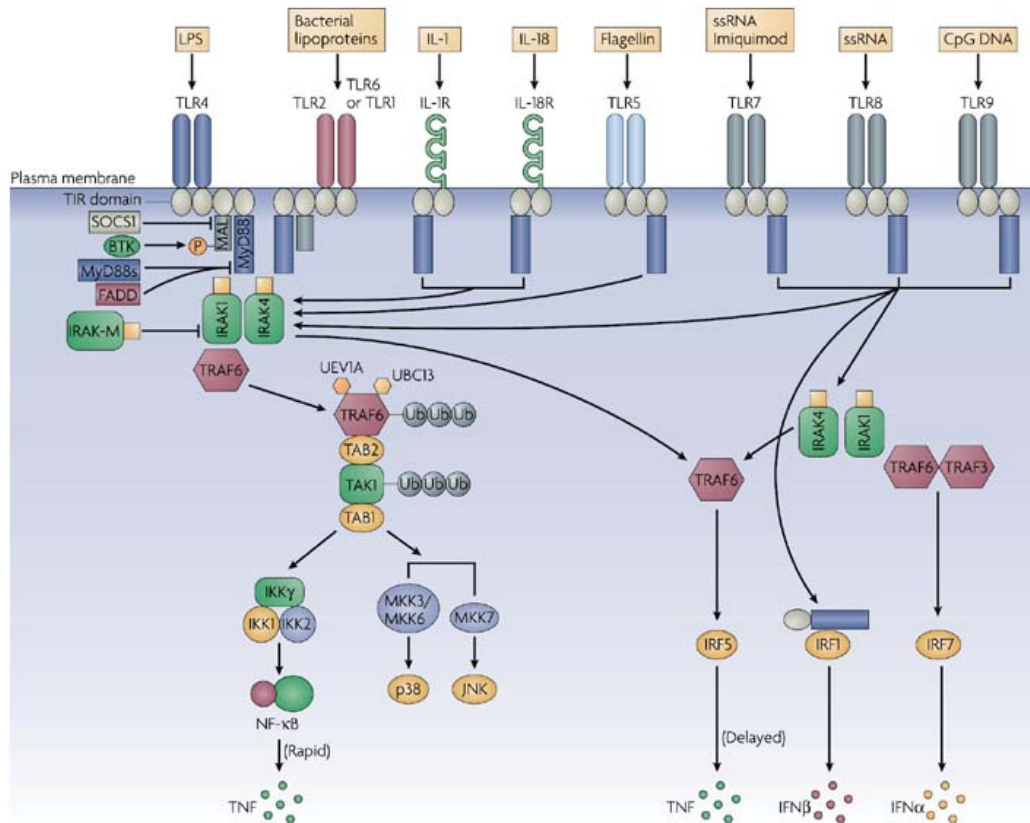


Abb. 2: Proteinstruktur eines aktivierten TLR-Dimers (TLR3: blau, violett) mit gebundener *dsRNA* (rot, grün) in der Zellmembran (grau). Die übrigen TLRs besitzen sehr ähnliche Strukturen. (26)

Alle bekannten TLRs mit Ausnahme von TLR3 benötigen das Adaptermolekül *Myeloid differentiation primary response gene* (MyD) 88 (27-29) für die Signalweiterleitung nach Ligandenbindung. TLR3 benötigt hierfür das Molekül TRIF, für die komplette Funktion von TLR4 sind beide Moleküle, MyD88 und TRIF, notwendig. Außerdem ist MyD88 auch für die Signalwege der Zytokinrezeptoren IL-1-Rezeptor und IL-18-Rezeptor (30) verantwortlich.

Das MyD88-Protein ist im Zytoplasma lokalisiert und besteht aus einer N-terminalen Todesdomäne (*death domain*, DD), einer intermediären Domäne (ID) und einer C-terminalen TIR-Domäne. Diese TIR-Domäne bindet an die TIR-Domäne der TLRs und IL-1R / IL-18R, während die DD andere Proteine über deren DD rekrutiert und bindet.



Nature Review:

Abb. 3: Übersicht aller bei der Maus bekannten MyD88-abhängigen Rezeptoren und ihrer Signalwege, modifiziert nach (31). MyD88 (blaue Balken) ist das Adapterprotein für die Signalweiterleitung aller TLRs außer TLR3 und eines der beiden Adapter von TLR4, sowie der Zytokinrezeptoren IL-1R und IL-18R. MyD88 wird an die intrazelluläre TIR (*Toll/interleukin-1receptor*)-Domäne der Rezeptoren rekrutiert und rekrutiert seinerseits IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*), was eine Signalkaskade auslöst, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und damit zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF führt.

TLRs bilden zur Ligandenbindung Homo- (TLR4, 5, 7-9, auch TLR3) oder Heterodimere (TLR2/1 bzw. TLR2/6). Nach dieser Aktivierung führt die Rekrutierung von IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*) durch MyD88 zu einem Signalweg über IRAK1. TRAF6 (*tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*) und TAK1 (*transforming-growth-factor-β-activated kinase*) werden von UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) und UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*) ubiquitinyliert und aktiviert. Dies aktiviert den IKK-Komplex (*inhibitor of NF-κB kinase*) und schließlich NF-κB sowie die vorgeschalteten

Kinasen von p38 und JNK (*Jun N-terminal kinase*). NF- κ B transloziert nach Aktivierung in den Zellkern und initiiert die rasche Transkription vieler pro-inflammatorischer Gene wie TNF. Eine später einsetzende TNF-Transkription wird zusätzlich über TRAF6 und *Interferon Regulatory Factor* (IRF) 5 ausgelöst. Bei TLR7-9 führt der MyD88-IRAK4-Signalweg zusätzlich über TRAF3 zur Aktivierung von IRF7 und schließlich ebenso wie bei IRF1 zur Freisetzung von Typ I Interferon (31).

Die Funktion von MyD88 kann durch negative Regulatoren inhibiert werden. Dazu gehören MyD88s, eine kürzere Spleiß-Variante des Proteins, die die IRAK4-Rekrutierung stört, sowie FADD (*FAS-associated death domain*) und IRAK-M, welches die Freisetzung von IRAK1 und IRAK4 von MyD88 hemmen kann. MyD88 bindet weiterhin an IRF5 (*Interferon-regulatory Factor 5*) und IRF1. Im letzteren Fall wandert MyD88 mit IRF1 in den Zellkern.

Bei der Signalgebung über TLR2 und TLR4 ist der weitere Adapter MAL (*MyD88-adaptor-like protein*) für die Rekrutierung von MyD88 notwendig. Dieser Prozess wird unter anderem von BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) und SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*) reguliert, welche die Degradierung von MAL fördern (31).

Wie hoch evolutionär konserviert die angeborene Immunität ist, zeigt eindrucksvoll der Süßwasserpolyt (*Hydra vulgaris*), der zu den Nesseltieren (Stamm *Cnidaria*) gehört. Nesseltiere gehören zu den ältesten Tierfossilien, es gibt sie seit mindestens 550 Millionen Jahren. Bereits bei diesen einfach gebauten Mehrzellern ist MyD88 für die Abwehr von Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und die normale Besiedelung mit kommensalen Bakterien notwendig (32). Auch bei Pflanzen sind LRR-Rezeptoren bekannt, die zur Pathogenabwehr beitragen, jedoch unterscheiden sich die Mechanismen von denen der Tiere (33).

Die Wichtigkeit von MyD88 beim Menschen zeigt die schwere Immundefizienz von MyD88-defizienten Patienten, die interessanterweise mit zunehmendem Alter abnimmt (34-36). Vor der Einführung von Antibiotika, Impfungen und passiven Immunisierungen waren von einer solchen Mutation betroffene Kinder vermutlich nicht überlebensfähig und auch heute noch erreichen viele diagnostizierte Patienten wegen invasiver bakterieller Infektionen nicht das Erwachsenenalter. Im Erwachsenenalter jedoch können therapeutische Maßnahmen wie Antibiotikaphylaxe oder Immunglobulin-Gabe häufig reduziert oder abgesetzt werden. MyD88-vermittelte Signalwege scheinen also nach der Jugend, wenn schon ein immunologisches Gedächtnis gegen die meisten Erreger aufgebaut ist, weniger wichtig zu sein als in der frühen Kindheit.

Die Funktionen der Toll-like-Rezeptoren zur Induktion und Modulation der adaptiven Immunität werden als vielversprechende Angriffspunkte für therapeutische Intervention bei verschiedenen Krankheitsbildern untersucht (37). Ein bereits häufig verwendetes Medikament ist der TLR7-Ligand Imiquimod (Aldara®), der bei topischer Applikation sehr wirksam die Immunantwort gegen Basalzellkarzinome und *humane Papillomaviren* aktiviert (38).

1.1.3 Erworbene / adaptive Immunität:

Die erworbene Immunabwehr wird vornehmlich durch lymphoide Zellen geleistet, d. h. von T-Zellen und B-Zellen. Diese Zellen besitzen mit den T-Zell- bzw. B-Zell-Rezeptoren ein enormes Repertoire an Bindungsmöglichkeiten, da sie aus variablen Gensegmenten aufgebaut sind, die während der Zellentwicklung zufällig kombiniert werden. Dieser Prozess wird als somatische Rekombination bezeichnet und führt dazu, dass praktisch jede naive T- bzw. B-Zelle eine andere Rezeptorstruktur hat. Zellen, deren Rezeptor autoreaktiv oder nicht funktionell ist, werden während der Zell-Entwicklung eliminiert (39).

T-Helferzellen ($CD4^+$ T-Zellen, T_H -Zellen) leiten nach ihrer Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen die adaptive Immunantwort ein. Abhängig von der Art des Antigens und des Zytokinmilieus können T-Helferzellen in verschiedene Richtungen differenzieren (Abb. 3): zu klassischen T_H1 - oder T_H2 -Zellen, T_H2 -ähnlichen T_H9 -Zellen oder $T_H17/22$ -Zellen (40).

T_H1 -Zellen sind die Hauptquelle von Interferon (IFN)- γ , was für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen sowie von Tumoren notwendig ist und die Produktion von Chemokinen fördert, die wiederum Phagozyten rekrutieren. T_H2 -Zellen richten die Immunabwehr gegen Parasiten und sind wichtige Auslöser allergischer Entzündungen. $T_H17/22$ -Zellen sekretieren v. a. IL-17A / IL-22. IL-17A hat ähnliche Funktionen wie IFN- γ , es fördert die Sekretion vieler Zytokine und Chemokine und wird sowohl mit Autoimmunerkrankungen als auch mit Allergien in Zusammenhang gebracht. IL-22 induziert lokale Gewebsentzündungen (40) aber kann auch schützende Funktion für Epithelgewebe haben (41).

Häufig, wie auch bei der atopischen Dermatitis, ist nicht nur eine homogene Art von T-Helferzellen beteiligt, sondern es werden sowohl T_H1 - als auch T_H2 -assoziierte Mediatoren produziert (42). Weitere T-Zell-Populationen sind natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen, die über die Freisetzung von IL-10 und *Transforming Growth Factor* (TGF)- β

Immunantworten dämpfen bzw. unterdrücken sowie zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, die als Effektorzellen infizierte oder entartete Zellen zerstören können (40).

Alle bisher genannten T-Zellen besitzen einen sogenannten $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor. Eine andere Gruppe sind die selteneren $\gamma\delta$ -T-Zellen, die weniger gut charakterisiert sind und auch angeborene Immunfunktionen haben können (43, 44).

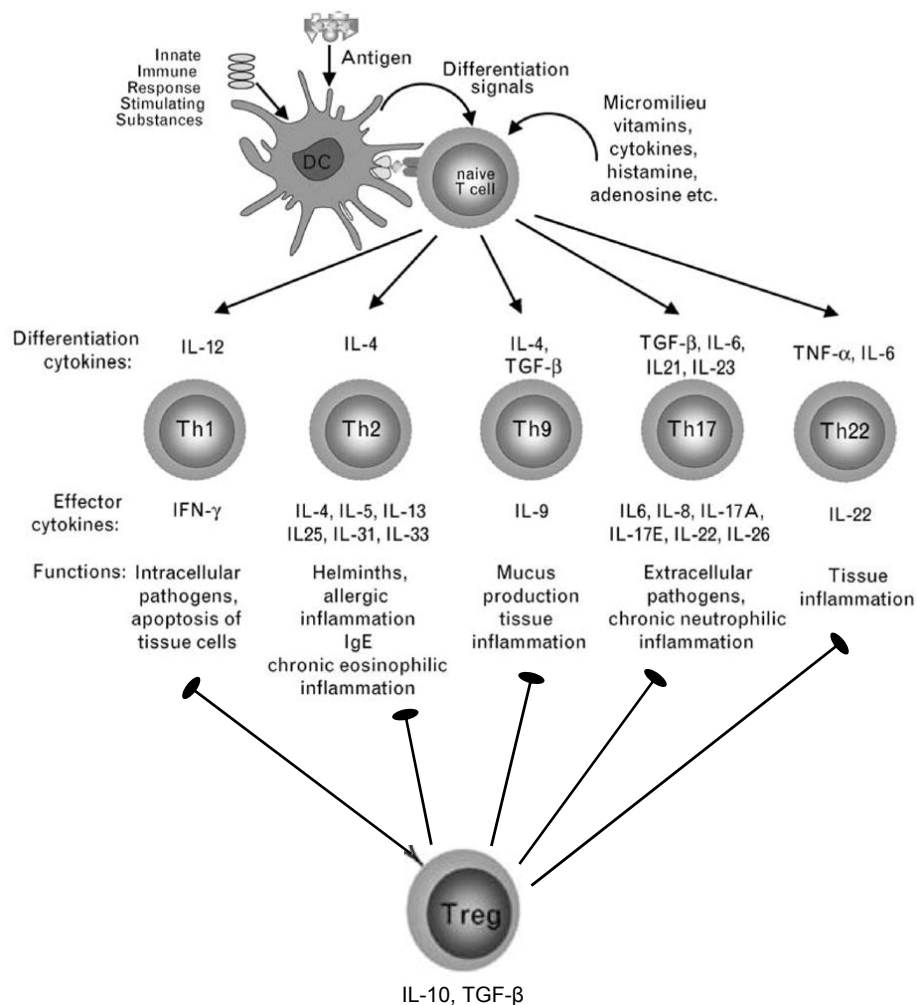


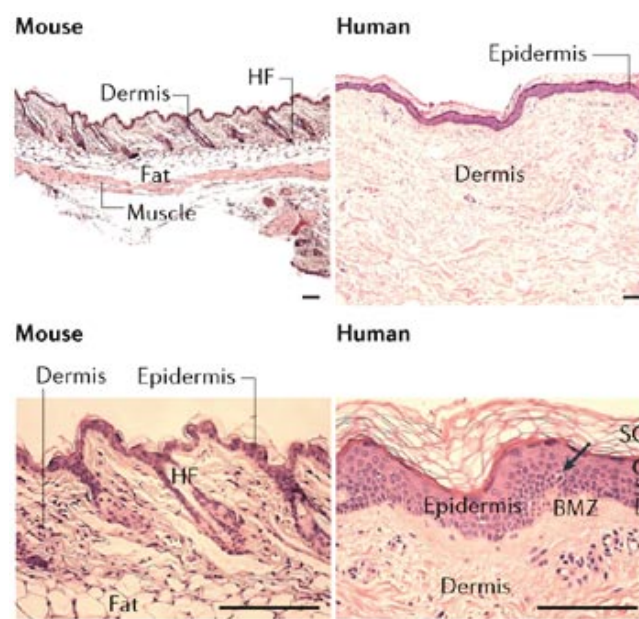
Abb. 4: Diversität von T-Helferzellen. Abhängig von dem jeweiligen Zytokinprofil, der Reaktion auf Chemokine und der Interaktion mit anderen Zellen können T-Helferzell-Populationen verschiedene Arten von Entzündungsreaktionen einleiten. Regulatorische T-Zellen sind eine heterogene Gruppe von T-Zellen mit inhibitorischen Funktionen. Modifiziert nach (40)

T_{H1}- / T_{H2}-Zellen können B-Zellen zur Freisetzung von Antikörpern aktivieren. Es existieren mehrere Klassen von Antikörpern. Zunächst produziert jede B-Zelle Antikörper der Klasse M, ein Klassenwechsel wird durch die beteiligten T-Helferzellen vermittelt. T_{H2}-Zellen induzieren die Produktion von Immunglobulin E (IgE) und IgG1, T_{H1}-Zellen fördern die Produktion von IgG2a / c (45). IgM und bei der Maus auch IgG3 werden als natürliche Immunglobuline bezeichnet, die von B-Zellen ohne vorherige Stimulation durch

T-Helferzellen produziert werden können (46, 47). Antikörper erkennen ihre spezifischen Antigene und können durch Neutralisierung, Opsonisierung oder Komplementaktivierung protektiv wirken (1, 2).

1.2 Haut und Umwelt

Die Haut schützt den Organismus vor äußeren Einflüssen sowie vor Wasser- und Wärmeverlust. Sie besteht aus drei Schichten, die jeweils hauptsächlich aus einem strukturenbildenden Zelltyp aufgebaut sind: der außen liegenden Epidermis (Oberhaut) mit Keratinozyten, der Dermis (Lederhaut) mit Fibroblasten und der innen liegenden Subkutis (Unterhaut) mit Fettgewebe. Abb. 5 zeigt den histologischen Vergleich der Haut von Maus und Mensch. Die Hautstrukturen unterscheiden sich stark in Dicke von Dermis und Epidermis, Haarfollikeldichte, dermalen Architektur und Lokalisation von Melanozyten (48).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Abb. 5: Vergleichende Histologie der Rückenhaut von Maus und Mensch (oben 5x Vergrößerung, unten 20x Vergrößerung). Maßstabsbalken = 100 µm. B = Basalschicht; BMZ = Basallamina-Zone; G = granuläre Schicht; S = Plattenepithelschicht; SC = Stratum Corneum. (48)

1.2.1 Epidermis

Der Haupt-Zelltyp in der Epidermis sind die strukturenbildenden Keratinozyten. Sie werden aus der Basalschicht stetig neu gebildet und durchlaufen mehrere Differenzierungsstadien, die

morphologisch die Schichten der Epidermis charakterisieren. Ausdifferenzierte abgestorbene Keratin- und Filaggrin-reiche Korneozyten (Hornzellen) sind in eine Lipidmatrix eingebettet und bilden so das Stratum corneum (Hornschicht) und damit die mechanische Hautbarriere (49) (Abb. 6). Zwischen den noch lebenden Keratinozyten im darunter liegenden Stratum granulosum (Körnerschicht) sind *tight junctions* ausgebildet, die eine zusätzliche Diffusionsbarriere darstellen, aber über spezielle Poren auch den Flüssigkeitshaushalt der Haut regeln können (50).

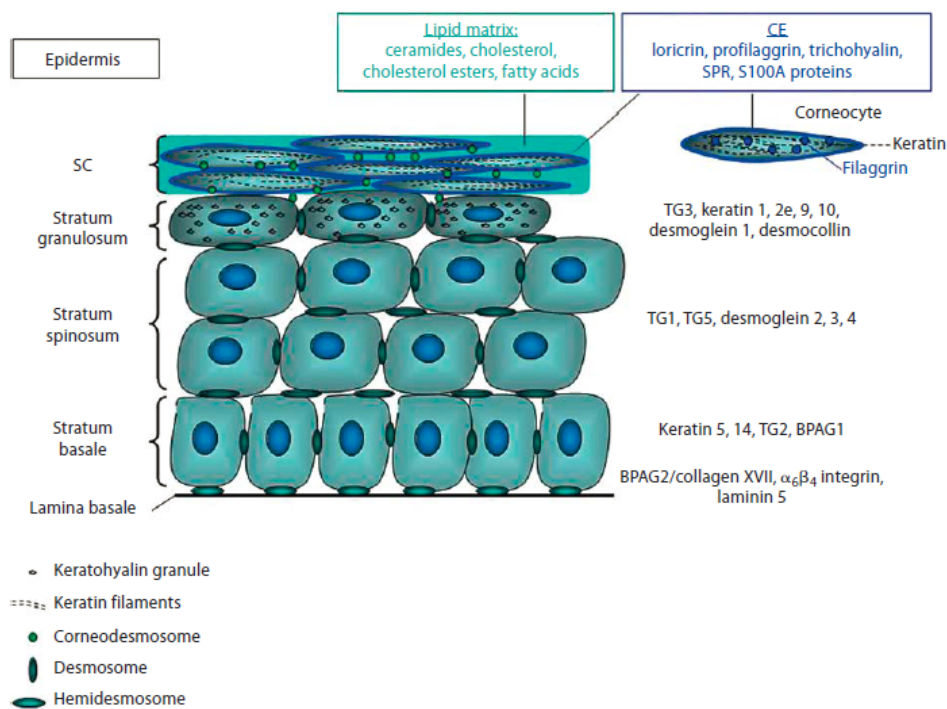


Abb. 6: Schematische Darstellung der Epidermis, nach (49). BPAG = *Bullous pemphigoid antigen*; CE = *cornified envelope*; SC = Stratum Corneum; SPR = *small proline-rich protein*; TG = *transglutaminase*.

Neben der mechanischen Barriere bildet die Epidermis auch eine immunologische Barriere. Auf der Haut finden sich viele antimikrobielle Peptide und Enzyme, die eine Kolonisierung mit pathogenen Mikroben verhindern, jedoch die Besiedelung mit der physiologischen Hautflora erlauben. Dies wird durch die Erkennung von Pathogen-spezifischen Molekülen sowie Toleranzmechanismen gegenüber den Kommensalen möglich (51-53).

Zwischen den Keratinozyten befinden sich folgende Netzwerk-bildende Zelltypen: Melanozyten, Langerhanszellen sowie bei der Maus residente $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem invarianten $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor V γ 3 (54). Ihnen ist gemeinsam, dass sie lange Dendriten ausbilden und damit Zell-Zell-Kontakte herstellen können. Langerhanszellen sind epidermale dendritische Zellen, sie können Antigene aufnehmen und in die Haut-drainierenden

Lymphknoten einwandern, um dort T-Zellen zu aktivieren (55). Den epidermalen $\gamma\delta$ -T-Zellen wird eine Rolle bei der Wundheilung zugeschrieben (56). Sie erkennen vermutlich ein von Keratinozyten freigesetztes Antigen und können auch in die Lymphknoten einwandern (44, 57). Melanozyten sind hauptsächlich für den UV-Schutz zuständig, indem sie Melanin produzieren, was von den Keratinozyten aufgenommen und apikal eingelagert wird, um den Zellkern abzuschirmen und vor UV-induzierten DNA-Schäden zu schützen (58). Daneben verfügen sie aber auch über PRRs und können proinflammatorische Zytokine produzieren (59).

In neuerer Zeit werden den Keratinozyten immer mehr immunologische Funktionen zugeordnet. Nach ihrer offensichtlichen Rolle bei der Wundheilung werden sie auch als aktive Immunmodulatoren gegen Pathogene und andere Noxen beschrieben (60, 61).

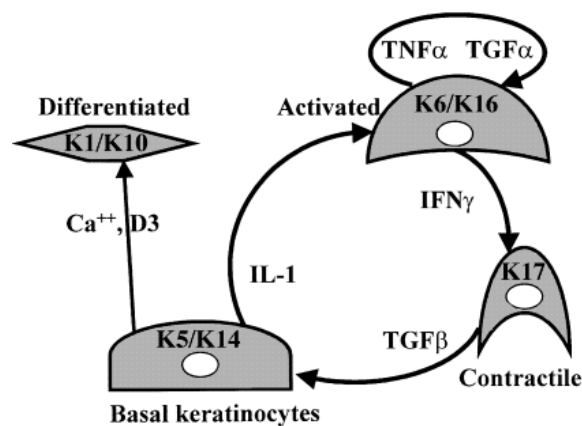


Abb. 7: Der Aktivierungszyklus von Keratinozyten (human) (62). Basale, aktivierte, kontraktile und differenzierte Keratinozyten sind durch die Produktion unterschiedlicher Keratine gekennzeichnet.

Basale Keratinozyten produzieren Keratin 5 (K5) und K14. Sie können Ca^{2+} -abhängig differenzieren und dann K1 und K10 produzieren oder sie können aktiviert werden und dann K6 und K16 produzieren. Keratinozyten produzieren große Mengen an IL-1 (62). Es liegt in diesen Zellen als IL-1-Speicher im Zytoplasma vor (63). IL-1 ist für die Differenzierung von Keratinozyten wichtig, aber auch das primäre Signal für die Keratinozyten-Aktivierung. Bei Beschädigung der Zellen bzw. Aktivierung des Inflammasoms (ein zytoplasmatischer Proteinkomplex, der durch zwei Signale aktiviert wird, z. B. ultraviolette Strahlung und LPS (64)) wird es freigesetzt, um sofort an die IL-1-Rezeptoren der umliegenden Zellen zu binden. Dies aktiviert die Keratinozyten autokrin und parakrin und induziert die Produktion von K6 und K16, die von TNF und TGF aufrecht erhalten wird. Außerdem regt IL-1 die Keratinozyten zur Produktion von GM-CSF an (65). Dieses wiederum ist für die Aktivierung

von Langerhanszellen notwendig (66). Ein weiteres Signal, wie IFN- γ , kann die Produktion von K17 induzieren und Kontraktilität der Keratinozyten fördern. TGF- β ist ein deaktivierendes Signal, das die Rückkehr zum basalen Phänotyp und die erneute Produktion von K5 und K14 einleitet (62).

Humane Keratinozyten können funktionelle TLRs exprimieren (67). In unserer Arbeitsgruppe wurde auch für murine Keratinozyten die Expression von TLR1-4 sowie TLR6 auf RNA-Ebene nachgewiesen (unveröffentlichte Daten). Außerdem können humane Keratinozyten eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen produzieren, was für murine Keratinozyten teilweise noch nicht nachgewiesen wurde. Murine Keratinozyten erweisen sich häufig als schwierig zu isolieren und kultivieren, so dass aus diesem Grund wenige *ex vivo*- bzw. *in vitro*-Daten vorliegen. Da die murine Haut durch das dichte Fell besser geschützt ist als die humane Haut, und da in der murinen Haut residente epidermale T-Zellen vorkommen, die beim Menschen unbekannt sind, wäre es jedoch denkbar, dass murine Keratinozyten durch evolutionäre Anpassung weniger und / oder andere Entzündungsmediatoren freisetzen als humane Keratinozyten.

1.2.2 Dermis

In der Dermis finden sich verschiedene Typen von residenten Immunzellen. Dies sind v. a. Mastzellen, dermale dendritische Zellen, T-Zellen und Granulozyten. Sie liegen vermehrt im oberen Bereich der Dermis, dem Stratum papillare vor (68). Dort setzen die Lymphgefäße an, die zu den Haut-drainierenden Lymphknoten führen (69). Da residente Immunzellen im Falle einer Hautverletzung sofort vor Ort sind, können sie schnell mit der Induktion von Entzündungsreaktionen beginnen, um eine Invasion von Pathogenen und Toxinen einzudämmen und eine Ausbreitung im Körper zu verhindern.

Im Falle einer solchen Entzündung führt die Zytokinfreisetzung zur Migration Antigen-präsentierender Zellen durch die Lymphgefäße in die Haut-drainierenden Lymphknoten, um T-Helferzellen zu aktivieren. Durch von anderen Zellen in der Haut freigesetzte Chemokine werden die T-Helferzellen und weitere Immunzellen wie Phagozyten in die Dermis rekrutiert, um Pathogene und Toxine zu zerstören und die Wundheilung zu fördern.

1.3 Allergien

Allergien oder atopische Erkrankungen werden allgemein als eine hypersensible Abwehrreaktion des Immunsystems an Barriereorganen gegen harmlose Substanzen aus der Umwelt verstanden (70). Dies grenzt sie von Autoimmunerkrankungen ab, welche alle Organe und Gewebe des Körpers betreffen können und nicht von Fremd-Antigenen ausgelöst werden.

Seit über einem halben Jahrhundert wird beobachtet, dass die Prävalenz allergischer Erkrankungen zunimmt, insbesondere in Industrieländern und bei hohem Lebensstandard (Abb. 8a). Dies weist auf eine umweltbedingte Pathogenese der Erkrankung hin (71).

Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis treten häufig assoziiert auf (Abb. 8b). Dieser Effekt, bei dem sich die atopische Dermatitis (AD) meist als erstes manifestiert, wird als „*Atopic / Allergic March*“ (atopischer / allergischer Marsch) bezeichnet (72, 73) und deutet auf die systemische Komponente dieser Erkrankungen hin.

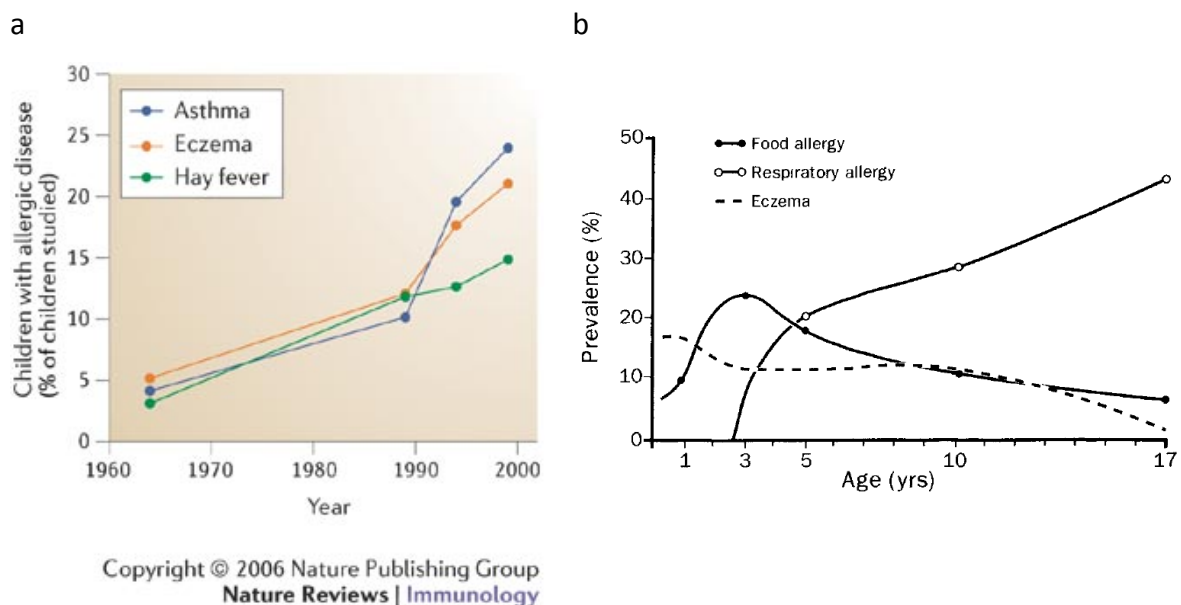


Abb. 8: Epidemiologie allergischer Erkrankungen. a) Steigende Prävalenz atopischer Erkrankungen in Industrieländern wie Großbritannien. (71) b) Atopischer Marsch: Prävalenz von AD, Nahrungsmittelallergie und Allergie der Atemwege in einer Kohorte von 236 Kindern während eines Beobachtungszeitraums von 17 Jahren. (72)

Klassischerweise werden Allergien in vier Typen von Hypersensibilitätsreaktionen eingeteilt, die die Art der Entzündung immunologisch differenzieren. Diese Einteilung wird in neuerer Zeit durch wachsende Kenntnisse über Auslöser und Mechanismen ergänzt (1, 74):

- Typ-I-Reaktionen (Sofort-Typ) sind z. B. allergische Rhinitis (Heuschnupfen) und allergisches Asthma. Sie werden hauptsächlich durch Bindung von Allergenspezifischem IgE an Mastzellen vermittelt. Bei Bindung des Allergens an das IgE-Molekül führt dies zur Degranulierung der Mastzellen und damit Freisetzung von Histamin und anderen Entzündungsmediatoren. Diese führen zu Prozessen in der Mucosa der Atemwege wie Ödembildung, Mucus-Produktion und Bronchokonstriktion, in schweren Fällen Anaphylaxie (d. h. systemische Reaktion bis zum lebensbedrohlichen Kreislaufschock).
- Typ-II-Reaktionen (zytotoxischer Typ) werden vornehmlich durch Medikamente ausgelöst. Sie sind gekennzeichnet durch IgG-Bindung von zellgebundenen Antigenen. Dies führt zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und des Komplementsystems und in der Folge zur Lyse der durch das Antigen gebundenen Zellen.
- Typ-III-Reaktionen (Immunkomplex-Typ) sind beispielsweise allergische Gefäßentzündungen. Sie werden im Gegensatz zu Typ-II-Reaktionen durch lösliche Antigen-Antikörperkomplexe ausgelöst, die ebenfalls das Komplementsystem aktivieren, was die Freisetzung lytischer Enzyme in den Gefäßen bewirkt.
- Typ-IV-Reaktionen (Spättyp) wie das allergische Kontaktekzem werden durch T-Zellen vermittelt. Je nach Art der beteiligten T-Zellen (T_{H1} , T_{H2} , zytotoxisch) werden verschiedene Zytokine ausgeschüttet und weitere Immunzellen aktiviert.

Die atopische Dermatitis (AD) (Abschnitt 1.3.1) ist eine Typ-I / IV-Mischform.

Neuere Forschungen beschäftigen sich mit einer ursprünglich protektiven Funktion „allergischer“ Reaktionen (75) in Barriereorganen wie Haut, Lunge oder Darm. Dabei geht es nicht nur um ihre Rolle bei der Abwehr parasitärer Infektionen durch Immunreaktionen wie die Degranulation von Mastzellen, was Immunmediatoren wie Histamin und lytische Enzyme freisetzt. Eine Parasiteninfektion kann über Expansion regulatorischer T-Zellen interessanterweise zur Minderung allergischer Symptome führen (76). Vielmehr werden auch die Eigenschaften der Allergieauslöser charakterisiert. „Vermeintlich“ harmlose Allergene weisen häufig Strukturähnlichkeiten mit Liganden von Mustererkennungsrezeptoren auf (z. B. ein Hausstaubmilben-Antigen (77)), greifen als Proteasen die Hautbarriere an (z. B. Milbenantigene und Pollen (78)), wirken toxisch (z. B. Gift der Honigbiene (79)) oder karzinogen (viele Kontaktallergene (80)). Daher könnten Abwehrmechanismen, die Allergien auslösen, auch einen positiven Effekt haben, indem sie den Organismus vor solchen Noxen schützen.

1.3.1 Atopische Dermatitis

Atopische Dermatitis (AD, atopisches Ekzem, Neurodermitis) ist eine wiederkehrende entzündliche Hauterkrankung, die vornehmlich im Kindesalter auftritt und mit starkem Juckreiz einhergeht. Aktuell sind 10-20 % der Kinder in Industrienationen betroffen. Die Erkrankung verschwindet häufig während der Pubertät und persistiert bei ca. 3 % aller Erwachsenen (81, 82). Sie kann jedoch auch bei Erwachsenen erstmals auftreten, häufig als berufsbedingte Erkrankung (83).



Abb. 9: Typisches Erscheinungsbild von Hautläsionen bei AD an den Beugeseiten der Gelenke und mit diffusem Umriss (84)

Die meisten AD-Patienten haben stark erhöhte Immunglobulin E-Spiegel als Zeichen einer (Typ-I-) Allergie und weisen eine Sensibilisierung gegen Umweltantigene auf, v. a. gegen Hausstaubmilbenantigene (85). Charakteristisch sind außerdem häufige, das Krankheitsbild verschlechternde Hautinfektionen durch typische Bakterien wie *Staphylokokkus aureus*, Viren wie *Herpes simplex* sowie Mykosen wie *Malassezia furfur* und *Candida albicans* (86). Dies ist einerseits auf eine beeinträchtigte Barrierefunktion der Haut sowie andererseits auf eine Störung der angeborenen Immunabwehr zurückzuführen. Während in der frühen Entzündungsphase eine T_{H2} -vermittelte Immunreaktion vorherrscht, tritt im späteren Verlauf ein T_{H1} -bestimmtes Entzündungsmilieu in der Haut auf (87). Die T-Helferzell-Antwort kann auch gemischt und „dysreguliert“ sein, sodass beide Typen parallel auftreten (88).

Eine Kombination aus genetischen Risikofaktoren im Zusammenspiel mit Umwelteinflüssen begünstigt die Entstehung der Krankheit und kann akute Schübe auslösen. Hierzu gehören zu häufiges Waschen der Haut mit Detergenzien (Störung der Hautflora und -barriere), Luftverschmutzung in städtischen Gebieten (Partikelbelastung), psychischer und körperlicher Stress (Ausschüttung von Cortisol), Ernährungsgewohnheiten, insbesondere Ernährung von Säuglingen und Kleinkindern (Einfluss auf die Darmflora), aber auch die geringe Exposition

gegenüber Mikroorganismen und das seltenere Auftreten von Infektionskrankheiten in den Industrieländern (Hygiene, Impfungen) (89).

Diese Auslöser wurden in der „Hygiene-Hypothese“ (90) zusammengefasst, welche in ihrem Kern weithin anerkannt ist. Jedoch ist die Rolle einiger Umweltfaktoren, v. a. der Säuglings- und Kleinkindernährung, sowie von Infektionskrankheiten noch umstritten. Überdies wurde diese Hypothese für das Auftreten von allergischem Asthma aufgestellt. Neuere epidemiologische Studien ergaben, dass dies nicht uneingeschränkt für die AD gelten muss (91).

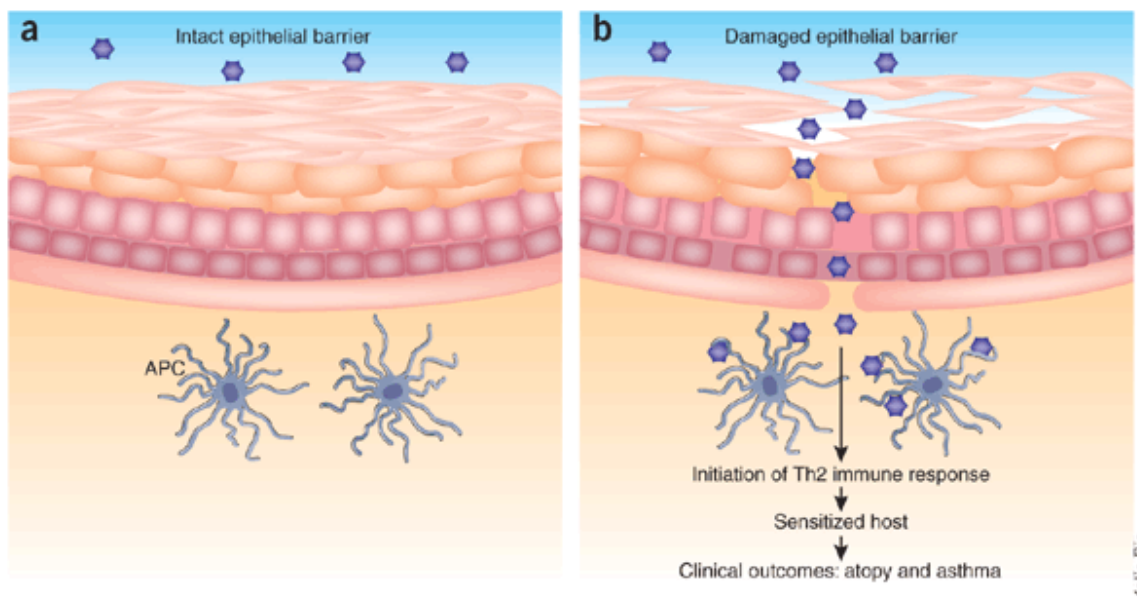


Abb. 10: Schema der Entwicklung von AD. a) Eine intakte Hautbarriere verhindert, dass Allergene an Antigen-präsentierende Zellen gelangen. b) Ein Barrieredefekt erlaubt das Eindringen von Allergenen und deren Aufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen, was zu Sensibilisierung und allergischen Reaktionen führt. (92)

Bemerkenswert ist das seltenere Auftreten von AD und anderen allergischen Erkrankungen bei einem landwirtschaftlichen Lebensstil im Gegensatz zum urbanen Umfeld. Insbesondere der regelmäßige Verzehr von unprozessierter Kuhmilch (93) sowie die Rinderhaltung (94) scheinen eine vor Allergien schützende Wirkung zu haben. Das Bakterium *Acinetobacter lwoffii* kommt typischerweise in der Rinderhaltung vor und verfügt über ein spezielles Lipopolysaccharid (LPS), das vermutlich das Immunsystem so beeinflusst, dass die Ausbildung von Allergien ausbleibt (95). In unprozessierter Kuhmilch könnten sich Spuren dieses Bakteriums bzw. seines LPS befinden, oder bestimmte aus der Rohmilch selber stammende Bestandteile könnten Einfluss auf die Darmflora nehmen.

Somit kann für TLR-abhängige Signalwege eine Rolle bei der Entstehung oder Verhinderung von allergischen Erkrankungen durch langfristige Beeinflussung der epithelialen Immunantworten vermutet werden. In einem Mausmodell für allergisches Asthma wurde bereits die Beteiligung von MyD88 bei der Initiation von T_H2 -Antworten gezeigt (96).

Bedeutsam ist in diesem Zusammenhang auch der Schutz vor AD durch die ausschließliche Säuglingsernährung mit Muttermilch, was zu einer besonderen Darmflora (72) und einem stärker anti-inflammatorischen Zytokinmilieu im Serum (97) des Kindes führt. Viele immunologisch wirksame Bestandteile wie z. B. antimikrobielle Peptide (98), Leukozyten (99) und Antikörper (100) wurden bislang in der Muttermilch identifiziert.

Weitere Arbeiten, die die Rolle von TLRs bei AD untermauern, zeigen, dass das Mikrobiom, d. h. die kommensale Flora, sich bei Kindern im Verlaufe des ersten Lebensjahres oder auch darüber hinaus verändert (101) und dass vorübergehende Veränderungen im Mikrobiom mit akuten AD-Schüben assoziiert sind (102). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Monozyten von erwachsenen AD-Patienten und Gesunden sowie von Kindern mit AD sich in ihrer Antwort auf LPS und SEB unterschieden: Monozyten von AD-Patienten waren stärker aktiviert, aber produzierten deutlich weniger des T_H1 -fördernden Zytokins IL-12 als Kontrollzellen (103).

Ein wichtiger Hinweis auf die Rolle einer genetischen / epigenetischen Prädisposition ist neben der familiären Häufung der Erkrankung die Erkenntnis, dass bereits im Nabelschnurblut Unterschiede zwischen späteren Atopikern und Gesunden beschrieben wurden, z. B. unterschiedliche Zytokinspiegel (104), erhöhte T_H2 -Chemokine (105), weniger regulatorische T-Zellen (106) und erhöhte IgE-Spiegel (107).

Bei AD-Patienten sind einige gehäuft auftretende Genvarianten beschrieben. Zu den die Hautbarriere betreffenden Genen gehören Mutationen im Filaggrin-Gen (108), welches bei der Verhornung der Keratinozyten eine Rolle spielt, *Tight junction*-Defekte durch Polymorphismen des Claudin-1-Gens (109) und weitere mit Keratinozyten-Funktionen assoziierte Gene (110). Auch unter den Immunabwehr-Genen wurden Risiko-Loci identifiziert, so z. B. Polymorphismen des T_H2 -Zytokins IL-13 (111), oder Varianten des Chemokins CCL22 (112).

AD-Patienten haben nach epidemiologischen Studien ein geringeres Risiko für die Entwicklung von Melanomen, dagegen jedoch ein erhöhtes Risiko, an Basalzellkarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen zu erkranken (113). Dabei handelt es sich um von

Keratinocyten ausgehende Tumoren. Dies weist ebenfalls auf eine Dysregulation des Immunsystems hin. Das Immunsystem ist entscheidend für die Eliminierung entarteter Zellen (1), in fortgeschrittenen Tumoren fördern dagegen Zytokine und Chemokine die Immunevasion und Metastasierung (114). Interessanterweise sind zwei Biomarker für Plattenepithelkarzinome auch als Biomarker für AD geeignet (115).

Bei schwerer AD sind Merkmale von Autoimmunität beschrieben, insbesondere der Nachweis von Antikörpern gegen Bestandteile des Hautgewebes (116-118). Dies deutet auf eine gestörte immunologische Toleranz gegenüber körpereigenen Molekülen hin. Möglicherweise existieren trotz der grundsätzlich unterschiedlichen Pathogenese einige mechanistische Gemeinsamkeiten zwischen Allergien und Autoimmunerkrankungen (119).

Die Behandlung von AD-Patienten beschränkt sich weitgehend auf symptomatische Therapien mit dem Ziel, die Hautbarriere zu verbessern und Auslöser zu vermeiden, sowie nach Bedarf entzündungshemmende und anti-infektiöse Medikation (120). Insbesondere bei schweren Fällen mit mehrfacher Allergen-Sensibilisierung und sehr starkem Juckreiz sind die Behandlungsmöglichkeiten unzureichend. Es kann zu großflächigen, schlecht heilenden Hautläsionen kommen, die die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen. Das Risiko für anaphylaktische Schocks ist in schweren Fällen erhöht. Die häufig eingesetzte Behandlung mit Hydrocortison wirkt zwar entzündungshemmend und lässt akute Symptome abklingen, schwächt aber durch diese Entzündungshemmung die Immunabwehr weiter und führt zu einer Atrophie der Haut (121). Neuere Behandlungsansätze z. B. mit Calcineurin-Inhibitoren oder photodynamischer Therapie stehen im Verdacht, langfristig das Risiko von Tumoren und Lymphomen erhöhen, dies ist umstritten (122-124).

1.3.2 Die Rolle von Staphylokokken-Infektionen der Haut bei AD

Bei über 90 % der Patienten ist die Haut dauerhaft mit Toxin-produzierenden Stämmen von *Staphylokokkus aureus* besiedelt, im Gegensatz zu nur ca. 5 % in der Normalbevölkerung (125, 126). Dieses Bakterium und das von ihm sekretierte staphylokokkale Enterotoxin B (SEB) scheint eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung und –progression zu spielen. *Staphylokokkus aureus* wird vom angeborenen Immunsystem vornehmlich über TLR2 erkannt (127). Eine starke Korrelation des Nachweises von SEB mit der Krankheitsentstehung oder

-progression von AD-Patienten wurde vielfach beschrieben (128-130), eine ursächliche Rolle ist jedoch umstritten (131).

Die Eigenschaft eines Superantigens wie SEB ist die Kreuzvernetzung von MHC Klasse II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen mit T-Zellrezeptoren, wodurch eine starke T-Zell-Antwort ausgelöst wird (1). Dies geschieht also ohne, dass das Antigen erst von der Antigenpräsentierenden Zelle aufgenommen, prozessiert und auf dem MHC-Komplex präsentiert werden müsste, und kann bis zum toxischen Schocksyndrom (TSS) mit tödlichem Ausgang führen (132).

Wie SEB vom angeborenen Immunsystem als konventionelles Antigen erkannt werden kann, ist nicht genau bekannt. Klar ist, dass es mit MHCII-Molekülen interagiert (133, 134), vorgeschlagen wurde eine Beteiligung von TLR2 (135) oder TLR4 (136).

Daneben kann SEB offenbar auch die sogenannte neurogene Entzündung verstärken (137), welche durch von Nervenfasern ausgeschüttete Neuropeptide vermittelt wird, indem es zur Proliferation dieser C-Fasern führt und somit u. a. den mit der neurogenen Entzündung verbundenen Juckreiz verstärkt. Hier findet sich also eine Verbindung von Immunsystem und Nervensystem, worauf auch der Begriff Neurodermitis zurückgeht.

1.4 Ziele der Arbeit

Die Prävalenz von Erkrankungen aus dem allergischen bzw. atopischen Formenkreis nimmt in Industrieländern seit Jahrzehnten zu. Sie sind gekennzeichnet durch chronisch-rezidivierende Immunreaktionen auf relativ harmlose Umweltantigene, die sich dauerhaft gewebeschädigend auswirken und zumeist an den Barriereorganen auftreten. Überdies sind Allergien mit einer verminderten Immunabwehr gegenüber infektiösen Keimen assoziiert, die das Krankheitsbild verschlechtern. Ein Grund hierfür sind Störungen der Barrierefunktion, sodass Keime und Noxen leichter in den Körper eindringen können. Die Therapieoptionen sind begrenzt auf symptomatische Medikationen und häufig unzureichend.

Da das angeborene Immunsystem neben Pathogenen auch sterile Gefahrensignale erkennen kann, soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit Signalwege der angeborenen Immunität bei der Fehlleitung der erworbenen Immunabwehr eine Rolle spielen. Die Neurodermitis bzw. atopische Dermatitis ist eine Erkrankung, die vornehmlich im Kindesalter auftritt und häufig die Progression zu weiteren atopischen Erkrankungen wie Asthma im Laufe des Lebens nach sich zieht. Daher erscheint sie zur Erforschung der Ursache atopischer Erkrankungen besonders geeignet.

MyD88 ist ein wichtiges Signalmolekül der angeborenen Immunabwehr, da es für die Funktion vieler Mustererkennungsrezeptoren und einiger Zytokinrezeptoren verantwortlich ist. Hierbei ist besonders die Funktion der epidermalen Zelltypen von Interesse, die den initialen Kontakt des Organismus mit Antigenen / Allergenen eingehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund dieser Vorüberlegungen folgende Fragestellungen behandelt:

- Welche Rolle spielen MyD88-abhängige Signalwege bei der Pathogenese und Progression der atopischen Dermatitis im Ovalbumin-induzierten Mausmodell?
- Wie wirkt sich die atopische Dermatitis im Mausmodell auf die MyD88-abhängige Immunreaktion gegen das staphylokokkale Superantigen B aus, welches für eine Krankheitsprogression bei Patienten verantwortlich gemacht wird?
- Sind MyD88-abhängige Signalwege speziell in epidermalen Keratinozyten von Bedeutung und könnten sie an der Barriestörung beteiligt sein?

So sollen neue Erkenntnisse über das Immunzell-Netzwerk der Epidermis und die Entstehung von Allergien gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien

Markenzeichen TM und Namensrechte ® wurden so weit wie möglich berücksichtigt. Das Fehlen einer solchen Kennzeichnung an Produkten schließt jedoch nicht aus, dass ein Schutzrecht vorliegt.

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Verwendete Geräte

	<i>Hersteller</i>
Absorptions-Mikroplatten-Lesegerät EL800	Bioteck, Bad Friedrichshall
<i>Blotting</i> Apparatur Semi-dry für <i>Western Blot</i>	Scie-Plas, Carl Roth, Karlsruhe
CO ₂ -Inkubator C150 für Zellkultur	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop eclipse TS100	Nikon Instruments, Düsseldorf
Elektrophoresekammern PCR/ <i>Western Blot</i>	Bio-Rad, München
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Essen
Geldokumentationssystem DarkHood DH-40/50	Biostep, Jahnsdorf
Grobwaage Kern	Kern, Balingen-Frommern
Homogenisator Precellys®	Peqlab, Erlangen
Infrarot Imager Odyssey für <i>Western Blot</i>	Li-Cor, USA
Kryostat CM3050 S	Leica, Nussloch
Kühl- und Gefriergeräte	Bosch, Stuttgart / New Brunswick, USA
Mehrfachdispenser-Pipette	VWR, Langenfeld
Mehrkanalpipetten	Abimed, Langenfeld
Multi Skin Test Center MC 750	Courage + Khazaka electronic, Köln
Netzteil für Elektrophorese	Biorad, München
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
octoMacs Zellseparationsmagnet	Miltenyi, Bergisch Gladbach
PCR-Maschine T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Spektrophotometer NanoDrop1000	Peqlab, Erlangen
Sicherheitswerkbank Klasse II für Zellkultur, BDK-SK	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Tecan Infinite® 200 Mikroplatten-Photometer	Tecan Group, Crailsheim
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge 5810R für Mikrotestplatten und 15/ 50 ml-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415R für Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Soweit hier nicht speziell angegeben, wurden Standard-Verbrauchsmaterialien von den Firmen Sarstedt, Nümbrecht und Greiner Bio-One, Frickenhausen verwendet.

Zellkulturgefäße wurden von Greiner Bio-One, Frickenhausen, bezogen.

Tab. 2: Verbrauchsmaterial

	<i>Hersteller</i>
Cutisoft Vlieskompressen vierlagig	BSN Medical, Hamburg
Einbettform für Gewebe-Gefrierschnitte	Sakura Finetek, USA
Einweg-Spritzen	Braun, Melsungen
ELISA Platten, <i>half area</i> , Bindekapazität mittel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ELISA-Platten Medisorp (für Serum)	Nunc, Dänemark
FACS-Röhrchen für Durchflusszytometrie (Falcon)	BD Biosciences, Heidelberg
Gel- <i>Blotting</i> Papier Whatman™	GE Healthcare, Solingen
Glasperlen aus Kalk-Soda-Glas, Ø 1,25-1,55 mm	Carl Roth, Karlsruhe
ImmEdge Stift (Histologie)	Vector Laboratories, USA
Kanülen Microlance	BD Biosciences, Heidelberg
MACS-Säulen „ <i>Large Cell Separation Columns</i> “	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, Na-Heparin	Brand, Wertheim
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, USA
Nitrozellulose-Membran Amersham Hybond™ ECL	GE Healthcare, Solingen
Tegaderm® 1624W Pflaster	3M Medica, Neuss
Zellsiebe 100 µm / 70 µm / 40 µm	VWR, Langenfeld

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen, Puffer

Soweit hier nicht speziell angegeben, wurden Standard-Chemikalien von den Firmen Merck, Darmstadt, Carl Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen.

Tab. 3: Chemikalien

<i>Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>
Universal-Agarose	Peqlab, Erlangen
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, USA
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA Leiter 100bp	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Einbettmedium für Gewebe-Gefrierschnitte	Jung/ Leica Microsystems, Wetzlar
Entellan®	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin Y Lösung, alkoholisch	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin Lösung Gill No. 3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Inject® Alum	Thermo Scientific, USA
Isofluran Forene®	Abbott, Wiesbaden
Mausserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MyTaq HS Red Polymerase Mix	Bioline, Luckenwalde
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS Pulver (nicht für Zellkultur)	Biochrom, Berlin
Primer	Biolegio, Niederlande
Proteinase K	Roche, Mannheim
Proteinstandard Page Ruler, prestained	Fermentas, ThermoScientific, USA
QiaAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rattenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ripa-Puffer	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Wiesbaden
Sybr®Safe DNA Gel stain	Life Technologies, Darmstadt
TAE-Puffer (TrisHCl-Acetat-EDTA), ultrapure	Life Technologies, Darmstadt
TMB One Substrat	Kem-En-Tec, Biotrend, Köln
TMB Plus Substrat	Kem-En-Tec, Biotrend, Köln
Toluidinblau O Certistain	Merck, Darmstadt
Vectashield Hard-Set Einbettmedium mit DAPI	Vector Laboratories, USA

Tab. 4: Selbst hergestellte Lösungen, Puffer, Gele:

	<i>Lösung</i>	<i>Zusätze</i>
Blockierungspuffer: für Immunhistologie	PBS	+ 5 % BSA + 1 % Mausserum + 1 % Rattenserum
Blockierungspuffer: für <i>Western Blot</i>	TBST	+ 5 % Magermilchpulver
Blottingpuffer: für <i>Western Blot</i>	A. dest.	+ 25 mM Tris, pH 8-10,5 + 192 mM Glycin + 20 % Methanol
Carbonatpuffer 0,06 M, pH 9,6: zur Beschichtung von <i>ELISA</i> -Platten	A. dest.	+ 150mM Na ₂ CO ₃ + 350mM NaHCO ₃
Lämmli-Puffer 5x: für <i>Western Blot</i>	A. dest.	+ 50 % Glycerol + 0,3 M Tris, pH 6,8 + 10 % SDS + 0,25 % Bromphenolblau + 20 % β-Mercaptoethanol
Laufpuffer: für magnetische Zellseparation und Durchflusszytometrie	PBS	+ 0,5 % BSA + 0,2 mM EDTA
Lysepuffer: für Schwanzbiopsien zur Genotypisierung für Epidermislysate	A. dest.	+ 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 5 mM EDTA, pH 8,0 + 0,2 % SDS + 200 mM NaCl + 0,1 mg/ml Proteinase K (frisch zusetzen)
Ponceau S-Lösung: für <i>Western Blot</i>	A. dest.	+ 0,1 % Ponceau S + 5 % Essigsäure
Probenpuffer: für Immunhistologie und <i>ELISA</i>	PBS	+ 1% BSA
Sammelgel 6 %: (1,5 ml pro Gel) für <i>Western Blot</i>	A. dest.	+ 0,375 M Tris, pH 6,8 + 6 % Polyacrylamid + 0,13 % SDS + 0,1 % APS + 0,1 % TEMED
Trenngel 10 %: (5,5 ml pro Gel) für <i>Western Blot</i>	A. dest.	+ 0,375 M Tris pH 8,8 + 10 % Polyacrylamid + 0,08 % SDS + 0,07 % APS + 0,1 % TEMED
TBST-Puffer pH 7,5: für <i>Western Blot</i>	A. dest.	+ 7,7 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 150 mM NaCl + 0,3 % Tween20®
TE-Puffer: für DNA aus Schwanzspitzen	A. dest.	+ 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 1 mM EDTA
Waschpuffer: für <i>ELISA</i>	PBS	+ 0,05 % Tween® 20

Sofern hier nicht aufgeführt, sind Konzentrationen einfacher Lösungen in den Methodenbeschreibungen enthalten.

2.1.4 Zellkulturreagenzien und –Stimuli

Tab. 5: Zellkulturreagenzien

	<i>Hersteller</i>
Anti CD117 MicroBeads, mouse	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Anti-CD3 ϵ MicroBead kit, mouse	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Anti-MHC Class II MicroBeads, mouse	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovine Pituitary Extract (BPE)	Life Technologies, Darmstadt
Kollagen A	Biochrom, Berlin
Kollagenase D	Roche, Mannheim
CpG ODN 1668 (Endkonzentration 1 μ M)	TIB Molbiol, Berlin
DNase I	Roche, Mannheim
Endograde Ovalbumin (endotoxinfrei) (Endkonzentration 100 μ g/ml)	Hyglos, Bernried am Starnberger See
Epidermal Growth Factor (EGF, murin rekombinant)	Biochrom, Berlin
Ethanolamin	Biochrom, Berlin
FcR Blocking Reagent	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Hydrocortison	Biochrom, Berlin
Insulin, rekombinant	Biochrom, Berlin
L-Glutamin, low endotoxin	Biochrom, Berlin
LPS <i>E. coli</i> 0111:B4 (Endkonzentrationen 0,01-5 μ g/ ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MCDB 153 Basalmedium	Biochrom, Berlin
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pam3Cys (Endkonzentration 10 μ g/ ml)	EMC Microcollections, Tübingen
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	PAA, Österreich
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Phosphoethanolamin	Biochrom, Berlin
Poly(I:C) (Endkonzentration 100 μ g/ ml)	InvivoGen, USA
Proteaseinhibitor complete mini	Roche, Mannheim
RPMI 1640 Medium	PAA, Österreich
Trypanblau	Sigma, Aldrich, Taufkirchen
Trypsin 0,25 % - 1x EDTA, Phenolrot	Life Technologies, Darmstadt
Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) (Endkonzentration 5-40 μ g/ ml)	Toxin Technology, USA

Tab. 6: Supplementierung der Zellkulturmedien:

<i>Zellkultur</i>	<i>Basalmedium</i>	<i>Zusätze</i>
Keratinocytenmedium:	MCDB 153	+ 2 % FCS + 25 mg BPE/ 500ml Medium + 1 % Penicillin / Streptomycin + 0,5 % L-Glutamin + 50 µM β-Mercaptoethanol + 5 mg/ ml Insulin + 1,4 µM Hydrocortison + 0,1 mM Ethanolamin + 0,1 mM Phosphoethanolamin + 10 ng/ ml EGF (frisch zusetzen)
Immunzellmedium:* / **	RPMI 1640	+ 10 % FCS + 0,5 % Penicillin / Streptomycin + 0,5 % L-Glutamin + 50 µM β-Mercaptoethanol

* Zur Generierung von BMDC:

+ 2 % Zellüberstand der GM-CSF-transfizierten Zelllinie X63-GMCSF (138) ***
 (entsprechend 20 ng/ ml)

** Zur Generierung von BMMph:

+ 10 % Zellüberstand der M-CSF-transfizierten Zelllinie L929 (139) ***
 (entsprechend 10 ng/ ml)

*** Die Mengen von GM-CSF bzw. M-CSF in jeder produzierten Charge wurden mittels Kultivierungstest und/ oder *ELISA* überprüft. Per *ELISA* wurde die genaue Konzentration des Wachstumsfaktors im gewonnenen Zellüberstand bestimmt, im Kultivierungstest wurde der Überstand auf eine optimale Zellausbeute und –Reifung titriert.

2.1.5 Antikörper für Histologie und Durchflusszytometrie

Tab. 7: Antikörper für Histologie und Durchflusszytometrie

	Konjugat	Klon	Verdünnung *	Hersteller
TruStain (CD16/CD32)	Purified	93	1:100	Biolegend, Großbritannien
CD3ε	FITC/ PE/ APC/ PerCP	145-2C11	1:200	Biolegend, Großbritannien
CD4 (L3T4)	APC-Cy7/ Pe-Cy7	RM4-5	1:200	Biolegend, Großbritannien
CD5	APC	53-7.3	1:200	eBioscience, Frankfurt am Main
CD8α	APC/ PerCP	53-6.7	1:100	Biolegend, Großbritannien
CD11b (Mac-1)	PerCP	M1/70	1:200	Biolegend, Großbritannien
CD11c	FITC	N418	1:200	Biolegend, Großbritannien
CD24 (HSA)	Pe	M1/69	1:4000	Biolegend, Großbritannien
CD25 (IL-2Rα)	Pe	PC61	1:500	Biolegend, Großbritannien
CD45R (B220)	APC-Cy7	RA3-6B2	1:200	Biolegend, Großbritannien
CD69 (VEA)	FITC	H1.2F3	1:500	Biolegend, Großbritannien
CD86 (B7-2)	Biotin/ PeCy7	GL-1	1:500	Biolegend, Großbritannien
CD90.2 (Thy-1.2)	PE	30-H12	-/-	eBioscience, Frankfurt am Main
CD117 (c-Kit)	APC	2B8	1:100	eBioscience, Frankfurt am Main
CD117 (c-Kit)	Purified	ACK4	-/-	ImmunoTools, Friesoythe
CD206 (MMR)***	APC	C068C2	1:200	Biolegend, Großbritannien
CD207 (Langerin)	purified	923B7	-/-	Dendritics, Acris, Herford
CD317 (PDCA-1)	APC	927	1:200	Biolegend, Großbritannien
F4/80	Biotin	Cl:A3-1	-/-	eBioscience, Frankfurt am Main
F4/80	PE	BM8	1:200	Biolegend, Großbritannien
FoxP3***	PE	FJK-16s	1:100	eBioscience, Frankfurt am Main
Γδ-TCR	Biotin	GL-3	1:200	Biolegend, Großbritannien
I-A/ I-E (MHCII)	FITC	2G9	-/-	BD Biosciences, Heidelberg
I-A/ I-E (MHCII)	PE/ APC/ PerCP	M5/114.15.2	1:2000	Biolegend, Großbritannien
IgD	FITC	11-26	1:200	eBioscience, Frankfurt am Main
IgM	Pe	R6-60.2	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
Pan-Cytokeratin***	FITC	C-11	1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rat IgG1, κ	PE/ APC	RTK2071	**	Biolegend, Großbritannien
Rat IgG2a, κ	PE/ FITC	RTK2758	**	Biolegend, Großbritannien
Rat IgG2b, κ	PE	RTK4530	**	Biolegend, Großbritannien
Hamster IgG	APC	-/-	**	Biolegend, Großbritannien
anti-rat IgG	TexasRed® / Alexa-488	-/-	-/-	Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin	Alexa-488	-/-	-/-	Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin	PE/ APC-Cy7	-/-	1:200	Biolegend, Großbritannien

* Diese Verdünnungen beziehen sich auf die Durchflusszytometrie. Für Immunhistologie wurden alle Antikörper in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Bei Antikörpern, die nicht für die Durchflusszytometrie verwendet wurden, ist entsprechend keine Verdünnung angegeben.

** Isotypkontrollen wurden entsprechend der Konzentration des zugehörigen verwendeten Antikörpers eingesetzt.

*** Intrazellulärfärbung (CD206 ist sowohl intra- als auch extrazellulär vorhanden)

2.1.6 Antikörper für Western Blot

Tab. 8: Antikörper für Western Blot

	Verdünnung	
Mouse-α-mouse GAPDH	1:10.000	Acris, Herford
Rabbit-α-mouse MyD88	1:500	Enzo Life Sciences, Lörrach
IRDye 680 RD donkey-α-mouse IgG	1:10.000	Li-Cor, USA
IRDye 800 CW goat-α-rabbit IgG	1:10.000	Li-Cor, USA

2.1.7 ELISA Reagenzien, Antikörper

Tab. 9: ELISA-kits

<i>Protein</i>	<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
CCL2 (MCP-1)	ELISA Development Kit	Peprtech, Hamburg
CCL17 (Tarc)	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
GM-CSF	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
IFN-γ	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
IgE	ELISA MAX™ Standard	Biolegend, Großbritannien
IgG2c *	Quantitation Kit	Bethyl, Biomol, Hamburg
IL-1α	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
IL-17A	ELISA MAX™ Standard	Biolegend, Großbritannien
KC	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
TSLP	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden
TNF	DuoSet®	R&D Systems, Wiesbaden

* ersetzt in C57BL/6J-Mäusen den Isotyp IgG2a (140)

Tab. 10: Weitere Immunglobulin-ELISA

**	<i>IgG1</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgM</i>
Beschichtung 2 µg/ ml (<i>purified AK</i>)	Klon A85-3	Klon R2-38	Klon II/41
Standard	Pur. Isotype control 100 ng / ml	Pur. Isotype control 100 ng / ml	Pur. Isotype control 200 ng / ml
Detektion 1 µg/ ml (<i>Biotin-AK</i>)	Klon A85-1	Klon R40-82	Klon R6-60.2

** alle Antikörper der Firma BD Biosciences, Heidelberg

Tabellen 11a-c: Antigen-spezifische Immunglobulin-*ELISA*:**Tab. 11a:** Ova-spezifische Ig-*ELISA*

	<i>Ova-IgE</i>	<i>Ova-IgG1</i>	<i>Ova-IgG2c</i>
Beschichtungspuffer	PBS	PBS	PBS
Beschichtung	pur. α -IgE-AK 2 μ g / ml Klon R35-72, BD	endoOva, 10 μ g / ml, Hyglos	endoOva, 10 μ g / ml, Hyglos
Standard	m- α -Ova AK, 2 μ g / ml Klon 2C6, AbD Serotec, Düsseldorf	Serum nach Ova-Alum-Immunisierung Siehe Tab. 13	Serum nach Ova-Alum-Immunisierung Siehe Tab. 13
Detektion	Ova:HRP, 50 μ g / ml, AbD Serotec, Düsseldorf	α -IgG1-AK Biotin, 1 μ g / ml Klon A85-1, BD	aus IgG2c Quantitation kit, Bethyl

Tab. 11b: SEB-spezifische Ig-*ELISA*

	<i>SEB-IgE</i>	<i>SEB-IgG1</i>	<i>SEB-IgG2c</i>
Beschichtungspuffer	Carbonatpuffer	Carbonatpuffer	Carbonatpuffer
Beschichtung	SEB, 5 μ g / ml, ToxinTech	SEB, 5 μ g / ml, ToxinTech	SEB, 5 μ g / ml, ToxinTech
Standard	Serum nach SEB-Alum-Immunisierung Siehe Tab. 13	Serum nach SEB-Alum-Immunisierung Siehe Tab. 13	Serum nach SEB-Alum-Immunisierung Siehe Tab. 13
Detektion	α -IgE-AK Biotin, Klon R35-118, BD	α -IgG1-AK biotin, Klon A85-1, BD	aus IgG2c Quantitation kit, Bethyl

Tab. 11c: anti-Epidermis-Ig-*ELISA*

	α - <i>Epidermis-IgE</i>	α - <i>Epidermis-IgG1</i>	α - <i>Epidermis-IgG2c</i>
Beschichtungspuffer	Carbonatpuffer	Carbonatpuffer	Carbonatpuffer
Beschichtung	Epidermislysate, 10 μ g / ml	Epidermislysate, 10 μ g / ml	Epidermislysate, 10 μ g / ml
Standard	Nicht verfügbar	Nicht verfügbar	Nicht verfügbar
Detektion	α -IgE-AK Biotin, Klon R35-118, BD	α -IgG1-AK biotin, Klon A85-1, BD	aus IgG2c Quantitation kit, Bethyl

2.1.8 Computerprogramme

Argus X1	Biostep, Jahnsdorf
AxioVision Rel 4.8	Carl Zeiss, Jena
BZ-II Viewer/ Analyzer	Keyence, Essen
Complete Skin Investigation CSI	Courage + Khazaka electronic, Köln
FACSDiva™	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo 7	TreeStar, USA
Gen5	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
MS Office Paket 2010	Microsoft, USA
Photoshop CS5	Adobe Systems, München
Prism 6®	GraphPad, USA

2.2. Versuchstiere

Tab. 12: Verwendete Mauslinien

<i>Linie</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Literatur/ Quelle</i>
C57BL/6J	Wildtyp, WT	eigene Zucht
MyD88knock-out	MyD88ko	(141), eigene Zucht
MyD88lox-stop-lox	MyD88LSL	(142), eigene Zucht
Keratin5Cre	K5Cre	(143, 144), eigene Zucht
MyD88LSL*K5Cre	K5 ^{ind} MyD88	Kreuzung, eigene Zucht
TRIFknock-out	TRIFko	(145), aus Tierhaltung „HET“, Uni Bonn, erhalten
TLR2knock-out	TLR2ko	(146), aus Tierhaltung „HET“, Uni Bonn, erhalten
Stat3flox	Stat3flox	(147), eigene Zucht
DeleterCre	DeleterCre	unveröffentlicht (Förster TU München), eigene Zucht

Alle Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt und unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt.

2.2.1 Generierung Keratinozyten-spezifischer MyD88^{knock-in}-Mäuse

Zur Analyse der Funktion MyD88-abhängiger Signalwege in Keratinozyten *in vivo* wurde mit Hilfe des Cre-lox-Systems eine Mauslinie generiert, die eine Zelltyp-spezifische Re-Expression von MyD88 in Keratinozyten erlaubt. Dazu wurden MyD88LSL-Mäuse (142), bei denen in das erste Intron des MyD88-Gens eine loxP-flankierte Stop-Kassette eingesetzt ist, mit Keratin5Cre-Mäusen (143, 144) verpaart.

Die Stop-Kassette beinhaltet eine Polyadenylierungssequenz, die einen Transkriptionsstop auslöst, sodass keine MyD88-RNA und kein Protein gebildet werden. Die homozygoten Mäuse sind also MyD88-defizient, wie konventionelle *knock-out*-Mäuse (141). Keratin5 (K5) wird in den basalen Keratinozyten exprimiert, also der regenerativen Zellschicht der Epidermis.

In den Nachkommen dieser Verkreuzung, die homozygot für MyD88LSL und heterozygot K5Cre sind (K5^{ind}MyD88), wird die loxP-flankierte Stop-Kassette durch die Cre-Rekombinase in K5-exprimierenden Zellen aus dem Intron entfernt und das MyD88-Gen kann wieder transkribiert werden. Da dieser Vorgang nicht reversibel ist, bleibt das MyD88-Gen funktionell, auch wenn im weiteren Verlauf der Keratinozyten-Proliferation und -Differenzierung die K5-Expression wieder verschwindet.

K5^{ind}MyD88-Mäuse verfügen also über eine Zelltyp-spezifische Expression von MyD88, während die übrigen Körperzellen MyD88-defizient sind.

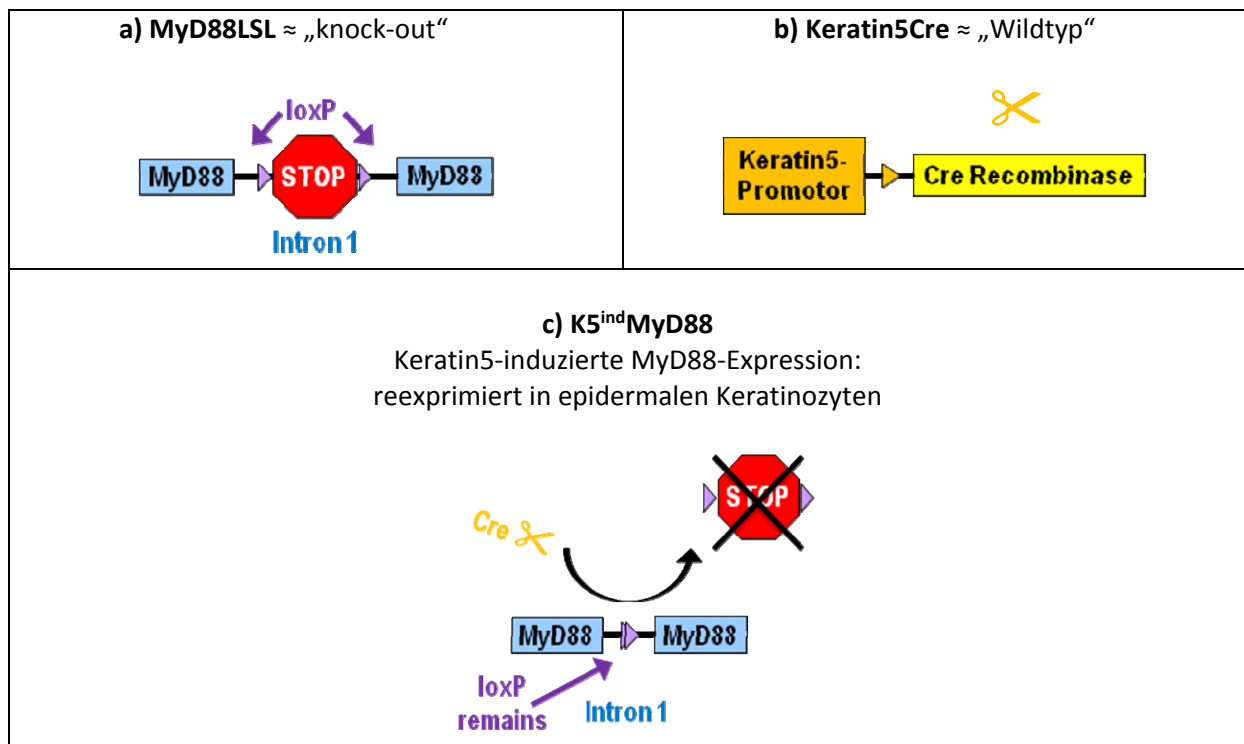


Abb. 11: Zelltyp-spezifische Re-Expression von MyD88 in epidermalen Keratinozyten. Verkreuzung von a) MyD88LSL- und b) Keratin5Cre-Mäusen ermöglicht die Generierung von c) Keratinozyten-spezifischen MyD88knock-in-Mäusen (K5^{ind}MyD88), bei denen das Gen in Keratinozyten wieder funktionell ist.

Der durch Deletion der loxP-flankierten Stop-Kassette entstandene MyD88-Genlocus ist wegen verbleibender Reste der loxP-Sequenzen (Abb. 11c) etwa 150 bp größer als das Wildtyp-MyD88-Gen. Dies erlaubt bei der Genotypisierung die Unterscheidung des Wildtyp-Allels vom Cre-lox-induzierten Zelltyp-spezifischen Allel (Tab. 11 / Tab. 12b).

Dieser Ansatz der Zelltyp-spezifischen Re-Expression bietet gegenüber einer ebenfalls möglichen Zelltyp-spezifischen MyD88-Deletion den Vorteil, dass auch bei nur partieller Cre-lox-induzierter Rekombination ein Phänotyp auftreten kann. Gen-Dosis-Effekte sind für MyD88-Expression nicht bekannt. Darüber hinaus verhindert dieses Vorgehen, dass redundante Mechanismen die Funktion des untersuchten Gens verdecken.

2.2.2 Genetik der Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden unter spezifisch-pathogen-freien (SPF) Bedingungen gehalten und grundsätzlich als Wurfgeschwister verpaart, um die Streuung der Ergebnisse durch genetischen Drift und unterschiedliche mikrobielle Flora möglichst gering zu halten. Das heißt, die Elterntiere wurden so verpaart, dass nach Mendelscher Vererbung in jedem Wurf

Tiere mit allen für die Versuchskontrollen nötigen Genotypen geboren werden können. Daher wurde jedes Tier per Ohrmarkierung registriert und per PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Polymerasekettenreaktion) die genomische DNA aus der Schwanzspitze genotypisiert. Für K5^{ind}MyD88-Mäuse wurde diese Genotypisierung aus Blut wiederholt, um eine Keimbahn-Transmission des Cre-induzierten Wildtyp-Allels auszuschließen (Tab. 13 und Abschnitt 2.2.3). Im Blut wurde das durch K5Cre re-exprimierte MyD88-Wildtyp-Gen dabei nicht nachgewiesen. Zu beachten ist, dass das Keratin5-Protein in der Eizelle vorliegen kann. Daher dürfen keine K5Cre-positiven Weibchen für eine Cre-lox-Verpaarung eingesetzt werden. Denn dies birgt die Gefahr, dass schon in der befruchteten Eizelle eine Cre-lox-Rekombination stattfinden kann und somit die loxP-flankierte Sequenz somatisch und Keimbahn-gängig deletiert werden kann (143). Dies gilt nicht nur für MyD88LSL-Mäuse, sondern für jede loxP-tragende Mauslinie.

Tab. 13: Schematische Darstellung der PCR-Produktbanden bei Genotypisierung von K5^{ind}MyD88-Mäusen und Wurfgeschwistern aus Schwanzbiopsie und Blut

Genotyp und interne Bezeichnung:	MyD88 +/+ (Wildtyp)	MyD88LSL p/p **	K5Cre +/c	MyD88 p/+ **	MyD88 p/+ +/c aus Schwanz- biopsie	MyD88 p/+ +/c aus Blut (**)	K5 ^{ind} MyD88 p/- +/c aus Schwanz- biopsie	K5 ^{ind} MyD88 p/- +/c aus Blut **
Phänotyp:	MyD88 ^{prof}	MyD88 ^{def}	MyD88 ^{prof}	MyD88 ^{prof}	MyD88 ^{prof}	MyD88 ^{prof}	K5 ^{ind} MyD88	K5 ^{ind} MyD88
Allel, Bandengröße:								
K5Cre 300 bp			—		—	—	—	—
MyD88 „WT“ Re-exprimiert durch Cre 492 bp					—		—	
MyD88 Wildtyp 350 bp	—		—	—	—	—		
MyD88 LSL 825 bp		—		—	—	—	—	—

** für AD-Induktion eingesetzte Tiere. MyD88^{prof} = profizient. MyD88^{def} = defizient. Bei K5^{ind}MyD88-Mäusen wurde die Genotypisierung aus Blut wiederholt, um auszuschließen, dass das Cre-induzierte MyD88-„WT“-Allel somatisch vorliegt.

Die Zelltyp-spezifische Re-Expression von MyD88 in K5^{ind}MyD88-Mäusen wurde überdies auf Proteinebene per MyD88-*Western Blot* aus verschiedenen Geweben überprüft (Abb. 45). Um einen Ergebnis-verfälschenden Effekt der Cre-Expression in Keratinozyten auszuschließen, wurde ein Kurzzeit-AD-Versuch mit einem Behandlungszyklus durchgeführt, bei dem MyD88-profiziente Tiere mit den Genotypen MyD88LSL^{p/+}, MyD88LSL^{p/+} K5Cre^{+/-}, MyD88LSL^{+/-} sowie als Kontrolle MyD88-defiziente Mäuse mit dem Genotyp

MyD88LSL^{p/p} (Tab. 13) verglichen wurden. Es ergaben sich keine auffallenden Abweichungen der verschiedenen MyD88-profizienten Genotypen.

2.2.3 Genotypisierung der Versuchstiere

Alle gentechnisch veränderten Mäuse wurden vor Versuchsbeginn per Ohrlochung markiert und per PCR genotypisiert. Dazu wurden ca. 3 mm der Schwanzspitze biopsiert. Das Gewebe wurde in Lysepuffer mit Proteinase K bei 56 °C unter Schütteln für mindestens 2 h inkubiert und anschließend die DNA gefällt: Die Gewebelysate wurden aufgeschüttelt, per Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min) von Haarresten befreit und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde 100 % Isopropanol im Volumen 1:1 zugefügt und die Reaktionsgefäße invertiert, bis die DNA sichtbar ausfiel. Diese wurde erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und die DNA dann durch Zugabe von 70 % EtOH weiter gereinigt und erneut zentrifugiert. Der EtOH wurde vollständig entfernt und die DNA in TE-Puffer aufgenommen und bei ca. 50 °C mindestens 30 min gelöst.

Zum Ausschluss einer Keimbahntransmission des Cre-induzierten Wildtyp-Allels bei MyD88LSL*K5Cre-Mäusen wurde die Genotypisierung von Mäusen mit Cre-induziertem Wildtyp-Allel aus peripherem Blut aus der Schwanzvene wiederholt, da im Blut keine Keratinozyten und somit bei sauberer Probennahme kein K5Cre-induziertes MyD88-Allel vorhanden sein sollte. Hierzu wurden mithilfe eines Skalpell und einer Na-heparinisierten Glaskapillare einige µl antikoagulierte Blut aus der Schwanzvene entnommen und die DNA aus dem Blut mithilfe des QiaAmp Mini DNA Kits isoliert.

Die so gewonnene Schwanzbiopsie-DNA oder Blut-DNA wurde in die den Mauslinien entsprechenden Genotypisierungs-PCRs (Tab. 14a+b) eingesetzt und die PCR-Produkte auf ein 1 % TAE-Agarosegel mit dem DNA-Farbstoff SybrSafe und neben einer 100bp-DNA-Leiter aufgetragen.

Tabellen 14a+b: Reaktionsansatz, Primersequenzen und PCR-Zyklen für die Genotypisierung

Tab. 14a: Reaktionsansatz für Typisierungs-PCR

<i>Reaktionsansatz für Genotypisierungs-PCR à 20 µl mit MyTaq Red Mix:</i>		
4	µl	MyTaq Red-Puffer
0,7	µl	Vorwärts-Primer
0,7	µl	Rückwärts-Primer
0,05	µl	MyTaq Polymerase
13,05	µl	Reinstwasser
1,5	µl	genomische DNA

Tab. 14b: Primersequenzen und PCR-Zyklen für Genotypisierung

Gen bzw. Allel, Bandengröße	Primersequenzen	Denaturierung	Melting	Annealing	Elongation	Ende
MyD88ko: WT ~1000bp	AGACAGGCTGAGTGCAAACCTTGCTG AGCCTCTACACCCTTCTCTTCTCCACA	94 °C 5 min	94 °C 30 s	62 °C 60 s	72 °C 90 s	72 °C 10 min
MyD88ko: ko ~1000bp	AGCCTCTACACCCTTCTCTTCTCCACA ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG	94 °C 5 min	94 °C 30 s	62 °C 60 s	72 °C 90 s	72 °C 10 min
MyD88LSL: WT ~350bp/ 492bp	ACACGTAGCTGCCTGCAGACACAC GGACTCCTGGTTCTGCTGCTTACCT	94 °C 5 min	94 °C 30 s	59 °C 45 s	72 °C 75 s	72 °C 5 min
MyD88LSL: LSL 825bp	CTAGCCTTGGCATATTAATCTTG CTGAAGAGGAGTTTACGTCCAG	94 °C 5 min	94 °C 60 s	62 °C 60 s	72 °C 90 s	72 °C 10 min
Keratin5Cre ~300bp	ATGCCAATGCCCCCTCAGTTTCCT TGCCCCCTTTAATCCCTTCCAGA	94 °C 3 min	94 °C 30 s	62 °C 40 s	72 °C 60 s	72 °C 5 min

2.3 Ovalbumin-induziertes AD-Modell

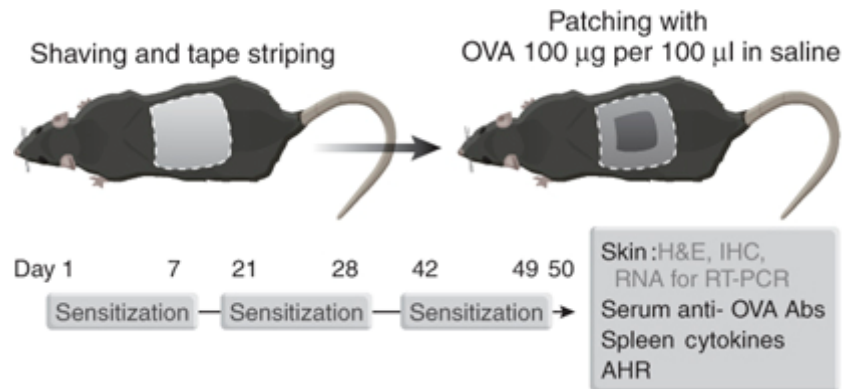
Für die Induktion von AD-Symptomen bei Mäusen stand ein etabliertes Krankheitsmodell zur Verfügung. Dabei wurde über einen Gesamtzeitraum von sieben Wochen die Rückenhaut der per Isofluraninhalation narkotisierten Tiere mehrfach durch Aufkleben und Abziehen eines medizinischen Pflasters gereizt („*tape-stripping*“). Anschließend wurde ein mit 100 µl Antigenlösung (in isotonischer NaCl-Lösung) getränktes steriles Mullstück mit medizinischem Pflaster für eine Woche appliziert (148-150) (Abb. 12). An Tag 1 jeder Behandlungswoche wurden die Tiere rasiert und die Haut viermal durch Aufkleben und Abziehen frischer Pflaster gereizt, an Tag 3 wurde erneut dreimal ein Pflaster appliziert und entfernt, um anschließend ein frisches Mullstück mit neuer Antigenlösung aufzubringen, das an Tag 7 der jeweiligen Woche wieder entfernt wurde. In der dritten Behandlungswoche wurde an Tag 6 (bzw. insgesamt Tag 49), d. h. einen Tag vor Versuchsende, zusätzlich zweimal ein Pflaster appliziert und abgezogen und noch einmal ein frisches Antigen-getränktes Mullstück aufgebracht.

Verwendete Antigene waren 100 µg Ovalbumin (Ova) sowie 5 µg Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), die einzeln und in Kombination verwendet wurden, außerdem wurde eine Kontrollbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung durchgeführt.

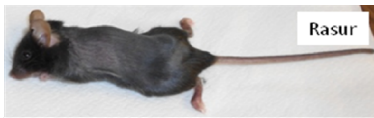
Es wurden drei Zyklen dieser Behandlung durchgeführt, welche jeweils von zwei Wochen Regenerationspause unterbrochen wurden. Nach Ende des Experiments wurden die lokale Hautentzündung, die Immunreaktion in den Haut-drainierenden Lymphknoten, sowie die systemische Antikörperantwort der Tiere ausgewertet.

Es wurden ausschließlich Wurfgeschwister-Weibchen verwendet, die bei Versuchsbeginn ein Alter von ca. 8-10 Wochen hatten. Tiere aus verschiedenen Würfen wurden gleichmäßig auf die verschiedenen Behandlungsgruppen verteilt.

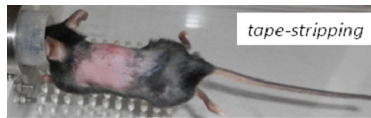
a



b



c



d



Abb. 12: Epikutane Sensibilisierung von Mäusen. a) Schema und Verlaufsprotokoll. Mäuse wurden unter Narkose am Rücken rasiert. Dann wurde die Haut durch mehrfaches Aufkleben und Abziehen eines medizinischen Pflasters gereizt. Anschließend wurde entweder 100 µg Ova in 100 µl isotonischer NaCl-Lösung oder nur die NaCl-Lösung als Kontrolle auf ein steriles ca. 1 cm² großes Mullstück aufgebracht und dieses mithilfe eines weiteren medizinischen Pflasters zwischen den Schulterblättern platziert. Dieses Pflaster wurde in jeder Behandlungswoche am dritten Tag nach erneuter Hautirritation durch ein frisches Pflaster mit neuem Ova-/NaCl-getränktem Mullstück ersetzt. In der letzten Behandlungswoche wurden die Tiere zusätzlich am Tag 49 entsprechend behandelt. Am Tag 50 wurde der Versuch beendet und die Tiere zur Probenentnahme schmerzfrei getötet (149). b-d) Aufnahmen des Behandlungsablaufes

Ova (151, 152) ist das Speicherprotein aus dem Hühnerei. Es gehört zur Proteinfamilie der Serpine (153) und ist ein häufig verwendetes Modell-Antigen und -Allergen. Im Gegensatz zu den meisten Serpinen hat es keine Proteaseaktivität (153). Es induziert im Organismus als Fremdeiweiß überwiegend Th₂-Antworten, wobei die genaue Wirkungsweise nicht gut untersucht ist. Zwar wird Ova physiologischerweise nicht perkutan aufgenommen, jedoch ist eine Assoziation von Ova-Sensibilisierung mit AD bei Patienten gut beschrieben (154). Vermutlich ist an der Erkennung und zellulären Aufnahme von Ova der Mannoserezeptor beteiligt (155, 156).

Das Superantigen SEB von *Staphylokokkus aureus* (157) ist ein wichtiger Faktor für die Krankheitsprogression bei AD-Patienten (128, 129). Auch bei Mäusen wurde bereits beschrieben, dass epikutan verabreichtes SEB Hautentzündungen auslösen kann (158) und in Kombination mit Ova AD-Symptome verstärkt (150). SEB kann als Superantigen T-Zellen aktivieren, hat aber auch andere Funktionen, die bereits in Abschnitt 1.3.2 behandelt wurden.

Um die Rolle von MyD88 bei der Pathogenese und Progression von AD zu untersuchen, wurden diese Antigene einzeln und in Kombination in dem beschriebenen Mausmodell verwendet.

2.3.1 Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)

An Tag 50 nach Beginn der AD-Induktion, d.h. unmittelbar nach dem dritten Behandlungszyklus und ca. 18-24 h nach der letzten Behandlung, wurden die Versuchstiere narkotisiert. Zunächst wurde das Pflaster vom behandelten Hautareal entfernt und 1 min abgewartet, so dass überschüssige Feuchte sich verflüchtigen konnte, danach wurde der transepidermale Wasserverlust (TEWL) als Maß für die Barrierefunktion des behandelten Hautareals bestimmt. Erst anschließend wurden die Tiere zur Probenentnahme schmerzfrei getötet.

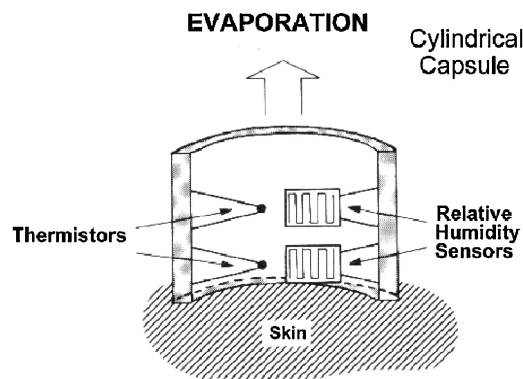


Abb. 13: Prinzip der TEWL-Messung (159). Eine zylindrische Sonde wird auf das zu untersuchende Hautareal aufgelegt. In ihr befinden sich Sensoren, die Temperatur und Luftfeuchtigkeit bestimmen, ein Computerprogramm wertet daraus die Verdunstungsrate aus.

Die TEWL-Messung erfolgte mit Hilfe einer Tewameter®-Sonde. Auch bei gesunder Haut verdunstet stetig eine geringe Menge Wasser, diese Menge steigt schon bei kleinen nicht sichtbaren Verletzungen der Hautbarriere an. Die verwendete Sonde besteht aus einem offenen Zylinder, der auf die Haut aufgesetzt wird (Abb. 13). In ihm befinden sich Feuchtigkeits- und Temperatursensoren, die die Ermittlung der Verdunstungsrate in Gramm Wasser pro Quadratmeter pro Stunde ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$) erlauben. Die Werte können über das Computerprogramm CSI ausgelesen werden.

2.4 Organentnahme und Aufbereitung

Unbehandelte Tiere für *in vitro*-Versuche und Kontrolltiere, sowie Versuchstiere nach AD-Induktion wurden zur Probenentnahme schmerzfrei getötet. Probenentnahmen erfolgten unter aseptischen Bedingungen und Gewebe für Zellkultur wurden bei der Weiterverarbeitung oberflächlich desinfiziert, kühl gehalten und möglichst schnell in Antibiotika-haltiges Kulturmedium überführt.

2.4.1 Blutentnahme

Kleine Mengen Blut können über Punktion der *Vena facialis* im Unterkieferbereich oder durch Anritzen der Schwanzvene auch von lebenden Tieren gewonnen werden. Dies wurde für Genotypisierungen (Abschnitt 2.2.3) und Serum-Immunglobulinspiegel unbehandelter Tiere genutzt.

Während einer Organentnahme am toten Tier kann eine große Menge Blut durch Herzpunktion gewonnen werden. Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut ohne Antikoagulanzen aufgenommen, mindestens 30 min bei RT aufbewahrt und anschließend 2x 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um Serum und koagulierte zelluläre Blutbestandteile voneinander zu trennen. Das Serum wurde bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Haut

Ein ausreichend großes Areal des Rückens (bei Versuchsmäusen das behandelte Hautareal nach Abziehen des Pflasters) wurde freipräpariert und von Unterhautfettgewebe entfernt. Für Gewebeschnitte zur Histologie wurden die Hautstücke in PBS zwischengelagert und anschließend in Einbettmedium für Gefrierschnitte auf Trockeneis senkrecht stehend eingebettet. Solche Gefrierpräparate wurden bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Ohren- und Schwanzhaut für Keratinozytenisolierung

Die Ohren und der Schwanz von unbehandelten oder Versuchsmäusen wurden an der Wurzel abgetrennt und in sterilem PBS auf Eis gelagert. Vor der Verarbeitung wurde das Gewebe zur oberflächlichen Desinfektion ca. 20 s in 70 % EtOH geschwenkt.

2.4.4 Lymphknoten

Die craniale Rückenhaut wird von den brachialen Lymphknoten drainiert, die beiderseits zwischen Schulterblatt und Achselhöhle lokalisiert sind. Sie sind nach Entfernung der Rückenhaut leicht zu finden und freizulegen, da sie auch bei unbehandelten Mäusen relativ groß sind und in diesem Bereich wenig Fettgewebe vorliegt. Die Lymphknoten wurden zur Zellisolierung, durchflusszytometrischen Färbung und Kultivierung in Immunzellmedium aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.4.5 Milz

Die Milz befindet sich bei Mäusen an der linken Flanke im oberen Peritoneum. Sie wurde nach Entnahme in PBS auf Eis gelagert. Milzen von Versuchsmäusen wurden gewogen, um zu untersuchen, ob bei Mäusen nach AD-Induktion wie auch bei AD-Patienten eine Vergrößerung der Milz als Zeichen einer systemischen Immunreaktion vorkommt.

2.4.6 Große Röhrenknochen zur Gewinnung von Knochenmarkszellen

Knochenmark wurde von unbehandelten Tieren entnommen, um daraus *in vitro* Antigen-präsentierende Immunzellen zu generieren. Dazu wurden die großen Röhrenknochen der Beine, *Femur* und *Tibia*, freipräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

2.5 Zellkultur

Primäre Zellen wurden unter einer Sterilbank aus Mausorganen isoliert und entsprechend der erwarteten Zellzahl in einem passenden Volumen Kulturmedium aufgenommen.

Zur Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 in einer 0,1 % Trypanblau-Lösung verdünnt. Diese dringt in tote bzw. perforierte Zellen ein, daher erscheinen diese blau. Die nicht gefärbten, lebenden Zellen wurden mittels Neubauer-Zählkammer quantifiziert und anschließend auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Zentrifugation von Zellen erfolgte stets bei 4 °C mit 300 g für 10 min. Die Kultivierung und Stimulierung lebender Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre (Luftfeuchtigkeit 90 %).

2.5.1 Generierung von dendritischen Zellen oder Makrophagen aus dem Knochenmark

Knochenmark wurde aus den großen Röhrenknochen *Femur* und *Tibia* gewonnen. Die freipräparierten Knochen wurden ca. 10-20 s in 70 % EtOH geschwenkt und dann in kaltem PBS gelagert. Mit einer scharfen Schere wurden die Enden der Knochen entfernt und dann mittels einer RPMI-gefüllten Spritze mit einer 27 g-Kanüle das Knochenmark aus den Knochen in eine Petrischale gespült. Die Knochenmarkzellen wurden durch Resuspension mit einer 1 ml-Pipette vereinzelt, zentrifugiert, in Immunzellmedium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt.

Die Knochenmarkzellen wurden in einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ / 10 ml auf Petrischalen ausgesät und mit 2 % GM-CSF-Überstand für dendritische Zellen oder 10% M-CSF-Überstand für Makrophagen für 6 Tage kultiviert. An Tag 3 wurde erneut 10 ml Immunzellmedium mit GM-CSF oder M-CSF zugefügt.

An Tag 6 wurden die differenzierten unreifen dendritischen Zellen (*BMDC*) aus den Kulturschalen gespült bzw. die Makrophagen (*BMMph*) mithilfe eines Zellschabers geerntet. Die Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von $0,5 \cdot 10^6$ / 500 μ l in 48-well-Platten ausgesät und über Nacht bzw. für 48 h (für Mannoserezeptorexpression von Makrophagen) mit Liganden stimuliert. An Tag 7 bzw. Tag 8 (für SEB-Stimulation von Makrophagen) wurden Zellkulturüberstände für *ELISA* abgenommen und bei -20 °C gelagert, die Zellen konnten geerntet und für die Durchflusszytometrie gefärbt werden.

2.5.2 Isolierung primärer muriner Keratinozyten

Keratinozyten *ex vivo* wurden aus Mausohren und der Schwanzhaut gewonnen. Die übrige Haut erwies sich wegen dichtem Haarwuchs und schlechter Ausbeute als ungeeignet. Die verwendeten Mäuse sollten mindestens 8-10 Wochen alt oder älter sein, da sich die Keratinozyten-Isolierung bei jüngeren Tieren (5-6 Wochen) wegen der Proliferationsphase des Haarzyklus schwieriger darstellt (160).

Ohren wurden in dorsale und ventrale Hautschicht geteilt, der Schwanz wurde mit einem Skalpell der Länge nach aufgeschnitten, um die Haut von Knochen und Gewebe zu befreien. Die so aufgetrennten Hautstücke wurden ca. 90 min in Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um den Verbund von Epidermis und Dermis entlang der Basallamina aufzutrennen. Danach wurde die Epidermis mithilfe einer gebogenen Pinzette isoliert, in 100 μ m-Zellsiebe überführt und darin in Laufpuffer aufgenommen. Das im Laufpuffer enthaltene BSA inhibiert verbliebenes Trypsin, EDTA verbessert die folgende Vereinzelung der epidermalen Zellen.

Mit der Rückseite des Stempels einer sterilen 5 ml-Spritze wurden die Epidermis-Fragmente durch die Zellsiebe gerieben und diese Zellsuspension dann weiter durch 70 µm- und 40 µm-Zellsiebe gefiltert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, in Keratinozytenmedium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt.

2.5.3 Magnetische Aufreinigung epidermaler Keratinozyten

Um eine mögliche Beeinflussung der kultivierten Keratinozyten durch verbliebene Langerhanszellen, epidermale T-Zellen oder Melanozyten auszuschließen, wurden Keratinozyten vor Kultivierung mittels magnetischer Zellseparation (MACS (161)) negativ, d. h. unmarkiert, selektiert.

Dazu wurden mindestens $2 \cdot 10^7$ Zellen (aus vier bis sechs Tieren) nach der Vereinzelung in Laufpuffer für die MACS-Markierung aufgenommen, wie im Herstellerprotokoll beschrieben. Mittels Zugabe von Fc-Blockierungslösung wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper blockiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden anti-MHCII-*beads* (gegen Langerhanszellen), anti-CD117-*beads* (gegen Melanozyten) und anti-CD3ε-Biotin-Antikörper (gegen T-Zellen) zugegeben und 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit Laufpuffer gewaschen (1200 rpm, 4 °C, 10 min), mit anti-Biotin-*beads* (Miltenyi) für die CD3ε-Markierung inkubiert (15 min, 4 °C) und erneut mit Laufpuffer gewaschen. Danach wurden sie in 500 µl frischem Laufpuffer aufgenommen und im octoMACS-Separator-Magnet auf spezielle Trennsäulen für große Zellen (*Large Cell Columns*) übertragen. Die unmarkierten Keratinozyten konnten die im Magneten befindliche Trennsäule passieren und wurden in einem Reaktionsgefäß aufgefangen, während die mit *beads* markierten Zellen zurückgehalten und nach Entfernung der Säule aus dem Magneten in ein frisches Reaktionsgefäß ausgespült wurden.

Der Erfolg der Zellseparation wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Dazu wurden die Proben mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3ε, CD117 und MHCII inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert.

2.5.4 Kultivierung und Stimulierung primärer Keratinozyten

Primäre Keratinozyten wurden entweder nach der Vereinzelung oder nach der magnetischen Aufreinigung in Keratinozytenmedium in kollagenisierten 96-*well*-Flachbodenplatten à $0,25 \cdot 10^6$ / 250 µl oder nicht kollagenisierten *half-area*-Flachbodenplatten à $0,5 \cdot 10^6$ / 100 µl

ausgesät, ggf. Stimuli zugefügt und kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt und die gesammelten Zellkulturüberstände bei -20 °C aufbewahrt.

Die Kollagenisierung erfolgte mit einer 1:1-Mischung von Kollagen A in PBS für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂, anschließend wurden die Kulturplatten einmal mit PBS gewaschen und sofort verwendet.

Die Zellen auf kollagenisierten Kulturplatten wurden an Tag 7 für den MTT-Test verwendet (Mediumwechsel an Tag 2 und 4). Die Zellen in unkollagenisierten Kulturplatten wurden wie beschrieben eine weitere Woche bis Tag 14 kultiviert und erst dann analysiert.

2.5.5 Lymphknotenzellen

Die die obere Rückenhaut drainierenden brachialen Lymphknoten wurden vorsichtig mithilfe einer feinen gebogenen Pinzette präpariert und sofort in RPMI-Medium auf Eis gelagert. Sie wurden in PBS mit 1 mg / ml Kollagenase D und 300 U / ml DNase I versetzt und 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Lymphknoten mit der Rückseite des Stempels einer 5 ml-Spritze durch ein 100 µm-Zellsieb gerieben, gewaschen, in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und ein Aliquot wurde für die Durchflusszytometrie gefärbt.

Die Lymphknotenzellen wurden in einer Dichte von $1 \cdot 10^6 / 250 \mu\text{l}$ in 96-well-Flachbodenplatten ausgesät und mit Antigenen stimuliert: 100 µg / ml endoOva oder 5 µg / ml SEB. Zusätzlich wurde eine unstimulierte Mediumkontrolle aller Proben mitgeführt. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden entweder verworfen oder für die Durchflusszytometrie verwendet.

2.5.6 Proliferations- / Viabilitäts-Test mittels MTT-Farbreaktion

Der MTT-Test ist ein Proliferations- / Viabilitätstest für kultivierte Zellen. Dazu werden die Zellen in definierten Kulturbedingungen mit dem wasserlöslichen schwach gelben Reagenz MTT versetzt, welches von zellulären Enzymen wie Dehydrogenasen und Reduktasen durch Reduktion in den blau-violetten Farbstoff Formazan umgesetzt wird.

In dieser Arbeit wurden in Mikrotestplatten kultivierte Keratinozyten an Tag 7 bzw. Tag 14 zentrifugiert, der Zellüberstand für *ELISA* abgenommen und bei -20 °C gelagert und die Zellen mit frischem Medium + 5 % MTT-Gebrauchslösung (5 mg / ml in PBS) weitere 3 h inkubiert. Eine Negativkontrolle mit Medium + MTT ohne Zellen wurde mitgeführt.

Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Zellüberstand vorsichtig verworfen und die Zellen mit 100 µl Isopropanol + 5 % Essigsäure lysiert. Die so vorbereiteten Mikrottestplatten wurden am Tecan Plattenphotometer zunächst 3 min geschüttelt und dann die Absorption bei 570 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm bestimmt. Bei der Auswertung wurde der Messwert der Negativkontrolle von den Proben subtrahiert.

2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Unterscheidung von Zellen in einer Suspension nach Größe und Granularität. Dazu werden die Zellen einzeln durch eine optische Mess-Zelle geleitet. Weiterhin können durch Einsatz von Lasern Zellen unterschieden werden, die ein- oder mehrfach Fluoreszenz-markiert sind, v. a. durch die Bindung Fluoreszenzfarbstoffgekoppelter Antikörper. Für Immunzellen sind mittlerweile mehrere hundert Oberflächenmarker beschrieben, die unterschiedliche Zellpopulationen oder –Funktionen charakterisieren, und entsprechende Antikörper sind kommerziell erhältlich. Auch intrazelluläre Antigene können so markiert werden. Die Fluoreszenz-Eigenschaften der Suspensionszellen können zur Auswertung als *dot plot* oder Histogramm dargestellt werden und mit Hilfe der Computersoftware können einzelne Populationen nach dem Ein- oder Ausschlussverfahren über mehrere Schritte weiter differenziert werden.

Während dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer FACSCanto II verwendet, welches über sechs verschiedene Fluoreszenzkanäle verfügt. Es wurden pro Messung 10^4 Zellen (bei homogenen Zellproben wie *BMDC*) bis zu 10^5 Zellen (für die Analyse von kleinen Subpopulationen in heterogenen Zellproben, z. B. Lymphknotenzellen) aufgenommen.

Zur durchflusszytometrischen Messung wurden entweder Zellen *ex vivo* isoliert oder aus Kultur geerntet, in Laufpuffer aufgenommen und bei 4 °C gehalten. Ca. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen pro Färbung wurden eingesetzt und in einer 96-well-Rundbodenplatte in 30 µl Volumen mit Fc-Blockierungs-Reagenz versetzt, um unspezifische Bindungen der zu verwendenden Antikörper zu verhindern. Nach 5 min Inkubation bei 4 °C wurden weitere 30 µl einer vorbereiteten Antikörpermischung zugesetzt und weitere 15 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden 100 µl Laufpuffer zugefügt und die Mikrottestplatten zentrifugiert (6 min, 1200 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig durch einmaliges Ausschlagen der Platte entfernt und die Zellen in neuem Laufpuffer aufgenommen.

Bei Verwendung biotinylierter Antikörper folgte noch ein Inkubationsschritt mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Streptavidin für 10 min bei 4 °C mit anschließender Zentrifugation und Aufnahme in neuem Puffer wie beschrieben.

Zur Markierung intrazellulärer Antigene wurden die Zellen nach der Oberflächenmarkierung wie beschrieben zentrifugiert und in PBS + 1 % PFA für 20 min bei RT fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Laufpuffer + 0,01 % Saponin aufgenommen, um die Durchlässigkeit der Zellmembran zu erhöhen, und die entsprechenden Antikörper zugefügt. Nach 20 – 30 min Inkubation bei 4 °C und anschließender Zentrifugation erfolgte ein Wasch-Schritt mit Laufpuffer + 0,01 % Saponin, die Zellen wurden ein letztes Mal zentrifugiert und wieder in normalem Laufpuffer aufgenommen.

Im Falle, dass eine Messung der Zellen am selben Tag nicht möglich war, wurden auch rein Oberflächen-markierte Zellen in PBS + 1 % PFA fixiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Bei noch nicht etablierten Immunfärbungen wurde eine Kontrollprobe mitgeführt, bei der der Antikörper durch einen unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps verwendet wurde.

2.7 Histologie

Aus bei -80 °C gelagerten Gewebepreparaten wurden im Kryostat bei ca. -22 °C 10 µm dicke Querschnitte durch die Haut angefertigt und auf Superfrost-Objektträgern platziert. Nach Trocknung der Gefrierschnitte wurden sie 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und entwässert und bis zur histologischen Färbung bei -80 °C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurden sie aufgetaut und in destilliertem Wasser rehydriert.

Gefärbte Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt und am Keyence BZ-9000 Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung fotografiert. Es wurden je zwei repräsentative Aufnahmen pro Probe bzw. Maus gemacht. Dermale Zellen im Haut-Querschnitt wurden je Bildaufnahme entsprechend 0,25 µm² Fläche ausgezählt. Die Anzahl epidermaler Langerhanszellen und T-Zellen wurde im Haut-Querschnitt je 1 mm Epidermislänge angegeben.

2.7.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Gewebe-Übersichtsfärbung. Sie stellt saure Strukturen wie Zellkerne und Ribosomen blau-violett und basische Strukturen wie Plasma und Kollagen rot dar.

Rehydrierte Gefrierschnitte wurden 10 min in Hämatoxylin gefärbt und 2x kurz in Leitungswasser gewaschen. Dann wurden sie 20-30 s in 70 % Ethanol + 1 % HCl differenziert und 10 min in Leitungswasser gebläut. Durch den hohen pH-Wert des Leitungswassers schlägt die zunächst bräunliche Färbung in blauviolett um. Danach wurden die Schnitte 30 s in 70 % EtOH gespült und 30 s in alkoholischem Eosin gefärbt. Anschließend erfolgte Spülen und Entwässern 2 min in 95 % EtOH und weiter 2x 2 min in 100 % EtOH. Nach Klärung der Schnitte für 5 min in Xylol und Trocknung wurden sie in Entellan eingedeckelt.

2.7.2 Toluidinfärbung

Mithilfe von Toluidinblau können in der Histologie Mastzellen bzw. deren Granula angefärbt werden. Diese erscheinen dann dunkel violett (Metachromasie, in der Haut keine anderen metachromatischen Gewebe), andere Gewebestrukturen erscheinen dunkelblau (orthochromatisch).

Dazu wurden Gefrierschnitte 1 min in destilliertem Wasser geschwenkt, 10 min in 0,01 % wässriger Toluidinblaulösung angefärbt, erneut 1 min in destilliertem Wasser geschwenkt und trocknen gelassen (alternativ in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässern). Anschließend wurden sie mit Entellan eingedeckelt.

2.7.3 Immunfluoreszenz-Färbungen

Gefrierschnitte wurden aufgetaut und vor der Rehydrierung in PBS die einzelnen Schnitte bzw. Objekte auf jedem Objektträger mit einem wasserabweisenden ImmEdge-Stift umrahmt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger 3x 5 min in PBS gewaschen.

Die Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte mit 300 µl Blockierungspuffer pro Schnitt für 30-60 min bei RT und bei einer Biotin-Streptavidin-Färbung zusätzlich mit dem Biotin-Avidin-Blocking *kit*. Alle verwendeten Antikörper wurden 1:100 in Probenpuffer verdünnt eingesetzt. Die Antikörper bzw. Antikörperkombinationen wurden zu 100 µl pro Schnitt für jeweils 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Probenpuffer inkubiert.

Wurde eine Kombination aus direkt und indirekt markierten Antikörpern verwendet, so wurde zunächst der indirekt markierte Erstantikörper, dann der entsprechende Zweitantikörper und zuletzt die direkt markierten Antikörper inkubiert, jeweils unterbrochen von Waschschritten, so dass unerwünschte Bindungen zwischen direkt markierten und Sekundärantikörpern vermieden wurden. Nach der Färbung wurden die Schnitte in aushärtendem DAPI-haltigen

Einbettmedium eingedeckelt. DAPI interkaliert in die DNA und lässt Zellkerne nach Anregung mit UV-Licht fluoreszieren.

Bei noch nicht etablierten Immunfärbungen wurde eine Kontrollprobe mitgeführt, bei der der Antikörper durch einen unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps ersetzt wurde.

2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels *ELISA* wurden in Serum oder Zellkulturüberstand gelöste Proteine spezifisch quantifiziert. Für *ELISA* von Serumproben wurden Nunc Medisorp-Platten verwendet, ansonsten Greiner *half area-ELISA*-Platten, Bindekapazität mittel. *ELISA*-Mikrotestplatten sind mit Polystyrol beschichtet, welches Protein-bindende Eigenschaften besitzt.

Die Platte wurde mit Erstantikörper oder Antigen beschichtet, über Nacht bei RT inkubiert und anschließend 3x mit *ELISA*-Waschpuffer gewaschen und für 60 min mit Probenpuffer abgesättigt. Nach 3x Waschen wurden Serumproben oder Zellkulturüberstände (ggf. in verschiedenen Verdünnungen) und eine siebenstufige Standardreihe mit Negativkontrolle in Doppelbestimmung aufgetragen und 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für Antigen-spezifische Ig erfolgte die Inkubation immer über Nacht. Detektionsantikörper bzw. –Antigen wurden nach erneutem Waschen zugefügt und ebenfalls 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. War der Detektionsantikörper nicht direkt HRP-gekoppelt, sondern biotinyliert, wurde nach erneutem Waschen Streptavidin-HRP zugegeben und 20-30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgten ein letzter Waschschrift und die Farbentwicklung mittels TMB-Substrat, die mit Schwefelsäure gestoppt wurde, sobald eine gut sichtbare Auftrennung der Standardreihe vorlag. Die Absorption wurde im Mikrotestplattenphotometer bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm gemessen. Die Konzentration der Proben konnte dann per Software anhand der Standardreihe berechnet werden.

2.8.1 Referenzseren für die Quantifizierung Antigen-spezifischer Immunglobuline

Für die relative Quantifizierung Antigen-spezifischer Immunglobuline (außer Ova-IgE, dort ein anderes Verfahren, siehe Tab. 11a) wurden standardisierte Seren von Mäusen verwendet, die mit dem Antigen und Alum als Adjuvans immunisiert worden waren.

Für jede zu immunisierende Maus wurden 50 µg Ova bzw. 10 µg SEB in 100 µl sterilem PBS mit 100 µl Alum versetzt und unter wiederholtem Aufschütteln mindestens 30 min bei RT adsorbieren lassen.

Mindestens zehn Wildtyp-Mäusen wurden an Tag 0 und 14 (Ova) bzw. an Tag 0, 14 und 28 (SEB) 200 µl des jeweiligen Antigen-Alum-Gemischs i. p. injiziert, um die Produktion spezifischer Antikörper anzuregen. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere schmerzfrei getötet und eine möglichst große Menge Blut zur Gewinnung von Serum abgenommen. Die Seren wurden vereinigt, ggf. per *ELISA* mit einer vorherigen Charge abgeglichen und anschließend als Standardreihe in den entsprechenden *ELISA* eingesetzt. Dabei wurde eine definierte Verdünnung dieses Referenzserums mit einer bestimmten Zahl relativer Einheiten gleichgesetzt.

Tab. 15: Relative Quantifizierung Antigen-spezifischer Immunglobuline mittels Seren immunisierter Mäuse

	<i>Ova-IgG1</i>	<i>Ova-IgG2c</i>	<i>SEB-IgE</i>	<i>SEB-IgG1</i>	<i>SEB-IgG2c</i>
Verdünnung für höchsten Standardwert	1:500	1:500	1:10	1:100	1:10
Verdünnungsstufen	1:5	1:2	1:2	1:2	1:2
entspricht relativen Einheiten	1000	100	10	100	10

2.8.2 Herstellung eines Epidermislysates für die Detektion von Autoimmun-Antikörpern

Zur Detektion von Autoimmun-Antikörpern gegen Bestandteile des Epidermisgewebes wurde ein Lysat aus der Epidermis von vier unbehandelten weiblichen Wildtypmäusen hergestellt. Dazu wurden Ohren- und Schwanzhaut aufgetrennt und 20 min bei RT in einer 3,8 % Ammoniumthiocyanat-Lösung inkubiert. Danach konnte die Epidermis abgelöst werden und wurde in Lysepuffer + 2 % β-Mercaptoethanol (ohne Proteinase K!) aufgenommen. Das Gewebe wurde in diesem Puffer 15 min im Ultraschallbad aufgeschlossen und anschließend durch ein 100 µm-Zellsieb gerieben. Anschließend wurde die Suspension wie Lysate für den *Western Blot* weiterverarbeitet (Abschnitt 2.9) und die Konzentration per Nanodrop ermittelt. 10 µg / ml Epidermislysate in Carbonatpuffer wurden zur Beschichtung von *ELISA*-Platten verwendet.

2.9 Western Blot

Per *Western Blot* wurde die Proteinexpression von MyD88 in verschiedenen Organen von K5^{ind}MyD88-Mäusen überprüft. Dazu wurden bei -80 °C gelagerte Organe aufgetaut und

100 µg Gewebe abgewogen, zerschnitten, in ein Schraubgefäß mit ~20 Glaskugeln überführt, und mit 40 µl Protease-Inhibitor in 1 ml PBS versetzt. Das Gewebe wurde dann im Precelly's® Homogenisator 4x 30 s bei 6500 rpm homogenisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und anschließend in heißem Wasser oder Heizblock aufgetaut. Danach wurde das Lysat 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und darin die Proteinkonzentration per Nanodrop bestimmt. Die Proteinlysate wurden bei -20 °C gelagert.

Die Proteinlysate wurden per Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt. Das verwendete Polyacrylamidgel bestand aus zwei Phasen: Die Taschen zur Auftragung der Proben bestanden aus einem schmalen gering konzentrierten Sammelgel, dass eine Aufkonzentration der Proben am Anfang der Elektrophorese gestattet. Darunter geschichtet befand sich das dichtere Trenngel, in dem die lysierten Proteine dann der Größe nach aufgetrennt wurden.

Zur Auftrennung per SDS-PAGE wurden alle zu vergleichenden Proben auf die gleiche Konzentration eingestellt und dann vier Teile Lysat mit einem Teil 5x Lämmli-Puffer versetzt. Die so vorbereiteten Proben wurden zur Denaturierung im Heizblock 5 min auf 95 °C erhitzt und danach je 20 µl pro Tasche auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Von dem Proteinstandard wurden 10 µl pro Tasche aufgetragen.

Zur Aufkonzentration der Proben im Sammelgel wurde die Elektrophorese zunächst für 10 min bei 100 V gestartet und anschließend auf 150 V ca. 45-60 min laufen gelassen, bis die Lauffront der Proben das Ende des Gels erreicht hatte.

Eine zugeschnittene Nitrozellulosemembran und vier Lagen zugeschnittenes *Blotting*-Papier wurden in *Blotting*-Puffer getränkt. Zwei Lagen *Blotting*-Papier wurden in die *Blotting*-Apparatur gelegt. Darauf wurde die Membran platziert, das Acrylamidgel vorsichtig darüber geschichtet, und zwei weiteren Lagen *Blotting*-Paper aufgelegt. Mittels einer Glaspipette wurden eventuelle Luftblasen aus dieser *Blotting*-Anordnung entfernt. Das *Blotten* erfolgte bei 20 mA / cm² Gel für 90 min. Dabei wurden durch den Stromfluss die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen.

Mithilfe einer Ponceau S-Lösung wurde die Membran danach für 3 min unter Schwenken angefärbt, um zu kontrollieren, dass die Proteine aus dem Acrylamidgel auf die Membran übergegangen waren, anschließend wurde die Membran unter Schwenken 2x mit A. dest. und 1-2x mit TBST gewaschen, um den Farbstoff wieder zu entfernen.

Vor der Immundetektion der gesuchten Proteine wurde die Membran 1 h unter Schwenken in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der zu verwendenden Antikörper

zu vermindern, anschließend wurde 2x 10 min mit TBST gewaschen. Die Primärantikörper gegen GAPDH (Positivkontrolle) und MyD88 wurden in 2,5 % Magermilch in PBS verdünnt, es konnten beide auf der selben Membran verwendet werden. Die Membran wurde mit 5 ml Antikörperlösung in eine Folie eingeschweißt und 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 10 min in TBST gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper wurden analog zu den Primärantikörpern inkubiert und anschließend die Membran wiederum 3x 10min mit TBST gewaschen. Danach konnten die fertigen *Western Blots* im Infrarot-Imager gescannt werden, um die Fluoreszenz-Signale der gebundenen Antikörper zu detektieren.

2.10 Auswertungen und Statistik

Ergebnisse wurden in der Regel in mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je mindestens drei biologischen Replikaten bestätigt. In Ausnahmefällen war dies nicht möglich und wurde entsprechend kenntlich gemacht als vorläufige Resultate. Abweichend von der angegebenen Stichprobengröße der Versuchsproben wurden unbehandelte Kontrollen / Negativkontrollen meist aus 3-4 biologischen Replikaten analysiert, sofern dies wegen geringer Schwankungen der Daten ausreichend war (z. B. kein entzündliches Infiltrat in unbehandelter Haut). Insgesamt wurden die Versuche zur AD-Induktion bei allen Genotypen und Versuchsgruppen in mindestens vier unabhängigen Experimenten mit je 3-5 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Computergestützte Datenberechnungen wurden mit MS Excel 2010 (Microsoft, USA) durchgeführt und mit Prism 6 (Graphpad Software, USA) grafisch dargestellt. Je nach Art und Streuung der biologischen Daten wurde der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (Stabw) oder Standardfehler (StdF) aufgetragen. Bei Auswertungen mit einzelnen extrem abweichenden Werten wurde die Darstellung von Median und Interquartilen gewählt. Bei Untersuchungen mit großen Schwankungen zwischen einzelnen Experimenten, aber gleichem relativen Ergebnis, wurde ein repräsentativer Versuch dargestellt. Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden ebenfalls mit Prism 6 unter Zuhilfenahme des Student'schen t-Tests bestimmt. Folgende Signifikanzniveaus wurden unterschieden: * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$. Irrtumswahrscheinlichkeiten über der Grenze von 5 % wurden als genaue Werte angegeben.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Rolle MyD88-induzierter Signalwege bei der Pathogenese der AD im Mausmodell untersucht. Zwar wird MyD88 ubiquitär exprimiert, jedoch gibt es Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Funktion (162). Um speziell die Funktion von MyD88 in epidermalen Keratinozyten untersuchen zu können, wurden nicht nur konventionelle MyD88^{knock-out}-Mäuse (141) für die Versuche eingesetzt, sondern auch MyD88-defiziente Mäuse, die eine durch die Cre-Rekombinase induzierte Re-Expression von MyD88 ermöglichen, da sie eine loxP-flankierte Stop-Kassette im ersten Intron des MyD88-Gens tragen (142). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden diese Mäuse mit Keratin5Cre-Mäusen verpaart (144), um MyD88 selektiv in epidermalen Keratinozyten zu exprimieren.

Die Ergebnisse wurden zur besseren Übersicht in drei Abschnitte entsprechend der Fragestellung der Arbeit (Abschnitt 1.4) aufgeteilt.

3.1 Der Phänotyp von MyD88LSL-Mäusen

Die Funktionalität der Stop-Kassette in den MyD88LSL-Mäusen wurde durch Kultur von *BMDC* und Stimulierung mit *TLR*-Liganden und anschließender Messung von TNF im Zellüberstand bestätigt (Abb. 14a). Dabei wurden die homozygoten MyD88LSL^{p/p}-Tiere mit homozygoten MyD88^{knock-out}-Tieren sowie mit den entsprechenden MyD88-profizienten Kontrollen (heterozygote und Wildtyp-Tiere) verglichen.

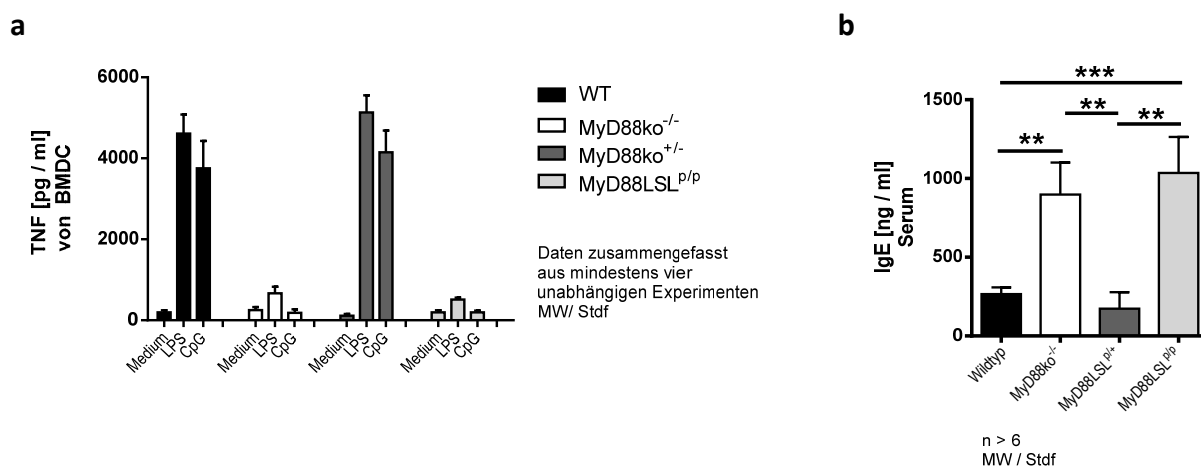


Abb. 14: Vergleich der Linien MyD88^{knock-out} und MyD88LSL. a) TNF-Sekretion nach TLR-Stimulation von MyD88-profizienten und -defizienten *BMDC*. b) IgE-Spiegel im Serum unbehandelter Mäuse.

Es konnte kein phänotypischer Unterschied zwischen den beiden MyD88-defizienten Mauslinien oder den heterozygoten Tieren und Wildtypmäusen festgestellt werden. Auch die IgE-Spiegel im Serum unbehandelter Tiere (Abb. 14b) (163) sowie die Keratinozytenkulturen und AD-Versuche zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden MyD88-defizienten Linien und zwischen den entsprechenden Kontrollen. Auf die Ergebnisse wird in den entsprechenden Abschnitten eingegangen.

3.2 Die Rolle von MyD88 bei der Antigen-Erkennung der verwendeten Allergene

Um zu untersuchen, wie die für die AD-Versuche verwendeten Antigene Ova und SEB Antigen-präsentierende Zellen *in vitro* beeinflussen, wurden aus dem Knochenmark Makrophagen generiert und mit Endotoxin-freiem endoOva oder SEB stimuliert sowie zur Kontrolle verschiedene TLR-Liganden verwendet. Anschließend wurden im Zellüberstand Zytokine per *ELISA* gemessen und die Zellen wurden per Durchflusszytometrie analysiert. Neben MyD88-defizienten und -profizienten Zellen wurden als zusätzliche Kontrolle TRIF^{knock-out}-Zellen sowie TLR2^{knock-out}-Zellen verwendet.

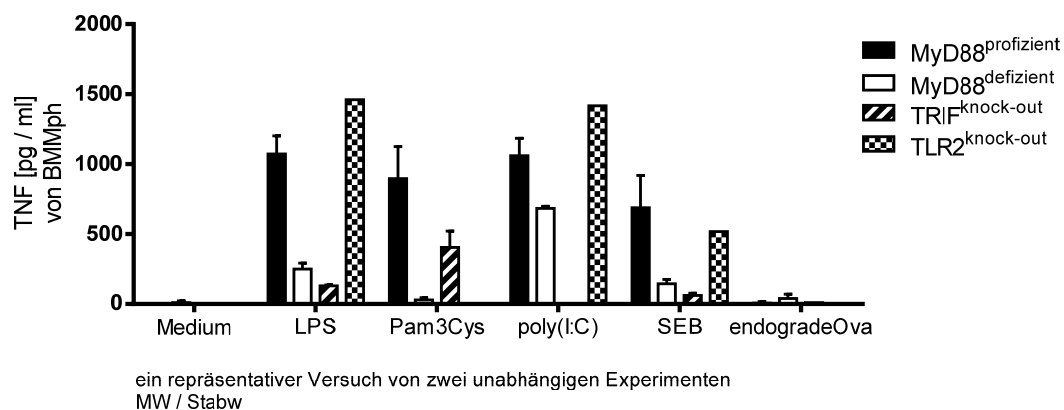


Abb. 15: Zytokinproduktion von Knochenmarks-generierten Makrophagen durch SEB-Stimulation ist sowohl von MyD88 als auch von TRIF abhängig.

Die Messung der TNF-Sekretion nach Stimulation der Makrophagen (Abb. 15) ergab, dass endoOva die Zellen nicht zur Zytokinproduktion aktiviert hatte, also wie erwartet frei von Endotoxin-Rückständen war. Die verwendeten TLR-Liganden verhielten sich ebenfalls wie erwartet. Der TLR4-Ligand LPS war von MyD88 und TRIF abhängig, der TLR2-Ligand Pam3Cys von MyD88 und TLR2, und der TLR3-Ligand poly(I:C) war von TRIF abhängig.

Auch die Stimulation mit SEB führte zu Zytokinfreisetzung, nicht jedoch bei MyD88-defizienten oder bei TRIF-defizienten Zellen. Da das verwendete SEB auf Endotoxin-Rückstände getestet ist, kann LPS-Kontamination als Ursache ausgeschlossen werden. In Makrophagen wird SEB also vermutlich über TLR4 erkannt, was bisher einmal diskutiert wurde (136). Eine Beteiligung von TLR2, die in einer anderen Studie vorgeschlagen wurde (135), ist hier nicht erkennbar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch weitere Rezeptoren, insbesondere auch weitere TLRs, eine Rolle spielen, dazu müssten z. B. weitere TLR^{knock-out}-Zellen analysiert werden.

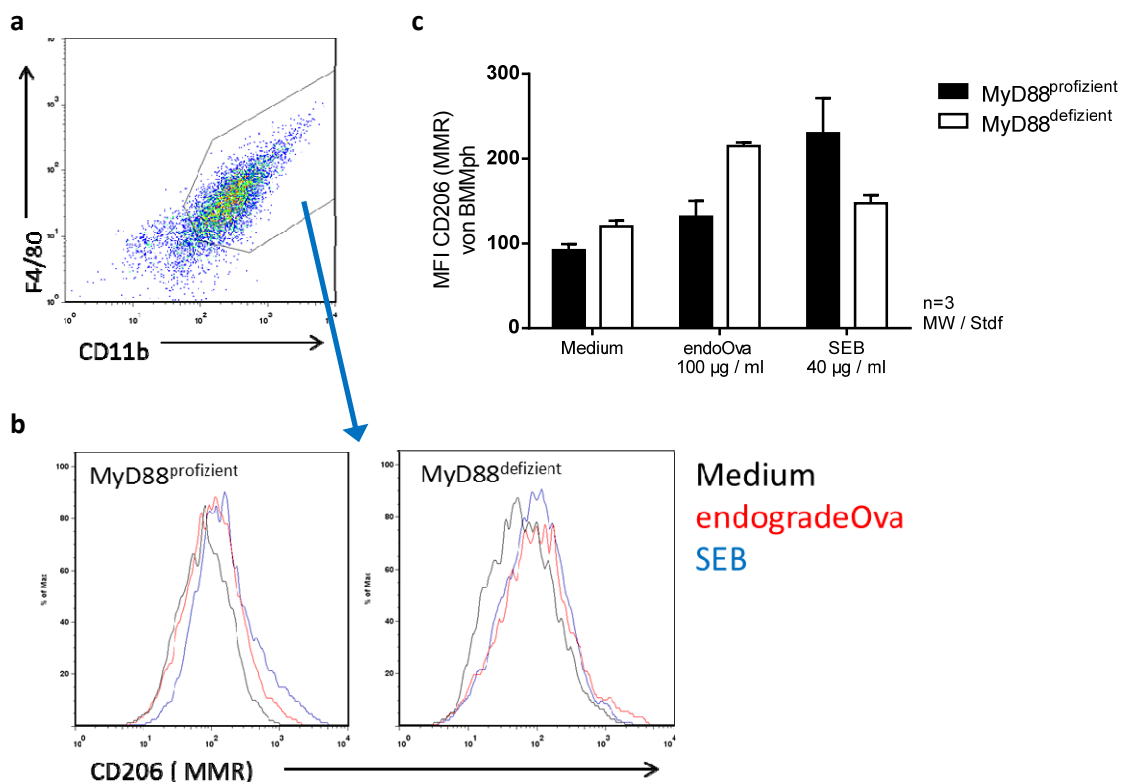


Abb. 16: Expression des Mannoserezeptors auf Knochenmarks-generierten Makrophagen nach 48 h Stimulation mit Endotoxin-freiem Ova oder SEB, vorläufige Ergebnisse. a) Makrophagen wurden als CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen definiert und b) die Fluoreszenzintensität des Mannoserezeptors MMR (CD206) wurde als Histogramm dargestellt. c) zeigt die quantitative Auswertung der Expressionsstärke des Mannoserezeptors.

Da neuere Erkenntnisse eine Rolle des Mannoserezeptors bei der Erkennung und zellulären Aufnahme von Ova implizieren (156) und für den Mannoserezeptor weiterhin eine Rolle bei der Entstehung von Allergien beschrieben wird (155), wurden die aus dem Knochenmark generierten und mit Allergenen stimulierten Makrophagen (Abb. 15a) durchflusszytometrisch auf die Expression des Mannoserezeptors (Abb. 16b) untersucht. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Verwendung einer Isotypkontrolle sichergestellt. Der größte Teil der

Makrophagen exprimiert den Mannoserezeptor. Ein prozentualer Anstieg der MMR⁺-Zellen war daher nicht aussagekräftig. Deswegen wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität analysiert, die die Expressionsstärke widerspiegelt. Hierbei wurde festgestellt, dass beide Allergene, sowohl SEB als auch das endoOva, das keine Zytokinfreisetzung induziert, die Expression des Mannoserezeptors im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen leicht verstärken (Abb. 16b). Interessanterweise ergab die Quantifizierung, dass endoOva in MyD88-defizienten Zellen zu einer stärkeren MMR-Expression als in MyD88-profizienten Zellen führte, während bei SEB das Gegenteil der Fall war, hier reagierten MyD88-profiziente Zellen deutlich stärker (Abb. 16c). Dies könnte mit der Ausprägung stärkerer TH₂- und fehlender TH₁-Antworten in MyD88-defizienten Tieren korrelieren und möglicherweise auf eine verstärkte Ausprägung von allergischen Immunantworten in MyD88-defizienten Mäusen hinweisen, da der Mannoserezeptor an der Entstehung von Allergien beteiligt ist (155).

3.3 Der Immunstatus von naiven MyD88-defizienten Mäusen

Unter SPF-Bedingungen zeigten MyD88-defiziente Mäuse keinen offenkundigen Phänotyp, abgesehen von gelegentlich auftretendem leicht verzögertem Wachstum. Sie konnten ein ähnliches Alter wie Kontrolltiere erreichen. MyD88-defiziente Weibchen waren jedoch fast infertil und wiesen in Verpaarungen eine hohe verfrühte Sterblichkeit auf. MyD88-defiziente Männchen hingegen waren normal fortpflanzungsfähig. Heterozygote Mäuse sind MyD88-profizient und mit Wildtypen vergleichbar.

Um festzustellen, ob bei naiven MyD88-defizienten Tieren bereits ein immunologischer Phänotyp vorliegt, der auf eine veränderte Pathogenese von Allergien hinweisen könnte, wurden die Immunglobulinspiegel von MyD88-defizienten und -profizienten Tieren bestimmt (Abb. 17).

Besonders die bei allergischen und parasitären Erkrankungen beteiligten IgE-Antikörper (Abb. 17a) waren in MyD88-defizienten Tieren gegenüber den Kontrollen stark erhöht (163), wie auch das ebenfalls mit TH₂-Antworten assoziierte IgG1 (Abb. 17b). Hingegen gab es keine bedeutsamen Unterschiede bei dem TH₁-assoziierten IgG2c (Abb. 17c), sowie den „natürlichen“ (T-Zell-unabhängigen) IgM-Antikörpern (Abb. 17e). Die Spiegel der ebenfalls T-Zell-unabhängigen IgG3-Antikörper (Abb. 17d) waren bei MyD88-defizienten Mäusen niedriger als bei den Kontrollen.

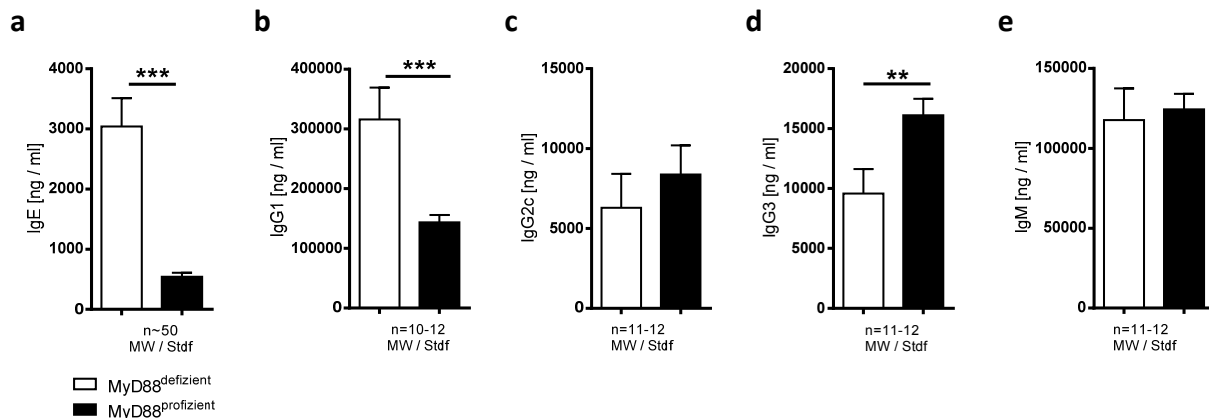


Abb. 17: Immunglobulinklassen in MyD88-profizienten und –defizienten Mäusen. IgE (a) und IgG1 (b) sind in MyD88-defizienten Tieren erhöht gegenüber den Kontrollen, IgG3 (d) ist erniedrigt, IgG2c (c) und IgM (e) sind unverändert.

Die Haut naiver MyD88-defizienter Tiere unterschied sich histologisch nicht von den Kontrollen. Auch die zelluläre Zusammensetzung der Haut-drainierenden brachialen Lymphknoten war in MyD88-profizienten und –defizienten Mäusen vergleichbar. Die entsprechenden Analysen unbehandelter Tiere wurden in die Untersuchungen in Abschnitt 3.4 mit eingeschlossen.

Erhöhte IgE-Spiegel beim Menschen sind beim sogenannten Hyper-IgE-Syndrom bekannt, das mit leichten Fehlbildungen, AD-ähnlichen Hautveränderungen und rezidivierenden Infektionen einhergeht. Es entsteht durch Mutationen im STAT3-Gen (164), einem Transkriptionsfaktor, der die Zellproliferation und auch Kanzerogenese fördert (165). Um zu untersuchen, ob dies auch bei der Maus der Fall ist und ob eine mechanistische Verbindung zum Phänotyp MyD88-defizienter Mäuse besteht, wurden STAT3-defiziente Mäuse generiert. Dies war möglich durch Verkreuzung von STAT3flox-Mäusen (147) mit DeleterCre-Mäusen, die eine ubiquitäre Deletion der loxP-flankierten DNA-Sequenz ermöglichen. Eine heterozygote STAT3-Deletion wirkt dominant negativ (147), eine homozygote STAT3-Deletion ist embryonal letal (166). Es wurden IgE-Spiegel in Seren von STAT3-Wildtyp- und STAT3-heterozygoten Wurfgeschwistern gemessen. Stat3-heterozygote Mäuse hatten erhöhte IgE-Spiegel im Serum, jedoch war dieser Anstieg wesentlich geringer als bei MyD88-defizienten Mäusen (Abb.18, vgl. Abb. 17a). Eine STAT3-Nullmutation führt außerdem zum Fehlen einer IL-17A-Produktion (167), was auch bei MyD88-defizienten Mäusen der Fall ist (168, 169). Die weitere vergleichende Analyse MyD88-defizienter und STAT3-defizienter

Mäuse könnte daher zusätzliche Erkenntnisse über Verbindungen beider Signalwege sowie die Pathogenese von allergischen u. a. Erkrankungen ermöglichen.

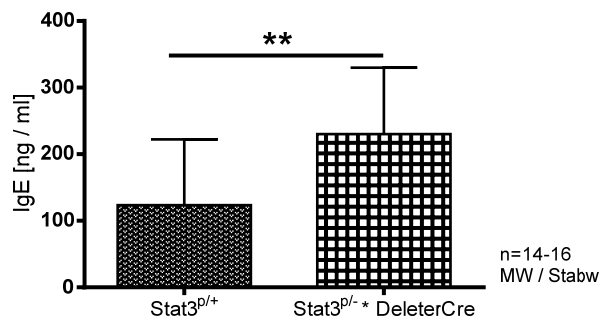


Abb. 18: IgE-Spiegel bei STAT3-defizienten Mäusen (Stat3^{p/-}*DeleterCre) sind höher als bei Wurfgeschwisterkontrollen.

3.4 Ova-induzierte AD in MyD88-defizienten Mäusen

Für die AD-Induktion bei der Maus wurden die Versuchstiere in drei Behandlungszyklen über einen Gesamtzeitraum von sieben Wochen behandelt. Die Rückenhaut wurde wiederholt durch Aufkleben und Abziehen eines Pflasters (Tegaderm) gereizt, dann wurden auf einem sterilen Mullvlies (Cutisoft) die in NaCl gelösten Allergene Ova und / oder SEB aufgebracht und diese mit einem weiteren medizinischen Pflaster auf der gereizten Haut befestigt. Kontrolltiere wurden entsprechend nur mit dem Lösemittel NaCl behandelt. Am Ende des Versuches wurden die Tiere schmerzfrei getötet und die behandelte Haut, die Haut-drainierenden brachialen Lymphknoten sowie das Serum auf Parameter einer allergischen Immunreaktion untersucht.

3.4.1 AD-Symptome in der Haut

Makroskopisch erschien die Haut der über sieben Wochen behandelten Tiere meist leicht schuppig, teilweise gerötet und gelegentlich gab es leichte oberflächliche Läsionen mit der Freisetzung von etwas Lymphflüssigkeit in das aufgebrachte Mullvlies. Teilweise waren die Pflaster bereits von den Tieren selbst durch Kratzen beschädigt oder entfernt worden. Dies sollte jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis haben, da das Vlies unter den Pflastern ohnehin einen Tag nach der Applikation trocken erschien, d. h. die Antigenlösung bereits in die Haut eindiffundiert war. Eine Quantifizierung dieser makroskopischen Beobachtungen war wegen der Schwierigkeit einer Standardisierung nicht möglich.

Für Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) als Maß für die Barrierefunktion der Haut stand in einem Experiment eine Tewameter-Sonde zur Verfügung (Abb. 13). Dabei wird die Verdunstungsrate der Haut durch Auflegen einer Mess-Sonde bestimmt. Bei einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion der Haut steigt der TEWL-Wert an.

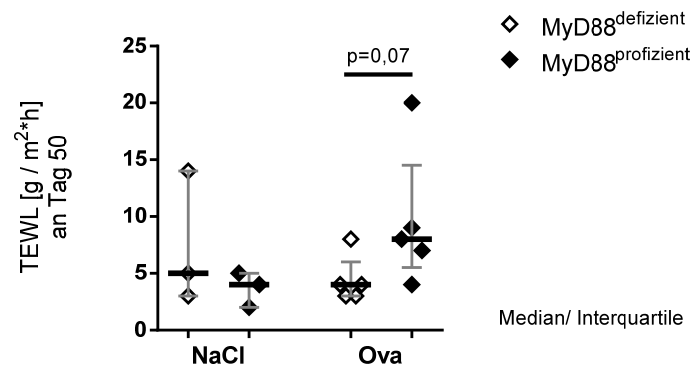


Abb. 19: Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) an Tag 50 (Ende der AD-Induktion). Die MyD88-profizienten Ova-behandelten Tiere zeigten tendenziell einen höheren Wert, d. h. stärkere Barrierschädigung, als die Tiere der anderen Versuchsgruppen.

Diese TEWL-Messung ergab in den MyD88-profizienten Mäusen nach Ova-Behandlung höhere Werte als in den anderen Versuchsgruppen, was auf eine stärkere Barriestörung der Haut hinweist. Zum Vergleich: der TEWL-Wert naiver Mäuse nach Rasur der Rückenhaut beträgt $\sim 1 \text{ g / m}^2 \cdot \text{h}$. Das Gerät zur TEWL-Messung stand nur bei einem Versuch zur Verfügung. Da die Messwerte schwankungsanfällig sind, sollte der Versuch wiederholt werden, um das Ergebnis zu bestätigen. Möglicherweise beeinflusst MyD88 im AD-Modell die Keratinozytendifferenzierung, die großen Einfluss auf den transepidermalen Wasserverlust hat (170).

Zur histologischen Beurteilung entzündlicher Veränderungen der Haut nach AD-Induktion wurden Gefrierschnitte angefertigt, die die behandelten Hautareale im Querschnitt zeigen. Mittels verschiedener histologischer Färbemethoden wurden Struktur und Immunzellen in diesen Gewebeschnitten dargestellt.

Mit Hilfe einer HE-Färbung konnte die für AD typische Verdickung der Epidermis quantifiziert werden (Abb. 20). Während in der NaCl-behandelten Kontrollgruppe nur eine leichte MyD88-unabhängige Verdickung der Epidermis auftrat, war die Epidermis nach Ova-Behandlung in MyD88-profizienten Tieren noch deutlich stärker verdickt (Akanthose). Diese Akanthose entsteht durch Hyperproliferation der Keratinozyten als Reaktion auf die

Barrierestörung. Darüber hinaus waren kleine interzelluläre Ödeme (Spongiose) erkennbar (Abb. 20b, Pfeile), welche ebenfalls ein typisches Merkmal von AD-Läsionen sind (171).

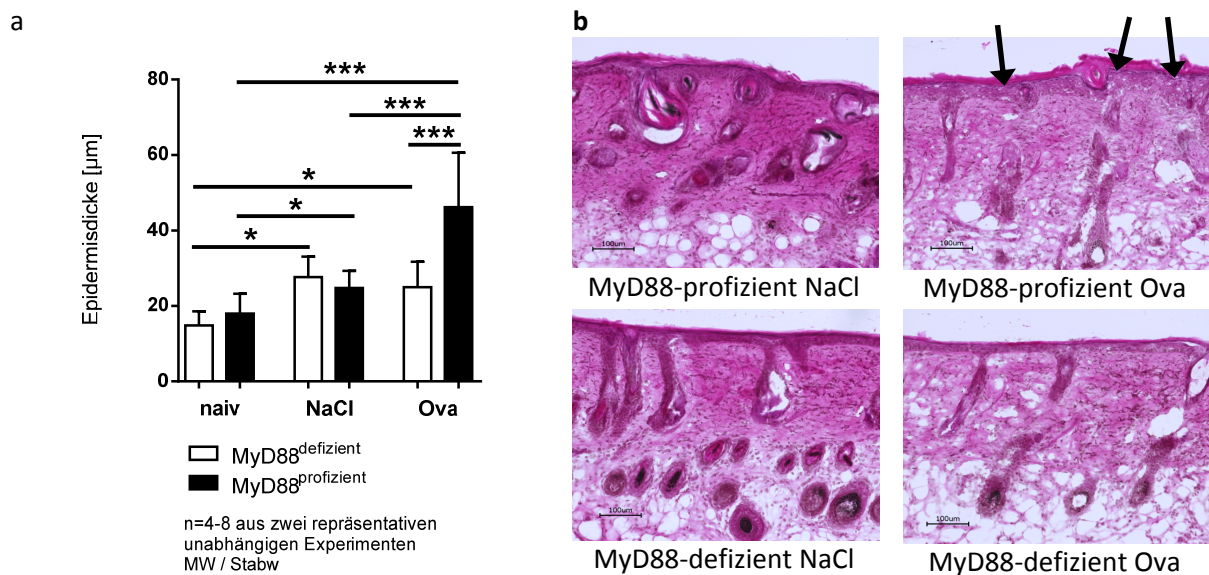


Abb. 20: Epidermisdicke des behandelten Hautareals nach AD-Induktion. a) Bei MyD88-profizienten Mäusen führte Ova-Behandlung zu einer signifikant verdickten Epidermis gegenüber den übrigen Versuchsgruppen. b) HE-gefärbte Haut, repräsentative Aufnahmen. Pfeile weisen aus Spongiose hin.

Dieses Ergebnis weist im Hinblick auf die TEWL-Messung darauf hin, dass durch die Hyperproliferation der Keratinozyten die Barrierestörung nicht ausgeglichen werden konnte. Darüber hinaus impliziert diese Beobachtung, dass die induzierte Barrierestörung nicht nur von der Hautirritation und Antigenapplikation abhängig war. Da der TEWL bei MyD88-defizienten Mäusen geringer als bei MyD88-profizienten Mäusen war, scheint durch eine MyD88-abhängige Immunreaktion die Barrierestörung verstärkt bzw. die Wiederherstellung der Barriere gehemmt zu werden.

Immunhistologisch wurde die Dichte der Langerhanszellen in der Epidermis ausgewertet (Abb. 21). Diese nehmen in die Epidermis gelangende Antigene auf und wandern anschließend in die Haut-drainierenden Lymphknoten ein. Daher sinkt ihre Anzahl in der Epidermis während der AD-Induktion. Die chronische Hautirritation und NaCl-Behandlung führte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen auch schon zu einer Verminderung der epidermalen Langerhanszellen. Dieser Effekt war jedoch nicht MyD88-abhängig.

Die Anzahl der verbliebenen Langerhanszellen in den MyD88-profizienten Mäusen nach Ova-Behandlung war wie erwartet deutlich vermindert gegenüber den NaCl-behandelten Kontrollen. In MyD88-defizienten Mäusen war die Anzahl der Langerhanszellen nach Ova-

Behandlung nicht signifikant verändert gegenüber den NaCl-Kontrollen. Dies bedeutet, dass die Ova-induzierte Emigration der Langerhanszellen aus der Epidermis MyD88-abhängig ist.

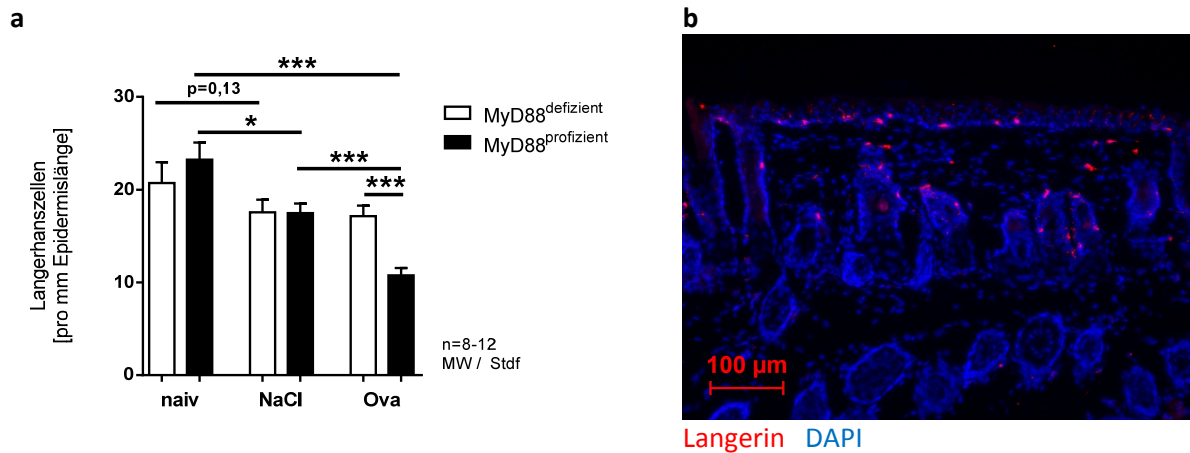


Abb. 21: Langerhanszellen in der Epidermis a) In MyD88-profizienten Mäusen nimmt nach Ova-Behandlung die Frequenz der Langerhanszellen gegenüber den Kontrollen ab. Dieser Effekt ist in MyD88-defizienten Mäusen nicht erkennbar. b) Immunhistologisch angefärbte Langerhanszellen in unbehandelter Maushaut.

Ein weiterer Typ von epidermalen Immunzellen sind residente T-Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind (172). Die Dichte dieser Zellen in der Epidermis wurde ebenfalls ausgewertet (Abb. 22). Es gab keinen Unterschied in der Anzahl der T-Zellen zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Möglich wären Unterschiede in der Aktivierung bzw. Zytokinproduktion dieser Zellen, dies könnte per *ELISA* aus einem Proteinlysats des behandelten Hautareals untersucht werden.

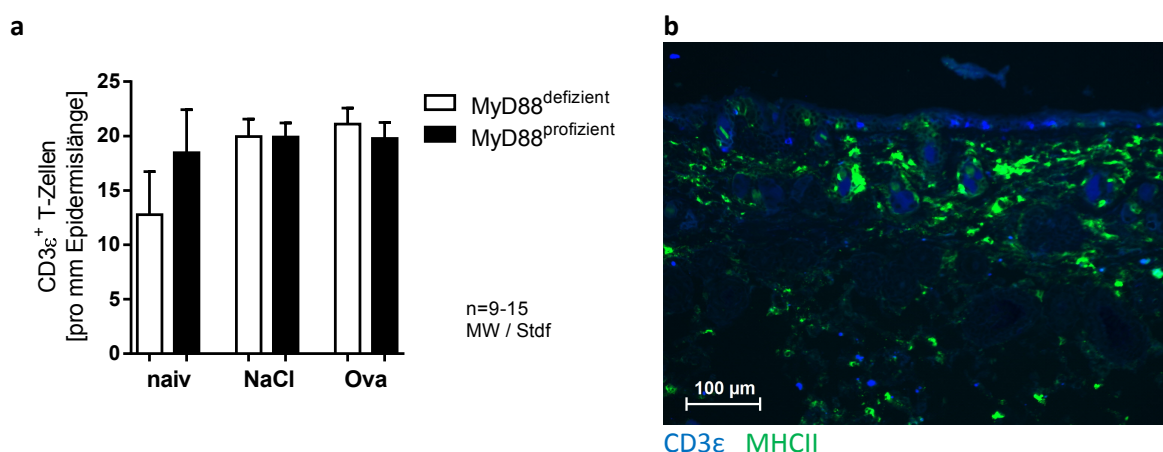


Abb. 22: Epidermale T-Zellen. a) Ova-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Anzahl epidermaler T-Zellen. b) Immunhistologisch angefärbte T-Zellen in der Haut.

In die Dermis wandern bei Entzündungen zahlreiche Immunzellen ein und bilden so das entzündliche Leukozyten-Infiltrat, das auch in der HE-Färbung als Übersicht dargestellt werden kann. Um dieses Infiltrat zu differenzieren, wurden weitere histologische und Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt.

Mastzellen spielen eine große Rolle bei allergischen Erkrankungen. Sie degranulieren nach Bindung von IgE-Antikörpern und setzen dabei u. a. Histamin frei. Neben Vasodilatation und Ödembildung tragen Mastzellen vermutlich auch zur Auslösung von Juckreiz bei. Mastzellen können einfach und spezifisch mit Toluidinblau angefärbt werden und erscheinen dann rot-violett im sonst bläulich gefärbten Gewebe. Wie in Abb. 23 gezeigt, war die Anzahl der Mastzellen in der Haut schon nach chronischer Hautirritation und NaCl-Behandlung sowohl in MyD88-profizienten als auch –defizienten Mäusen gleich stark erhöht. Zusätzliche Ova-Behandlung führte zu keinem weiteren Anstieg der Mastzell-Zahl in der Dermis. Daher ist die Anzahl von Mastzellen in diesem Modell kein Parameter für eine Ova-induzierte allergische Entzündung. Möglich wäre, dass die Ova-Behandlung die Freisetzung von Mediatoren durch Mastzellen beeinflusst. Dies wurde jedoch hier nicht näher untersucht.

Eine immunhistologische Färbung des Mastzellmarkers c-Kit (CD 117) ergab ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt), jedoch können c-Kit-positive Zellen in der Dermis auch basophile Granulozyten sein, weswegen der Toluidinfärbung der Vorzug für die systematische Auswertung gegeben wurde.

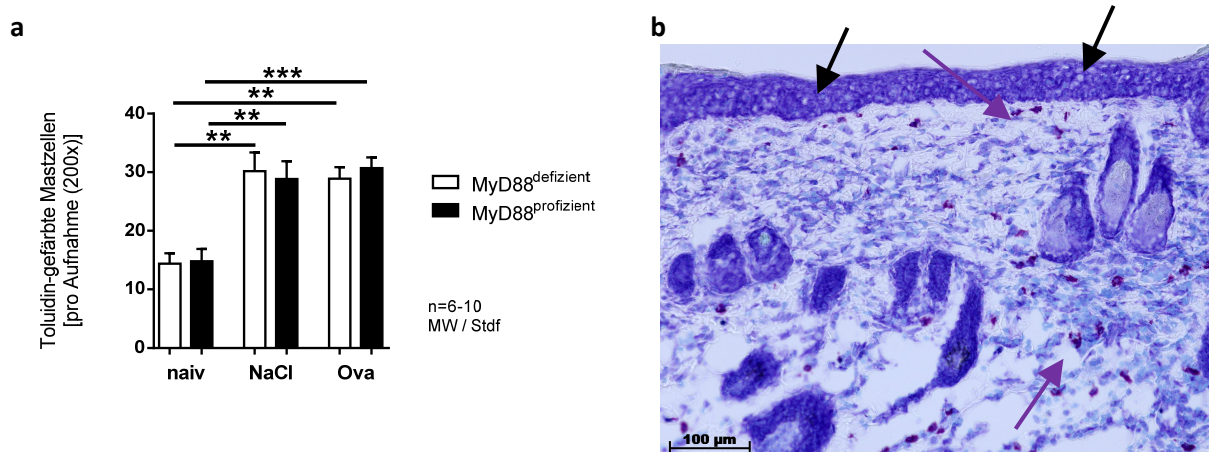


Abb. 23: Mastzellen in der Haut. a) Die Anzahl der Mastzellen in der Haut war nach chronischer Hautirritation angestiegen, jedoch unabhängig von Antigen oder Genotyp. b) Exemplarische Aufnahme gereizter Haut: Toluidin färbt die Mastzellgranula rot-violett an (violette Pfeile), in der Epidermis ist auch hier die Spongiose (interzelluläre Ödeme, schwarze Pfeile) nach AD-Behandlung gut sichtbar.

Makrophagen wandern in Entzündungsherde ein und können Antigene, Pathogene und zerstörte Zellen aufnehmen und abbauen. Sie wurden in der Haut immunhistologisch durch Färbung des Makrophagenmarkers F4/80 nachgewiesen und quantifiziert (Abb. 24). Da auch dendritische Zellen F4/80 exprimieren können, wurde in einem AD-Versuch zusätzlich eine Doppelfärbung mit dem Oberflächenmarker CD11c durchgeführt, der dendritische Zellen definiert. Da keine $F4/80^+$ $CD11c^+$ doppelt positiven Zellen auftraten, kann angenommen werden, dass es sich bei den dermalen $F4/80^+$ Zellen in dieser Analyse rein um Makrophagen handelt.

Wiederholte Hautirritation ohne Antigenbehandlung führte zum Influx von Makrophagen unabhängig von MyD88. Nach zusätzlicher Ova-Behandlung gab es bei MyD88-profizienten Mäusen einen weiteren Anstieg der Makrophagenzahl, was auf eine stärkere Entzündung hindeutet. In MyD88-defizienten Mäusen dagegen gab es keine Veränderung gegenüber NaCl-behandelten Kontrolltieren.

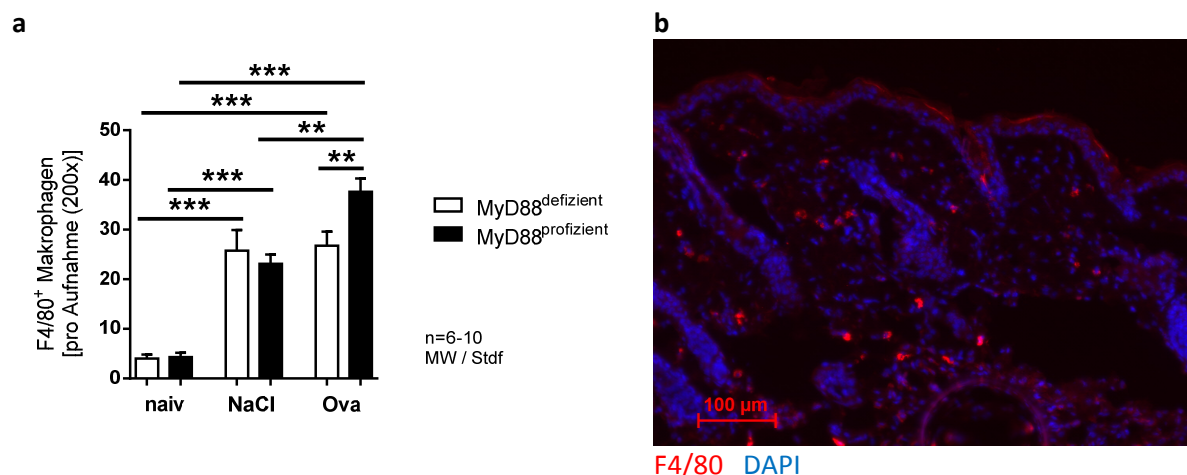


Abb. 24: Makrophagen in der Dermis. a) Wiederholte Hautirritation und NaCl-Behandlung führte zu einer MyD88-unabhängigen Infiltration der Dermis durch Makrophagen. Nach Ova-Behandlung war die Anzahl der Makrophagen in der Dermis MyD88-abhängig weiter erhöht gegenüber den NaCl-Kontrollen. b) Immunhistologisch angefärbte Makrophagen in der Haut

Die Infiltration der Dermis mit T-Helferzellen wurde per CD4-Färbung nachgewiesen (Abb. 25). Da auch dendritische Zellen CD4 exprimieren können, wurde in einem Versuch eine Doppelfärbung mit CD4 und MHCII durchgeführt, welches nur von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, nicht aber von T-Zellen. Es traten keine doppelt-positiven Zellen auf, sodass angenommen werden kann, dass alle dermalen $CD4^+$ Zellen in dieser Analyse T-Helferzellen waren.

Durch chronische Hautirritation kam es zu einem starken Anstieg der Anzahl von T-Helferzellen in der Dermis. Im Gegensatz zu den Makrophagen war die Anzahl von

T-Helferzellen nach AD-Induktion in den MyD88-defizienten Tieren interessanterweise deutlich größer als in den MyD88-profizienten Tieren (Abb. 25a), auch schon nach NaCl-Behandlung. T-Helferzellen müssen erst von in den Lymphknoten ausgewanderten dendritischen Zellen aktiviert werden und durch angeborene Immunzellen wie Makrophagen zum Ort der Entzündung rekrutiert werden. Da in MyD88-defizienten Mäusen nach Behandlung weniger Makrophagen in der Dermis vorhanden waren, war die Beobachtung, dass dennoch mehr T-Helferzellen als in MyD88-profizienten Mäusen auftraten, zunächst überraschend. Auf das u. a. von Keratinozyten produzierte Zytokin TSLP als eine mögliche Ursache (173) wird in Abschnitt 3.4.4 und 4.4.4 eingegangen.

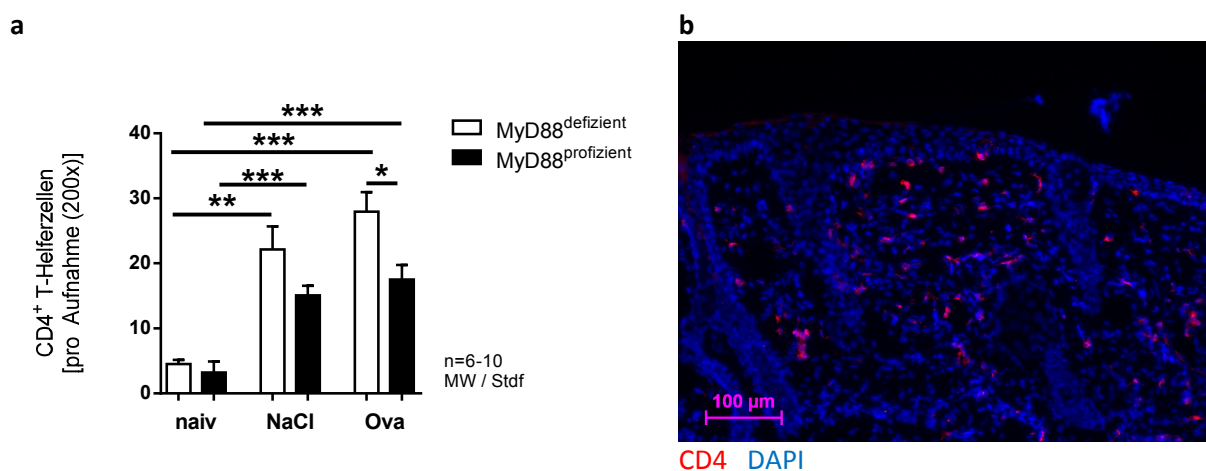


Abb. 25: T-Helferzellen in der Dermis. a) Wiederholte Hautirritation und Behandlung mit NaCl oder Ova führte zu einer starken T-Helferzell-Rekrutierung in die Dermis. Diese war bei MyD88-defizienten Mäusen stärker ausgeprägt als bei MyD88-profizienten Mäusen. b) Immunhistologische Färbung von T-Helferzellen in der Haut.

3.4.2 AD-induzierte Immunantwort in Haut-drainierenden Lymphknoten

Die dem behandelten Hautareal nächstgelegenen brachialen Lymphknoten wurden isoliert, um die Induktion der adaptiven Immunantwort zu untersuchen, die dort nach Einwanderung von Antigen-präsentierenden Zellen aus der Haut stattfindet.

In Abb. 26 ist die absolute Zellzahl dieser Lymphknoten pro Maus dargestellt. Die chronische Hautirritation induzierte bereits eine MyD88-unabhängige Vergrößerung der Lymphknoten als Zeichen einer Entzündung. Diese wurde durch zusätzliche Ova-Applikation MyD88-abhängig verstärkt.

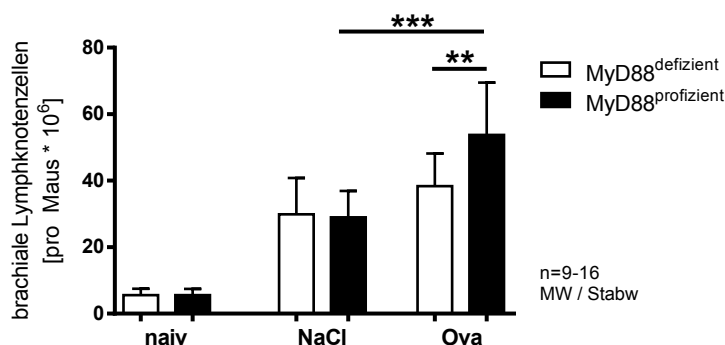


Abb. 26: Zellzahl der Haut-drainierenden brachialen Lymphknoten naiver und AD-behandelter Mäuse. Chronische Hautirritation und NaCl-Behandlung führte zu einer MyD88-unabhängigen Vergrößerung der Lymphknoten. Ova-Behandlung führte bei MyD88-profizienten Mäusen zu signifikant vergrößerten Lymphknoten gegenüber den übrigen Versuchsgruppen.

Tabellen 16a-c: Zelluläre Zusammensetzung brachialer Lymphknoten nach AD-Induktion

Tab. 16a: Zelltypen in brachialen Lymphknoten nach AD-Induktion*, prozentualer Anteil

	MyD88 ^{defizient} NaCl	MyD88 ^{profizient} NaCl	MyD88 ^{defizient} Ova	MyD88 ^{profizient} Ova
B220 ⁺ B-Zellen	30,0 ± 2,8	33,1 ± 10,2	35,4 ± 0,8	37,8 ± 2,6
CD3 ⁺ T-Zellen	52,6 ± 3,5	47,8 ± 10,4	44,6 ± 1,5	42,9 ± 1,3
CD11c ⁺ dendritische Zellen	5,3 ± 0,3	5,6 ± 0,1	6,0 ± 1,3	6,1 ± 0,4

Tab. 16b: Subpopulationen von Lymphknotenzellen*, prozentualer Anteil

	MyD88 ^{defizient} NaCl	MyD88 ^{profizient} NaCl	MyD88 ^{defizient} Ova	MyD88 ^{profizient} Ova
CD5 ⁺ B1-Zellen von B220 ⁺	13,2 ± 1,8	12,8 ± 3,0	11,3 ± 2,4	9,8 ± 1,3
CD4 ⁺ T-Helferzellen von CD3 ⁺	48,6 ± 1,6	47,3 ± 4,1	46,0 ± 1,0	45,6 ± 1,2
CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen von CD3 ⁺	39,0 ± 2,4	39,6 ± 0,4	39,3 ± 0,9	39,2 ± 2,3
γδ-T-Zellen von CD3 ⁺	6,9 ± 1,0	7,9 ± 3,4	8,8 ± 2,0	9,5 ± 1,1
CD8 ⁺ dendritische Zellen von CD11c ⁺	1,3 ± 0,1	4,6 ± 0,7	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,4
CD317 ⁺ plasmazytoide dendritische Zellen von CD11c ⁺	6,5 ± 0,7	5,3 ± 2,1	8,7 ± 2,1	7,3 ± 1,1

Tab. 16c: Aktivierungszustand der Lymphknotenzellen*, prozentualer Anteil

	MyD88 ^{defizient} NaCl	MyD88 ^{profizient} NaCl	MyD88 ^{defizient} Ova	MyD88 ^{profizient} Ova
IgM ⁺ IgD ⁻ unreife dendritische Zellen von B220 ⁺	4,2 ± 0,7	3,7 ± 0,2	5,0 ± 0,4	3,6 ± 0,5
CD69 ⁺ CD25 ⁺ aktivierte T-Helferzellen von CD3 ⁺ CD4 ⁺	12,7 ± 0,8	11,7 ± 0,1	12,6 ± 1,2	11,5 ± 0,8
MHCII ⁺⁺ aktivierte dendritische Zellen von CD11c ⁺	39,6 ± 1,1	34,9 ± 6,3	28,6 ± 1,4	34,0 ± 1,5

* jeweils dargestellt für ein repräsentatives Experiment mit n=3-4

Die Zusammensetzung dieser Lymphknotenzellen wurde durchflusszytometrisch analysiert (Tab. 16a-c). Nach Ova-Behandlung waren prozentual mehr B-Zellen und weniger T-Zellen vorhanden, das Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen änderte sich nicht, der Anteil von γδ-T-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen stieg leicht an. Nach Ova-Behandlung wurde ein etwas höherer Aktivierungszustand der Zellen von MyD88-profizienten Mäusen gemessen, d. h. weniger unreife B-Zellen und mehr aktivierte dendritische Zellen.

Zur Untersuchung der Zytokinproduktion Antigen-spezifischer T-Zellen, die *in vivo* im Verlaufe des Versuchs gebildet worden waren, wurden die isolierten Lymphknotenzellen für drei Tage *in vitro* mit Endotoxin-freiem endoOva restimuliert. Anschließend konnten im Zellüberstand Zytokine nachgewiesen werden, die von den in der Zellsuspension vorhandenen Ova-spezifischen T-Zellklonen produziert worden waren. Dies gab Aufschluss über die Art der adaptiven Immunantwort, die von den T-Helferzellen vermittelt wurde. Das T_H1 -Zytokin $IFN-\gamma$ wurde nach Ova-Restimulation nur von den Lymphknotenzellen der Ova-behandelten MyD88-profizienten Mäuse verstärkt freigesetzt (Abb. 27a). Auch die IL-17A-produzierenden T_H17 -Zellen waren nur in den Zellen der MyD88-profizienten Ova-behandelten Mäuse nachweisbar (Abb. 27b). IL-10 hingegen, das von T_H2 -Zellen und auch von regulatorischen T-Zellen produziert werden kann, wurde von Lymphknotenzellen MyD88-defizienter Mäuse sogar in höherem Maße freigesetzt als von MyD88-profizienten Mäusen (Abb. 27c) und zeigte, dass auch die MyD88-defizienten Tiere Ova-spezifische T-Zellen gebildet hatten.

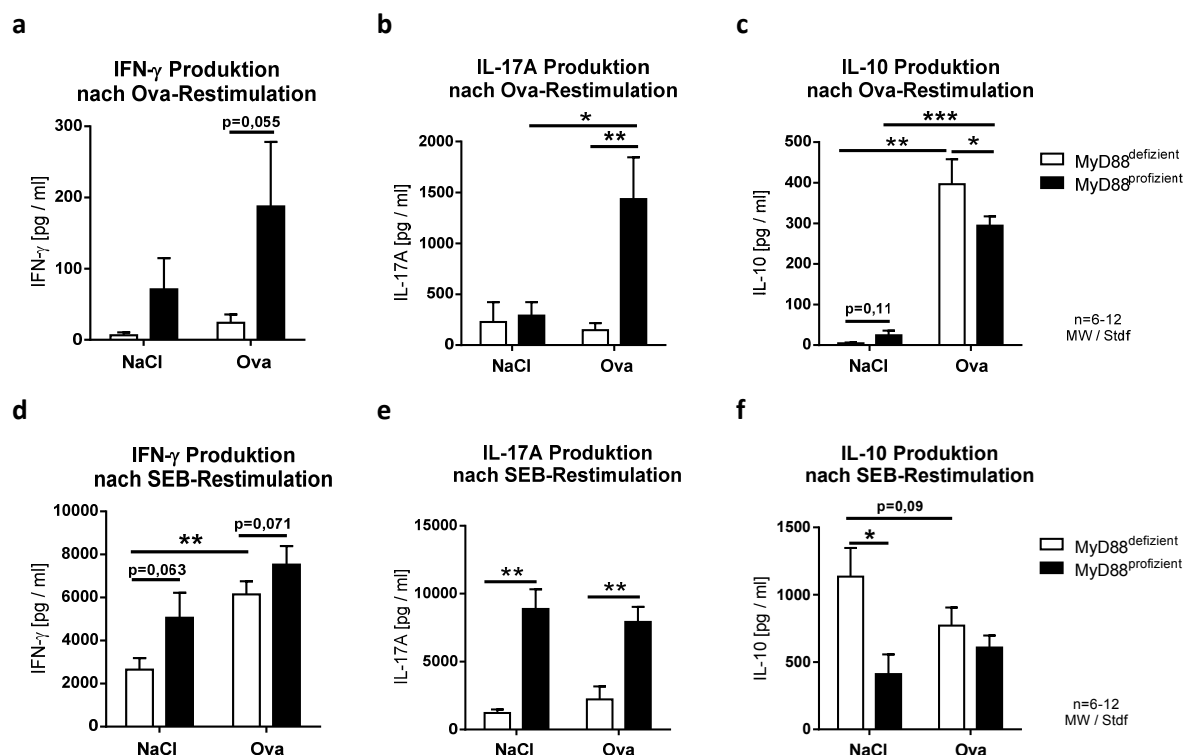


Abb. 27: Zytokinproduktion von kultivierten Lymphknotenzellen nach Restimulation mit Ova (a-c) oder SEB (d-f). $IFN-\gamma$ und IL-17A wurden MyD88-abhängig produziert, IL-10 wurde von MyD88-defizienten Zellen in größerem Maße freigesetzt als von MyD88-profizienten Zellen. Ova-Vorbehandlung *in vivo* führte zu starker Zytokinproduktion durch Ova-spezifische T-Zellen nach Ova-Restimulation *in vitro*.

Die Lymphknotenzellen wurden außerdem auch mit SEB stimuliert, um sie mit den Zellen von SEB- / Ova+SEB-behandelten Tieren vergleichen zu können (Abschnitt 3.5). Da SEB ein Superantigen ist, das T-Zellen unabhängig von Antigenpräsentation aktivieren kann, wurden Zytokine auch von Zellen produziert, die nicht *in vivo* mit SEB in Kontakt gekommen waren. Interessanterweise unterschieden sich die Zytokinspiegel von MyD88-profizienten und MyD88-defizienten Mäusen, was darauf hinweisen könnte, dass SEB auch konventionelle Antigen-Funktion hat und in der Lymphknotenzellsuspension von Antigen-präsentierenden Zellen den T-Zellen präsentiert wird. Alternativ wäre auch möglich, dass eine unterschiedliche T-Zell-Aktivierung *in vivo* die unterschiedlichen Zytokinspiegel *in vitro* bedingt. SEB-spezifisches IFN- γ wurde von MyD88-profizienten Zellen stärker produziert als von MyD88-defizienten Zellen und darüber hinaus von Lymphknotenzellen von Ova-behandelten Mäusen in größeren Mengen freigesetzt als von NaCl-behandelten Mäusen (Abb. 27d). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine stärkere Voraktivierung der Zellen. SEB-spezifisches IL-17A wurde von MyD88-profizienten Zellen in großen Mengen freigesetzt, von MyD88-defizienten Zellen nur minimal (Abb. 27e). Im Gegensatz zu IFN- γ und IL-17A wurde das regulatorische Zytokin IL-10 von MyD88-defizienten Zellen stärker produziert als von MyD88-profizienten Zellen (Abb. 27f). Dies korreliert mit den verstärkten TH₂-Antworten in MyD88-defizienten Mäusen, die z. B. auch höhere IgE-Spiegel im Serum aufweisen. Bei Zellen aus Ova-behandelten Mäusen war die SEB-spezifische IL-10-Produktion allerdings vermindert. In der Zusammenschau mit der höheren IFN- γ -Produktion dieser Zellen weist das darauf hin, dass SEB in Lymphknotenzellen von Ova-behandelten Mäusen eine stärkere proinflammatorische Reaktion auslöst als nach NaCl-Behandlung. Dies könnte ein Hinweis auf die Rolle von SEB bei der Krankheits-Progression von AD sein.

Bezüglich der IL-10-Messung in Lymphknotenzellen ist zu berücksichtigen, dass dieses Zytokin auch von Antigen-präsentierenden Zellen und B-Zellen freigesetzt wird, so dass die Quelle dieses Zytokins in der Lymphknotenkultur durch intrazelluläre Zytokinfärbung oder Aufreinigung der Zellpopulationen vor der Restimulation weiter eingegrenzt werden müsste.

Da zur Differenzierung von TH₁₇-Zellen IL-23 notwendig ist, wurde in BMDC die IL-23-Produktion untersucht. IL-23 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und gehört zur IL-12-Familie. MyD88-defiziente Zellen produzierten nach Stimulation kein IL-23 (Abb. 28), dies ist also vermutlich eine Ursache für die beobachtete fehlende IL-17A-Produktion in den Lymphknoten.

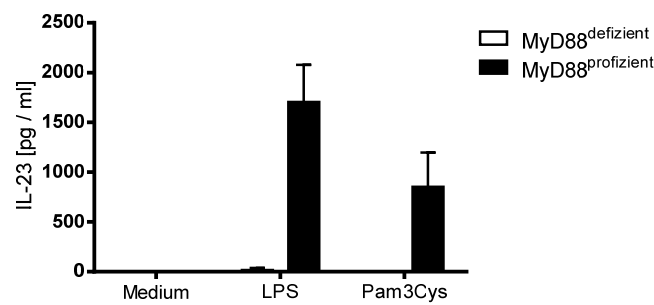


Abb. 28: IL-23-Produktion von dendritischen Zellen ist abhängig von MyD88. Ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Experimenten.

Per durchflusszytometrischer Analyse wurde zusätzlich der Anteil regulatorischer T-Zellen in den Lymphknotenkulturen bestimmt. Dazu wurde der Transkriptionsfaktor FoxP3 in T-Helferzellen gefärbt. Hierbei wurden keine bedeutenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Lymphknotenzellen unterschiedlich vorbehandelter Tiere festgestellt (Abb. 29). Nach Restimulation mit Ova lag der Anteil von T_{reg}-Zellen bei ca. 5-7 %, nach Restimulation mit SEB war der Anteil auf ca. 12-15 % angestiegen, d. h. neben der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wurde durch SEB auch die Expansion von T_{reg}-Zellen induziert.

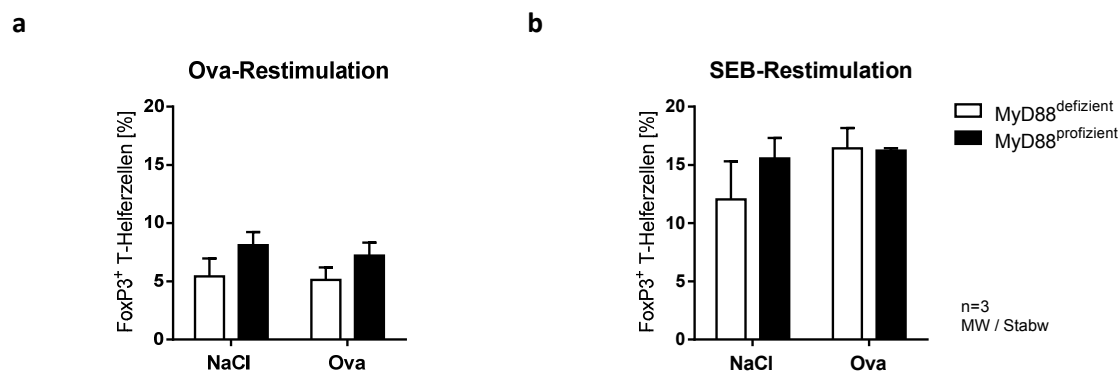


Abb. 29: Regulatorische T-Zellen in restimulierten Lymphknotenzellen von AD-behandelten Mäusen. a) Ova-Restimulation b) SEB-Restimulation. Zwischen Zellen von NaCl- oder Ova-vorbehandelten Tieren sowie zwischen MyD88-profizienten und -defizienten Tieren gab es keine Unterschiede. SEB-Stimulation führte zur Vermehrung von T_{reg}-Zellen *in vitro*.

3.4.3 Systemische Immunabwehr und Immunglobulinspiegel nach AD-Induktion

Eine Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) ist ein Symptom, das auf ein systemisches Entzündungsgeschehen hinweist. Eine Beteiligung der Milz wurde bereits bei verschiedenen AD-Modellen gezeigt, indem in Milzzellen spezifische Allergen-induzierte Immunantworten

nachgewiesen wurden (158, 174, 175). Die Milz ist ein wichtiges immunologisches Organ, in dem B- und T-Lymphozyten proliferieren, und ist vermutlich an der AD-abhängigen Antikörperproduktion beteiligt. Um zu untersuchen, ob diese symptomatische Splenomegalie auch bei Mäusen nach AD-Induktion auftritt, wurden nach einem Versuch die Milzen der Versuchstiere entnommen und gewogen (Abb. 30). Tatsächlich wurde nach Ova-Behandlung in den MyD88-profizienten Mäusen eine tendenziell vergrößerte Milz gefunden, bei MyD88-defizienten Mäusen war dies nicht der Fall. Weitere Messungen, auch von unbehandelten Tieren, müssten hier erfolgen, um diesen Befund zu bestätigen.

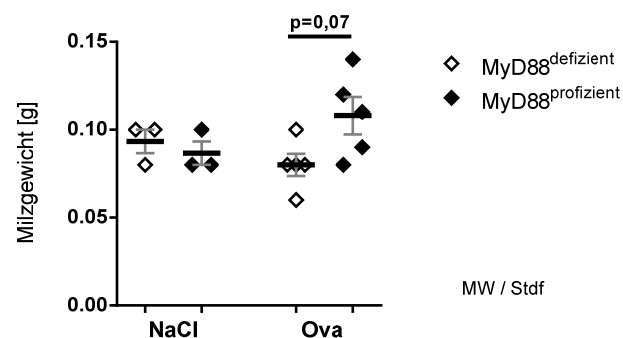


Abb. 30: Milzgewicht nach AD-Induktion. Ova-behandelte MyD88-profiziente Tiere wiesen eine tendenziell vergrößerte Milz auf im Vergleich zu den Kontrollen.

Die natürlichen Immunglobuline IgM und auch IgG3 werden unabhängig von T-Helferzellen schon früh im Verlaufe einer Entzündung gebildet. Sie besitzen eine limitierte Keimbahn-codierte Spezifität und gehören daher zur angeborenen bzw. natürlichen Abwehr. Wie in Abb. 31 im Vergleich zu Abb. 17 dargestellt, wird die Produktion dieser Antikörper durch die chronische Hautirritation induziert und MyD88-abhängig verstärkt. Eine zusätzliche Regulation durch Ova-Applikation war nicht festzustellen.

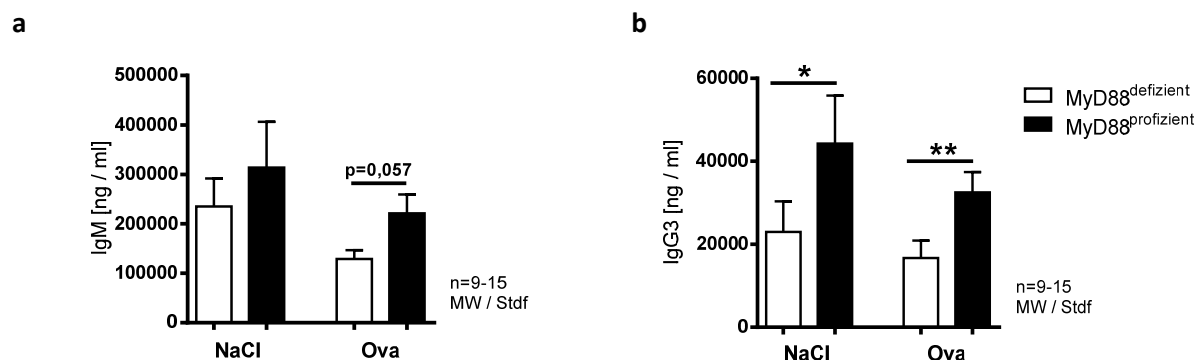


Abb. 31: Natürliche Antikörper nach AD-Induktion. a) IgM- und b) IgG3-Spiegel waren in MyD88-profizienten Mäusen höher als in MyD88-defizienten Mäusen. Der Vergleich mit unbehandelten Tieren zeigt, dass *tape-stripping* die Produktion der Antikörper unabhängig vom Antigen induziert.

Obwohl naive MyD88-defiziente Mäuse deutlich höhere IgE-Spiegel als MyD88-profiziente Mäuse aufwiesen (Abb. 17), zeigte sich nach der siebenwöchigen Behandlungsphase der Tiere kein signifikanter Unterschied mehr. Die IgE-Spiegel von MyD88-profizienten Tieren waren stark angestiegen und erreichten ähnlich hohe Werte wie bei MyD88-defizienten Mäusen (Abb. 32). Dies bedeutet, dass die IgE-Produktion in den MyD88-defizienten Tieren durch die AD-Behandlung weit weniger erhöht wurde.

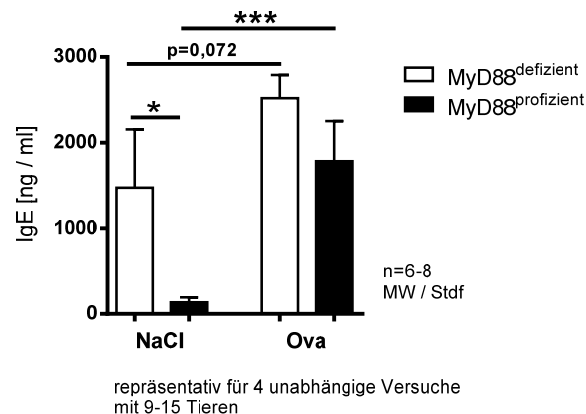


Abb. 32: Gesamt-IgE-Spiegel nach AD-Induktion. Bei MyD88-profizienten Mäusen zeigte sich eine starke Erhöhung der IgE-Spiegel durch AD-Induktion mit Ova. Bei MyD88-defizienten Mäusen, die schon vor Behandlung sehr hohe IgE-Spiegel aufwiesen, war die weitere Erhöhung deutlich schwächer, sodass sich die IgE-Spiegel in MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen nach Ova-Behandlung annäherten.

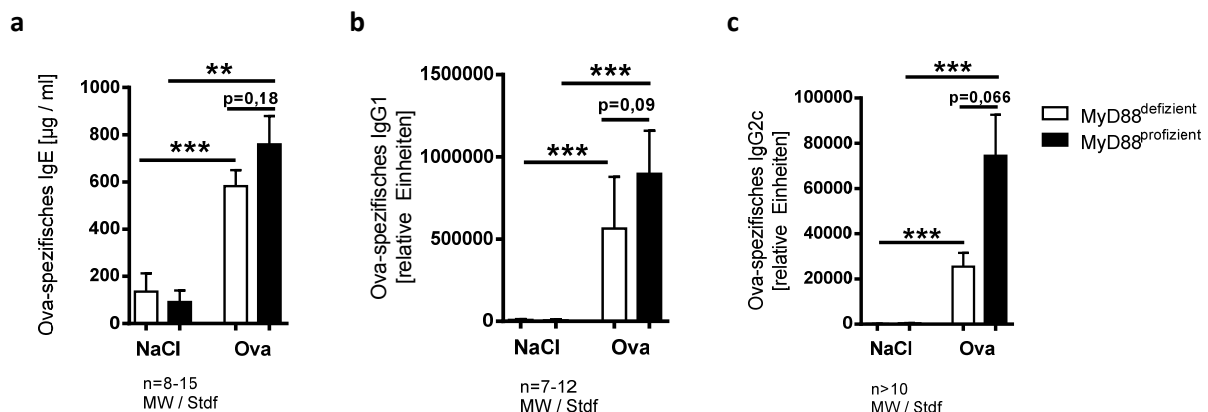


Abb. 33: Ova-spezifische Immunglobulinspiegel nach AD-Induktion. a) Ova-IgE- und b) Ova-IgG1-Spiegel waren bei MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu MyD88-profizienten Mäusen leicht bis moderat vermindert, c) Ova-IgG2c-Spiegel waren bei MyD88-defizienten Mäusen stark vermindert.

Wichtig für die Beurteilung der Ova-induzierten Immunantwort sind die Allergen-spezifischen Antikörper (Abb. 33), insbesondere Ova-spezifisches IgE. Bei den Ova-spezifischen IgE-Spiegeln konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden (Abb. 33a). Bei Ova-IgG1 gab es eine moderate Verminderung in

MyD88-defizienten gegenüber MyD88-profizienten Tieren (Abb. 33b), die Ova-IgG2c-Spiegel waren bei MyD88-defizienten Tieren deutlich niedriger, was wie erwartet eine schwächere T_H1 -Antwort widerspiegelt (Abb. 33c).

3.4.4 Zusammenfassung MyD88-abhängige AD-Induktion

Zusammenfassend wurde bei der Analyse der Ova-abhängigen AD-Induktion festgestellt, dass MyD88-abhängige Signalwege an der Entstehung von Allergie-Symptomen beteiligt sind. MyD88-defiziente Mäuse zeigten deutlich verminderte Akanthose, d. h. weniger Epidermishyperplasie, eine verringerte Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis, sowie verminderte Infiltration von Makrophagen, aber verstärkte T-Helferzellrekrutierung in die Dermis. Die Induktion der adaptiven T-Helferzell-Antwort in den Haut-drainierenden Lymphknoten war bei MyD88-defizienten Mäusen T_H2 -polarisiert, während die Ova-spezifischen T-Zellen von MyD88-profizienten Mäusen sowohl T_H2 - als auch $T_H1/17$ -Zytokine freisetzen konnten. Natürliche Antikörper waren in MyD88-profizienten Mäusen stärker erhöht als in MyD88-defizienten Mäusen. Bei den Ova-spezifischen Antikörpern waren in MyD88-defizienten Mäusen nur die T_H2 -Isotypen IgE und IgG1 produziert worden, während MyD88-profiziente Mäuse auch T_H1 -assoziiertes IgG2c produzierten.

3.5 MyD88-abhängige Verstärkung der AD-Symptome durch Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)

Das Superantigen SEB spielt bei AD-Patienten eine wichtige Rolle für das Fortschreiten der Erkrankung. Bei 90 % aller AD-Patienten ist die Haut dauerhaft mit *Staphylokokkus aureus* besiedelt, der wiederkehrende Infektionen auslösen kann, gegenüber nur 5 % in der Normalbevölkerung (125, 126). Um zu untersuchen, welche Rolle MyD88 bei dieser SEB-induzierten Hautentzündung spielt, wurden Mäuse für die Dauer des AD-Versuchs nicht nur mit Ova, sondern auch mit SEB oder Ova+SEB behandelt, dies wird im Folgenden als SEB-Sensibilisierung bezeichnet. Die Entzündungsparameter wurden analog zur AD-Induktion mit NaCl- / Ova-Behandlung ausgewertet. Zum Vergleich der Ergebnisse wird auf die Auswertungen in Abschnitt 3.2 verwiesen.

3.5.1 Hautentzündung nach SEB-Sensibilisierung

Nach epikutaner Behandlung mit SEB / Ova+SEB wurde am letzten Versuchstag der transepidermale Wasserverlust per Tewameter®-Sonde bestimmt (Abb. 34). Nach Behandlung mit SEB waren die TEWL-Werte MyD88-defizienter Mäuse tendenziell besser als die MyD88-profizienter Mäuse, was wie nach Behandlung mit Ova (Abb. 19) auf eine bessere Barrierefunktion in MyD88-defizienten Mäusen hinweist. Nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung war dies nicht der Fall, sowohl MyD88-defiziente als auch MyD88-profiziente Tiere hatten tendenziell erhöhte TEWL-Werte. Da das Messgerät bisher nur in diesem einen Versuch zur Verfügung stand, müssten weitere Untersuchungen diese Beobachtung bestätigen.

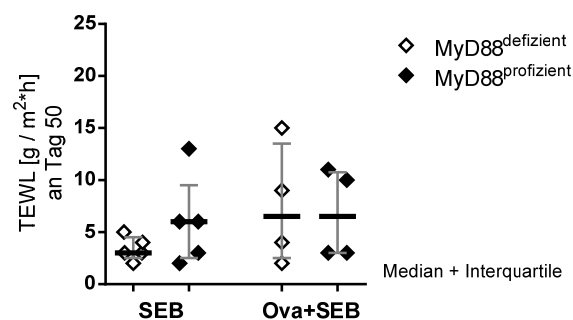


Abb. 34: Transepidermaler Wasserverlust nach SEB-Sensibilisierung. Große Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen wegen kleiner Stichprobengröße.

Nach epikutaner Behandlung der Mäuse mit SEB war nur eine minimale Verdickung der Epidermis messbar (Abb. 35a), die sich kaum von den NaCl-behandelten Tieren abhob (Abb. 20). Nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung war dagegen eine für AD typische Verdickung der Epidermis feststellbar (Abb. 35a). Diese war abhängig von MyD88, fiel jedoch weniger stark aus als nach Behandlung der Mäuse nur mit Ova (Abb. 20).

Behandlung mit SEB führte genau wie mit Ova zu einer MyD88-abhängigen Emigration der Langerhanszellen aus der Epidermis. Nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung dagegen war kein klarer Effekt nachweisbar, da die Streuung der Ergebnisse deutlich größer als nach Behandlung mit einem einzelnen Antigen war (Abb. 35b). Dies könnte darauf hinweisen, dass die kombinierte Behandlung keinen kumulativen Effekt auf die Langerhanszell-Migration hat, sondern diese stören könnte.

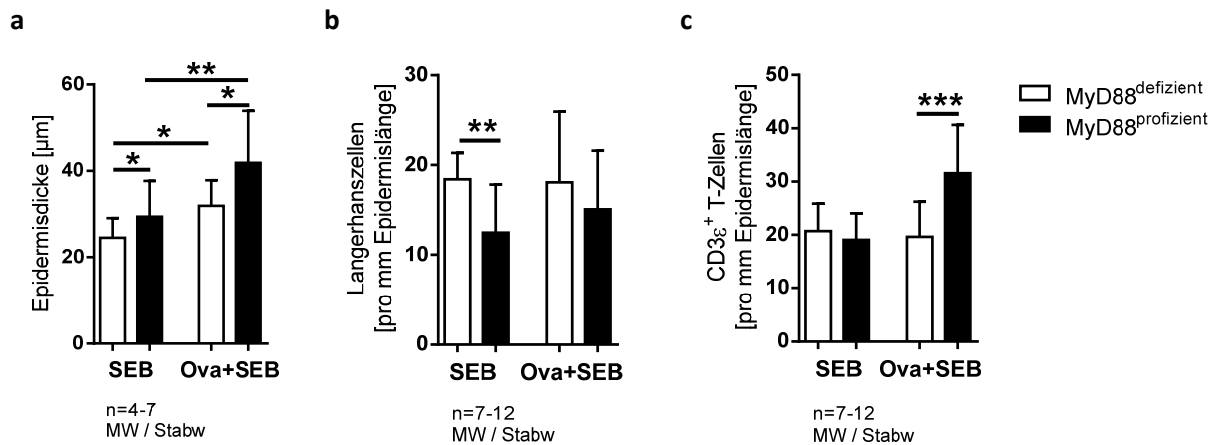


Abb. 35: Histologie der Epidermis nach SEB-Sensibilisierung. a) Die Epidermis wurde kaum durch SEB, aber deutlich durch Ova+SEB-Behandlung verdickt. b) Langerhanszellen wanderten auch nach SEB-Sensibilisierung MyD88-abhängig aus, nach Ova+SEB-Behandlung traten größere Schwankungen auf. c) Epidermale T-Zellen akkumulierten nach Ova+SEB-Behandlung bei MyD88-profizienten Tieren.

Die Anzahl der epidermalen T-Zellen war nach einzelner Behandlung mit SEB nicht verändert (Abb. 35c), ebenso wie nach Behandlung mit NaCl oder Ova (Abb. 22). Nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung kam es dagegen zu einer starken Akkumulation von T-Zellen in der Epidermis, die abhängig von MyD88 war (Abb. 35c). Die nähere Analyse ergab, dass diese zusätzlich in die Epidermis eingewanderten T-Zellen CD8⁺ waren (Abb. 36b). CD8⁺ T-Zellen können zytotoxische oder auch tolerogene T-Zellen sein (176, 177).

Interessanterweise waren bei diesen mit Ova+SEB-behandelten MyD88-profizienten Mäusen auch die meisten in der Epidermis verbliebenen Langerhanszellen CD8⁺ (Abb. 36a). Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Langerhanszellen die epidermalen CD8⁺ T-Zellen durch Kreuz-Präsentation über MHCI-Moleküle stimulieren könnten. Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass die MHCI-Expression in der Haut nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung stark erhöht ist (Daten nicht gezeigt), was diese Vermutung stützen würde. Hier sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Kombinierte Ova+SEB-Behandlung führte offenbar nicht zu einer additiv verstärkten Entzündung gegenüber der Behandlung mit den einzelnen Antigenen, sondern schien die Immunreaktion in der Epidermis qualitativ zu verändern. Möglich wäre, dass die zelluläre Aufnahme und Prozessierung der Antigene Ova und SEB kompetitiv gestört wird oder dass es zur Bildung von Komplexen aus Ova und SEB kommt, die die Antigenaufnahme verändern.

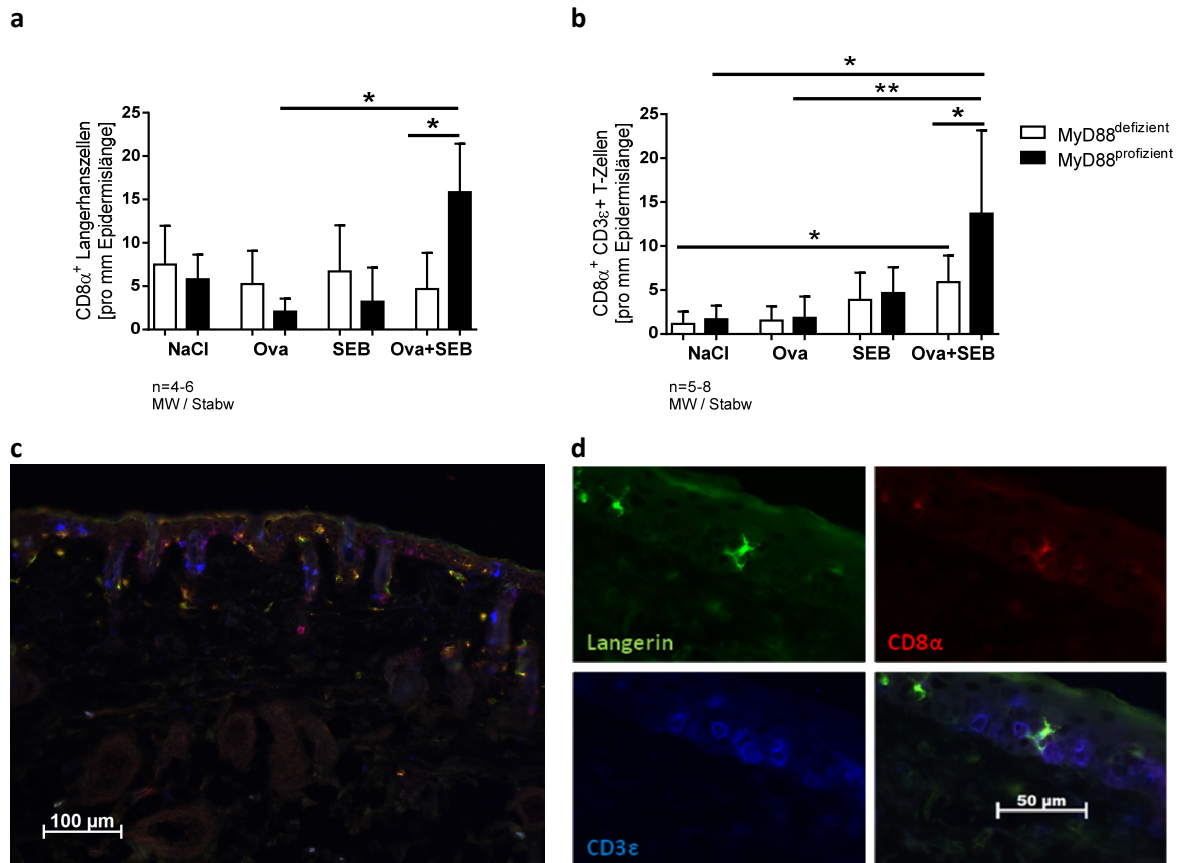


Abb. 36: CD8α-Expression auf Langerhanszellen und T-Zellen in der Epidermis nach Ova+SEB-Behandlung. a) CD8α⁺ Langerhanszellen b) CD8α⁺ T-Zellen in der Epidermis. c) Mikroskopische Aufnahme bei 200x und d) 400x Vergrößerung. CD8α⁺ Langerhanszellen erscheinen gelb (Langerin grün + CD8α rot), CD8α⁺ T-Zellen erscheinen violett (CD3ε blau + CD8α rot).

In der Dermis wurde nach SEB-Sensibilisierung der Influx von Makrophagen und T-Helferzellen quantifiziert (Abb. 37a). SEB führte zu einer MyD88-unabhängigen Einwanderung von Makrophagen, die etwas stärker als nach NaCl-Behandlung war. In MyD88-profizienten Tieren stieg die Makrophagenzahl nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung noch deutlich weiter an auf fast den doppelten Wert gegenüber einzelner Behandlung mit Ova (Abb. 24). Hier handelt es sich vermutlich um einen additiven Effekt beider Antigene.

Die Anzahl von T-Helferzellen in der Dermis wurde durch SEB-Behandlung nicht stärker erhöht als nach NaCl-Behandlung. Auch hier waren deutlich mehr T-Helferzellen in der Haut von MyD88-defizienten Mäusen vorhanden. Interessanterweise stieg nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung die Anzahl der T-Helferzellen bei MyD88-profizienten Mäusen so stark an, dass ihre Anzahl höher war als bei den MyD88-defizienten Mäusen (Abb. 37b). Auch hier könnte ein MyD88-abhängiger additiver Effekt beider Antigene vorliegen.

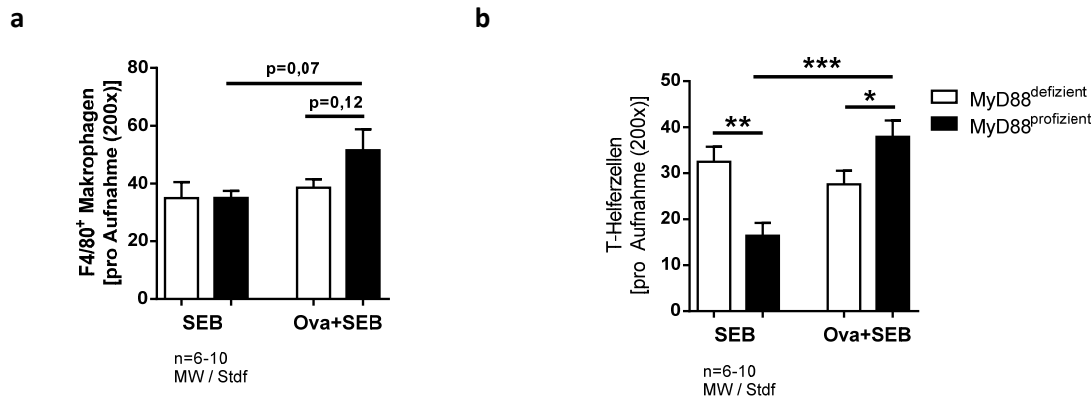


Abb. 37: Entzündungszellen in der Dermis nach SEB- / Ova+SEB-Behandlung. a) Die Anzahl dermalen Makrophagen war nach Ova+SEB-Behandlung MyD88-abhängig verstärkt gegenüber der MyD88-unabhängigen Makrophageninfiltration nach einzelner SEB-Behandlung. b) Nach einzelner SEB-Behandlung waren wie auch nach NaCl- oder Ova-Behandlung in der Haut von MyD88-defizienten Mäusen mehr T-Helferzellen vorhanden als bei MyD88-profizienten Mäusen. Während die Anzahl in MyD88-defizienten Tieren nach Ova+SEB-Behandlung unverändert blieb, stieg sie in MyD88-profizienten Tieren stark an.

3.5.2 Immunantwort in den Haut-drainierenden Lymphknoten nach SEB-Sensibilisierung

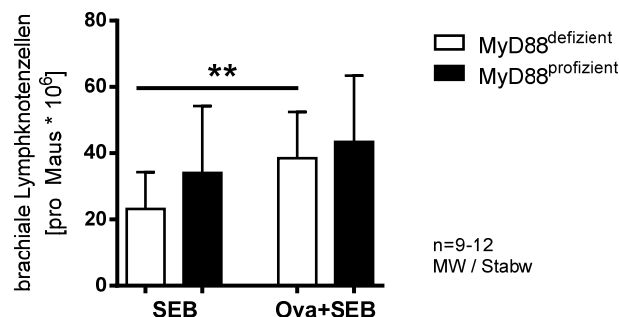


Abb. 38: Zellzahl der Haut-drainierenden brachialen Lymphknoten nach SEB-Sensibilisierung. Die Vergrößerung der Lymphknoten war im Gegensatz zur AD-Induktion mit Ova nicht MyD88-abhängig.

Die Haut-drainierenden Lymphknoten waren nach SEB- oder Ova+SEB-Behandlung im Vergleich zu NaCl-Behandlung vergrößert, tendenziell war die Zellzahl nach kombinierter Behandlung etwas höher als nach Einzelbehandlung mit SEB (Abb. 38). Im Gegensatz zu einzelner Behandlung mit Ova war hier jedoch kein signifikanter MyD88-abhängiger Effekt vorhanden. Die Anzahl der Lymphknotenzellen MyD88-profizienter Tiere nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung war niedriger als nach Einzelbehandlung mit Ova (Abb. 26), was unerwarteterweise auf eine schwächere Immunreaktion in den Lymphknoten hindeutet. Diese Beobachtung korreliert jedoch mit der ebenfalls abgeschwächten Auswanderung von

Langerhanszellen aus der Epidermis MyD88-profizienter Tiere nach der kombinierten Behandlung (Abb. 35b), die auch ursächlich für die verminderte Aktivierung von Immunzellen in den Lymphknoten sein könnte.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Lymphknoten (Tab. 17a-c) ergaben sich einige Unterschiede in der relativen zellulären Zusammensetzung im Vergleich zu NaCl- / Ova-behandelten Tieren (vgl. Tab. 16a-c). So waren die Anteile der B-Zellen etwas geringer, insbesondere nach SEB-Behandlung. Interessanterweise war die Frequenz an B1-Zellen nach SEB-Behandlung auf das Doppelte erhöht im Vergleich zu allen anderen Behandlungsgruppen. B1-Zellen vermitteln vermutlich wie $\gamma\delta$ -T-Zellen zwischen angeborener und adaptiver Immunität (178), sie sind an der Immunantwort gegen Polysaccharid-Antigene beteiligt. Jedoch war dieser Anstieg von B1-Zellen nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung nicht zu sehen. Möglicherweise könnte hier durch Co-Administration von Ova eine Hemmung der B1-Proliferation stattfinden. Weiter war der Anteil der CD8⁺ dendritischen Zellen sowohl nach SEB- als auch nach Ova+SEB-Behandlung höher als nach AD-Induktion mit NaCl oder Ova. SEB einzeln oder in Kombination mit Ova führte also zur Expansion dieser Zellen. Darüber hinaus fiel auf, dass der Prozentsatz aktivierter dendritischer Zellen nach Ova+SEB-Behandlung wesentlich vermindert war gegenüber den anderen Behandlungsgruppen. Dieses Ergebnis weist ebenfalls auf eine abgeschwächte Immunantwort durch die kombinierte Behandlung mit beiden Antigenen hin.

Tabellen 17 a-c: Zelluläre Zusammensetzung brachialer Lymphknoten nach SEB- / Ova+SEB-Behandlung

Tab. 17a: Zelltypen in brachialen Lymphknoten nach SEB- / Ova+SEB-Behandlung*, prozentualer Anteil

	<i>MyD88</i> ^{defizient} SEB	<i>MyD88</i> ^{profizient} SEB	<i>MyD88</i> ^{defizient} Ova+SEB	<i>MyD88</i> ^{profizient} Ova+SEB
B220 ⁺ B-Zellen	23,8 ± 10,8	28,2 ± 5,7	29,3 ± 2,3	33,1 ± 3,5
CD3 ⁺ T-Zellen	60,0 ± 0,7	54,5 ± 7,2	46,0 ± 2,8	40,4 ± 2,1
CD11c ⁺ dendritische Zellen	6,6 ± 0,4	8,5 ± 2,4	6,2 ± 1,2	7,7 ± 1,1

Tab. 17b: Subpopulationen von Lymphknotenzellen*, prozentualer Anteil

	<i>MyD88</i> ^{defizient} SEB	<i>MyD88</i> ^{profizient} SEB	<i>MyD88</i> ^{defizient} Ova+SEB	<i>MyD88</i> ^{profizient} Ova+SEB
CD5 ⁺ B1-Zellen von B220 ⁺	23,5 ± 11,7	20,9 ± 3,1	11,2 ± 1,4	13,6 ± 2,5
CD4 ⁺ T-Helferzellen von CD3 ⁺	51,8 ± 3,2	46,8 ± 3,7	50,8 ± 1,0	48,3 ± 2,9
CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen von CD3 ⁺	39,1 ± 2,5	43,1 ± 5,1	38,1 ± 2,2	41,4 ± 1,9
$\Gamma\delta$ -T-Zellen von CD3 ⁺	5,8 ± 1,6	8,5 ± 1,3	6,9 ± 1,2	8,0 ± 1,6
CD8 ⁺ dendritische Zellen von CD11c ⁺	13,4 ± 3,1	12,6 ± 0,6	9,1 ± 0,4	9,9 ± 1,0
CD317 ⁺ plasmazytoide dendritische Zellen von CD11c ⁺	4,8 ± 1,6	2,8 ± 0,2	5,7 ± 2,1	2,9 ± 0,4

Tab. 17c: Aktivierungszustand von Lymphknotenzellen*, prozentualer Anteil

	<i>MyD88</i> ^{defizient} SEB	<i>MyD88</i> ^{profizient} SEB	<i>MyD88</i> ^{defizient} Ova+SEB	<i>MyD88</i> ^{profizient} Ova+SEB
IgM ⁺ IgD ⁻ unreife dendritische Zellen von B220 ⁺	10,0 ± 3,1	6,3 ± 2,3	7,4 ± 1,1	6,6 ± 2,3
CD69 ⁺ CD25 ⁺ aktivierte T-Helferzellen von CD3 ⁺ CD4 ⁺	12,4 ± 1,9	9,4 ± 1,0	10,7 ± 0,9	7,5 ± 1,3
MHCII ⁺⁺ aktivierte dendritische Zellen von CD11c ⁺	28,6 ± 13,4	37,4 ± 8,5	14,1 ± 4,9	20,6 ± 4,4

* jeweils dargestellt für ein repräsentatives Experiment mit n=3-4

Die Lymphknotenzellen wurden für drei Tage in Kultur mit Ova oder SEB restimuliert, um die Zytokinfreisetzung der entsprechenden Antigen-spezifischen T-Zellen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass kombinierte Ova+SEB-Behandlung zu einer deutlich verstärkten Zytokinproduktion Ova-spezifischer T-Zellen im Vergleich zu Zellen von nur mit Ova behandelten Tieren führte (vgl. Abb. 27a-c). Die IFN- γ -Freisetzung von Lymphknotenzellen aus Ova+SEB-behandelten *MyD88*-profizienten Tieren nach Ova-Restimulation war etwa um das Doppelte erhöht gegenüber der einzelnen Behandlung der Mäuse mit Ova (Abb. 39a), die Menge von IL-10 lag etwa 30 % höher (Abb. 39c). Dies impliziert, dass SEB möglicherweise einen Adjuvans-Effekt auf die Zytokinproduktion Ova-spezifischer T-Zellen hat. IL-17A wurde von *MyD88*-profizienten Zellen nach Ova+SEB-Behandlung in ähnlich großen Mengen produziert wie nach einzelner Ova-Behandlung (Abb. 39b). Unerwarteterweise war auch die IL-17A-Produktion *MyD88*-defizienter Zellen erhöht, jedoch war die Streuung der Ergebnisse sehr groß, sodass die Ursache vermutlich experimentelle Schwankungen sind.

Im Gegensatz zur Ova-Stimulation konnten nach Restimulation mit SEB nur Spuren der T-Zell-Zytokine im Zellüberstand gemessen werden, wenn die Mäuse zuvor mit SEB oder Ova+SEB behandelt worden waren. Zellen von Mäusen, die nur mit NaCl oder Ova behandelt worden waren, reagierten dagegen mit starker Zytokinproduktion auf SEB-Stimulation *in vitro* (vgl. Abb. 27d-f). Die wiederholte SEB-Behandlung *in vivo* führte somit zu einer anhaltenden Anergie SEB-spezifischer T-Zellen, obwohl andererseits die T-Zell-Antwort auf Ova durch kombinierte Ova+SEB-Behandlung sogar verstärkt worden war.

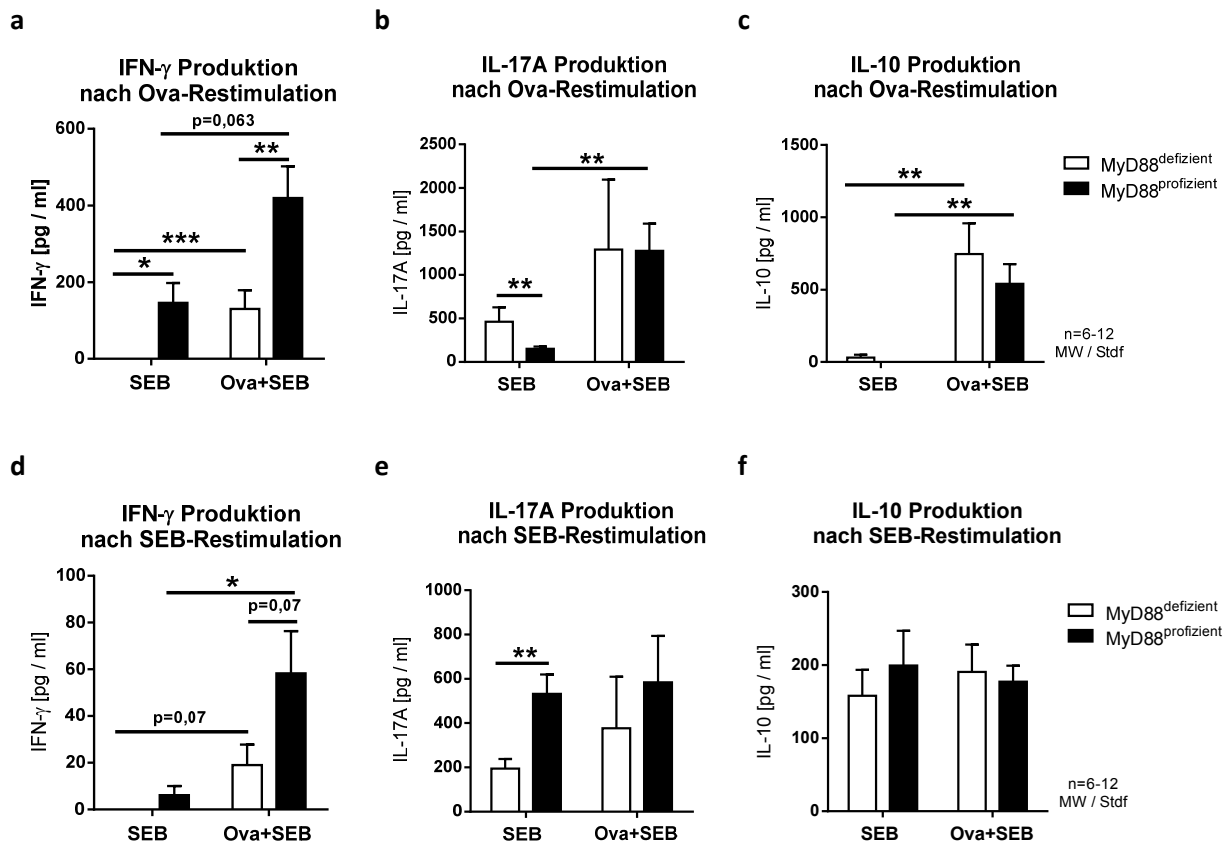


Abb. 39: Zytokinproduktion von Lymphknotenzellen SEB-sensibilisierter Tiere nach Restimulation mit Ova (a-c) oder SEB (d-f). Die Zytokinproduktion durch Ova-Restimulation war bei Zellen von Ova+SEB-behandelten Tieren verstärkt im Vergleich zu nur mit Ova-behandelten Tieren. Die Zytokinfreisetzung bei SEB-Restimulation von Zellen, die *in vivo* mit SEB in Kontakt gekommen waren, war kaum messbar und stark supprimiert im Vergleich zur Zellen von Mäusen, die nicht mit SEB behandelt worden waren.

Um zu untersuchen, ob die fehlende Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch SEB-spezifische T-Zellen auf eine generelle T-Zell-Anergie zurückgeht, oder möglicherweise eine Expansion regulatorischer T-Zellen erfolgt war, wurde per intrazellulärer Färbung für die Durchflusszytometrie der Anteil FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen nach der Lymphknoten Kultivierung untersucht. Nach Ova-Restimulation befanden sich unter den T-Helferzellen aller Versuchsgruppen ca. 8 % natürliche T_{reg}-Zellen (Abb. 40a), ebenso viele waren auch in den kultivierten Lymphknotenzellen von NaCl- oder Ova-behandelten Tieren vorhanden (Abb. 28a). Regulatorische T-Zellen wurden also durch Ova-Restimulation *in vitro* nicht expandiert. Nach SEB-Restimulation waren in Lymphknotenkulturen von SEB-behandelten Tieren ca. 10 % T_{reg}-Zellen, nach Ova+SEB-Behandlung ca. 7 % vorhanden, beides jeweils unabhängig vom Genotyp der Tiere (Abb. 40b). Dies war deutlich weniger als der Anteil von T_{reg}-Zellen in SEB-stimulierten Lymphknotenzellen von NaCl- oder Ova-behandelten Mäusen. In diesen Kulturen betrug der Anteil der T_{reg}-Zellen ca. 15 %,

unabhängig von Genotyp und Behandlung (Abb. 28b). D. h. Zellen, die *in vivo* noch nicht mit SEB in Kontakt gekommen waren, reagierten *in vitro* u. a. mit der Expansion regulatorischer T-Zellen auf dieses Toxin.

Daraus kann geschlossen werden, dass die durchgeführte wiederholte epikutane SEB-Behandlung *in vivo* eine generelle T-Zell-Anergie induzierte, die *in vitro* persistierte und nicht auf einer Vermehrung entzündungshemmender regulatorischer T-Zellen beruhte. Eine solche SEB-induzierte SEB-Anergie wurde bereits beschrieben (179, 180). Dass mehrmalige *in vivo*-Behandlung mit SEB dafür notwendig ist, wurde durch eine einwöchige Kurzzeit-Behandlung der Mäuse entsprechend dem AD-Induktionsschema kontrolliert. In diesem vorläufigen Versuch war die Zytokinproduktion der Lymphknotenzellen von SEB-behandelten Tieren deutlich stärker als nach der hier dargestellten siebenwöchigen AD-Induktion (Daten nicht gezeigt).

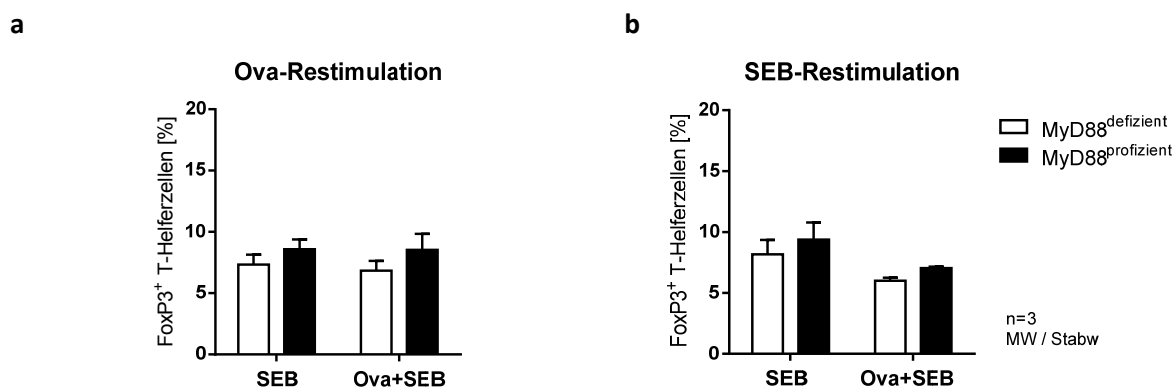


Abb. 40: Regulatorische T-Zellen in restimulierten Lymphknotenzellen nach SEB-Sensibilisierung. Der Anteil von T_{reg}-Zellen war unabhängig von der Versuchsgruppe ähnlich hoch. Im Vergleich zu T_{reg}-Zellen von Mäusen, die nicht mit SEB behandelt worden waren, blieb hier eine Expansion dieser Zellen aus.

3.5.3 Systemische Immunreaktion und Immunglobulinspiegel nach SEB-Sensibilisierung

Die Milzen der Versuchsmäuse eines Experiments wurden gewogen, um zu untersuchen, ob eine Vergrößerung des Organs als Ausdruck eines systemischen Entzündungsgeschehens vorlag. Im Gegensatz zur Ova-Behandlung (Abb. 30) war hier kein Effekt erkennbar. Nach Behandlung mit SEB schwankten die Werte relativ stark, sodass hier bei einer größeren Stichprobenmenge möglicherweise eine tendenzielle Vergrößerung der Milz erkennbar werden könnte. Nach Behandlung mit Ova+SEB war kein Unterschied im Milzgewicht erkennbar. Ob die Milzen von MyD88-profizienten Mäusen tatsächlich tendenziell größer

waren als von MyD88-defizienten Mäusen, müsste ebenfalls durch eine größere Stichprobenmenge geklärt werden.

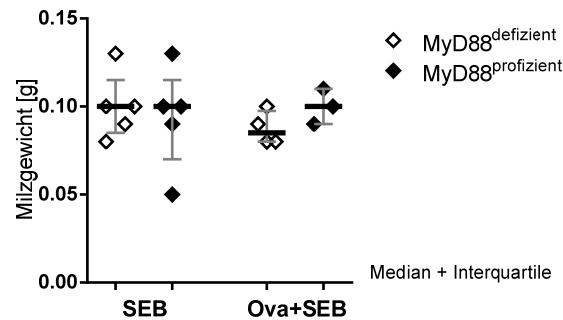


Abb. 41: Milzgewicht nach SEB-Sensibilisierung. Wegen geringer Stichprobengröße kann nur vermutet werden, dass SEB-Behandlung eine leichte Vergrößerung der Milz induzieren könnte.

Die Serum-Spiegel der natürlichen Antikörper IgM und IgG3 wiesen ähnliche Werte wie nach NaCl- oder Ova-Behandlung auf. Sie waren bei MyD88-profizienten Mäusen stärker erhöht als bei MyD88-defizienten Mäusen, Unterschiede zwischen SEB- oder Ova+SEB-Behandlung gab es jedoch nicht (Abb. 42). Dies unterstreicht, dass die chronische Hautirritation durch *tape stripping* größeren Einfluss auf die Produktion dieser Antikörper hatte als die Behandlung mit Antigenen.

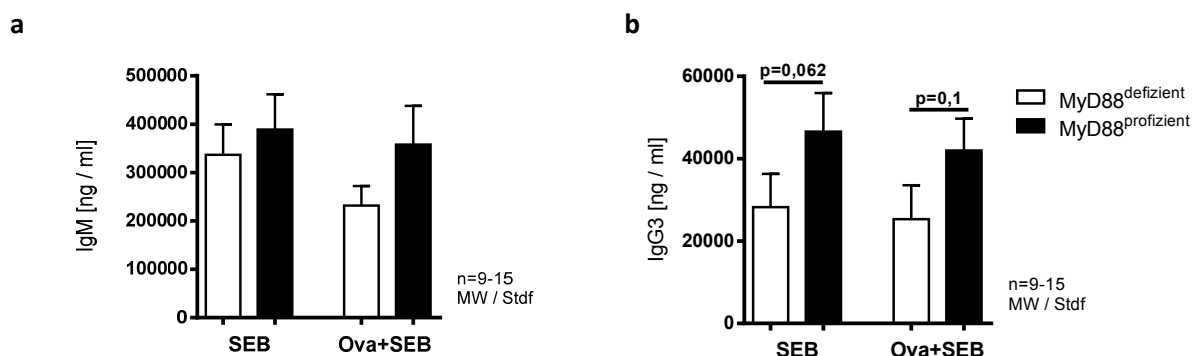


Abb. 42: Natürliche Antikörper nach SEB-Sensibilisierung. a) IgM- und b) IgG3-Spiegel wiesen ähnliche Werte auf wie nach AD-Induktion mit NaCl oder Ova. MyD88-profiziente Mäuse hatten höhere Spiegel natürlicher Antikörper im Serum als MyD88-defiziente Mäuse.

Die Gesamt-IgE-Spiegel lagen bei MyD88-defizienten Mäusen nach SEB-Sensibilisierung weiter deutlich höher als bei MyD88-profizienten Mäusen (Abb. 43), eine Annäherung wie nach Ova-Behandlung (Abb. 32) war nicht erkennbar. Insgesamt lagen die IgE-Spiegel nach SEB-Behandlung fast doppelt so hoch wie nach NaCl-Behandlung und ebenso nach Ova+SEB-Behandlung fast doppelt so hoch wie nach einzelner Ova-Behandlung (vgl. Abb. 32). D. h. auch bei MyD88-defizienten Tieren können die von vornherein stark erhöhten IgE-Spiegel im Serum durch entsprechende Behandlung noch deutlich mehr ansteigen.

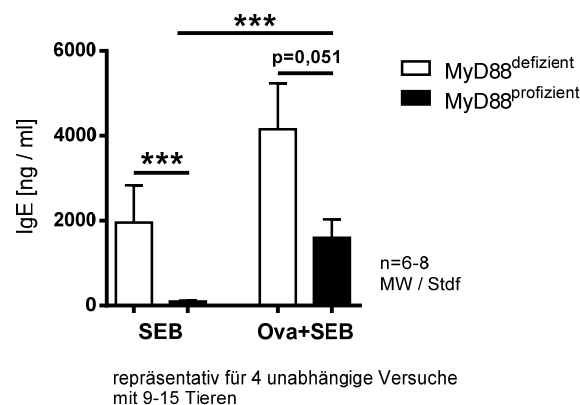


Abb. 43: Gesamt-IgE-Spiegel nach SEB-Sensibilisierung. MyD88-defiziente Mäuse hatten auch hier stark erhöhte IgE-Spiegel. Im Vergleich zu NaCl- / Ova-behandelten Mäusen waren die Werte noch deutlich höher.

Die Co-Administration von Ova+SEB hatte weiterhin großen Einfluss auf die Produktion Antigen-spezifischer Antikörper (Abb. 44). Die Spiegel der Ova-spezifischen Antikörper aller drei Isotypen waren nach Ova+SEB-Behandlung stark erhöht gegenüber einzelner Behandlung mit Ova (Abb. 44a-c). SEB verstärkte also die Immunreaktion gegen Ova, was auch schon bei der Zytokinproduktion Ova-spezifischer T-Zellen in restimulierten Lymphknotenzellen beobachtet wurde (Abb. 39). Im Gegenteil dazu waren SEB-spezifische Antikörper nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung vermindert gegenüber der einzelnen Behandlung mit SEB, wegen starker Schwankungen sind diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant (Abb. 44d-f). Möglicherweise stören die beiden Antigene wechselseitig die Immunreaktion gegen das jeweils andere Antigen, da sie unterschiedliche Mechanismen aktivieren, die unterschiedliche Zytokinmilieus benötigen.

Wie auch schon bei der AD-Induktion mit NaCl oder Ova hatten MyD88-abhängige Signalwege keinen großen Einfluss auf die Produktion Ova-spezifischer TH₂-Antikörper (Abb. 44a+b). Lediglich Ova-IgG2c wurde, wie auch nach einzelner Ova-Behandlung gesehen, in MyD88-defizienten Mäusen schwächer produziert als in MyD88-profizienten Kontrollen (Abb. 44c). Gegen SEB produzierten MyD88-defiziente Mäuse sogar tendenziell mehr IgE und IgG1 als MyD88-profiziente Mäuse, SEB-IgG2c wurde von MyD88-defizienten Mäusen wiederum schwächer gebildet (Abb. 44d-f). Da im Referenzserum SEB-Alum-immunisierter Mäuse nur Spuren von IgG2c vorhanden waren, konnte diese Messung nur über die optische Dichte ausgewertet werden. Sowohl SEB-IgE als auch SEB-IgG2c waren nur sehr schwach nachweisbar im Vergleich zu nicht mit SEB behandelten Kontrolltieren.

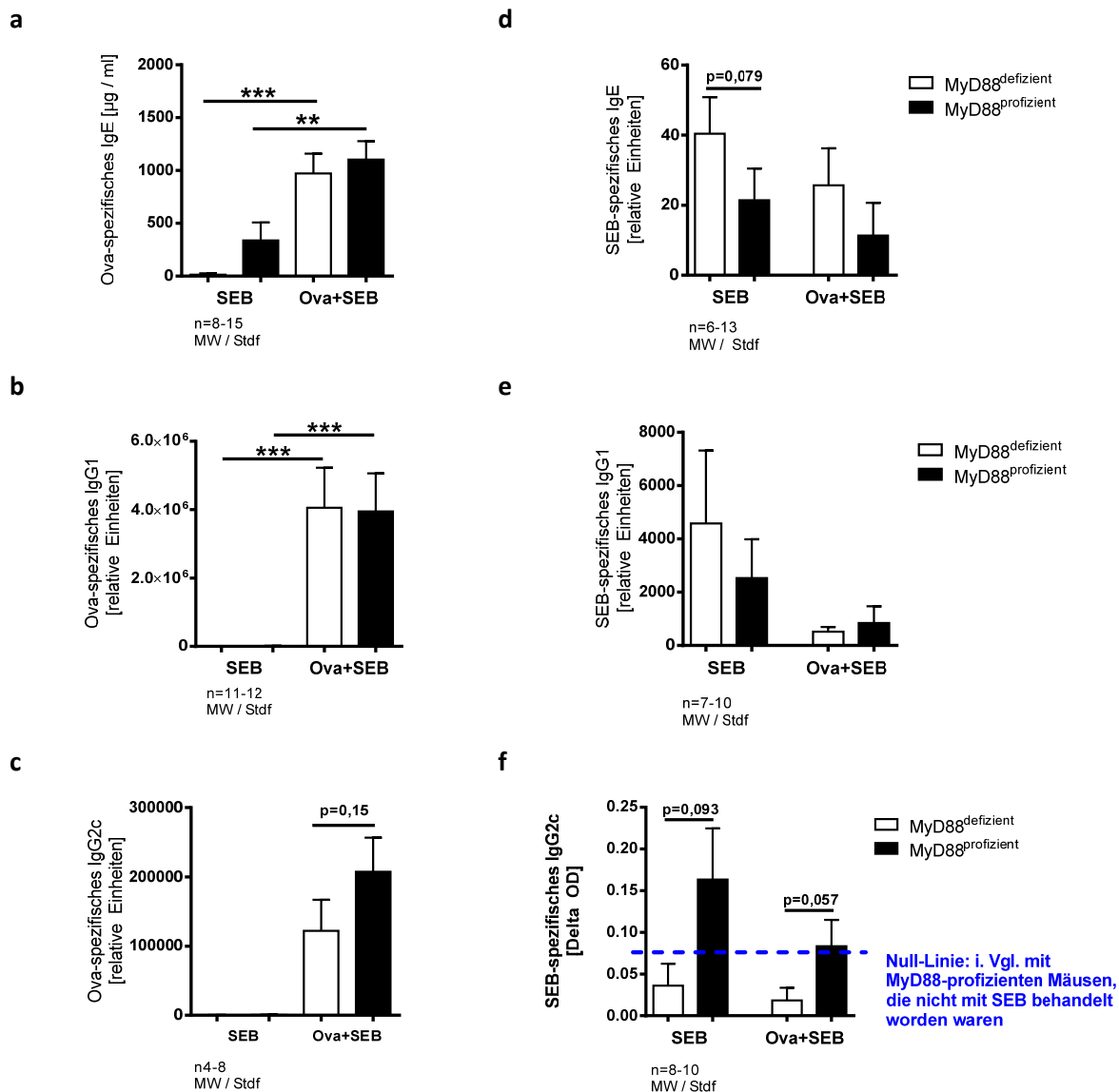


Abb. 44: Ova- und SEB-spezifische Immunglobulinspiegel nach SEB-Sensibilisierung. a-c) Ova-spezifische Antikörperspiegel von IgE und IgG1 waren unabhängig von MyD88, Ova-IgG2c-Spiegel waren tendenziell in MyD88-profizienten Mäusen höher, d-f) SEB-spezifische Antikörperspiegel dagegen waren höher in MyD88-defizienten Mäusen. d+f) an der Nachweisgrenze.

3.5.4 Zusammenfassung MyD88-abhängige SEB-Sensibilisierung bei AD

Co-Administration von Ova+SEB im Mausmodell zur AD-Induktion verstärkte viele Ova-induzierte Entzündungsparameter wie Makrophagen- und T-Helferzell-Infiltration in die Dermis, Zytokinproduktion Ova-spezifischer T-Zellen im Lymphknoten und Produktion von Antikörpern. Diese Effekte waren MyD88-abhängig. Co-Administration von Ova+SEB veränderte darüber hinaus MyD88-abhängig die Immunreaktion epidermaler T-Zellen und hemmte die Produktion SEB-spezifischer Antikörper im Vergleich zu einzelner SEB-Behandlung. Die wiederholte SEB- oder Ova+SEB-Behandlung induzierte eine generelle T-Zell-Anergie.

3.4 Keratinozyten-spezifische Rolle von MyD88 bei AD

3.4.1 Keratinozyten-spezifische MyD88^{knock-in}-Mäuse

Zur Analyse der Zelltyp-spezifischen Funktion von MyD88-abhängigen Signalwegen wurden Keratinozyten-spezifische MyD88^{knock-in}-Mäuse generiert. Dazu wurden MyD88LSL-Mäuse, welche eine von loxP-Stellen flankierte Stop-Kassette im ersten Intron des MyD88-Gens tragen (142) mit Keratin5Cre-Mäusen verkreuzt. Diese tragen das Cre-Rekombinase-Transgen unter dem Promotor des Keratin5-Gens, das in basalen epidermalen Keratinozyten exprimiert wird (144). In den Nachkommen, die homozygot für MyD88LSL und heterozygot für K5Cre waren (K5^{ind}MyD88), wurde die Stop-Kassette durch die Cre-Rekombinase deletiert. So wurde in diesen Tieren eine Re-Expression von MyD88 in epidermalen Keratinozyten induziert, während der restliche Organismus MyD88-defizient war.

Zur routinemäßigen Bestätigung der Zelltyp-spezifischen Re-Expression von MyD88 in K5^{ind}MyD88-Mäusen auf molekularer Ebene wurde bei diesen Tieren die Genotypisierung nicht nur aus DNA aus der Schwanzspitze, sondern zusätzlich aus Blut-DNA durchgeführt. Da im Blut keine K5-exprimierenden Zellen vorkommen, würde eine dort nachgewiesene Cre-induzierte MyD88-Wildtyp-Bande darauf hinweisen, dass bei dieser Maus eine Transmission dieses Allels in die Keimbahn aufgetreten ist, was bei Cre-loxP-Verkreuzungen in seltenen Fällen vorkommen kann. Solche Tiere dürften nicht für Versuche oder Verpaarungen verwendet werden. Da das Cre-Protein (auch bei anderen Cre-Transgen-tragenden Mauslinien!) in der Oozyte vorliegen kann, wurden für die Zucht der K5^{ind}MyD88-Mäuse keine K5Cre-Transgen-tragenden Weibchen verpaart, sondern K5Cre stets über das Männchen vererbt. Zusätzlich wurde bei je drei Mäusen jeden Genotyps (K5^{ind}MyD88, MyD88-profizient, MyD88-defizient) per *Western Blot* die Proteinexpression von MyD88 in verschiedenen Organlysaten untersucht (Abb. 45, unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Die Proteinmengen wurden per Nanodrop angeglichen und GAPDH wurde als konstitutiv exprimiertes Kontrollprotein mitgeführt.

Die Lunge enthält Epithelgewebe, welches jedoch kein K5 exprimiert. Entsprechend war dort in K5^{ind}MyD88-Mäusen kein MyD88-Protein nachweisbar. In der Milz kommt kein Epithelgewebe vor, auch hier war in K5^{ind}MyD88-Mäusen wie erwartet kein MyD88-Protein nachweisbar. Im Thymus kommt Epithelgewebe vor, welches während der Embryonalphase

vorübergehend K5 exprimiert, so dass in dem aus diesen Zellen entstandenen Gewebe MyD88 dauerhaft re-exprimiert wird. Hier war in den K5^{ind}MyD88-Mäusen ein schwaches MyD88-Signal erkennbar, jedoch deutlich weniger als in MyD88-profizienten Mäusen. Im Thymus findet die T-Zell-Selektion statt, d. h. T-Zellen mit autoreaktivem oder nicht-funktionellem T-Zell-Rezeptor werden dort vor der endgültigen Differenzierung eliminiert. Ob die Expression von MyD88 die T-Zell-Selektion beeinflusst, ist nicht bekannt. Ob T-Zellen von MyD88-defizienten Mäusen einen Differenzierungsdefekt haben, der auf die Thymus-Selektion zurückzuführen ist, müsste in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

In der Haut wurde sowohl in K5^{ind}MyD88-Mäusen als auch in MyD88-profizienten Mäusen ein ähnlich starkes MyD88-Signal nachgewiesen, sowohl bei MyD88 als auch GAPDH waren einige kleinere Banden als Zeichen einer Proteindegradation zu sehen. Hier sollte die Proteinisolation optimiert werden. Zur weiteren Sicherung, dass in K5^{ind}MyD88-Mäusen dieses Signal nur von den Keratinozyten stammt, sollten überdies Epidermis und Dermis voneinander getrennt lysiert und für einen *Western Blot* verwendet werden. Dies war wegen geringer Proteinausbeute und auftretender Degradation schwierig umzusetzen.

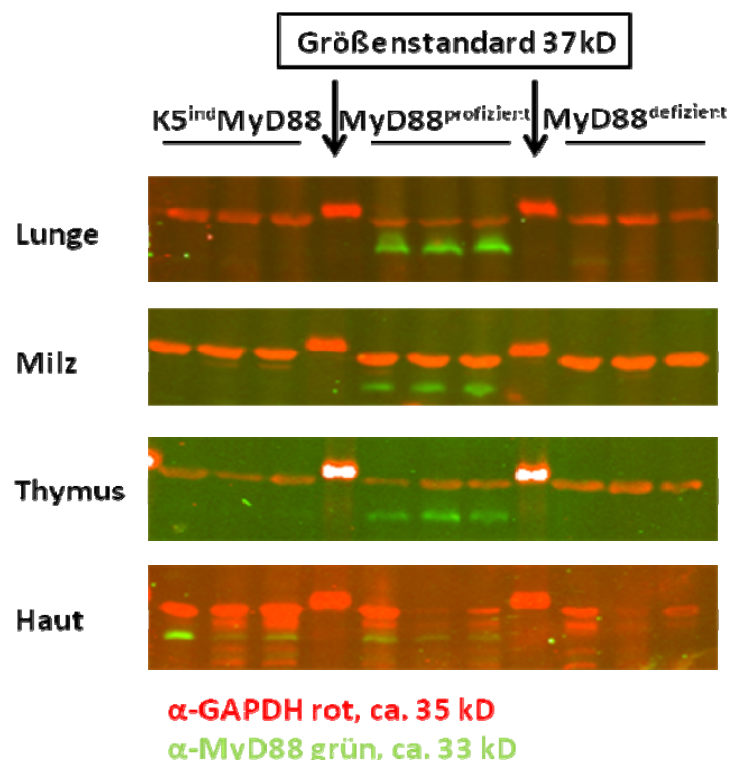


Abb. 45: Organ-spezifische Expression von MyD88 in K5^{ind}MyD88-Mäusen im *Western Blot*. Nur in der Haut war bei K5^{ind}MyD88-Mäusen ein deutliches MyD88-Signal darstellbar. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe.

Zum Vergleich der Immunglobulinspiegel von unbehandelten K5^{ind}MyD88-Mäusen und MyD88-defizienten und -profizienten Mäusen wurden die Seren dieser Tiere analysiert.

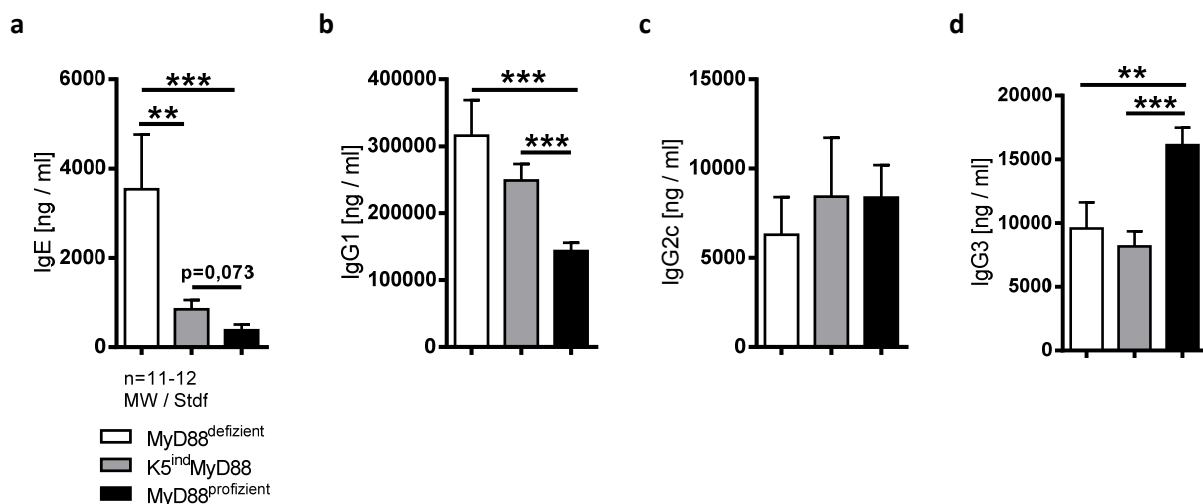


Abb. 46: Immunglobulinspiegel von naiven K5^{ind}MyD88-Mäusen. a) Die starke Überproduktion von IgE bei MyD88-defizienten Mäusen war bei K5^{ind}MyD88-Mäusen teilweise unterdrückt, die Spiegel lagen jedoch immer noch etwas höher als bei MyD88-profizienten Kontrollen. b) Die IgG1-Spiegel waren bei K5^{ind}MyD88-Mäusen nur leicht niedriger als bei MyD88-defizienten Tieren und waren immer noch hoch signifikant erhöht im Vergleich zu MyD88-profizienten Tieren. c) Keine Unterschiede bei IgG2c. d) IgG3 war bei K5^{ind}MyD88-Mäusen ebenso wie bei MyD88-defizienten Mäusen stark erniedrigt gegenüber MyD88-profizienten Mäusen.

Keratinozyten-spezifische Re-Expression von MyD88 inhibierte interessanterweise die in MyD88-defizienten Tieren stark erhöhte IgE-Produktion, jedoch nicht vollständig (Abb. 46a). Die IgG1-Spiegel waren bei K5^{ind}MyD88-Mäusen gegenüber MyD88-defizienten Mäusen leicht vermindert, aber weiterhin stark erhöht gegenüber MyD88-profizienten Tieren (Abb. 46b). Auf die Serum-Spiegel von IgG2c, IgG3 (Abb. 46c+d) und auch IgM (nicht gezeigt, kein Unterschied zwischen MyD88-profizient und -defizient), hatte K5-induzierte MyD88-Expression keinen Einfluss.

3.4.2 Ausschluss eines zytotoxischen Effekts der Cre-Rekombinase auf Keratinozyten bei K5^{ind}MyD88-Mäusen

Um auszuschließen, dass die Expression der Cre-Rekombinase in den Keratinozyten einen unerwünschten Effekt auf die Versuchsergebnisse hat, wurden MyD88-profiziente Mäuse mit und ohne K5Cre-Insertion sowie WT-Mäuse in einem einwöchigen AD-Versuch verglichen. Als Negativkontrolle wurden auch MyD88-defiziente Tiere mitgeführt. Als erster Parameter wurde die Haut- und Epidermisdicke mittels HE-Färbung dargestellt (Abb. 47).

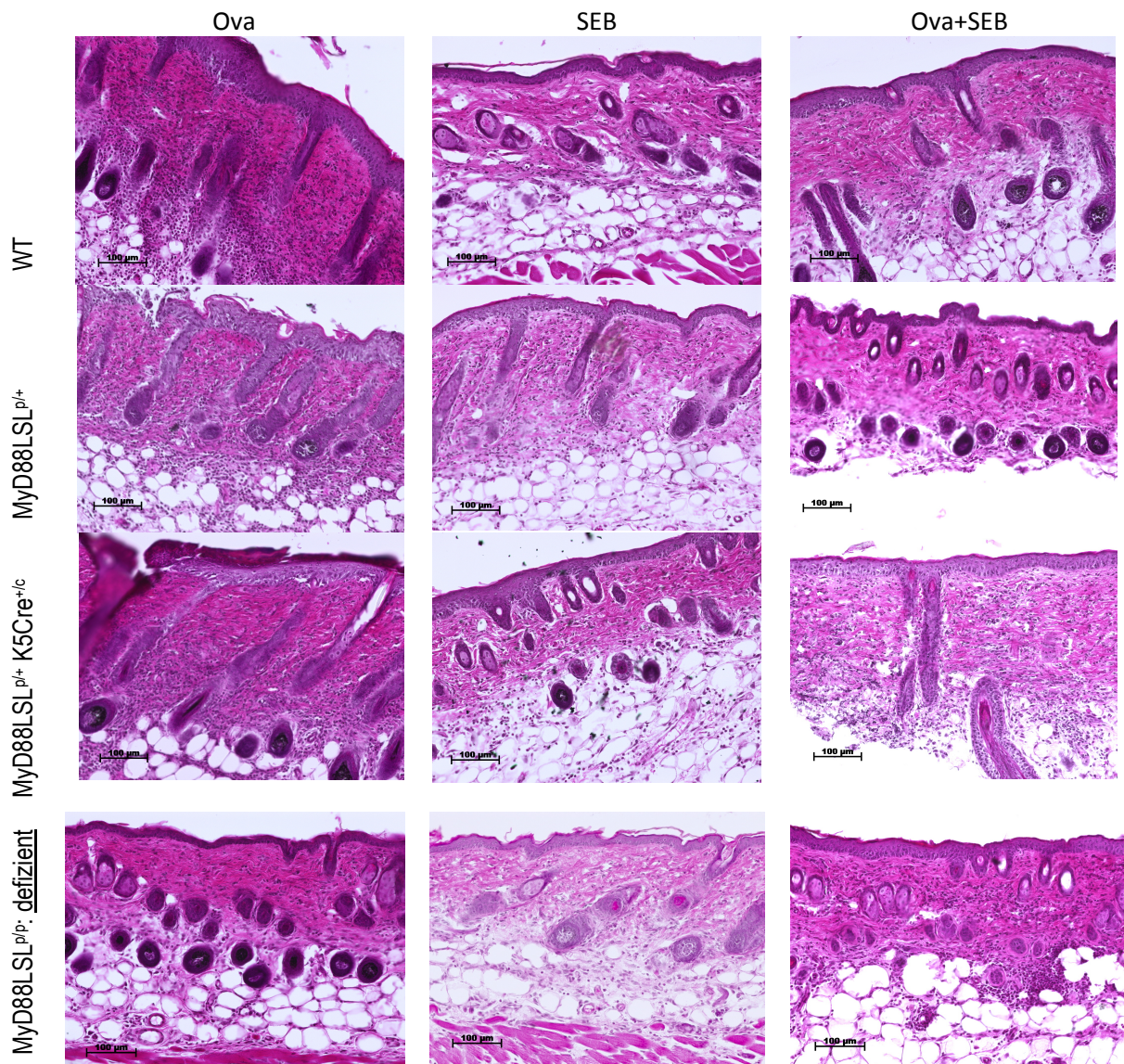


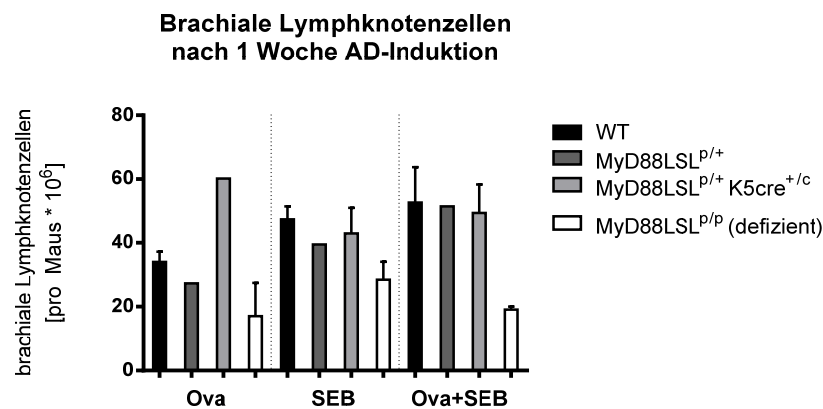
Abb. 47: Ausschluss eines unerwünschten Effektes des K5Cre-Transgens auf die Epidermis nach AD-Induktion. Nach einer einwöchigen Behandlung zur AD-Induktion wurde die Haut der Tiere histologisch mittels HE-Färbung dargestellt (exemplarische Bilder). Bei der Epidermisdicke gab es keine erkennbaren Unterschiede zwischen Wildtyp-Tieren, sowie MyD88-profizienten Mäusen, die das K5Cre-Transgen trugen oder die es nicht trugen. Auch bei der Beurteilung des dermalen entzündlichen Infiltrates (Dichte der Zellkerne) in den Präparaten traten keine bedeutsamen Unterschiede auf.

Die Epidermis von Tieren aller drei MyD88-profizienten „Genotypen“ war nach der jeweiligen Antigen-Behandlung ähnlich stark verdickt, bei MyD88-defizienten Kontrolltieren fehlte diese Epidermishyperplasie wie erwartet. Bei der Beurteilung des entzündlichen Infiltrates, was durch die Dichte der Zellkerne charakterisiert werden kann, traten ebenfalls keine bedeutsamen Unterschiede auf.

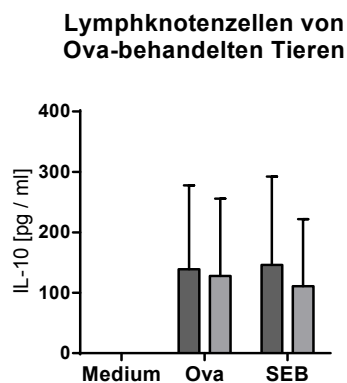
Auch die Lymphknotenzellen dieser Tiere wurden untersucht, um auszuschließen, dass das K5Cre-Transgen unerwarteterweise die Induktion der adaptiven Immunantwort stören könnte.

Sowohl bei der Zellzahl als auch bei der Restimulation traten keine Unterschiede auf, die eine weitere Analyse notwendig gemacht hätten (Abb. 48).

a



b



c

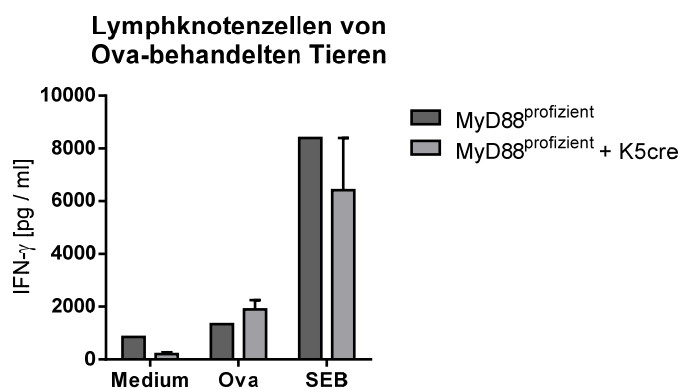


Abb. 48: Ausschluss eines unerwünschten Effektes des K5Cre-Transgens auf die AD-Induktion in den Lymphknoten. a) Zellzahl von brachialen Lymphknoten nach AD-Induktion. b+c) Zytokinproduktion von Lymphknotenzellen Ova-behandelter Tiere nach Restimulation. Es traten keine bedeutsamen Unterschiede auf zwischen Zellen von Mäusen, die das K5Cre-Transgen trugen und solchen, die es nicht trugen.

3.4.3 AD in Keratinozyten-spezifischen MyD88^{knock-in}-Mäusen

Die Rolle von Keratinozyten-spezifischen MyD88-Signalwegen *in vivo* bei AD wurde durch zusätzlichen Einsatz von K5^{ind}MyD88-Mäusen im Vergleich zu den parallel analysierten MyD88-defizienten und MyD88-profizienten Wurfgeschwistern im beschriebenen Mausmodell untersucht. Der Übersicht halber werden die Ergebnisse für die K5^{ind}MyD88-Mäuse hier gesondert dargestellt. Da nach NaCl-Behandlung keine wesentlichen Unterschiede zwischen MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen auftraten, werden im Folgenden für die K5^{ind}MyD88-Mäuse meist nur die Ergebnisse nach Ova-Behandlung behandelt, NaCl-behandelte Kontrollen sind jedoch stets mitgeführt worden.

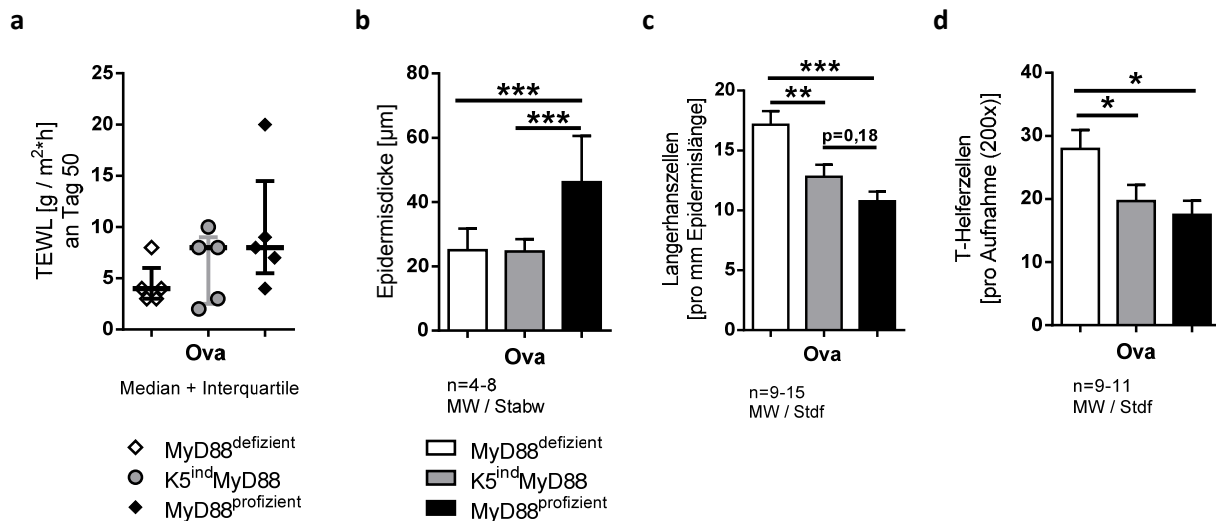


Abb. 49: Entzündungszeichen der Haut nach AD-Induktion in K5^{ind}MyD88-Mäusen. a) Transepidermaler Wasserverlust b) Epidermisdicke c) Anzahl von Langerhanszellen in der Epidermis d) T-Helferzellen in der Dermis. MyD88-Signalwege in Keratinozyten beeinflussten den transepidermalen Wasserverlust, die Langerhanszellmigration, und die T-Helferzellrekrutierung in der Dermis, nicht aber die Epidermishyperplasie.

Für die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes des behandelten Hautareals am Versuchsende stand nur in einem repräsentativen Versuch das Messgerät zur Verfügung. Die vorläufigen Daten (Abb. 49a) zeigen, dass die Barrierefunktion in K5^{ind}MyD88-Mäusen schlechter war als in MyD88-defizienten Mäusen und ähnliche TEWL-Werte aufwies wie bei MyD88-profizienten Mäusen. Dies weist darauf hin, dass MyD88-Signalwege in Keratinozyten die Entzündungsreaktion der Epidermis fördern, die zur erhöhten Durchlässigkeit der Barriere führt. Hier sollten weitere Versuche folgen, um die Stichprobengröße zu erhöhen und damit die Beobachtung zu sichern.

Abb. 49b zeigt, dass die in Abb. 20 dargestellte Allergen-induzierte Verdickung der Epidermis im Verlaufe der Behandlung mit Ova, die bei MyD88-defizienten Tieren ausblieb, durch Keratinozyten-intrinsische MyD88-Expression nicht wiederhergestellt werden konnte. Dies weist darauf hin, dass zur Induktion dieser Akanthose Signale notwendig sind, die von anderen Zelltypen MyD88-abhängig produziert werden.

Die in Abb. 21 gezeigte MyD88-abhängige Verminderung der Anzahl von Langerhanszellen in der Epidermis, welche auf eine Emigration der Zellen hindeutet, konnte hingegen durch Keratinozyten-spezifische MyD88-Signalwege partiell wieder hergestellt werden (Abb. 49c). Ob dies ein essenzieller Mechanismus für die Antigen-abhängige Emigration ist, oder ob sie auch allein durch intrinsische Signalwege der Langerhanszellen induziert werden kann, konnte anhand dieser Versuche nicht festgestellt werden. Dazu sollten

Langerin^{ind}MyD88-Mäuse generiert und der AD-Induktion unterzogen werden. Möglich ist auch eine Interaktion mit weiteren Zelltypen.

Ein weiterer von Keratinozyten über MyD88-Signalwege beeinflusster Effekt war die Infiltration der Dermis mit T-Helferzellen (Abb. 49d). MyD88-defiziente Mäuse wiesen nach AD-Induktion deutlich mehr T-Helferzellen in der Epidermis auf als MyD88-profiziente Kontrollen. In NaCl-behandelten K5^{ind}MyD88-Mäusen entsprach die Anzahl der dermalen T-Helferzellen zwar den MyD88-defizienten Tieren. Jedoch waren nach Ova-Behandlung nur so viele T-Helferzellen in der Haut von K5^{ind}MyD88-Mäusen wie bei MyD88-profizienten Kontrolltieren (Abb. 49d). Hier vermindern MyD88-abhängige Signalwege in Keratinozyten offenbar die Ova-induzierte Einwanderung von T-Helferzellen in die Dermis.

Die Infiltration der Dermis mit Makrophagen wurde durch MyD88-Expression in Keratinozyten nicht beeinflusst, in der Dermis der K5^{ind}MyD88-Mäuse waren ebenso viele Makrophagen vorhanden wie in MyD88-defizienten Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Analyse der beobachteten Langerhanszell-Migration wurde eine Chemokinbestimmung per *ELISA* durchgeführt. Dabei wurde die Menge des v. a. von Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen sekretierten Chemokins CCL17 aus Zellüberständen der kultivierten Haut-drainierenden Lymphknoten bestimmt. Die absolute Quantifizierung von Langerhanszellen in den Lymphknoten per Durchflusszytometrie war wegen des geringen Anteils dieser Zellen nicht aussagekräftig.

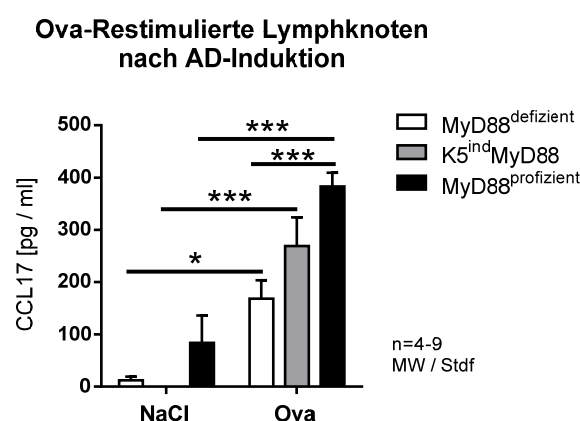


Abb. 50: CCL17-Sekretion restimulierter Lymphknoten nach AD-Induktion.

Die CCL17-Menge in den Lymphknoten (Abb. 50) verhielt sich reziprok zur Anzahl der Langerhanszellen in der Epidermis nach AD-Induktion (Abb. 49c). Dies bestätigt die Beobachtung, dass CCL17-produzierende dendritische Zellen inklusive der Langerhanszellen

nach Ova-Behandlung MyD88-abhängig aus der Haut in die Lymphknoten migrieren, und dass dies zum großen Teil durch Signale von Keratinozyten induziert wird.

Wie zuvor beschrieben, wurden Haut-drainierende Lymphknoten von Versuchsmäusen analysiert und mit endoOva restimuliert. Bei der Analyse von Lymphknoten-Zellzahl, zellulärer Zusammensetzung und Zytokinfreisetzung Ova-spezifischer T-Zellen wurde kein Einfluss von MyD88-Signalwegen in Keratinozyten auf die T-Zell-Aktivierung gefunden. Lymphknotenzellen von K^{5ind}MyD88-Mäusen entsprachen in allen untersuchten Parametern den Lymphknotenzellen von MyD88-defizienten Tieren. Abb. 51a zeigt exemplarisch dafür die Zellzahl der brachialen Lymphknoten.

Die IgE-Spiegel in unbehandelten und NaCl-behandelten K^{5ind}MyD88-Mäusen waren stark vermindert gegenüber MyD88-defizienten Mäusen und lagen nur noch leicht höher als bei MyD88-profizienten Mäusen (Abb. 51b). Nach AD-Induktion mit Ova wurde allerdings kein Effekt der MyD88-Expression in Keratinozyten auf die Höhe der Antigen-spezifischen oder Gesamt-Immunglobulinspiegel gefunden. Die Seren dieser Tiere entsprachen denen der MyD88-defizienten Versuchstiere. Abb. 51b zeigt dazu exemplarisch die Gesamt-IgE-Spiegel nach AD-Induktion.

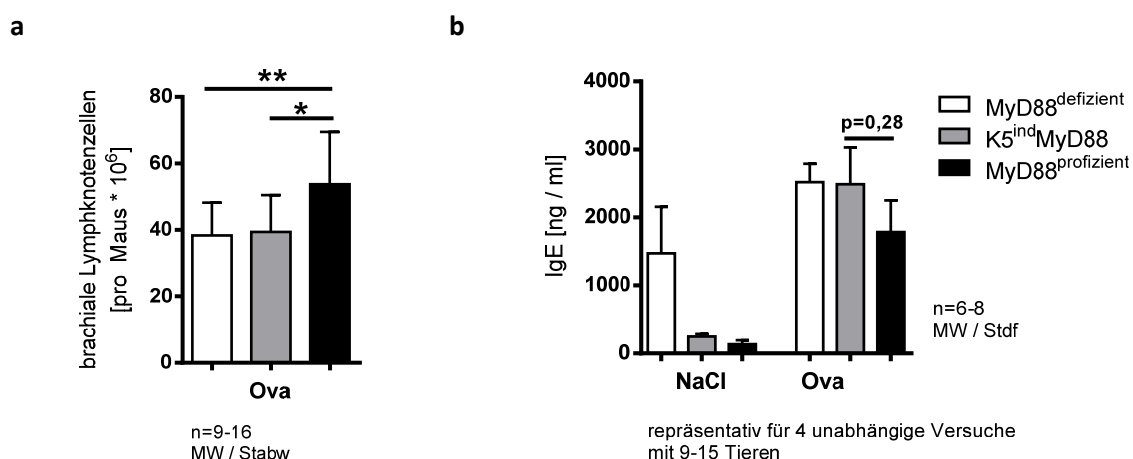


Abb. 51: Haut-drainierende Lymphknoten und Antikörperbildung von K^{5ind}MyD88-Mäusen

Somit haben MyD88-abhängige Signalwege in Keratinozyten eine Rolle bei der homöostatischen Regulation der IgE-Sekretion, nicht aber bei der Antikörperproduktion nach AD-Induktion. Die lokale Entzündung in der Haut dagegen wird klar von Keratinozyten MyD88-abhängig beeinflusst, indem die Auswanderung von Langerhanszellen aus der Epidermis angeregt wird, sowie die Infiltration der Dermis mit T-Helferzellen kontrolliert wird.

3.4.4 Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch primäre murine Keratinozyten *in vitro*

Um zu untersuchen, welche Entzündungsmediatoren von Keratinozyten MyD88-abhängig gebildet werden, die die *in vivo* beobachteten Effekte auf Langerhanszell-Migration und T-Zell-Rekrutierung vermitteln könnten, wurden primäre epidermale Keratinozyten von MyD88-defizienten und MyD88-profizienten Mäusen isoliert. Diese wurden in Kultur mit verschiedenen Antigenen stimuliert und anschließend die Proliferation / Viabilität sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Zellüberstand bestimmt. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen von TRIF-defizienten Tieren mitgeführt. TRIF ist neben MyD88 das zweite Adaptermolekül von TLR4 und das einzige Adaptermolekül von TLR3.

Durch magnetische Zellseparation isolierter Keratinozyten und anschließende durchflusszytometrische Bestätigung der Zellseparation wurde eine mögliche Kontamination der Kultur mit anderen epidermalen Immunzellen wie Langerhanszellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen überprüft (Abb. 52a). Jedoch war die Ausbeute sowie Kultivierungsfähigkeit der magnetisch separierten Zellen wesentlich vermindert und der Vergleich mit nicht auf diese Weise aufgereinigten Keratinozytenkulturen ergab keine qualitativen Unterschiede der Ergebnisse. Daher wurde im weiteren Verlauf der Experimente auf dieses Verfahren verzichtet und die Zellen nach der Isolierung und Vereinzelung sofort kultiviert.

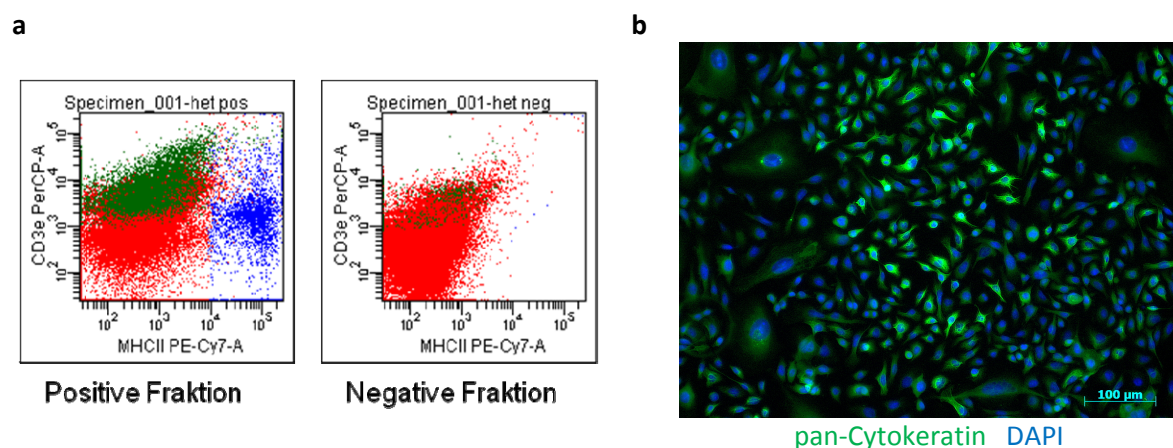


Abb. 52: Reinheit isolierter und kultivierter Keratinozyten. a) Entfernung von epidermalen Immunzellen durch magnetische Zellseparation b) Auf kollagenisiertem Objektträger kultivierte Keratinozyten

Abb. 52b zeigt exemplarisch eine Immunfluoreszenz-markierte Kultur überwiegend konfluenter Keratinozyten. Sowohl morphologisch als auch durch die panCytokeratin-Färbung ließ sich eine sichtbare Kontamination mit anderen Zelltypen ausschließen. Durch

eine Doppelfärbung mit CD90.2 wurde überprüft, ob in der Kultur Fibroblasten aus der Dermis vorkommen. Dies war nicht der Fall.

Unveröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten überdies, dass frisch isolierte Suspensionen von Epidermiszellen nur sehr geringe Anteile der genannten Zelltypen enthielten. Überdies ist das Zellkulturmedium für Keratinozyten selektiv, da es *BMDC* zum schnellen Absterben brachte, was vermutlich auch für andere Immunzellen gelten könnte. Vereinzelte Immunzellen zwischen den frisch isolierten Keratinozyten sollten daher nach einer 7 oder 14 Tage dauernden Kultur mit mehrfachem Mediumwechsel keinen messbaren Einfluss mehr auf die proliferierenden Keratinozyten haben.

Weiterhin wurde die Reinheit der Keratinozytenkultur überprüft, indem mit CCL17 sowie IL-17A zwei Proteine, die in der Epidermis hauptsächlich von Langerhanszellen bzw. $\gamma\delta$ -T-Zellen produziert werden, in Zellkulturüberständen von verschiedenen Zeitpunkten und nach Zugabe verschiedener Stimuli gemessen wurden. Beides war in mindestens drei unabhängigen Experimenten nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt), was das Vorhandensein von Langerhanszellen oder epidermalen T-Zellen in der Kultur unwahrscheinlich macht.

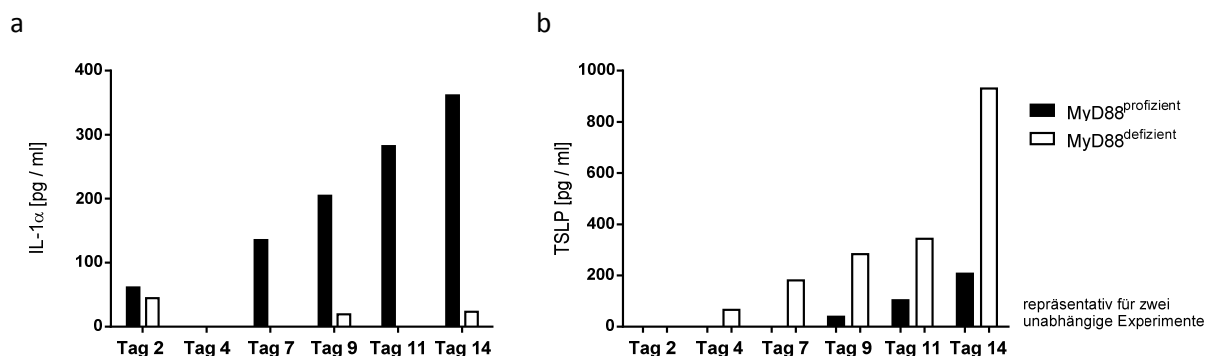


Abb. 53: Kinetik der Zytokinproduktion von Keratinozyten im Verlauf der Kultivierung. a) IL-1 α wurde MyD88-abhängig produziert. b) TSLP war dagegen in MyD88-defizienten Zellen stark erhöht gegenüber Kontrollen. Die sekretierten Mengen beider Zytokine stiegen im Verlauf der Kultivierung stark an.

Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium der kultivierten Keratinozyten gewechselt und die Zellüberstände für *ELISA* bei -20 °C gelagert. Die Messung von Zytokinen wie IL-1 α und TSLP aus diesen Überständen ergab, dass die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren mit der Kultivierungsdauer der Zellen anstieg. Außerdem wurde festgestellt, dass MyD88-defiziente Keratinozyten wenig bis kein IL-1 α produzierten, dafür sehr viel mehr TSLP freisetzten als MyD88-profiziente Zellen (Abb. 53).

Um zu untersuchen, ob den Unterschieden in der Zytokinfreisetzung zwischen MyD88-profizienten und MyD88-defizienten Keratinozyten eine unterschiedliche Proliferation / Viabilität der Zellen zugrunde liegt, wurden MTT-Tests der kultivierten Zellen durchgeführt. In kollagenisierten Kulturplatten wurde die Proliferation / Viabilität der Keratinozyten nach 7 Tagen Kultur gemessen (Abb. 54a), auch TRIF-defiziente Zellen wurden mitgeführt. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei Mauslinien und kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimuli. Eine Ausnahme stellten die TRIF-defizienten mit endoOva+SEB stimulierten Zellen dar. Ihre Viabilität war ca. 30 % geringer als die der übrigen Versuchsansätze. Diese Beobachtung könnte auf einer veränderten Antigen-Aufnahme gegenüber einzeln mit Endotoxin-freiem Ova oder SEB stimulierten Zellen beruhen, bei der TRIF-abhängige Signalwege eine Rolle spielen.

Daneben wurden Keratinozyten auch ohne Kollagenbeschichtung der Kulturplatten kultiviert, um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit der Zellen gibt. Nach 14 Tagen zeigte sich eine um ca. 20 % schwächere MTT-Reaktion in den MyD88-profizienten Zellen im Vergleich zu MyD88-defizienten oder TRIF^{knock-out}-Zellen (Abb. 54b). Dies könnte entweder auf verstärkte Proliferation und / oder stärkere Adhärenz der MyD88-defizienten und TRIF^{knock-out}-Zellen hinweisen, die mit unterschiedlicher Differenzierungsfähigkeit einhergehen könnte und somit eine Rolle bei der epidermalen Akanthose nach AD-Induktion *in vivo* spielen könnte.

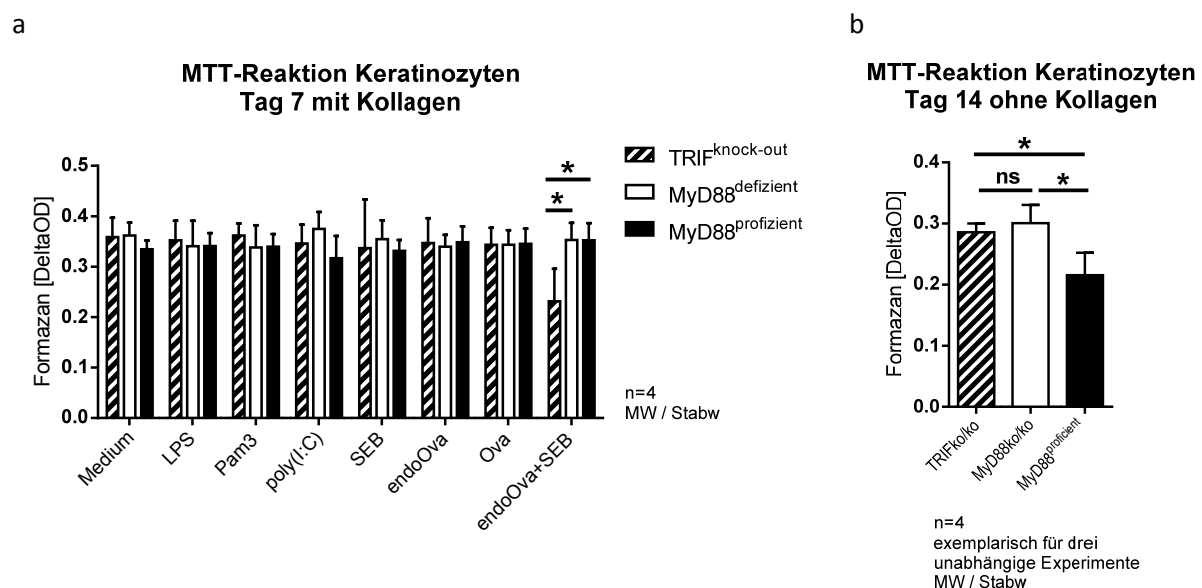


Abb. 54: Proliferation / Viabilität primärer Keratinozyten. a) Nach 7 Tagen Kultur auf Kollagen traten keine Unterschiede zwischen Genotypen oder verwendeten Stimuli auf mit Ausnahme mit Ova+SEB in TRIF^{knock-out}-Zellen. b) Nach 14 Tagen Kultur ohne Kollagen hatten MyD88-defiziente oder TRIF^{knock-out}-Zellen eine ca. 30 % bessere Viabilität als Kontrollzellen.

In den Zellkulturüberständen konnten die Zytokine IL-1 α , GM-CSF und TSLP sowie die Chemokine KC (CXCL1) und CCL2 nachgewiesen werden (Abb. 55). Mit Ausnahme von TSLP war die Expression aller genannten Proteine stark von MyD88 abhängig, nicht jedoch von TRIF. In MyD88-defizienten Zellen wurden sie in weit geringerem Maße produziert als in den beiden anderen Genotypen. Im Gegensatz dazu war die Produktion von TSLP in MyD88-defizienten Keratinozyten stark erhöht.

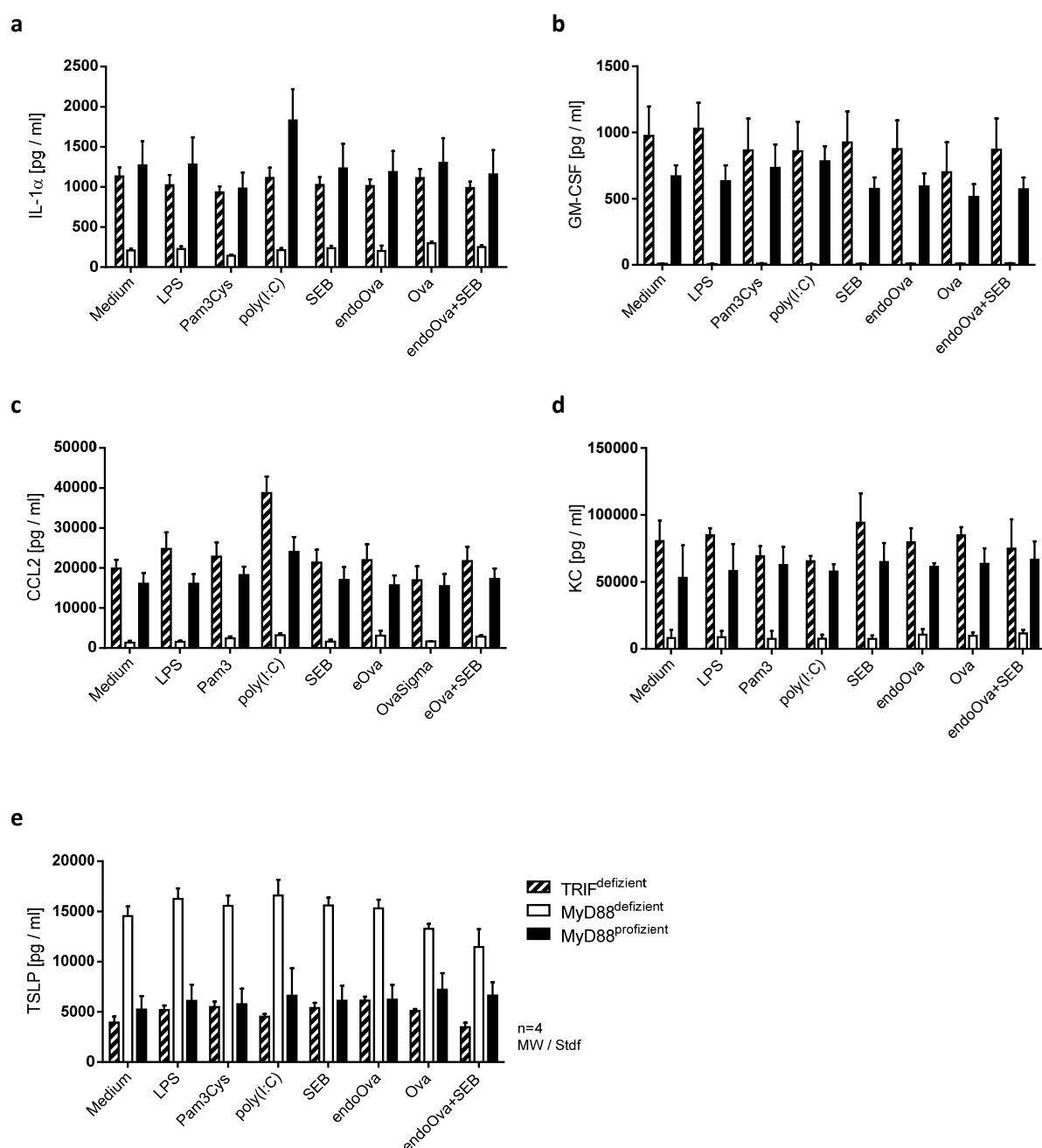


Abb. 55: Entzündungsmediatoren kultivierter primärer Keratinozyten. a) IL-1 α , b) GM-CSF, c) CCL2, d) KC wurden MyD88-abhängig produziert. e) TSLP-Produktion war in MyD88-defizienten Zellen stark erhöht.

Die bei der Keratinozytenkultur verwendeten TLR-Liganden und Allergene sollten Aufschluss darüber geben, wie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch diese Antigene beeinflusst wird, und somit nähere Erkenntnisse über die Rolle der Keratinozyten bei der allergischen Sensibilisierung bringen. Jedoch war der Einfluss der eingesetzten Stimuli auf die Sekretion dieser Proteine mit wenigen Ausnahmen gering. Ursache hierfür ist vermutlich das künstliche *in vitro*-Milieu, das die Keratinozyten wahrscheinlich unspezifisch stimuliert.

3.4.5 Primäre Keratinozyten aus nicht-betroffener Haut von AD-behandelten Mäusen

Bei AD-Patienten sind verschiedene Parameter beschrieben, in denen sich unbetroffene / asymptomatische Hautstellen von denen gesunder (nicht-atopischer) Probanden unterscheiden. Dies wird hauptsächlich mit der individuellen Barrierefunktion in Verbindung gebracht, die bei AD-Patienten gestört ist, z. B. durch Mutationen im Filaggrin-Gen (108).

Um zu untersuchen, ob die Induktion von AD im Mausmodell Einfluss auch auf die Epidermis von entfernten unbehandelten Hautstellen hat, wurden Keratinozyten aus Ohren und Schwanzhaut von Versuchsmäusen isoliert und kultiviert. So sollte ein Einfluss der lokal applizierten Allergene auf entfernte unbehandelte Hautareale untersucht werden, da dies durch die Verwendung von Wurfgeschwister-Tieren gegen eine genetische oder umweltbedingte Ursache für mögliche Unterschiede zwischen naiven und behandelten Mäusen sprechen würde.

K5^{ind}MyD88-Mäuse wurden in diesem Versuch aus verschiedenen Gründen nur bei der Ova-Behandlung mitgeführt: In dieser Arbeit wurde der Einfluss von MyD88-Signalwegen in Keratinozyten im Ova-induzierten AD-Modell genauer untersucht und dargestellt. Es traten bei der Entzündung nach NaCl-Behandlung kaum MyD88-abhängige Unterschiede auf. Aus Zuchtgründen war die Anzahl der verfügbaren K5^{ind}MyD88-Tiere zum Zeitpunkt dieses Versuchs limitiert.

Bei der Isolierung der Keratinozyten zeigten sich deutliche Unterschiede in der Zellausbeute (Abb. 56). Bei allen Genotypen war die erhaltene Zellzahl pro Maus nach Ova-Behandlung um ca. 30 % höher als in den anderen Behandlungsgruppen. Lediglich die NaCl-behandelten MyD88-profizienten Tiere zeigten ebenfalls eine etwas erhöhte Zellzahl. Dies könnte ein Hinweis auf eine durch die AD-Induktion verursachte Hyperproliferation der Keratinozyten

auch in weit von der Läsion entfernten Hautstellen sein. Dies würde entweder auf eine adaptive Reaktion oder auf eine systemisch erhöhte Barrierepermeabilität hinweisen.

Zwar wurde auch bei den Keratinozyten der naiven TRIF-defizienten Mäuse eine höhere Zellzahl erzielt als in den MyD88-defizienten und MyD88-profizienten Tieren, jedoch stammten die TRIF-defizienten Mäuse aus einer anderen Tierhaltungsanlage, so dass genetische und mikrobielle Unterschiede zwischen den Mauslinien als Ursache dieses Ergebnisses nicht ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus ist hier die Stichprobe noch zu klein, um die Ergebnisse abschließend beurteilen zu können.

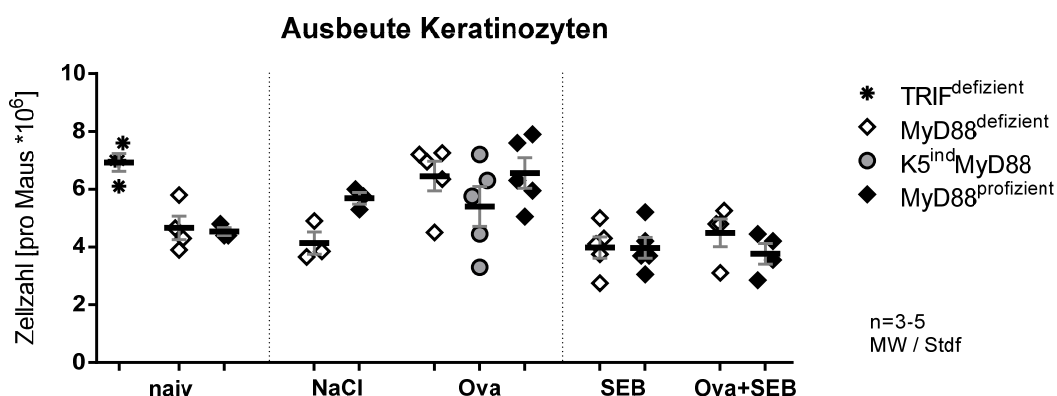


Abb. 56: Zellausbeute bei der Keratinozyten-Isolation naiver und AD-vorbehandelter Mäuse

Die Proliferation / Viabilität sowie die Sekretion von Entzündungsmediatoren der Keratinozyten von Versuchstieren wurde analog zu den Keratinozyten unbehandelter Mäuse (Abb. 57, vgl. Abb. 54) bestimmt. Im Gegensatz zu den Keratinozyten unbehandelter Mäuse war nach NaCl- oder Ova-Behandlung zu beobachten, dass die Keratinozyten MyD88-profizienter Mäuse tendenziell eine bessere Proliferation / Viabilität aufwiesen als die Zellen von MyD88-defizienten oder auch K5^{ind}MyD88-Mäusen. Die Keratinozyten der SEB- oder Ova+SEB-vorbehandelten Mäuse wiesen zwar nach MTT-Test eine deutlich schlechtere Proliferation / Viabilität auf als nach NaCl- oder Ova-Vorbehandlung. Da jedoch diese Versuchsgruppen nicht parallel verarbeitet wurden, könnte es sich um experimentelle Schwankungen handeln. Hier sollten weitere Versuche durchgeführt werden, um festzustellen, ob die Ergebnisse sich bestätigen lassen.

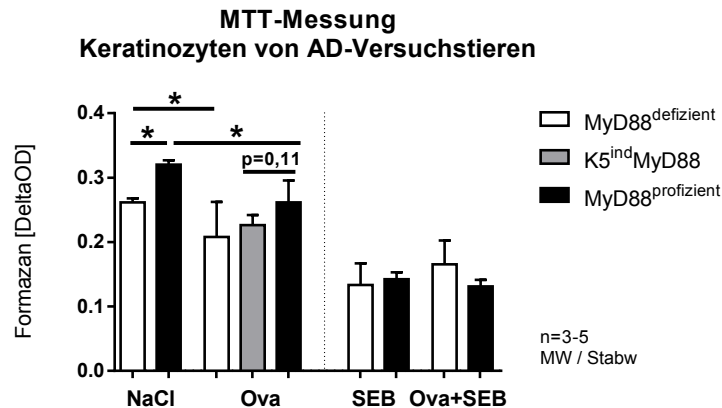


Abb. 57: Proliferation / Viabilität von kultivierten Keratinocyten aus AD-behandelten Mäusen

Die Messung der von den Keratinocyten freigesetzten Zytokine ergab, dass die AD-Induktion auf der Rückenhaut tatsächlich auch Einfluss auf Keratinocyten von entfernten unbehandelten Hautstellen hatte, in diesem Fall Ohr- und Schwanzhaut. Wie Abb. 58e zeigt, sekretierten MyD88-defiziente Zellen von Ova- und Ova+SEB-behandelten Mäusen deutlich mehr TSLP als die NaCl-behandelte Kontrollgruppe sowie die Zellen der nur mit SEB behandelten Tiere. In MyD88-profizienten Zellen, die weitaus weniger TSLP freisetzen, war dieser Effekt nicht erkennbar. Nach Vorbehandlung der Tiere mit Ova und / oder SEB war die TSLP-Produktion im Gegenteil sogar vermindert gegenüber den NaCl-Kontrollen.

IL-1 α (Abb. 58a), dessen Sekretion MyD88-abhängig verstärkt wurde und dessen Wirkung über den MyD88-abhängigen IL-1R vermittelt wird, wurde in Keratinocyten von MyD88-profizienten Ova-vorbehandelten Tieren verstärkt produziert, hingegen in MyD88-defizienten Zellen vermindert gegenüber den NaCl-Kontrollen. Für GM-CSF, KC und CCL2 (Abb. 58b-d) waren die Ergebnisse weniger eindeutig und lassen noch keine Aussage zu, ob AD-Induktion *in vivo* eine Veränderung unbeteiligter Keratinocyten *in vitro* vermitteln könnte.

Da die NaCl- und Ova-behandelten Tiere und Zellen separat von den SEB- und Ova+SEB-Gruppen bearbeitet wurden, kann hier kein unmittelbarer Vergleich gezogen werden, Schwankungen zwischen einzelnen Versuchen sind möglich. Deswegen sollten die Versuchsgruppen Ova und Ova+SEB bei Folgeversuchen parallel bearbeitet werden, um festzustellen, ob es sich um experimentelle Schwankungen handelt oder ob Keratinocyten von SEB- und Ova+SEB-behandelten Mäusen grundsätzlich schlechter proliferieren und weniger Zytokine freisetzen als nach NaCl- oder Ova-Behandlung der Mäuse.

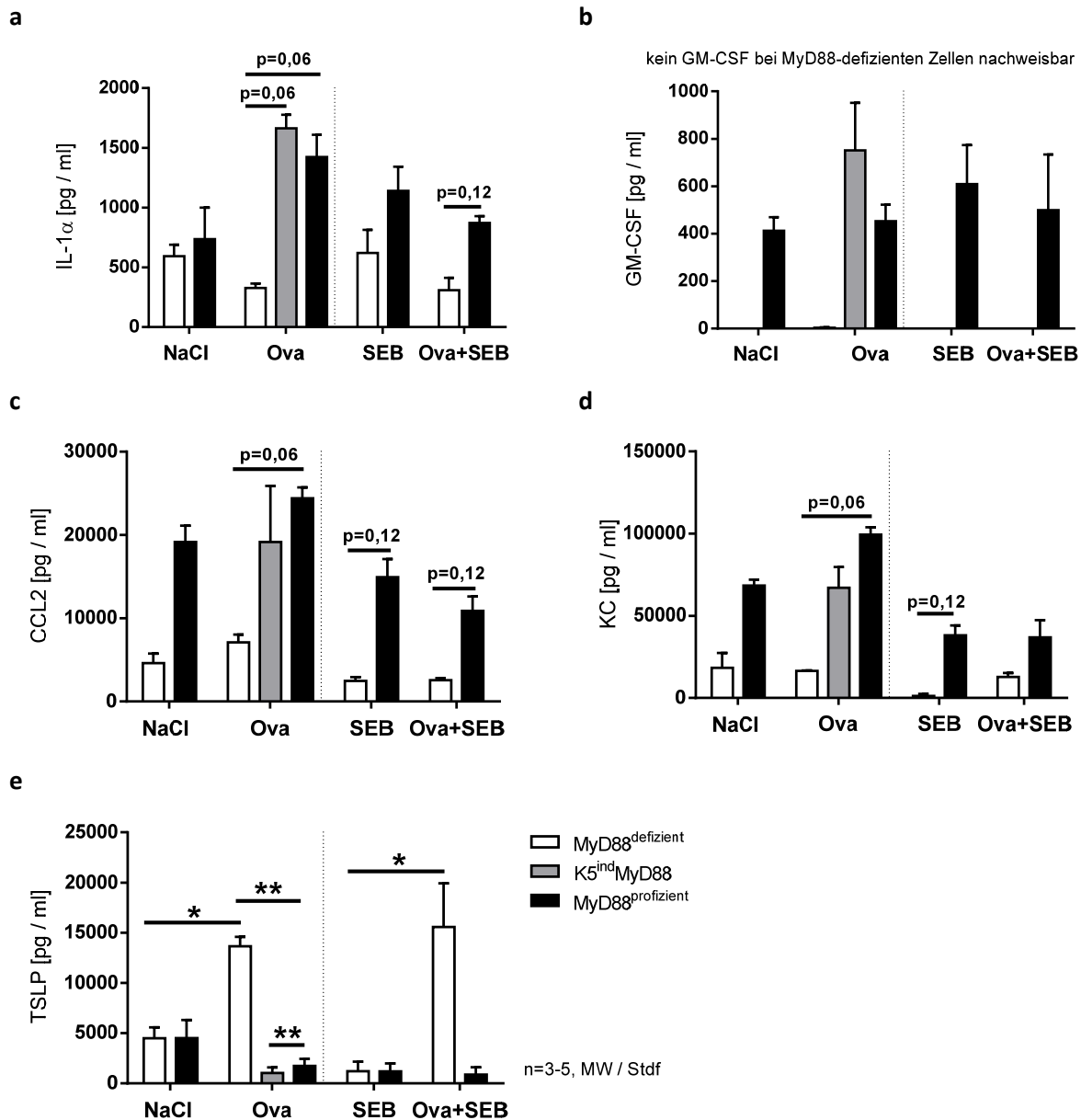


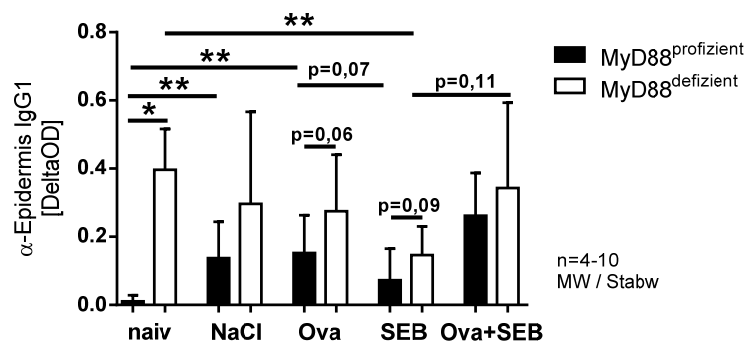
Abb. 58: Entzündungsmediatoren kultivierter Keratinozyten aus AD-vorbehandelten Mäusen. a) IL-1 α und e) TSLP waren nach Ova-Behandlung der Tiere deutlich erhöht gegenüber NaCl-behandelten Mäusen. Bei b) GM-CSF, c) CCL2 und d) KC war kein deutlicher Effekt erkennbar.

3.4.6 Anti-epidermale Autoimmun-Antikörper in MyD88-defizienten Mäusen vor und nach AD-Induktion

Die Expression von TSLP wird nicht nur mit allergischen Erkrankungen, sondern neuerdings auch mit Autoimmunreaktionen in Verbindung gebracht (181) und bei schwerer AD können Autoimmun-Antikörper gegen Bestandteile des Hautgewebes nachgewiesen werden (116). Daher wurden die Seren der Versuchstiere auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen ein Epidermislysate naiver Wildtypiere mittels *ELISA* getestet (Abb. 59). In Seren von unbehandelten MyD88-profizienten Mäusen war wie erwartet kein Signal messbar, während

die Seren der AD-Versuchstiere tatsächlich IgE- und IgG1-Antikörper gegen das Lysat aufwiesen. Die Spiegel dieser IgE-Antikörper waren nach kombinierter Behandlung mit Ova+SEB am höchsten. In MyD88-defizienten Mäusen waren interessanterweise schon vor jeglicher Behandlung gegen das Epidermislysate gerichtete Antikörper messbar und die Werte stiegen durch AD-Induktion nicht mehr weiter an.

a



b

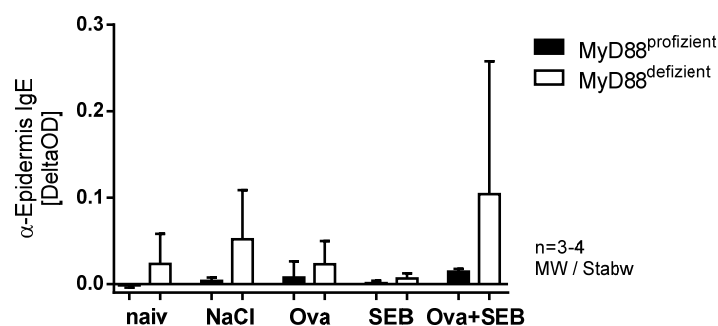


Abb. 59: Anti-epidermale Autoimmun-Antikörper vor und nach AD-Induktion in MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. a) Spezifische IgG1- und b) IgE-Spiegel waren in MyD88-defizienten Mäusen schon vor Behandlung stark erhöht. Bei MyD88-profizienten Mäusen wurden sie erst durch die AD-Behandlung detektierbar. Die Spiegel spezifischer IgG2c-Autoimmun-Antikörper waren an der Nachweisgrenze und deshalb nicht darstellbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden als nächstes die Seren von K5^{ind}MyD88-Mäusen auf den Nachweis dieser gegen die Epidermis gerichteten Autoimmunantikörper untersucht (Abb. 60). Die Messung führte häufig zu hohem Hintergrundsignal, daher sind die detektierten Unterschiede relativ gering, die Methode sollte weiter optimiert werden. Es zeichnete sich jedoch ab, dass MyD88-Expression in Keratinozyten die Produktion dieser Auto-Antikörper vermutlich inhibiert, möglicherweise jedoch nur partiell. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch andere Zelltypen wie Fibroblasten die Produktion von TSLP MyD88-abhängig regulieren und möglicherweise so die Immunglobulinspiegel beeinflussen.

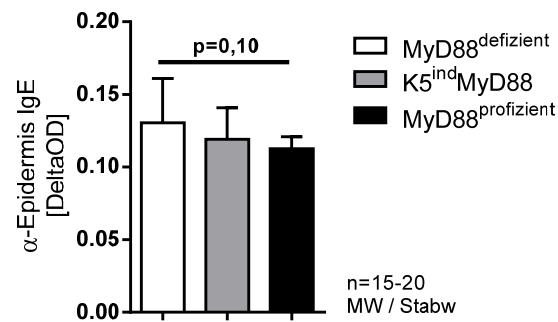


Abb. 60: Anti-epidermale Autoimmun-Antikörper bei K5^{ind}MyD88-Mäusen

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Haut naiver und akut gereizter Tiere näher histologisch untersucht. Dabei zeigte sich in HE-Färbungen, dass in der Haut MyD88-defizienter Tiere stets eine etwas höhere Zahl von Eosinophilen vorhanden war, was vermutlich in Zusammenhang mit der erhöhten TSLP-Sekretion und den erhöhten IgE-Werten stehen könnte, da beides dafür bekannt ist, Eosinophile zu aktivieren (182, 183):

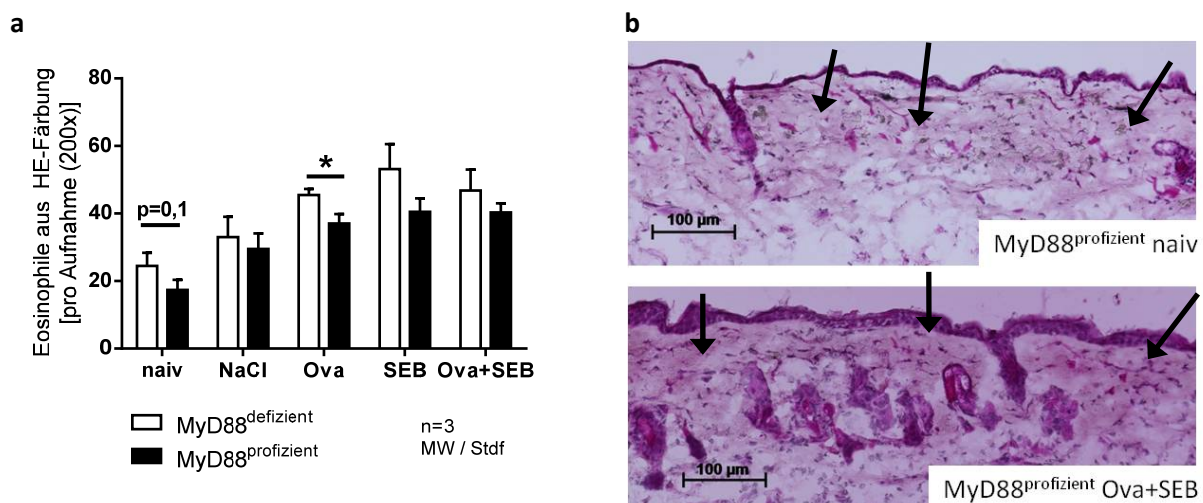


Abb. 61: Eosinophile in der HE-Färbung von unbehandelter und akut gereizter Haut 24h nach einmaliger Behandlung. a) Tendenziell mehr Eosinophile in MyD88-defizienten-Mäusen. b) HE-Färbung zur Darstellung von Eosinophilen (kräftige Eosinfärbung, Pfeile). Vorläufiges Ergebnis

Da es sich hier um vorläufige Daten handelt und die Eosinophilen-Quantifizierung mittels HE-Färbung schwierig ist, sollte diese Analyse evtl. mittels Immunfärbung fortgeführt werden, bei der das Eosinophilen-spezifische Oberflächenmolekül Siglec-F markiert werden kann.

3.4.7 Zusammenfassung der MyD88-abhängigen Rolle von Keratinozyten bei der AD

Keratinozyten spielen über Signalwege des angeborenen Immunsystems eine aktive Rolle bei der Induktion allergischer Immunreaktionen. Sie fördern die Emigration von Langerhanszellen aus der Epidermis und regulieren die T-Helferzell-Rekrutierung in die Dermis. Keratinozyten können MyD88-abhängig die Entzündungsmediatoren IL-1 α , GM-CSF und CCL2 produzieren, die an der Langerhanszell-Emigration beteiligt sind. TSLP wird von MyD88-defizienten Zellen in stark erhöhten Mengen produziert im Vergleich zu MyD88-profizienten Zellen. Nach AD-Vorbehandlung der Mäuse war die Zytokinproduktion *in vitro* von Keratinozyten aus entfernt liegenden unbeteiligten Hautarealen verändert, insbesondere wurde mehr IL-1 α von MyD88-profizienten Zellen und mehr TSLP von MyD88-defizienten Zellen nach Ova-Behandlung im Vergleich zu NaCl-Kontrollen gebildet. TSLP könnte die Produktion von gegen die Epidermis gerichteten Autoimmun-Antikörpern fördern.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von MyD88-vermittelten Signalwegen bei der Pathogenese der AD im Mausmodell untersucht. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Rolle der epidermalen Keratinozyten gelegt, welche die ersten Zellen sind, die mit an die Haut gelangenden Allergenen in Kontakt kommen.

Die Funktion von MyD88 wurde bisher vor allem bei Infektionen untersucht, da es für die Signalweiterleitung von Pathogen-erkennenden TLRs notwendig ist. Da auch endogene Gefahrensignale Liganden für TLRs darstellen könnten, ist die Analyse der Funktion von MyD88 auch in nicht-infektiösen Entzündungsreaktionen von Interesse.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass MyD88 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Antigen-abhängigen allergischen Hautentzündung spielt. Dazu gehörten die Entwicklung einer Akanthose, die Migration von Langerhanszellen, das entzündliche Zellinfiltrat in der Dermis, die Zytokinproduktion in den Haut-drainierenden Lymphknoten und die Antikörperspiegel.

Epidermale Keratinozyten können verschiedene Zytokine und Chemokine produzieren, welche Hautentzündungen und Wundheilungsreaktionen beeinflussen können. Selektive MyD88-Re-Expression in Keratinozyten spielte eine wichtige Rolle für die Entzündung in der Haut bei AD. Um die Immunfunktionen der Keratinozyten näher zu untersuchen, wurden sie von unbehandelten sowie von AD-vorbehandelten Tieren isoliert und *in vitro* analysiert. MyD88-Expression von Keratinozyten regulierte die Expression von Entzündungsmediatoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darüber hinaus darauf hin, dass wiederholte lokale Hautirritation und Antigen-Applikation auch einen systemischen Effekt auf Keratinozyten von entfernten unbeteiligten Hautstellen haben kann.

Weiterhin könnten MyD88-defiziente Mäuse in entsprechenden Experimenten eine stärkere Ausprägung von Autoimmunreaktionen aufweisen, da im Serum naiver MyD88-defizienter Tiere Auto-Antikörper nachgewiesen werden konnten.

4.1 Genetik und Immunsystem der Versuchstiere

MyD88 ist ein zentrales Adaptermolekül im angeborenen Immunsystem. Es vermittelt die Signalweiterleitung der meisten TLRs sowie der Zytokinrezeptoren IL-1R und IL-18R. Somit spielt es eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und der Induktion von

Entzündungsreaktionen. Weiterhin ist es beteiligt an der Kontrolle der erworbenen Immunität, sowie an der Ausbildung von Toleranz. MyD88-defiziente Zellen produzieren keine pro-inflammatorischen Zytokine nach Stimulierung mit TLR-Liganden.

4.1.1 Genetik von MyD88LSL-Mäusen

Für diese Arbeit wurde eine MyD88-defiziente Mauslinie verwendet, die eine selektive Re-Expression des MyD88-Gens in einzelnen Zellpopulationen erlaubt. Bei diesen MyD88LSL-Mäusen ist in das erste Intron des MyD88-Gens eine loxP-flankierte Stop-Kassette eingesetzt (142), die bei Kreuzung mit einer Cre-Rekombinase-exprimierenden Mauslinie in den entsprechenden Cre-exprimierenden Zellen deletiert wird. So wird eine Zelltyp-spezifische Re-Expression von MyD88 erreicht. Eine durch das Cre-lox-System induzierte Rekombination ist nicht immer vollständig, sondern kann ggf. nur partiell funktionieren. Ein Vorteil der Zelltyp-spezifischen Re-Expression gegenüber einem Zelltyp-spezifischen *knock-out* durch Verwendung von MyD88flox-Tieren (184) besteht deshalb darin, dass bei der selektiven Re-Expression mittels MyD88LSL-Tieren auch bei partieller Rekombination ein Phänotyp auftritt. Dies ist bei selektivem *knock-out* nicht zu erwarten, da für die MyD88-Expression kein Gen-Dosis-Effekt beobachtet wird. Darüber hinaus könnten beim selektiven *knock-out* redundante Mechanismen einen Phänotyp verdecken.

Um sicherzustellen, dass die loxP-flankierte Stop-Kassette der MyD88LSL-Mäuse funktioniert, wurden homozygote MyD88LSL-Mäuse funktionell mit konventionellen MyD88ko^{-/-}-Mäusen verglichen. Wie in konventionellen MyD88ko^{-/-}-Mäusen konnte auch in den MyD88LSL-Mäusen im *Western Blot* kein MyD88-Protein nachgewiesen werden und keine MyD88-abhängige Produktion von Zytokinen. Außerdem wiesen sie gleichsam stark erhöhte IgE-Spiegel im Serum auf. Dies zeigt, dass MyD88LSL-Mäuse ebenso wie MyD88ko^{-/-}-Mäuse komplett MyD88-defizient sind. Weiterhin wurden MyD88-heterozygote Mäuse mit Wildtypen verglichen, um nachzuweisen, dass ein funktionelles MyD88-Allel ausreicht, um die komplette Genfunktion wiederherzustellen. Serum-IgE-Spiegel und TNF von stimulierten *BMDC* waren bei MyD88-heterozygoten (= profizienten) Mäusen auf dem gleichen Niveau wie bei Wildtypmäusen. Da heterozygote Mäuse also so reagieren wie Wildtypen, wurden diese Tiere als MyD88-profiziente Kontrolltiere verwendet. Dies hatte den Vorteil, dass für die Versuche keine Wildtypmäuse als Wurfgeschwister gezüchtet werden mussten.

4.1.2 Zuchtschema und Reproduktionserfolg von MyD88-defizienten und –profizienten Tieren

Unter SPF-Bedingungen sind MyD88-defiziente naive Mäuse größtenteils unauffällig, es wurde lediglich vereinzelt leicht verzögertes Wachstum der Jungtiere beobachtet. Allerdings hatten MyD88-defiziente Weibchen auf dem verwendeten C57BL/6J-Mausstamm aus eigener Zucht eine verminderte Fruchtbarkeit und hohe verfrühte Mortalität in Verpaarung. Dies trat in beiden Mauslinien, sowohl MyD88^{ko} als auch MyD88^{LSL}, auf. Aus diesem Grund wurden stets MyD88-profiziente (heterozygote) Weibchen mit MyD88-defizienten Männchen verpaart, so dass sich unter den Nachkommen im Durchschnitt gleich viele homozygote und heterozygote Wurfgeschwister für die Versuche befanden. Ähnliche Beobachtungen über verminderte Reproduktion von MyD88-defizienten Tieren wurden vereinzelt berichtet, aber bisher nicht systematisch beschrieben oder untersucht. Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen (z. B. C57BL/6J bzw. BALB/c) sind wahrscheinlich.

Im Zusammenhang mit dem Immundefekt der MyD88-defizienten Tiere ist theoretisch nicht vollständig auszuschließen, dass die verminderte Reproduktionsfähigkeit von MyD88-defizienten C57BL/6J-Weibchen an asymptomatischen aufsteigenden Genitalinfektionen, z. B. durch *Chlamydia muridarum*, liegen könnte (185, 186), die bei der routinemäßigen Überwachung der Tierhaltung nicht untersucht oder erkannt würden. Es erscheint allerdings sehr unwahrscheinlich, dass solche Erreger unter SPF-Bedingungen auftreten und unerkannt bleiben könnten. Eine weitere Möglichkeit wäre eine gestörte immunologische Toleranz gegenüber den Embryonen, da MyD88 wie erwähnt auch eine Rolle bei Toleranzausbildung spielt. Insbesondere im Zusammenhang mit der starken Ausprägung von T_{H1}-Antworten beim Stamm C57BL/6J könnte dies erschwerte Implantation der Embryonen und gestörte Plazentabildung zur Folge haben und so Aborte oder Mangelversorgung fördern, was auch zum Tod MyD88-defizienter trächtiger Weibchen in Verpaarung führen könnte. Hinweise darauf ergeben sich aus Studien über die Expression von MyD88 im murinen Uterus während der embryonalen Implantationsphase (187) sowie einer MyD88-abhängigen entzündungshemmenden Funktion humaner Plazentazellen (188). TLRs sind entscheidend am Reproduktionserfolg beteiligt (189). MyD88-defiziente C57BL/6J-Weibchen könnten daher ein Modell für weibliche Fertilitätsstörungen oder Gestations-assoziierte Erkrankungen darstellen.

4.1.3 Erhöhte IgE-Spiegel in naiven MyD88-defizienten Mäusen

MyD88-defiziente Mäuse wiesen deutlich erhöhte IgE-Spiegel im Vergleich zu Kontrolltieren auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass sie stärkere Allergie-Symptome entwickeln könnten, was die Hygiene-Hypothese untermauern würde. Diese besagt, dass das Fehlen von ausreichenden infektiionsbedingten TLR-Stimulationen durch westlichen Lebensstil ausschlaggebend für die ansteigende Prävalenz allergischer Erkrankungen ist (90).

Die Entwicklung und Frequenz von Immunzellen unbehandelter MyD88-defizienter Tiere ist weitgehend normal (163). Eine Rolle von MyD88 bei der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen ist nicht bekannt. Insbesondere die Frequenz unterschiedlicher B-Zell-Populationen in MyD88-defizienten und MyD88-profizienten Tieren wurde in unserer Arbeitsgruppe durchflusszytometrisch untersucht (unveröffentlichte Daten). Hierbei ergaben sich keine Unterschiede, die einen Anhaltspunkt für die veränderten Immunglobulinspiegel in MyD88-defizienten Mäusen darstellen könnten. Der Phänotyp von MyD88-defizienten Tieren wird somit als Folge von fehlenden Stimuli in intakten Zellen verstanden.

Die erhöhten IgE-Spiegel in MyD88-defizienten Mäusen wurden bereits beschrieben (163), auch IRAK4-Mutationen können zu erhöhten IgE-Spiegeln führen (190). Die Ursache ist jedoch nicht genau bekannt. Das humane genetisch bedingte Hyper-IgE-Syndrom (191) geht mit leichten Fehlbildungen, Allergie-ähnlichen Entzündungen und rezidivierenden Infektionen einher und kann im Einzelfall diagnostisch mit AD verwechselt werden (192). Jedoch ist das Hyper-IgE-Syndrom nach bisherigen Studien nicht durch TLR-assoziierte Gendefekte bedingt (193-195). Stattdessen sind mittlerweile eine Vielzahl von STAT3-Mutationen als Auslöser für das Hyper-IgE-Syndrom entdeckt worden (164, 167). Eine Mutation im STAT3-Gen führt zum Fehlen der Produktion von IL-17A. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass auch MyD88-defiziente Mäuse kein IL-17A produzieren können, wie es in anderen Entzündungsmodellen bereits beschrieben wurde (168, 186, 196).

Ein gemeinsamer Defekt bei Hyper-IgE-Syndrom und MyD88-Defizienz erscheint daher möglich. Um zu überprüfen, ob ein Fehlen von STAT3 auch bei Mäusen erhöhte IgE-Spiegel bedingt, wurden im Rahmen dieser Arbeit STAT3-defiziente „STAT3^{flox}DeleterCre-Mäuse“ generiert, bei denen das loxP-flankierte STAT3-Gen durch systemische Cre-Expression deletiert wird. Eine homozygote Deletion von STAT3 ist embryonal letal (166), heterozygote Mäuse sind lebensfähig, wobei nach Deletion ein trunkiertes Protein bleibt, das dominant negativ wirkt (147). Im Serum dieser Mäuse traten erhöhte IgE-Spiegel auf. Diese Mauslinie könnte daher als Modell für das Hyper-IgE-Syndrom verwendet werden. Ein weiteres Gen, das durch Mutation bei Patienten zu erhöhten IgE-Spiegeln und AD-ähnlichen Symptomen

führt, ist Dock8 (197, 198). Dock8 ist MyD88-abhängig für die durch STAT3-vermittelte Hemmung des Antikörperklassenwechsels zu IgE notwendig.

4.2 Die Rolle von MyD88 bei der Pathogenese von AD im Mausmodell

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse des Stamms C57BL/6J untersucht. Dieser Stamm ist einer der am besten analysierten Labormausstämme und ist durch starke T_H1 -dominierte Immunantworten charakterisiert. Für Allergiemodelle, die größtenteils T_H2 -vermittelt sind, wird üblicherweise der Stamm BALB/c eingesetzt, der weniger durch T_H1 - und deutlich mehr durch T_H2 -Immunantworten geprägt ist (199). Dies war für diese Arbeit nicht praktikabel, da die in der Arbeit untersuchten genetisch manipulierten Mauslinien alle auf dem C57BL/6J-Hintergrund beruhen. Bei der chronischen AD tritt im Gegensatz z. B. zu allergischem Asthma keine reine T_H2 -Immunantwort, sondern vielmehr ein dysreguliertes gemischtes T_H1 - T_H2 -Milieu auf (87, 88, 200). Daher könnte die Pathologie des AD-Modells in beiden Mausstämmen unterschiedliche Ausprägungen haben.

Auch die C57BL/6J-Tiere reagierten auf wiederholte Hautirritation und Ova-Behandlung mit einer Entzündung der behandelten Hautstelle, die viele Charakteristika von humaner AD zeigt. In den Haut-drainierenden Lymphknoten waren Ova-spezifische T-Zellen nachweisbar, die T_H1 -, T_H17 -, und auch T_H2 -/ T_{reg} -Zytokine produzierten. Dies bildet das dysregulierte T-Helferzell-Milieu von AD-Patienten gut nach. Allerdings war das wichtige Allergie-assoziierte T_H2 -Zytokin IL-4 in restimulierten Haut-drainierenden Lymphknotenzellen nach der siebenwöchigen AD-Induktion unter oder an der Nachweisgrenze, bei BALB/c-Mäusen wird es wesentlich stärker produziert ((201) und eigene unveröffentlichte Daten). In der akuten stark T_H2 -vermittelten Induktionsphase der AD nach einwöchiger Behandlung konnte Ova-spezifische IL-4-Produktion von Lymphknotenzellen aber auch von C57BL/6J-Mäusen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt und unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Eine Erhöhung der Gesamt-Immunglobulinspiegel sowie die Bildung von Ova-spezifischen Antikörpern nach der siebenwöchigen AD-Induktion wurden ebenfalls nachgewiesen.

Dies bestätigt, dass die Induktion von Allergiesymptomen in diesem Mausmodell gut nachzustellen ist. Einige Parameter jedoch, wie Akanthose, Langerhanszell-Migration und die erwähnte IL-4-Sekretion, unterschieden sich deutlich geringer zwischen Ova- und NaCl-Behandlung als in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe an Mäusen auf BALB/c-

Hintergrund ((201) und eigene unveröffentlichte Daten) und waren daher nicht direkt vergleichbar.

Bei MyD88-defizienten Mäusen trat nach wiederholter Hautirritation und NaCl-Behandlung wie erwartet (202) eine leichte Entzündung im Vergleich zu unbehandelten Tieren auf, jedoch wurde sie im Gegensatz zu MyD88-profizienten Mäusen nicht durch Ova-Behandlung verstärkt. Dies impliziert die Beteiligung von zwei unterschiedlichen Mechanismen: einem durch wiederholte Hautirritation induzierten MyD88-unabhängigen Mechanismus sowie einem durch zusätzliche Ova-Behandlung induzierten, MyD88-abhängigen Mechanismus. Ein äquivalenter Effekt wurde bereits für MyD88-abhängige Signalwege in Langerhanszellen beschrieben, welche für eine *Candida*-Infektion, nicht aber für Kontakthypersensibilität notwendig waren (203). Hingegen waren bei einer anderen Studie über Kontakthypersensibilität MyD88-abhängige Signalwege sehr wohl beteiligt, mit unterschiedlichen Funktionen von IL-1 und IL-18 in unterschiedlichen Zelltypen (204).

Dies deutet darauf hin, dass die beteiligten Mechanismen von der Art des Antigens abhängen, in diesem Fall Protein-Antigene (*Candida*) bzw. Haptene (Kontakthypersensibilität). Bei dem für die AD-Induktion verwendeten Ova handelt es sich ebenfalls um ein Protein. Welche Art von „Antigen“ bei den NaCl-behandelten Kontrollmäusen eine Rolle spielen könnte, ist nicht bekannt, möglich wären endogene Gefahrensignale oder Bestandteile der Hautflora.

Verschiedene Parameter der allergischen Hautentzündung waren im Ova-abhängigen AD-Modell abhängig von MyD88. Die Ausbildung einer Akanthose, d. h. der Verdickung der Epidermis durch verstärkte Proliferation der Keratinozyten und einer Spongiose, d. h. Entstehung von interzellulären Ödemen, war in MyD88-defizienten Mäusen nach Ova-Behandlung nicht zu beobachten. Die Epidermisdicke entsprach den NaCl-behandelten Kontrolltieren beider Genotypen. Über die Mechanismen, die zu einer Hyperproliferation der Keratinozyten führen, ist wenig bekannt, Typ I-IFN-produzierende plasmazytoide dendritische Zellen (202) und IL-22-produzierende T-Zellen sind offenbar beteiligt (205). Keratinozyten-intrinsisch beteiligt sind Barriereproteine (206), der EGF-Rezeptor (207) und FGF-Rezeptoren (208).

Die durch Ova-Applikation induzierte Langerhanszell-Migration aus der Epidermis blieb in MyD88-defizienten Tieren aus, hier entsprach die Anzahl der verbliebenen Langerhanszellen ebenfalls den NaCl-behandelten Kontrolltieren, bei denen nur eine geringfügige Langerhanszell-Emigration zu beobachten war. Auch hier gibt es also vermutlich zwei

Mechanismen, die wie bereits ausgeführt von der Art des Antigens bzw. der Aktivierung der Zellen abhängig sind (203, 204).

Die Rolle von Langerhanszellen bei der Pathogenese von AD ist umstritten, sie könnten nicht nur zur Sensibilisierung beitragen (209, 210), sondern auch Toleranz induzieren (176, 211). Möglicherweise ist ihre Funktion abhängig von der Art der Antigene, dem Stadium der Entzündung oder von unterschiedlichen Subpopulationen.

In der Dermis war die Anzahl der Mastzellen nicht durch MyD88 beeinflusst, in diesem Modell spielten also nur durch die Hautirritation induzierte MyD88-abhängige Signalwege eine Rolle. Interessanterweise ist die Proliferation und Aktivierung von Mastzellen in anderen Modellen durchaus von MyD88 abhängig ((212, 213) und unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Darüber hinaus war bei BALB/c-Mäusen die Anzahl von Mastzellen in der Haut durch Ova um ca. das Doppelte erhöht gegenüber den mit NaCl behandelten Tieren (201), was auf weitere Unterschiede bei der Pathogenese von AD in verschiedenen Mausstämmen hinweist. Möglich wäre, dass auch im AD-Modell die Aktivierung der Mastzellen (im Gegensatz zu ihrer reinen Anzahl) MyD88-abhängig ist, dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Diese Analyse könnte z. B. durch eine Histaminmessung in den Hautproben der behandelten Mäuse erfolgen.

Die Anzahl von Makrophagen in der Dermis war in MyD88-defizienten Mäusen nach Ova-Behandlung deutlich geringer als in MyD88-profizienten Tieren, d. h. ihre Rekrutierung zum Ort der Antigen-vermittelten Entzündung war stark MyD88-abhängig. Haut-residente Makrophagen könnten entweder direkt über Bindung der Antigene an eigene Rezeptoren aktiviert werden, oder durch von anderen Zellen wie z. B. Keratinozyten oder Makrophagen freigesetzte Immunmediatoren.

Das Gegenteil war für die Infiltration der Dermis mit T-Helferzellen der Fall. Ihre Anzahl war in MyD88-defizienten Tieren stark erhöht gegenüber MyD88-profizienten Kontrollen. Dies trat auch nach NaCl-Behandlung auf. Da Makrophagen und Langerhanszellen als Zellen des angeborenen Immunsystems die Initiierung einer Entzündungsreaktion beeinflussen, war es erstaunlich, dass eine schwächer erscheinende Entzündungsreaktion in MyD88-defizienten Tieren mit einer stärkeren T-Helferzell-Antwort des adaptiven Immunsystems einhergeht.

In Abschnitt 4.4.4 wird auf die mögliche MyD88-abhängige Rolle der Keratinozyten für die Rekrutierung von T-Helferzellen eingegangen.

Weiterhin wurde die Zytokinproduktion in Haut-drainierenden Lymphknoten überprüft. In den Zellkulturüberständen von *ex vivo* restimulierten Lymphknotenzellen nach AD-Induktion

wurde die Ova-spezifische Sekretion von IFN- γ , IL-17A und IL-10 nachgewiesen. IFN- γ und IL-17A wurden nur von Zellen aus MyD88-profizienten Mäusen sekretiert, in Zellen von MyD88-defizienten Tieren fehlten diese Zytokine komplett. IFN- γ wird in der chronischen Phase der AD produziert (87). Es ist ein wichtiges T_{H1}-Zytokin, das durch IL-12-Produktion von Antigen-präsentierenden Zellen induziert wird (214). Zwar ist die Produktion von IFN- γ nicht direkt MyD88-abhängig. Jedoch können MyD88-defiziente Mäuse keine T_{H1}-Antworten auslösen, daher war dieses Ergebnis erwartet worden.

Dass auch IL-17A bei der epikutanen Sensibilisierung mit Ova induziert wird und eine Rolle bei der Pathogenese von Allergien spielt, wurde bereits beschrieben (215). Auch die Notwendigkeit eines MyD88-induzierten Signalweges für die Produktion von IL-17A ist bereits für verschiedene Entzündungsmodelle, insbesondere für Infektionen, beschrieben worden (169, 196). Ebenso korreliert die MyD88-abhängige IL-17A-Produktion mit der Stärke von allergischem Asthma (216). Die Ursache für das Fehlen von IL-17A-Antworten in MyD88-defizienten Mäusen ist nicht genau beschrieben. MyD88-Signalwege in Antigen-präsentierenden Zellen sind, soweit bekannt, vor allem für T_{H1}-Polarisierung von T-Zellen verantwortlich (163). Allerdings induzieren T_{H1}-Zytokine wie IL-1 oder IL-23 auch die T_{H17}-Differenzierung (217-219). IL-17A wird in großen Mengen von CD4⁺ T_{H17}-Zellen produziert, aber auch andere T-Zellen, insbesondere auch $\gamma\delta$ -T-Zellen sekretieren dieses Zytokin (220).

Ein intrinsischer Defekt von MyD88-defizienten T-Zellen, der die Differenzierung zu T_{H17}-Zellen verhindert, wäre ebenfalls denkbar. Um dies zu untersuchen, wurde in einem vorläufigen Versuch eine *MLR (mixed leukocyte reaction)* zur T-Zell-Aktivierung durchgeführt. Nach Co-Kultur von MyD88-profizienten oder -defizienten *BMDC* mit MyD88-profizienten oder -defizienten T-Zellen aus der Milz wurde die Zytokinsekretion in den Zellüberständen gemessen. Dieser Versuch ergab keine klaren Hinweise auf einen solchen T-Zell-Defekt, da T-Zellen von MyD88-defizienten Tieren IL-17A produzieren konnten. Die sekretierten Mengen schwankten, sodass dieses Experiment wiederholt werden müsste (Daten nicht gezeigt). Neben T_{H17}-Zellen können auch CD8⁺ T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen IL-17A produzieren, die aus der Milz isolierten T-Zellen waren jedoch vorwiegend T-Helferzellen. Da MyD88-defiziente *BMDC* kein IL-23 bilden, welches für die IL-17A-Induktion verantwortlich ist, könnte hier eine wichtige Ursache für die fehlende Differenzierung von T_{H17}-Zellen (219) liegen. $\gamma\delta$ -T-Zellen benötigen keine T-Zell-Rezeptor-Aktivierung für die Sekretion von IL-17A, sodass in weiteren Versuchen zwischen verschiedenen Arten von T-Zellen unterschieden werden sollte.

Weiterhin gibt es Hinweise auf einen möglicherweise aktiv IL-17A-hemmenden Effekt in MyD88-defizienten Mäusen. Die Abwesenheit von MyD88 führt zu verstärkter Produktion von TSLP in Keratinozyten, was in dieser Arbeit erstmals direkt gezeigt wurde und auch Typ I IFN wird wahrscheinlich ohne MyD88 verstärkt gebildet (221). Überexpression beider Zytokine wurde mit einer verminderten IL-17A-Produktion in Verbindung gebracht (222, 223). Auch die erhöhten IgE-Spiegel in MyD88-defizienten Tieren können mit verminderter IL-17A- und erhöhter TSLP-Produktion in ursächlichem Zusammenhang stehen (183, 223, 224).

IL-10 ist ein Zytokin, dass von T_{H2}-Zellen, T_{reg}-Zellen, B-Zellen und auch dendritischen Zellen produziert werden kann (225). Bei der Lymphknoten-Restimulation mit Ova wurde festgestellt, dass Zellen von MyD88-defizienten Ova-behandelten Mäusen IL-10 freisetzen können, sogar in größeren Mengen als Zellen von MyD88-profizienten Mäusen. Da die Lymphknotenzellen ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen Zelltypen sind, ist nicht feststellbar, welche Zellen in Kultur an der IL-10-Produktion beteiligt waren. Eine messbare Menge IL-10 von den wenigen vorhandenen dendritischen Zellen ist jedoch unwahrscheinlich. Somit können neben T-Zellen auch die B-Zellen an der Ova-spezifischen IL-10-Produktion beteiligt gewesen sein. Zur weiteren Analyse könnten die Lymphknotenzellen vor der Kultivierung per magnetischer Zellsortierung in T- und B-Zellen aufgetrennt werden. Oder es könnte nach der dreitägigen Restimulation eine intrazelluläre Zytokinfärbung für die Durchflusszytometrie durchgeführt werden, bei der durch Markierung Zelltyp-spezifischer Antigene die IL-10-produzierenden Zellpopulationen genau unterschieden werden können.

Regulatorische T-Zellen waren in den Lymphknotenzellen aller Versuchsgruppen in ähnlichen Anteilen vorhanden. Eine Antigen-abhängige Expansion von regulatorischen T-Zellen *in vitro* fand nicht statt.

Die Serum-Konzentrationen der natürlichen (T-Zell-unabhängigen) Antikörperklassen IgM und IgG3 wurden unabhängig von Ova durch wiederholte Hautirritation MyD88-abhängig erhöht. IgG3 war auch in unbehandelten MyD88-profizienten Mäusen höher als in MyD88-defizienten Tieren. Im Gegensatz zu den T-Zell-abhängigen adaptiven Isotypen verfügen natürliche Antikörper nur über Keimbahn-codierte B-Zell-Rezeptor-Spezifitäten (1, 2). IgM ist immer der initial von reifen aktivierten B-Zellen sekretierte Isotyp, bevor ein Klassenwechsel je nach Art der Entzündung induziert wird (1, 2). Murines IgG3 (226) ist vornehmlich gegen bakterielle Toxine gerichtet. Es wurde beschrieben, dass die Bildung von

LPS-spezifischem IgG3 über TLR4 erfolgt (227). Diese Beobachtung passt zusammen mit dem nach AD-Induktion MyD88-abhängig erhöhten IgG3 zu einer Beteiligung von LPS aus der Hautflora und TLR-Signalen bei der Pathogenese der Erkrankung.

Bei extrinsischer AD finden sich erhöhte IgE-Spiegel im Serum. Aus diesem Grund wurden die Gesamt-IgE-Spiegel der Versuchstiere vor und nach AD-Induktion gemessen. Während unbehandelte MyD88-defiziente Tiere stark erhöhte IgE-Spiegel im Vergleich zu MyD88-profizienten Tieren aufweisen, glichen sich die Mengen von Gesamt-IgE im Serum nach AD-Induktion an. Das heißt, bei MyD88-profizienten Tieren wurden die IgE-Spiegel durch AD-Induktion wie erwartet erhöht. Im Gegensatz dazu fand bei MyD88-defizienten Tieren durch die Behandlung kaum noch eine weitere Erhöhung der IgE-Spiegel statt.

Durch epikutane Ova-Behandlung wird auch die Produktion von Ova-spezifischen Antikörpern induziert (148). MyD88-defiziente Mäuse konnten Ova-spezifische IgE-Antikörper in vergleichbarer Menge wie MyD88-profiziente Mäuse bilden. Ova-spezifisches IgG1 wurde von MyD88-defizienten Mäusen in mäßig geringerer Menge als von Kontrolltieren produziert. Die Spiegel des TH1-assoziierten Ova-spezifischen IgG2c (das in Mäusen des Stamms C57BL/6J den Isotyp IgG2a ersetzt (140)) waren hingegen bei MyD88-defizienten Mäusen in wesentlich geringerem Maße als von –profizienten Mäusen vorhanden. Dies entspricht den Beobachtungen, dass MyD88-defiziente Tiere nach Immunisierung mit Ova+CFA (*Complete Freund's Adjuvans*, komplettes Freund-Adjuvans) kaum Ova-spezifisches IgG2c produzieren im Vergleich zu Wildtypmäusen (163). Inzwischen wurde berichtet, dass für den Antikörper-Klassenwechsel zu IgG2c B-Zell-intrinsische MyD88-Expression notwendig ist, welche die Produktion von IFN- γ durch T-Zellen anregt (228).

4.3 Die Rolle von MyD88 bei der Progression von AD durch Co-Administration des Superantigens SEB

Toxin-bildende Stämme von *Staphylokokkus aureus* treten vermehrt auf der Haut von AD-Patienten auf und spielen vermutlich eine Rolle bei der Progression der Erkrankung. Insbesondere das Superantigen SEB wird hierfür verantwortlich gemacht (129, 157). Auch bei der Ova-abhängigen AD-Induktion im Mausmodell wurde beschrieben, dass SEB die allergischen Entzündungssymptome verstärkt (150). Chronische Hautirritation und

SEB-Applikation im Rahmen dieser Arbeit führte zu Entzündungsreaktionen in der Haut sowie zur Produktion von natürlichen Antikörpern. Die Zytokinproduktion SEB-spezifischer T-Zellen sowie Expansion regulatorischer T-Zellen nach Restimulation *in vitro* blieb jedoch fast aus, wohingegen T-Zellen, die *in vivo* noch nicht mit SEB in Kontakt gekommen waren, eine starke pro-inflammatorische Reaktion auf SEB-Stimulation *in vitro* zeigten. Dieses Ergebnis entspricht der durch SEB-Behandlung induzierten T-Zell-Anergie (179, 180).

Dass epikutan appliziertes SEB Hautentzündungen auslösen kann, wurde bereits beschrieben (158). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigten darüber hinaus, dass diese SEB-induzierte Entzündung auch abhängig von MyD88 war. Da SEB vornehmlich als Superantigen fungiert, das T-Zellen durch direkte Bindung des T-Zell-Rezeptors aktiviert, war dies nicht erwartet worden. Offenbar kann SEB also auch als konventionelles Antigen und eigenständiges Allergen wirken, was durch den Nachweis SEB spezifischer IgE-Antikörper untermauert wird.

SEB kann MyD88-abhängige Entzündungsreaktionen auslösen (133), wenig beschrieben ist jedoch, wie dies geschieht. Eine weitergehende Untersuchung zeigte, dass die Bindung von SEB an MHCII die MyD88-abhängige Signalkaskade einleitet (134). Interessanterweise wurde ebenfalls beschrieben, dass Monozyten von AD-Patienten einen selektiven Defekt in der TLR2-abhängigen Zytokinproduktion aufweisen (229), was die Abwehr von Staphylokokken-Infektionen erschweren könnte.

Um zu untersuchen, wie SEB vom angeborenen Immunsystem erkannt wird, wurden aus dem Knochenmark *in vitro* Makrophagen generiert und mit SEB stimuliert. Diese Aktivierung der *BMMph* war abhängig von MyD88 und auch TRIF. Eine Beteiligung von TLR2 war in der Vergangenheit vorgeschlagen worden (135), konnte hier aber nicht nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass TLR4 für die SEB-induzierte Zytokinproduktion von Makrophagen notwendig ist, da dieser Rezeptor beide Moleküle für die Signalweiterleitung benötigt. Eine Rolle von TLR4 bei der Erkennung von SEB wurde auch bereits diskutiert (136). Das hier verwendete SEB war auf Endotoxin-Kontamination getestet, daher steht auch nicht zu vermuten, dass dieses Ergebnis auf LPS-Rückstände zurückzuführen ist. Die Beteiligung anderer TLRs außer TLR2 wäre möglich. Weiterhin wurde beobachtet, dass SEB in *BMMph* die Expression des Mannoserezeptors MyD88-abhängig erhöhte. Dies untermauert eine Funktion von SEB als Allergen, da der Mannoserezeptor an der zellulären Aufnahme von Allergenen beteiligt sein soll (155).

Als Modell für die Krankheitsprogression von AD durch Superantigene wurden Mäuse über den gesamten Zeitraum der AD-Induktion mit der Antigenkombination Ova+SEB behandelt. Diese Co-Administration führte nicht zu einer schlicht additiv verstärkten Entzündungsreaktion. Vielmehr implizieren die Ergebnisse, dass die Antigene die Immunreaktion auf das jeweils andere Antigen verändern bzw. stören könnten. So war die Epidermisdicke und die Zellzahl in den brachialen Lymphknoten nach Ova+SEB-Behandlung geringer als nach einzelner Behandlung mit Ova, auch die Langerhanszell-Migration und die Aktivierung von dendritischen Zellen im Lymphknoten war abgeschwächt im Vergleich zur einzelnen Ova-Behandlung, die SEB-spezifischen Antikörperspiegel waren nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung niedriger als nach einzelner SEB-Behandlung.

Die meisten Entzündungsparameter waren auch nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung in MyD88-defizienten Mäusen schwächer ausgeprägt als in MyD88-profizienten Tieren, also ebenso wie nach einzelner Ova-Behandlung abhängig von MyD88. Die Spiegel von SEB-spezifischem IgE und IgG1 waren jedoch in MyD88-defizienten Mäusen höher als in MyD88-profizienten Mäusen. Dies könnte bedeuten, dass MyD88-abhängige Signalwege die Produktion SEB-spezifischer Antikörper hemmen.

Ein prominenter Effekt bei Ova+SEB-behandelten MyD88-profizienten Mäusen war das Auftreten von CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺ Langerhanszellen in der Epidermis, die nach Behandlung mit den einzelnen Antigenen gar nicht bis kaum zu beobachten war. Die Co-Lokalisation von CD8⁺ Antigen-präsentierenden Zellen und CD8⁺ T-Zellen könnte auf den Prozess der Kreuzpräsentation hinweisen, bei dem Antigene über MHCI den zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden (230). Dies impliziert eine veränderte Aufnahme der Antigene in die Antigen-präsentierenden Zellen. Für die klassische Antigenpräsentation über MHCII-Moleküle an T-Helferzellen werden Antigene über Makropinozytose aufgenommen. Die Kreuzpräsentation erfordert hingegen eine Antigenaufnahme über Clathrin-abhängige Endozytose (231-233). Gestärkt wurde diese Theorie durch vorläufige Ergebnisse, die eine wesentlich höhere MHCI-Expression in einer Immunfluoreszenzfärbung der Haut MyD88-profizienter Tiere nach Ova+SEB-Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit einzelnen Antigenen und im Vergleich mit MyD88-defizienten Tieren ergab (Daten nicht gezeigt). Dies wäre bei stärkerer Kreuzpräsentation über MHCI zu erwarten. Um darzustellen, ob die Expression des Mannoserezeptors in der Haut nach Ova+SEB-Behandlung ebenfalls erhöht war, wurde eine weitere Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Bei einem vorläufigen Versuch erschienen MMR⁺ Zellen in den gefärbten Hautpräparaten morphologisch wie Langerhanszellen sowie Makrophagen oder andere

dermale Zellen, es war jedoch kein Unterschied in der Fluoreszenz-Intensität verschiedener Präparate zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Deswegen sollten die *in vitro*-Experimente zur MMR-Expression in *BMMph* weitergeführt werden und neben einzelner Stimulierung mit endoOva oder SEB sollte auch eine Co-Stimulation der Makrophagen mit beiden Antigenen erfolgen. Im Zusammenhang mit der hier ausgeführten Theorie wäre zu erwarten, dass die MMR-Expression durch Verwendung der kombinierten Stimuli im Vergleich zur Einzelstimulation wesentlich ansteigt. Für den Nachweis eines synergistischen Effektes müsste die MMR-Expression in MyD88-profizienten Zellen um mehr als das Doppelte gegenüber den Einzelstimulationen ansteigen, in MyD88-defizienten Zellen müsste dieser Effekt ausbleiben.

4.4 MyD88-induzierte Signalwege in murinen Keratinozyten

Die Zelltyp-spezifische Expression von MyD88 in Keratinozyten *in vivo* wurde durch Einsatz von K5^{ind}MyD88-Mäusen untersucht, bei denen MyD88 selektiv nur in epidermalen Keratinozyten exprimiert wird, während alle übrigen Körperzellen MyD88-defizient sind. Dies hatte zwei Vorteile gegenüber einer selektiven Deletion von MyD88 in Keratinozyten einer sonst MyD88-profizienten Maus. Einerseits wird so vermieden, dass redundante Mechanismen einen Phänotyp verdecken könnten, andererseits tritt bei diesem Ansatz auch dann ein Phänotyp auf, wenn die Cre-lox-induzierte Re-Expression von MyD88 nicht vollständig, sondern nur partiell sein sollte. Bei nur partieller Deletion im umgekehrten Falle wäre das nicht unbedingt zu erwarten, da für die Funktion von MyD88 kein Gen-Dosis-Effekt bekannt ist.

Die Zelltyp-spezifische Re-Expression von MyD88 in K5^{ind}MyD88-Mäusen wurde neben der routinemäßigen Genotypisierung aller Tiere mittels DNA-Proben aus Haut und Blut auch auf Proteinebene per *Western Blot* aus je drei Mäusen pro Genotyp bestätigt. Wie erwartet war bei MyD88-profizienten Mäusen in allen untersuchten Organen MyD88-Protein vorhanden, bei MyD88-defizienten Mäusen in keinem der untersuchten Organe. Bei K5^{ind}MyD88-Mäusen wurde in der Haut MyD88-Protein nachgewiesen, nicht aber in der Lunge, die K5-negatives Epithelgewebe enthält oder der Milz, die kein Epithel enthält. Im Thymus konnten Spuren von MyD88-Protein nachgewiesen werden, deutlich weniger als in MyD88-profizienten Mäusen. Thymuszellen können K5 exprimieren (234). Ob MyD88-abhängige Signalwege im Thymus die dort stattfindende T-Zell-Selektion beeinflussen könnten, ist nicht bekannt.

4.4.1 AD-Induktion in K5^{ind}MyD88-Mäusen

Um die Rolle von MyD88-abhängigen Signalwegen in Keratinozyten *in vivo* zu untersuchen, wurde die AD-Induktion an Keratinozyten-spezifischen MyD88^{knock-in}-Mäusen (K5^{ind}MyD88) durchgeführt und zum Vergleich MyD88-defiziente und –profiziente Wurfgeschwister in den Versuchen mitgeführt.

Re-Expression von MyD88 in Keratinozyten führte interessanterweise nicht zu einer Verdickung der Epidermis nach Ova-abhängiger AD-Induktion, wie sie in MyD88-profizienten Tieren zu beobachten war. Dies weist darauf hin, dass Keratinozyten-intrinsische Signale nicht ausreichen, um diesen Effekt herbeizuführen, sondern dass hierfür eine Kommunikation mit anderen MyD88-profizienten Zelltypen stattfinden muss.

Seit langem ist bekannt, dass IL-17A und IFN- γ die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Keratinozyten anregen können (235). Diese beiden T-Zell-Zytokine konnten im Rahmen dieser Arbeit nur in den restimulierten Lymphknoten von MyD88-profizienten Mäusen, nicht aber von MyD88-defizienten und K5^{ind}MyD88-Tieren nachgewiesen werden. Es steht zu vermuten, dass dies auch in der Haut der Fall ist, was mittels Organ-*ELISA* aus Proteinlysaten der Haut untersucht werden könnte.

Im Rahmen einer Studie über Psoriasis (205) wurde beschrieben, dass bei Mäusen das durch IL-23 induzierte TH17-Zytokin IL-22 entscheidend für die Entwicklung einer Akanthose ist. IL-23 gehört zur IL-12-Familie und wird MyD88-abhängig vornehmlich von dendritischen Zellen produziert. Es wirkt pro-inflammatorisch und induziert u. a. IL-17A und IL-22 (205). Zwar sind Psoriasis und AD zwei immunologisch verschiedene Krankheitsprozesse, jedoch sind bei beiden Erkrankungen TH17-Zellen beteiligt. Daher wäre es möglich, dass auch bei AD dieser Mechanismus für die Ausbildung der Akanthose notwendig ist.

In dieser Arbeit wurde die MyD88-Abhängigkeit der IL-23-Produktion in *BMDC* bestätigt. Ebenso produzierten Lymphknotenzellen von MyD88-defizienten Versuchsmäusen nach Restimulation kein IL-17A und kein IL-22, auch nicht nach polyklonaler, Antigen-unabhängiger Aktivierung durch ConA (Daten nicht gezeigt). Zwar wurde beschrieben, dass IL-23 von humanen Keratinozyten produziert werden kann (236), was nahelegen würde, dass Keratinozyten-spezifisches MyD88^{knock-in} die Akanthose wiederherstellen könnte. Jedoch ist die IL-23-Produktion für murine primäre Wildtyp-Keratinozyten bisher nicht explizit gezeigt worden und war auch bei den in dieser Arbeit kultivierten Keratinozyten nicht messbar. Weitere Faktoren können eine Akanthose, d. h. Hyperproliferation der Keratinozyten und

damit einhergehende Verdickung der Epidermis vermitteln. Dazu gehören z. B. FGF1 und FGF2 (*Fibroblast Growth Factor*) (208).

Durch *in vitro*-Versuche mit primären Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass MyD88-defiziente Keratinozyten eine vergleichbare Proliferation / Viabilität (nach MTT-Test) aufwiesen wie MyD88-profiziente-Keratinozyten. Ein intrinsischer Defekt MyD88-defizienter Keratinozyten, der Ursache für die fehlende Akanthose nach AD-Induktion sein könnte, ist daher unwahrscheinlich. Im Gegenteil zeigten MyD88-defiziente Keratinozyten nach Kultivierung ohne Kollagenmatrix sogar eine höhere Proliferation / Viabilität als MyD88-profiziente Keratinozyten, d. h. es waren vermutlich mehr Zellen vorhanden. Dies könnte auf stärkere Proliferations- und / oder Adhäsionsfähigkeit hindeuten und damit auf eine unterschiedliche Differenzierungsfähigkeit. Im Gegensatz zur Akanthose wurden jedoch andere untersuchte AD-Parameter durch Keratin5-induzierte MyD88-Signalwege beeinflusst. Diese umfassten Serum-IgE-Spiegel in unbehandelten Tieren, die Ova-abhängige Auswanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis und die AD-induzierte Infiltration der Dermis mit T-Helferzellen. Diese Parameter waren in K5^{ind}MyD88-Tieren auf vergleichbarem oder ähnlichem Niveau wie bei Wildtypen. Dies bedeutet, dass Keratinozyten über Expression von Rezeptoren und Freisetzung von Entzündungsmediatoren mit anderen Immunzellen interagieren und dass dafür MyD88-abhängige Signalwege notwendig sind. Ob Keratinozyten Antigene auch selber aufnehmen und prozessieren, oder durch Zytokinproduktion anderer Zellen aktiviert werden, ist unklar.

4.4.2 Ex vivo kultivierte primäre Keratinozyten

Um zu analysieren, welche MyD88-abhängig von Keratinozyten produzierten Faktoren die IgE-Spiegel naiver Mäuse, die Ova-induzierte Langerhanszell-Migration sowie die Hemmung der T-Helferzell-Infiltration in die Dermis vermitteln könnten, wurden primäre murine Keratinozyten aus Ohren und Schwanzhaut isoliert. Die Isolierung aus der dicht behaarten Haut z. B. des Rückens war wegen störendem Fell, dickem Unterhautfettgewebe und schlechter Ausbeute nicht praktikabel.

Nach der Aufreinigung wurden die Zellen mit verschiedenen Stimuli kultiviert. Dabei wurde festgestellt, dass bereits unstimulierte Keratinozyten eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen MyD88-abhängig freisetzen und dass durch zusätzliche Stimulation mit TLR-Liganden oder Allergenen keine bedeutenden Unterschiede in der Zytokinsekretion

erzielt werden konnten. Dies liegt vermutlich zum Teil an der Zusammensetzung des Keratinozytenmediums, welches als Supplemente u. a. die immunologisch wirksamen Substanzen Hydrocortison und Insulin enthält, außerdem bovines Hypophysenextrakt, welches reich an Hormonen ist. All diese Substanzen haben auch immunologische Funktionen und können daher die Ergebnisse beeinflussen. Darüber hinaus werden Keratinozyten durch die Vereinzelung vor der Kultivierung angeregt, zu proliferieren und neue Zellverbände auszubilden, wie es bei einer Wundheilung *in vivo* geschieht. Bei langer Kultivierungsdauer können die Keratinozyten auch terminal ausdifferenzieren und apoptotisch werden, in diesem Fall ist auch keine Stimulation mehr möglich.

Für weitere Analysen sollten entweder *ex vivo*-isolierte Keratinozyten von unterschiedlich vorbehandelten Tieren verwendet werden oder spezielle hormon- und serumfreie Keratinozytenmedien getestet werden. Allerdings sind diese Medien meist auf humane Keratinozyten abgestimmt und nicht unbedingt für murine Keratinozyten geeignet.

Unabhängig von den verwendeten Stimuli wurde gezeigt, dass die Sekretion von Zytokinen im Verlauf der Kultivierungsdauer ansteigt, d. h. mit der Anzahl der proliferierenden Zellen. IL-1 α , GM-CSF, CXCL1 und CCL2 wurden MyD88-abhängig produziert, die jeweils im Zellüberstand gemessene Menge war bei MyD88-defizienten Keratinozyten sehr viel geringer als bei MyD88-profizienten Zellen, GM-CSF konnte bei MyD88-defizienten Zellen gar nicht nachgewiesen werden. CCL2 (237) und CXCL1 (238) werden bekanntermaßen MyD88-abhängig induziert, für GM-CSF wurde dies noch nicht explizit beschrieben. IL-1 α wird MyD88-unabhängig gebildet, führt aber über den MyD88-abhängigen IL-1R zur Produktion der übrigen vorgenannten Entzündungsmediatoren (239), was auch die MyD88-abhängige GM-CSF-Produktion erklärt. Bei der hier beobachteten verstärkten IL-1 α -Produktion von MyD88-profizienten Zellen könnte es sich um einen *feedback-loop* handeln, da GM-CSF wiederum die IL-1-Produktion verstärken kann (240).

Die MyD88-abhängige Produktion dieser Entzündungsmediatoren in Keratinozyten könnte die in den K5^{ind}MyD88-Mäusen wieder hergestellte Auswanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis nach Ova-Behandlung erklären. Insbesondere IL-1 und GM-CSF fördern diese Zellmigration und Allergen-Sensibilisierung (241). GM-CSF induziert überdies CCL17 (242), das für die Langerhanszell-Emigration notwendig ist (201).

4.4.3 Keratinozyten von AD-behandelten Mäusen

Um die Rolle von Keratinozyten bei der Pathogenese der AD noch näher zu untersuchen, wurden Keratinozyten von AD-behandelten Mäusen isoliert. Dies war nicht aus der behandelten Rückenhaut möglich, sondern nur aus Ohren und Schwanzhaut. Dieses Vorgehen erlaubte einen interessanten Einblick darauf, ob die AD-Induktion einen systemischen Einfluss auf Keratinozyten aus nicht-läsionalen (nicht behandelten) entfernt liegenden Hautarealen hat.

Bereits bei der Zellisolation fiel auf, dass die Ausbeute an Keratinozyten von Ova-behandelten Tieren größer war als die von Kontrolltieren. Die *in vitro*-Sekretion von IL-1 α war in Keratinozyten von Ova-behandelten MyD88-profizienten Mäusen deutlich gegenüber Kontrolltieren erhöht. Auch die Produktion von CXCL1 war nach Ova-Vorbehandlung MyD88-profizienter Tiere etwas höher als von NaCl-Kontrollen. Ein solcher Effekt wurde in den MyD88-defizienten Tieren nicht beobachtet, was zu erwarten war, da MyD88 für die Produktion dieser Zytokine notwendig ist (238, 239).

Tatsächlich scheint wiederholte lokale Hautirritation und Antigen-Applikation also einen systemischen Effekt auf die Epidermis zu haben. Verstärkte Keratinozytenproliferation schwächt die Barriere zunächst, weil die terminale Differenzierung verzögert wird (243). Jedoch könnte einerseits die ebenfalls verstärkte Zytokinsekretion dem entgegensteuern und andererseits könnte nach der Proliferation und dann anschließender Differenzierung die Barriere als adaptive Reaktion verstärkt ausgebildet werden.

Beim Menschen werden die Unterschiede in der Barrierefunktion sowie der Produktion von Entzündungsmediatoren zwischen asymptomaler Haut von AD-Patienten im Vergleich zur Haut von gesunden Probanden größtenteils als Folge einer genetischen Disposition für Barrieredefekte und Allergien beschrieben (244). Diskutiert wird aber auch in der humanen Situation die Induktion einer systemischen Reaktion der Haut auf lokale Irritation (200, 245). Darüber hinaus wurde für verschiedene Entzündungsmodelle der Haut und des Darms, jedoch bisher nicht für allergische Entzündungen, die Infiltration der Haut mit residenten langlebigen CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen beschrieben (246, 247).

Bei der beschriebenen MyD88-abhängigen Akkumulation von CD8⁺ T-Zellen in der Epidermis nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung könnte es sich um eine solche Reaktion handeln. Sie wurde nicht durch Keratinozyten-intrinsische MyD88-abhängige Signalwege induziert, sondern nur in MyD88-profizienten Mäusen und nur nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung beobachtet. Hierfür sind also andere Zelltypen notwendig.

In einer aktuellen Studie wurde beschrieben, dass nach AD-Induktion auch Mastzellen systemisch proliferieren, insbesondere auch im Darm (248). Ob die Akkumulation von Mastzellen und T-Zellen nach AD miteinander in Verbindung steht, könnte durch Immunhistologie von unbeteiligten Hautarealen AD-behandelter Mäuse untersucht werden.

Wie die CD8⁺ T-Zellen in das Gewebe rekrutiert werden, ist noch unklar, könnte von verschiedenen Zelltypen abhängen und könnte außerdem abhängig von der Art der Entzündung und des Organs unterschiedlich erfolgen. Möglich wäre die Beteiligung von Chemokinen wie CCL17, CCL2, CCL5, und / oder CXCL10, welche T-Zellen rekrutieren können (249). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MyD88-abhängige Produktion von CCL2 durch Keratinozyten beobachtet. CCL17 wurde von *BMDC* größtenteils unabhängig von MyD88 sekretiert (durch Zugabe von GM-CSF für die Differenzierung), nicht jedoch von murinen Keratinozyten (Daten nicht gezeigt), CCL5 war in *BMDC* MyD88-abhängig verstärkt (Daten nicht gezeigt) und wurde bei Keratinozyten ebenfalls nicht nachgewiesen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion dieser T-Zellen zu charakterisieren.

4.4.4 TSLP

Das Zytokin TSLP wurde interessanterweise von MyD88-defizienten Keratinozyten in sehr viel größeren Mengen freigesetzt als von MyD88-profizienten Keratinozyten, was im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit von Keratinozyten nachgewiesenen Entzündungsmediatoren steht. Es wurde berichtet, dass die Expression von TSLP in Keratinozyten und auch dendritischen Zellen auch MyD88-abhängig durch TLR-Liganden induziert werden kann (223, 250). In dieser Arbeit konnte keine TSLP-Produktion von *BMDC* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), eine mögliche Verunreinigung der Keratinozytenkultur durch Langerhanszellen oder auch andere dendritische Zellen wurde ausgeschlossen.

Die Produktion von TSLP ist mit Th₂-Antworten wie Allergien assoziiert. Es ist beschrieben, dass experimentelle Überexpression von TSLP in der Haut ein Asthmodell in der Maus verstärkt (251). Experimentelle Überexpression von TSLP in der Lunge führt zu erhöhten IgE-Spiegeln im Blut (252). Im Verlaufe dieser Arbeit wurde festgestellt, dass MyD88-defiziente Mäuse per se erhöhte IgE-Spiegel im Blut aufweisen. Daher könnte die verstärkte Expression von TSLP in MyD88-defizienten Tieren eine Ursache für die erhöhten IgE-Spiegel sein. Dieser Zusammenhang wurde jedoch noch nicht beschrieben. Bisher sind

als Ursachen für erhöhte IgE-Spiegel STAT3-Mutationen (wie beim Hyper-IgE-Syndrom) und DOCK8-Mutationen bekannt (197, 198). Beide Moleküle werden durch MyD88-abhängige Signalwege aktiviert, wie dies mit TSLP in Zusammenhang steht, ist unbekannt.

Seit kurzem ist bekannt, dass TSLP überdies die Differenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen, kurz M2-Makrophagen fördert, die ebenfalls an allergischen Entzündungen beteiligt sind (253). In einem Modell für invasive *Staphylokokkus aureus*-Infektionen wurde eine verstärkte Rekrutierung von M2-Makrophagen in MyD88^{knock-out}-Mäusen beobachtet (254). M2-Makrophagen exprimieren den Mannoserezeptor (MMR) (255), dieser ist offenbar an der Internalisierung von Allergenen beteiligt (155). Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass in Knochenmarks-generierten Makrophagen die Expression des MMR durch Stimulation mit dem Allergen Ova verstärkt wird. In MyD88-defizienten Zellen war die MMR-Expression nach Ova-Stimulation wesentlich stärker erhöht als in MyD88-profizienten Zellen. Diese Beobachtung korreliert also mit der stark erhöhten TSLP-Produktion von MyD88-defizienten Keratinozyten und könnte darauf hinweisen, dass in MyD88-defizienten Mäuse *in vivo* durch hohe TSLP-Spiegel mehr M2-Makrophagen differenzieren könnten als in MyD88-profizienten Mäusen. Dies sollte in Versuchsmäusen histologisch weiter untersucht werden.

Keratinozyten aus nicht-läsionaler Haut von Mäusen nach AD-Induktion wurden wie Keratinozyten von naiven Mäusen kultiviert. Dabei wurde festgestellt, dass die Zellen von MyD88-defizienten Mäusen nach Ova-Behandlung größere Mengen von TSLP freisetzen als NaCl-behandelte Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu war die Sekretion von TSLP durch Keratinozyten von MyD88-profizienten und K5^{ind}MyD88-Mäusen nach Ova-Behandlung sogar etwas niedriger als von Kontrolltieren. Da TSLP eine wichtige Rolle für die Wiederherstellung der Mucosa-Barriere spielt (256) und zusammen mit TGF- β eine tolerogene Immunantwort gegenüber der kommensalen Flora einleitet (257), könnte für die Hautbarriere die gleiche Funktion angenommen werden. Dies würde den niedrigeren TEWL-Wert als Maß für die geringere Hautbarriere-Durchlässigkeit von Ova-behandelten MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu MyD88-profizienten Mäusen erklären. Außerdem könnte durch diesen Barriere-aufbauenden Effekt von TSLP die Emigration von Langerhanszellen gehemmt werden, was neben dem Fehlen von IL-1 α und GM-CSF ein weiterer Faktor wäre, der die fehlende Langerhanszell-Auswanderung in MyD88-defizienten Mäusen erklären würde.

Weiterhin könnte die starke TSLP-Produktion von MyD88-defizienten Tieren auch die stark erhöhte Zahl von dermalen T-Helferzellen nach AD-Induktion vermitteln, die in K5^{ind}MyD88-Mäusen nicht auftrat, da TSLP das TH₂-Chemokin CCL17 in dendritischen Zellen induzieren kann (258) und Haut-infiltrierende T-Zellen zur Produktion von TH₂-Zytokinen aktivieren kann (173).

Von entzündlichen Epithelzellen freigesetztes TSLP kann darüber hinaus Mastzellen aktivieren (259), allerdings trat in dem in dieser Arbeit angewendeten AD-Modell eine MyD88-unabhängige und Allergen-unabhängige Erhöhung der Mastzellen auf, die offenbar bereits durch die wiederholte Hautirritation ausgelöst wurde. Histologisch wurden keine Unterschiede im Grad der Degranulation beobachtet. Die Analyse von Entzündungsmediatoren, die durch Mastzellen freigesetzt werden, oder die Anwendung anderer Entzündungsmodelle könnten möglicherweise klären, ob dies auch für durch MyD88-Defizienz erhöhte TSLP-Produktion zutrifft. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine durch MyD88 vermittelte Vermehrung von Mastzellen in der Haut nach chronischer Bestrahlung mit UV B-Licht. Da dies in MyD88-defizienten Mäusen komplett ausblieb, ist TSLP wahrscheinlich nicht der einzige notwendige Faktor für die Aktivierung von Mastzellen.

Bisherige Studien beschreiben für TSLP eine Allergie-fördernde Funktion (260), wenngleich nicht immer ausgeschlossen werden kann, dass die Expression von TSLP als Reaktion auf eine Barrierestörung notwendig sein könnte, um die Wundheilung und Wiederherstellung der Barrierefunktion einzuleiten. Dies wäre analog zu seiner oben beschriebenen Funktion für die Mucosa im Darm. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine aktuelle Studie, die beschreibt, dass TSLP-Produktion zwar mit Allergen-Sensibilisierung und Anaphylaxie assoziiert, jedoch nicht ursächlich verknüpft ist (261).

TSLP kommt vermutlich auch eine Schlüsselrolle beim „atopischen Marsch“ oder der „Allergiekarriere“ zu, d. h. der Progression bei Atopikern von AD zu anderen allergischen Erkrankungen und insbesondere Asthma (262-264). Auch nach AD-Induktion bei der Maus ist eine allergische Reaktion der Lunge durch intranasale Antigen-Provokation beschrieben (265), ebenso wie im Darm durch orale Antigenaufnahme (248). Es wäre von Interesse, diese Reaktion bei MyD88-defizienten und Kontrolltieren nach AD-Induktion zu vergleichen und auch die TSLP-Produktion in der Lunge zu bestimmen. Trotz verminderter Entzündungssymptome der Haut nach AD-Induktion könnten MyD88-defiziente Tiere eine gleich starke oder stärkere Antigen-vermittelte Hypersensibilität in der Lunge ausbilden. Dies würde die wichtige Rolle von TSLP beim atopischen Marsch bestätigen. Im anderen Falle

würden solche Versuche für eine möglicherweise protektive Rolle von TSLP über die Wiederherstellung der Barrierefunktion sprechen.

4.4.5 Die Korrelation von MyD88-Defizienz, TSLP-Expression und Autoimmunität

Die Produktion von TSLP wird in Keratinozyten durch Aktivierung von Rezeptoren für dsRNA induziert (266, 267), die nicht MyD88-abhängig wirken. Bei den Keratinozytenkulturen für diese Arbeit wurde auch der TLR3-Ligand poly(I:C) verwendet mit der Erwartung, dass dieser die TSLP-Produktion verstärkt. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden, was vermutlich an der beschriebenen unspezifischen Aktivierung der Zellen durch die Kulturbedingungen lag. Bei Aufnahme ins Zytoplasma kann poly(I:C) auch über den intrazellulären Mustererkennungsrezeptor MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated protein 5*) erkannt werden (268). Dazu müsste poly(I:C) mit Liposomen komplexiert werden, um eine Aufnahme über Endosomen zu erreichen, was z. B. durch die Mischung mit dem Transfektionsreagenz DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammoniumpropanmethylsulfat) (269) möglich ist. Auf diesem Wege könnte untersucht werden, ob eine Verstärkung der TSLP-Produktion in Keratinozyten durch Aktivierung intrazellulärer MyD88-unabhängiger Mustererkennungsrezeptoren möglich ist.

Frühere unveröffentlichte Daten (Weighardt et al., unveröffentlicht) weisen darauf hin, dass MyD88-defiziente Mäuse verstärkt Typ I-IFN bilden können, da in MyD88-defizienten *BMDC* der RIG-I (*Retinoic acid inducible gene 1*)-Signalweg verstärkt war. RIG-I ist ein weiterer intrazellulärer Mustererkennungsrezeptor, der virale *RNA* erkennt (270). Typ I-IFN sind für die Abwehr viraler Infektionen notwendig, aber auch an Autoimmunerkrankungen beteiligt. Dies könnte darauf hinweisen, dass MyD88-defiziente Mäuse möglicherweise verstärkte Autoimmunreaktionen ausbilden. Typ I-IFN wird hauptsächlich von plasmazytoiden dendritischen Zellen produziert (202). Ob bei MyD88-defizienten Mäusen ein Phänotyp der plasmazytoiden dendritischen Zellen vorliegt, ist unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der durchflusszytometrischen Analyse der Lymphknotenzellen aller Versuchsgruppen festgestellt, dass die Frequenz von CD317⁺ plasmazytoiden dendritischen Zellen bei MyD88-defizienten Mäusen höher war als bei MyD88-profizienten Mäusen. Hier sollten weitergehende Untersuchungen folgen, z. B. immunhistologische Darstellung von plasmazytoiden dendritischen Zellen in den Hautpräparaten der Versuchstiere.

Es wurde bereits eine verstärkte Aktivierung des TLR3-Signalweges in Abwesenheit von MyD88 in Zellkultur nachgewiesen (221), der ebenfalls Typ I-IFN induziert. Überdies wurde

systemische und auch epidermale Überexpression von TSLP nicht nur mit erhöhten IgE-Spiegeln und Allergien (252), sondern auch mit Autoimmunität in Verbindung gebracht (181, 271, 272). In einem anderen Modell hingegen wird ein vor Autoimmunität schützender Effekt von TSLP vorgeschlagen (273), wobei in diesem Fall mit TSLP-Rezeptor-defizienten Mäusen gearbeitet wurde, was nicht direkt vergleichbar ist. Auch könnte TSLP in unterschiedlichen Organen verschiedene Funktionen ausüben. In der erstgenannten Studie (181) wurden Mäuse untersucht, die über eine Keratin5-induzierte TSLP-Überexpression verfügen. Dieses Modell kommt den in dieser Arbeit verwendeten K5^{ind}MyD88-Mäusen mechanistisch relativ nah, da auch hier der Keratin-Promotor verwendet wurde, und die Keratin5-induzierte Re-Expression von MyD88 die TSLP-Produktion von Keratinozyten offenbar stark hemmt. Weiter zu untersuchen wäre noch, wie die TSLP-Expression in anderen Organen bzw. Zelltypen wie z. B. Fibroblasten durch MyD88 beeinflusst werden, und ob die Keratin5-induzierte Re-Expression von MyD88 auch Einfluss auf die TSLP-Produktion anderer Zelltypen hat. Da Keratin5 auch im Thymus exprimiert werden kann (234), kann bei Mäusen, die mithilfe des Keratin5-Promotors gentechnisch verändert wurden, ein Einfluss auf die T-Zell-Entwicklung im Thymus nicht ganz ausgeschlossen werden.

Da auch bei Patienten mit schwerer AD IgE-Antikörper gegen Bestandteile der Epidermis nachgewiesen wurden (116), wurde dieser Parameter auch im Rahmen dieser Arbeit bei Versuchstieren nach AD-Induktion bestimmt. Für diesen Zweck wurde eine bereits beschriebene Nachweismethode (116) adaptiert und modifiziert. Insbesondere wurde für einen höheren Probendurchsatz statt *Western Blot* ein *ELISA* durchgeführt.

Auf diese Weise konnten in Seren von MyD88-profizienten Mäusen nach AD-Induktion Auto-Antikörper gegen ein Epidermislysat unbehandelter Wildtyp-Tiere nachgewiesen werden, jedoch nicht bei naiven Tieren. Die Menge an Auto-Antikörpern war nach kombinierter Ova+SEB-Behandlung höher als in den mit nur einem Antigen behandelten Versuchsgruppen und spiegelt die bei Patienten beschriebene AD-Progression durch SEB (274) wieder. Insbesondere die so nachgewiesenen spezifischen Antikörper des T_{H2}-assoziierten IgE-Isotyps zeigen die Beteiligung von Auto-Antikörpern bei schwerer AD auch im Mausmodell, da sie klassische Allergiesymptome wie Histaminfreisetzung aus Mastzellen auslösen können.

Interessanterweise wiesen MyD88-defiziente Mäuse schon vor jeglicher Behandlung diese Auto-Antikörper auf und nach Behandlung stiegen sie noch etwas weiter an, erreichten aber nach Ova+SEB-Behandlung keinen höheren Wert als die Seren MyD88-profizienter

Kontrollen, d. h. die Antikörperspiegel können möglicherweise nicht über einen bestimmten Wert hinaus gesteigert werden.

Nicht nur Epidermislysate, sondern auch ein Lysat einer Keratinozyten-Zelllinie ist als „Antigen“ zum Nachweis von Auto-Antikörpern gegen das Epidermisgewebe geeignet (116), daher ist es unwahrscheinlich, dass Antikörper gegen Bakterien der Hautflora diesen Effekt verursachen. Es könnte versucht werden, die genauen Auto-Antigene zu identifizieren, da dies ein Angriffspunkt für Therapien sein könnte.

Zusammen mit den erhöhten Spiegeln von Gesamt-IgE und –IgG1 bei unbehandelten MyD88-defizienten Mäusen steht zu vermuten, dass diese Erhöhung mindestens teilweise durch das Vorliegen verschiedener Auto-Antikörper bedingt ist. Zur Sicherung dieser Vermutung sollte mit der gleichen Methode das Vorhandensein von Auto-Antikörpern gegen Lysate anderer Organe, z. B. der Niere oder des Magens, untersucht werden, da das Auftreten weiterer Auto-Antikörper in MyD88-defizienten Mäusen möglich ist.

Auto-Antikörper können zu gewebeschädigenden Entzündungsreaktionen beitragen. Meist muss dafür jedoch zunächst eine Gewebeerletzung vorliegen, die die Freisetzung der entsprechenden Auto-Antigene und deren Bindung an die zirkulierenden Antikörper ermöglicht. Trotz der vorhandenen Auto-Antikörper in unbehandelten MyD88-defizienten Mäusen treten keine „spontanen“ Entzündungen auf. Auch sind MyD88-abhängige Signalwege für die Induktion vieler Entzündungsmediatoren notwendig, sodass das Vorhandensein von Auto-Antikörpern an sich möglicherweise noch keine Gewebeschäden auslösen kann, wenn MyD88 fehlt.

Weiter wäre es von Interesse, die Rolle von MyD88-vermittelten Signalwegen bei Autoimmunerkrankungen zu untersuchen. Verschiedentlich gibt es Berichte, dass MyD88 die Entwicklung von Autoimmunität unterdrücken kann (275-279).

Bei verschiedenen humanen Immundefizienz-Syndromen, die mit erhöhten IgE-Spiegeln einhergehen, tritt auch Autoimmunität auf (280). Zwar ist für diese Erkrankungen kein direkter Effekt in MyD88-abhängigen Signalwegen bekannt, jedoch korreliert dies sehr gut mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten und der vorliegenden Literatur.

Die Psoriasis (Schuppenflechte) als immunologisches Gegenstück zur AD wäre im Anschluss an diese Arbeit besonders geeignet, um Autoimmunreaktionen bei MyD88-defizienten Mäusen zu untersuchen. Ein Mausmodell für Psoriasis kann z. B. durch topische Applikation von Imiquimod (Aldara®, 3M) induziert werden, allerdings ist dieser Wirkstoff ein

TLR7/8-Ligand und wird daher direkt MyD88-abhängig erkannt. Hier würde aller Wahrscheinlichkeit nach die erwartete Entzündung in MyD88-defizienten Mäusen ausbleiben, da das Antigen nicht vom Organismus erkannt werden kann. Besser geeignet wäre ein TLR3- oder Rig-I-Ligand oder auch eine andere Substanz, die nicht direkt MyD88-abhängige Signalwege aktiviert. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Stearinsäure, eine Trägersubstanz von Aldara®, ebenfalls eine immunstimulatorische Wirkung hat, die einen anderen noch unbekannten Signalweg unabhängig von TLR7 aktiviert (281). Somit könnte versucht werden, die Entzündungsreaktion nach Applikation reiner Stearinsäure zu untersuchen.

Mäuse des Stamms BALB/c haben ein T_H2 -polarisiertes Immunsystem, somit u. a. mehr IL-4 und IgE, stärkere Allergiesymptome und auch mehr IL-17A als C57BL/6-Mäuse (eigene Daten und vgl. frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe (201)). Es wäre daher interessant, im direkten Vergleich zu untersuchen, ob diese BALB/c-Mäuse mehr TSLP und höhere Serumspiegel von Auto-Antikörpern als C57BL/6-Mäuse aufweisen. Dies würde die Relevanz von TSLP nicht nur für Allergien, sondern auch für Autoimmunerkrankungen unterstreichen.

4.5 Klinische Relevanz und Ausblick

AD ist eine in Industrienationen mit wachsender Prävalenz auftretende Erkrankung im Kindesalter. Sie kann durch quälenden Juckreiz zu schlecht heilenden Wunden und hohem Leidensdruck führen. Zwar heilt sie häufig bis zum Erreichen des Erwachsenenalters aus, jedoch ist sie mit dem späteren Auftreten anderer atopischer Erkrankungen wie Nahrungsmittelallergien, Rhinitis und Asthma assoziiert. Als schwere Komplikation können u. a. wiederkehrende Infektionen und anaphylaktische Reaktionen auftreten. Berufsbedingte AD und die Progression von allergischer Rhinitis zu Asthma sind erhebliche Faktoren für krankheitsbedingte Fehltag im Beruf bis hin zur Berufsunfähigkeit. Daher sind allergische Erkrankungen ein hoher volkswirtschaftlicher Kostenfaktor (282).

Die Häufung atopischer Erkrankungen in Industrieländern wird mit Lebensstil-Faktoren in Zusammenhang gebracht. Wenige Infektionen im Kindesalter, Ernährungs- und Hygienegewohnheiten sowie Umweltverschmutzung beeinflussen die Hautbarriere und kommensale Besiedelung sowie die Reaktion des Körpers auf exogene Substanzen.

Heutige Präventions- und Therapiemaßnahmen beschränken sich hauptsächlich auf Symptom-Minderung und sind häufig unzureichend. Da über die ursächliche Entstehung dieser Erkrankungen noch zu wenig bekannt ist, sind weitere Forschungen zur Identifizierung möglicher Therapie-Ansatzpunkte notwendig. Die in dieser Arbeit untersuchte Beteiligung von MyD88-abhängigen Signalwegen und der Rolle der Epidermis bei der Pathogenese von AD brachte einige neue Hinweise darauf, dass Allergien keine rein sterilen Erkrankungen sind, sondern im Kontext mit kommensalen und pathogenen Mikroben entstehen. Eine pharmazeutische Modulation von Rezeptoren oder Entzündungsmediatoren des angeborenen Immunsystems könnte neue kausale Therapieoptionen für allergische Erkrankungen eröffnen. So können TLR-Liganden Allergiesymptome abschwächen (283-285), was zunächst den erhaltenen Daten widerspricht, die in MyD88-defizienten Mäusen, also ohne TLR-Aktivierung, schwächere Entzündungssymptome zeigten. Im Gegensatz dazu steht außerdem, dass AD-Patienten unter häufigen Hautinfektionen leiden, die das Hautbild verschlechtern, nicht lindern. Offensichtlich müssen bei der Immunmodulation von AD vielfältige mikrobielle und immunologische Faktoren berücksichtigt werden. Insbesondere das Zusammentreffen verschiedenartiger Antigene durch gleichzeitiges Aufbringen von Allergenen und mikrobiellen Antigenen auf vorgeschädigte Haut (endogene Gefahrensignale) könnte unerwartete Reaktionen auslösen. Gut bekannt ist in dem Zusammenhang, dass Infektionen auch Autoimmunreaktionen auslösen können (286). Daher müssen weitere Arbeiten mögliche Nebenwirkungen einer immunmodulatorischen AD-Behandlung im Kontext mit Infektionsabwehr, Autoimmunität und Tumorentstehung klären.

Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2009. *Janeway Immunologie*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg.
2. Kindt, T., Goldsby, R., Osbourne, B. 2007. *Kuby Immunology*. W. H. Freeman and Company, New York.
3. Kubinak, J. L., and J. L. Round. 2012. Toll-like receptors promote mutually beneficial commensal-host interactions. *PLoS pathogens* 8: e1002785.
4. Slack, E., S. Hapfelmeier, B. Stecher, Y. Velykoredko, M. Stoel, M. A. Lawson, M. B. Geuking, B. Beutler, T. F. Tedder, W. D. Hardt, P. Bercik, E. F. Verdu, K. D. McCoy, and A. J. Macpherson. 2009. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* 325: 617-620.
5. Pai, R., and G. Kang. 2008. Microbes in the gut: a digestable account of host-symbiont interactions. *The Indian journal of medical research* 128: 587-594.
6. Du, W., Z. Adam, R. Rani, X. Zhang, and Q. Pang. 2008. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. *Antioxidants & redox signaling* 10: 1909-1921.
7. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.
8. Whitham, S., S. P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr, and B. Baker. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115.
9. Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 588-593.
10. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway, Jr. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell* 2: 253-258.
11. Langerhans, P. 1868. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* 44: 325-337.
12. Zola, H., B. Swart, A. Banham, S. Barry, A. Beare, A. Bensussan, L. Boumsell, D. B. C, H. J. Buhring, G. Clark, P. Engel, D. Fox, B. Q. Jin, P. J. Macardle, F. Malavasi, D. Mason, H. Stockinger, and X. Yang. 2007. CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *Journal of immunological methods* 319: 1-5.
13. Piccinini, A. M., and K. S. Midwood. 2010. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of inflammation* 2010.
14. Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137: 1142-1162.
15. Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
16. Mazzoni, A., and D. M. Segal. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *Journal of leukocyte biology* 75: 721-730.
17. Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* 12: 557-569.
18. Beutler, B. 2000. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current opinion in immunology* 12: 20-26.
19. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088.
20. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 4: 499-511.
21. Mills, K. H. 2011. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* 11: 807-822.
22. Brown, J., H. Wang, G. N. Hajishengallis, and M. Martin. 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of dental research* 90: 417-427.
23. Gong, J., T. Wei, N. Zhang, F. Jamitzky, W. M. Heckl, S. C. Rossle, and R. W. Stark. 2010. TollML: a database of toll-like receptor structural motifs. *Journal of molecular modeling* 16: 1283-1289.
24. Casanova, J. L., L. Abel, and L. Quintana-Murci. 2011. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual review of immunology* 29: 447-491.
25. Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guiet, F. Briere, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri, and E. E. Bates. 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B

- cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *Journal of immunology* 174: 2942-2950.
26. Botos, I., D. M. Segal, and D. R. Davies. 2011. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 19: 447-459.
 27. Lord, K. A., B. Hoffman-Liebermann, and D. A. Liebermann. 1990. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 5: 1095-1097.
 28. Hardiman, G., F. L. Rock, S. Balasubramanian, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. 1996. Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene* 13: 2467-2475.
 29. Hultmark, D. 1994. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochemical and biophysical research communications* 199: 144-146.
 30. Han, J. 2006. MyD88 beyond Toll. *Nature immunology* 7: 370-371.
 31. O'Neill, L. A., and A. G. Bowie. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 7: 353-364.
 32. Franzenburg, S., S. Fraune, S. Kunzel, J. F. Baines, T. Domazet-Loso, and T. C. Bosch. 2012. MyD88-deficient Hydra reveal an ancient function of TLR signaling in sensing bacterial colonizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 19374-19379.
 33. Padmanabhan, M., P. Cournoyer, and S. P. Dinesh-Kumar. 2009. The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular microbiology* 11: 191-198.
 34. von Bernuth, H., C. Picard, Z. Jin, R. Pankla, H. Xiao, C. L. Ku, M. Chrabieh, I. B. Mustapha, P. Ghandil, Y. Camcioglu, J. Vasconcelos, N. Sirvent, M. Guedes, A. B. Vitor, M. J. Herrero-Mata, J. I. Arostegui, C. Rodrigo, L. Alsina, E. Ruiz-Ortiz, M. Juan, C. Fortuny, J. Yague, J. Anton, M. Pascal, H. H. Chang, L. Janniere, Y. Rose, B. Z. Garty, H. Chapel, A. Issekutz, L. Marodi, C. Rodriguez-Gallego, J. Banchereau, L. Abel, X. Li, D. Chaussabel, A. Puel, and J. L. Casanova. 2008. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321: 691-696.
 35. Picard, C., H. von Bernuth, P. Ghandil, M. Chrabieh, O. Levy, P. D. Arkwright, D. McDonald, R. S. Geha, H. Takada, J. C. Krause, C. B. Creech, C. L. Ku, S. Ehl, L. Marodi, S. Al-Muhsen, S. Al-Hajjar, A. Al-Ghonaïum, N. K. Day-Good, S. M. Holland, J. I. Gallin, H. Chapel, D. P. Speert, C. Rodriguez-Gallego, E. Colino, B. Z. Garty, C. Roifman, T. Hara, H. Yoshikawa, S. Nonoyama, J. Domachowske, A. C. Issekutz, M. Tang, J. Smart, S. E. Zitnik, C. Hoarau, D. S. Kumararatne, A. J. Thrasher, E. G. Davies, C. Bethune, N. Sirvent, D. de Ricaud, Y. Camcioglu, J. Vasconcelos, M. Guedes, A. B. Vitor, C. Rodrigo, F. Almazan, M. Mendez, J. I. Arostegui, L. Alsina, C. Fortuny, J. Reichenbach, J. W. Verbsky, X. Bossuyt, R. Doffinger, L. Abel, A. Puel, and J. L. Casanova. 2010. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine* 89: 403-425.
 36. Conway, D. H., J. Dara, A. Bagashev, and K. E. Sullivan. 2010. Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) deficiency in a large kindred. *The Journal of allergy and clinical immunology* 126: 172-175.
 37. Zhu, J., and C. Mohan. 2010. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation* 2010: 781235.
 38. Tran, H., G. Moreno, and S. Shumack. 2004. Imiquimod as a dermatological therapy. *Expert opinion on pharmacotherapy* 5: 427-438.
 39. Eason, D. D., J. P. Cannon, R. N. Haire, J. P. Rast, D. A. Ostrov, and G. W. Litman. 2004. Mechanisms of antigen receptor evolution. *Seminars in immunology* 16: 215-226.
 40. Akdis, M. 2010. The cellular orchestra in skin allergy; are differences to lung and nose relevant? *Current opinion in allergy and clinical immunology* 10: 443-451.
 41. Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, S. Stevens, and R. A. Flavell. 2008. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29: 947-957.
 42. Shimada, Y., K. Takehara, and S. Sato. 2004. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *Journal of dermatological science* 34: 201-208.
 43. Vantourout, P., and A. Hayday. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* 13: 88-100.
 44. Chodaczek, G., V. Papanna, M. A. Zal, and T. Zal. 2012. Body-barrier surveillance by epidermal gammadelta TCRs. *Nature immunology* 13: 272-282.
 45. DeKruyff, R. H., L. V. Rizzo, and D. T. Umetsu. 1993. Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones. *Seminars in immunology* 5: 421-430.
 46. Perlmutter, R. M., D. Hansburg, D. E. Briles, R. A. Nicolotti, and J. M. Davie. 1978. Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *Journal of immunology* 121: 566-572.

47. Der Balian, G. P., J. Slack, B. L. Clevinger, H. Bazin, and J. M. Davie. 1980. Subclass restriction of murine antibodies. III. Antigens that stimulate IgG3 in mice stimulate IgG2c in rats. *The Journal of experimental medicine* 152: 209-218.
48. Khavari, P. A. 2006. Modelling cancer in human skin tissue. *Nature reviews. Cancer* 6: 270-280.
49. Maintz, L., and N. Novak. 2011. Modifications of the innate immune system in atopic dermatitis. *Journal of innate immunity* 3: 131-141.
50. Tsukita, S., and M. Furuse. 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *The Journal of cell biology* 149: 13-16.
51. Hornef, M. W., and C. Bogdan. 2005. The role of epithelial Toll-like receptor expression in host defense and microbial tolerance. *Journal of endotoxin research* 11: 124-128.
52. van der Aar, A. M., D. I. Picavet, F. J. Muller, L. de Boer, T. M. van Capel, S. A. Zaat, J. D. Bos, H. Janssen, T. C. George, M. L. Kapsenberg, S. M. van Ham, M. B. Teunissen, and E. C. de Jong. 2013. Langerhans Cells Favor Skin Flora Tolerance through Limited Presentation of Bacterial Antigens and Induction of Regulatory T Cells. *The Journal of investigative dermatology* 133: 1240-1249.
53. Vance, R. E., R. R. Isberg, and D. A. Portnoy. 2009. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell host & microbe* 6: 10-21.
54. Kuhnlein, P., R. Mitnacht, N. E. Torres-Nagel, T. Herrmann, A. Elbe, and T. Hunig. 1996. The canonical T cell receptor of dendritic epidermal gamma delta T cells is highly conserved between rats and mice. *European journal of immunology* 26: 3092-3097.
55. Igyarto, B. Z., and D. H. Kaplan. 2013. Antigen presentation by Langerhans cells. *Current opinion in immunology* 25: 115-119.
56. Komori, H. K., D. A. Witherden, R. Kelly, K. Sendaydiego, J. M. Jameson, L. Teyton, and W. L. Havran. 2012. Cutting edge: dendritic epidermal gammadelta T cell ligands are rapidly and locally expressed by keratinocytes following cutaneous wounding. *Journal of immunology* 188: 2972-2976.
57. Shimura, E., N. Hozumi, O. Kanagawa, D. Metzger, P. Chambon, F. Radtke, S. Hirose, and N. Nakano. 2010. Epidermal gammadelta T cells sense precancerous cellular dysregulation and initiate immune responses. *International immunology* 22: 329-340.
58. Kobayashi, N., A. Nakagawa, T. Muramatsu, Y. Yamashina, T. Shirai, M. W. Hashimoto, Y. Ishigaki, T. Ohnishi, and T. Mori. 1998. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 110: 806-810.
59. Mackintosh, J. A. 2001. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *Journal of theoretical biology* 211: 101-113.
60. Kupper, T. S. 1990. The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *The Journal of investigative dermatology* 94: 146S-150S.
61. Pasparakis, M. 2012. Role of NF-kappaB in epithelial biology. *Immunological reviews* 246: 346-358.
62. Freedberg, I. M., M. Tomic-Canic, M. Komine, and M. Blumenberg. 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal of investigative dermatology* 116: 633-640.
63. Kupper, T. S., E. A. Deitch, C. C. Baker, and W. C. Wong. 1986. The human burn wound as a primary source of interleukin-1 activity. *Surgery* 100: 409-415.
64. Schroder, K., and J. Tschopp. 2010. The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.
65. Kupper, T. S., F. Lee, N. Birchall, S. Clark, and S. Dower. 1988. Interleukin 1 binds to specific receptors on human keratinocytes and induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein. A potential autocrine role for interleukin 1 in epidermis. *The Journal of clinical investigation* 82: 1787-1792.
66. Heufler, C., F. Koch, and G. Schuler. 1988. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 167: 700-705.
67. Lebre, M. C., A. M. van der Aar, L. van Baarsen, T. M. van Capel, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *The Journal of investigative dermatology* 127: 331-341.
68. Bangert, C., P. M. Brunner, and G. Stingl. 2011. Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology* 29: 360-376.
69. Ryan, T. J. 1989. Structure and function of lymphatics. *The Journal of investigative dermatology* 93: 18S-24S.
70. Culver, G. D. 1923. Allergy and Anaphylaxis of the Skin. *California state journal of medicine* 21: 374-376.
71. Devereux, G. 2006. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nature reviews. Immunology* 6: 869-874.
72. Saarinen, U. M., and M. Kajosaari. 1995. Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow-up study until 17 years old. *Lancet* 346: 1065-1069.

73. Zheng, T., J. Yu, M. H. Oh, and Z. Zhu. 2011. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, asthma & immunology research* 3: 67-73.
74. Rajan, T. V. 2003. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends in immunology* 24: 376-379.
75. Palm, N. W., R. K. Rosenstein, and R. Medzhitov. 2012. Allergic host defences. *Nature* 484: 465-472.
76. Pritchard, D. I., D. G. Blount, P. Schmid-Grendelmeier, and S. J. Till. 2012. Parasitic worm therapy for allergy: is this incongruous or avant-garde medicine? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 42: 505-512.
77. Trompette, A., S. Divanovic, A. Visintin, C. Blanchard, R. S. Hegde, R. Madan, P. S. Thorne, M. Wills-Karp, T. L. Gioannini, J. P. Weiss, and C. L. Karp. 2009. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457: 585-588.
78. Takai, T., and S. Ikeda. 2011. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 60: 25-35.
79. Brown, T. C., and M. S. Tankersley. 2011. The sting of the honeybee: an allergic perspective. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 107: 463-470; quiz 471.
80. Albert, R. E., and P. S. Magee. 2000. The tumorigenicity of mutagenic contact-sensitizing chemicals. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis* 20: 317-325.
81. Spergel, J. M. 2010. Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children. *Immunology and allergy clinics of North America* 30: 269-280.
82. Schultz Larsen, F., T. Diepgen, and A. Svensson. 1996. The occurrence of atopic dermatitis in north Europe: an international questionnaire study. *Journal of the American Academy of Dermatology* 34: 760-764.
83. Schwensen, J. F., U. F. Friis, T. Menne, and J. D. Johansen. 2013. One thousand cases of severe occupational contact dermatitis. *Contact dermatitis* 68: 259-268.
84. Lebwohl, M., and T. Gower. 2006. A safety assessment of topical calcineurin inhibitors in the treatment of atopic dermatitis. *MedGenMed : Medscape general medicine* 8: 8.
85. Kim, J., S. Lee, S. Y. Woo, Y. Han, J. H. Lee, I. Y. Lee, I. S. Lim, E. S. Choi, B. W. Choi, H. K. Cheong, S. I. Lee, and K. Ahn. 2013. The indoor level of house dust mite allergen is associated with severity of atopic dermatitis in children. *Journal of Korean medical science* 28: 74-79.
86. Ong, P. Y., and D. Y. Leung. 2010. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunology and allergy clinics of North America* 30: 309-321.
87. Chen, L., O. Martinez, L. Overbergh, C. Mathieu, B. S. Prabhakar, and L. S. Chan. 2004. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clinical and experimental immunology* 138: 375-387.
88. Boguniewicz, M., and D. Y. Leung. 2011. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunological reviews* 242: 233-246.
89. Jenerowicz, D., W. Silny, A. Danczak-Pazdrowska, A. Polanska, A. Osmola-Mankowska, and K. Olek-Hrab. 2012. Environmental factors and allergic diseases. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* 19: 475-481.
90. Strachan, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 299: 1259-1260.
91. Cramer, C., E. Link, S. Koletzko, I. Lehmann, J. Heinrich, H. E. Wichmann, C. P. Bauer, A. V. Berg, D. Berdel, O. Herbarth, B. Schaaf, M. Borte, H. Behrendt, and U. Kramer. 2012. The hygiene hypothesis does not apply to atopic eczema in childhood. *Chemical immunology and allergy* 96: 15-23.
92. Hudson, T. J. 2006. Skin barrier function and allergic risk. *Nature genetics* 38: 399-400.
93. von Mutius, E. 2012. Maternal farm exposure/ingestion of unpasteurized cow's milk and allergic disease. *Current opinion in gastroenterology* 28: 570-576.
94. Debarry, J., H. Garn, A. Hanuszkiewicz, N. Dickgreber, N. Blumer, E. von Mutius, A. Buße, S. Gatermann, H. Renz, O. Holst, and H. Heine. 2007. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119: 1514-1521.
95. Debarry, J., A. Hanuszkiewicz, K. Stein, O. Holst, and H. Heine. 2010. The allergy-protective properties of *Acinetobacter lwoffii* F78 are imparted by its lipopolysaccharide. *Allergy* 65: 690-697.
96. Piggott, D. A., S. C. Eisenbarth, L. Xu, S. L. Constant, J. W. Huleatt, C. A. Herrick, and K. Bottomly. 2005. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *The Journal of clinical investigation* 115: 459-467.
97. Kainonen, E., S. Rautava, and E. Isolauri. 2012. Immunological programming by breast milk creates an anti-inflammatory cytokine milieu in breast-fed infants compared to formula-fed infants. *The British journal of nutrition*: 1-9.

98. Dallas, D. C., A. Guerrero, N. Khaldi, P. A. Castillo, W. F. Martin, J. T. Smilowitz, C. L. Bevins, D. Barile, J. B. German, and C. B. Lebrilla. 2013. Extensive in vivo Human Milk Peptidomics Reveals Specific Proteolysis Yielding Protective Antimicrobial Peptides. *Journal of proteome research* 12: 2295-2304.
99. Jarvinen, K. M., and H. Suomalainen. 2002. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 13: 243-254.
100. Iyengar, S. R., and W. A. Walker. 2012. Immune factors in breast milk and the development of atopic disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 55: 641-647.
101. Capone, K. A., S. E. Dowd, G. N. Stamatas, and J. Nikolovski. 2011. Diversity of the human skin microbiome early in life. *The Journal of investigative dermatology* 131: 2026-2032.
102. Kong, H. H., J. Oh, C. Deming, S. Conlan, E. A. Grice, M. A. Beatson, E. Nomicos, E. C. Polley, H. D. Komarow, N. C. S. Program, P. R. Murray, M. L. Turner, and J. A. Segre. 2012. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome research* 22: 850-859.
103. Mandron, M., M. F. Aries, F. Boralevi, H. Martin, M. Charveron, A. Taieb, and C. Davrinche. 2008. Age-related differences in sensitivity of peripheral blood monocytes to lipopolysaccharide and Staphylococcus aureus toxin B in atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 128: 882-889.
104. Prescott, S. L., P. Noakes, B. W. Chow, L. Breckler, C. A. Thornton, E. M. Hollams, M. Ali, A. H. van den Biggelaar, and M. K. Tulic. 2008. Presymptomatic differences in Toll-like receptor function in infants who have allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 122: 391-399, 399 e391-395.
105. Miyahara, H., N. Okazaki, T. Nagakura, S. Korematsu, and T. Izumi. 2011. Elevated umbilical cord serum TARC/CCL17 levels predict the development of atopic dermatitis in infancy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 41: 186-191.
106. Hinz, D., M. Bauer, S. Roder, S. Olek, J. Huehn, U. Sack, M. Borte, J. C. Simon, I. Lehmann, G. Herberth, and L. s. group. 2012. Cord blood Tregs with stable FOXP3 expression are influenced by prenatal environment and associated with atopic dermatitis at the age of one year. *Allergy* 67: 380-389.
107. Wen, H. J., Y. J. Wang, Y. C. Lin, C. C. Chang, C. C. Shieh, F. W. Lung, and Y. L. Guo. 2011. Prediction of atopic dermatitis in 2-yr-old children by cord blood IgE, genetic polymorphisms in cytokine genes, and maternal mentality during pregnancy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 22: 695-703.
108. Palmer, C. N., A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S. P. Lee, D. R. Goudie, A. Sandilands, L. E. Campbell, F. J. Smith, G. M. O'Regan, R. M. Watson, J. E. Cecil, S. J. Bale, J. G. Compton, J. J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C. S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L. B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, and W. H. McLean. 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics* 38: 441-446.
109. De Benedetto, A., N. M. Rafaels, L. Y. McGirt, A. I. Ivanov, S. N. Georas, C. Cheadle, A. E. Berger, K. Zhang, S. Vidyasagar, T. Yoshida, M. Boguniewicz, T. Hata, L. C. Schneider, J. M. Hanifin, R. L. Gallo, N. Novak, S. Weidinger, T. H. Beaty, D. Y. Leung, K. C. Barnes, and L. A. Beck. 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127: 773-786 e771-777.
110. Paternoster, L., M. Standl, C. M. Chen, A. Ramasamy, K. Bonnelykke, L. Duijts, M. A. Ferreira, A. C. Alves, J. P. Thyssen, E. Albrecht, H. Baurecht, B. Feenstra, P. M. Sleiman, P. Hysi, N. M. Warrington, I. Curjuric, R. Myhre, J. A. Curtin, M. M. Groen-Blokhuis, M. Kerkhof, A. Saaf, A. Franke, D. Ellinghaus, R. Folster-Holst, E. Dermitzakis, S. B. Montgomery, H. Prokisch, K. Heim, A. L. Hartikainen, A. Pouta, J. Pekkanen, A. I. Blakemore, J. L. Buxton, M. Kaakinen, D. L. Duffy, P. A. Madden, A. C. Heath, G. W. Montgomery, P. J. Thompson, M. C. Matheson, P. Le Souef, C. Australian Asthma Genetics, B. St Pourcain, G. D. Smith, J. Henderson, J. P. Kemp, N. J. Timpson, P. Deloukas, S. M. Ring, H. E. Wichmann, M. Muller-Nurasyid, N. Novak, N. Klopp, E. Rodriguez, W. McArdle, A. Linneberg, T. Menne, E. A. Nohr, A. Hofman, A. G. Uitterlinden, C. M. van Duijn, F. Rivadeneira, J. C. de Jongste, R. J. van der Valk, M. Wjst, R. Jogi, F. Geller, H. A. Boyd, J. C. Murray, C. Kim, F. Mentch, M. March, M. Mangino, T. D. Spector, V. Bataille, C. E. Pennell, P. G. Holt, P. Sly, C. M. Tiesler, E. Thiering, T. Illig, M. Imboden, W. Nystad, A. Simpson, J. J. Hottenga, D. Postma, G. H. Koppelman, H. A. Smit, C. Soderhall, B. Chawes, E. Kreiner-Moller, H. Bisgaard, E. Melen, D. I. Boomsma, A. Custovic, B. Jacobsson, N. M. Probst-Hensch, L. J. Palmer, D. Glass, H. Hakonarson, M. Melbye, D. L. Jarvis, V. W. Jaddoe, C. Gieger, C. Genetics of Overweight Young Adults, D. P. Strachan, N. G. Martin, M. R. Jarvelin, J. Heinrich, D. M. Evans, S. Weidinger, E. A. Genetics, and C. Lifecourse Epidemiology. 2012. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new risk loci for atopic dermatitis. *Nature genetics* 44: 187-192.

111. Arshad, S. H., W. Karmaus, R. Kurukulaaratchy, A. Sadeghnejad, M. Huebner, and S. Ewart. 2008. Polymorphisms in the interleukin 13 and GATA binding protein 3 genes and the development of eczema during childhood. *The British journal of dermatology* 158: 1315-1322.
112. Hirota, T., H. Saeki, K. Tomita, S. Tanaka, K. Ebe, M. Sakashita, T. Yamada, S. Fujieda, A. Miyatake, S. Doi, T. Enomoto, N. Hizawa, T. Sakamoto, H. Masuko, T. Sasaki, T. Ebihara, M. Amagai, H. Esaki, S. Takeuchi, M. Furue, E. Noguchi, N. Kamatani, Y. Nakamura, M. Kubo, and M. Tamari. 2011. Variants of C-C motif chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to atopic dermatitis: case-control studies. *PloS one* 6: e26987.
113. Jensen, A. O., C. Svaerke, D. Kormendine Farkas, A. B. Olesen, K. Kragballe, and H. T. Sorensen. 2012. Atopic dermatitis and risk of skin cancer: a Danish nationwide cohort study (1977-2006). *American journal of clinical dermatology* 13: 29-36.
114. Koontongkaew, S. 2013. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer* 4: 66-83.
115. Mitsuiishi, K., T. Nakamura, Y. Sakata, N. Yuyama, K. Arima, Y. Sugita, H. Suto, K. Izuhara, and H. Ogawa. 2005. The squamous cell carcinoma antigens as relevant biomarkers of atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35: 1327-1333.
116. Altrichter, S., E. Kriehuber, J. Moser, R. Valenta, T. Kopp, and G. Stingl. 2008. Serum IgE autoantibodies target keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 128: 2232-2239.
117. Zeller, S., A. G. Glaser, M. Vilhelmsson, C. Rhyner, and R. Cramer. 2008. Immunoglobulin-E-mediated reactivity to self antigens: a controversial issue. *International archives of allergy and immunology* 145: 87-93.
118. Schmid-Grendelmeier, P., S. Fluckiger, R. Disch, A. Trautmann, B. Wuthrich, K. Blaser, A. Scheynius, and R. Cramer. 2005. IgE-mediated and T cell-mediated autoimmunity against manganese superoxide dismutase in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 115: 1068-1075.
119. Shah, A. 2012. The pathologic and clinical intersection of atopic and autoimmune disease. *Current allergy and asthma reports* 12: 520-529.
120. Paller, A. S., E. L. Simpson, L. F. Eichenfield, C. N. Ellis, and A. J. Mancini. 2012. Treatment strategies for atopic dermatitis: optimizing the available therapeutic options. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 31: S10-17.
121. Gebhardt, C., M. Averbeck, N. Diedenhofen, A. Willenberg, U. Anderegg, J. P. Sleeman, and J. C. Simon. 2010. Dermal hyaluronan is rapidly reduced by topical treatment with glucocorticoids. *The Journal of investigative dermatology* 130: 141-149.
122. Hui, R. L., W. Lide, J. Chan, J. Schottinger, M. Yoshinaga, and M. Millares. 2009. Association between exposure to topical tacrolimus or pimecrolimus and cancers. *The Annals of pharmacotherapy* 43: 1956-1963.
123. Tennis, P., J. M. Gelfand, and K. J. Rothman. 2011. Evaluation of cancer risk related to atopic dermatitis and use of topical calcineurin inhibitors. *The British journal of dermatology* 165: 465-473.
124. Kirby, B., and R. J. Chalmers. 1999. Multiple squamous cell carcinomas following photochemotherapy for atopic eczema. *Clinical and experimental dermatology* 24: 337.
125. Matsui, K., A. Nishikawa, H. Suto, R. Tsuboi, and H. Ogawa. 2000. Comparative study of *Staphylococcus aureus* isolated from lesional and non-lesional skin of atopic dermatitis patients. *Microbiology and immunology* 44: 945-947.
126. Leung, D. Y. 1999. Pathogenesis of atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 104: S99-108.
127. Pietrocola, G., C. R. Arciola, S. Rindi, A. Di Poto, A. Missineo, L. Montanaro, and P. Speziale. 2011. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *The International journal of artificial organs* 34: 799-810.
128. Zollner, T. M., T. A. Wichelhaus, A. Hartung, C. Von Mallinckrodt, T. O. Wagner, V. Brade, and R. Kaufmann. 2000. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 30: 994-1000.
129. Breuer, K., M. Wittmann, B. Bosche, A. Kapp, and T. Werfel. 2000. Severe atopic dermatitis is associated with sensitization to staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Allergy* 55: 551-555.
130. Ide, F., T. Matsubara, M. Kaneko, T. Ichiyama, T. Mukouyama, and S. Furukawa. 2004. Staphylococcal enterotoxin-specific IgE antibodies in atopic dermatitis. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 46: 337-341.
131. Kozman, A., Y. Yao, P. Bina, C. Saha, W. Yao, M. H. Kaplan, and J. B. Travers. 2010. Encoding a superantigen by *Staphylococcus aureus* does not affect clinical characteristics of infected atopic dermatitis lesions. *The British journal of dermatology* 163: 1308-1311.

132. Lee, V. T., A. H. Chang, and A. W. Chow. 1992. Detection of staphylococcal enterotoxin B among toxic shock syndrome (TSS)- and non-TSS-associated *Staphylococcus aureus* isolates. *The Journal of infectious diseases* 166: 911-915.
133. Kissner, T. L., G. Ruthel, E. D. Cisney, R. G. Ulrich, S. Fernandez, and K. U. Saikh. 2011. MyD88-dependent pro-inflammatory cytokine response contributes to lethal toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice. *Innate immunity* 17: 451-462.
134. Kissner, T. L., G. Ruthel, S. Alam, R. G. Ulrich, S. Fernandez, and K. U. Saikh. 2011. Activation of MyD88 signaling upon staphylococcal enterotoxin binding to MHC class II molecules. *PloS one* 6: e15985.
135. Mandron, M., M. F. Aries, R. D. Brehm, H. S. Tranter, K. R. Acharya, M. Charveron, and C. Davrinche. 2006. Human dendritic cells conditioned with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B promote TH2 cell polarization. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117: 1141-1147.
136. Calkins, C. M., K. Barsness, D. D. Bensard, A. Vasquez-Torres, C. D. Raeburn, X. Meng, and R. C. McIntyre, Jr. 2002. Toll-like receptor-4 signaling mediates pulmonary neutrophil sequestration in response to gram-positive bacterial enterotoxin. *The Journal of surgical research* 104: 124-130.
- 파평 7. Ohshima, M., M. Miyake, M. Takeda, M. Kamijima, and T. Sakamoto. 2011. Staphylococcal enterotoxin B causes proliferation of sensory C-fibers and subsequent enhancement of neurogenic inflammation in rat skin. *The Journal of infectious diseases* 203: 862-869.
138. Karasuyama, H., and F. Melchers. 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *European journal of immunology* 18: 97-104.
139. Weischenfeldt, J., and B. Porse. 2008. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH protocols* 2008: pdb prot5080.
140. Martin, R. M., J. L. Brady, and A. M. Lew. 1998. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *Journal of immunological methods* 212: 187-192.
141. Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143-150.
142. Gais, P., D. Reim, G. Jusek, T. Rossmann-Bloek, H. Weighardt, K. Pfeffer, F. Altmayr, K. P. Janssen, and B. Holzmann. 2012. Cutting edge: Divergent cell-specific functions of MyD88 for inflammatory responses and organ injury in septic peritonitis. *Journal of immunology* 188: 5833-5837.
143. Ramirez, A., A. Page, A. Gandarillas, J. Zanet, S. Pibre, M. Vidal, L. Tusell, A. Genesca, D. A. Whitaker, D. W. Melton, and J. L. Jorcano. 2004. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* 39: 52-57.
144. Tarutani, M., S. Itami, M. Okabe, M. Ikawa, T. Tezuka, K. Yoshikawa, T. Kinoshita, and J. Takeda. 1997. Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7400-7405.
145. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
146. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451.
147. Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, and S. Akira. 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *Journal of immunology* 161: 4652-4660.
148. Spergel, J. M., E. Mizoguchi, J. P. Brewer, T. R. Martin, A. K. Bhan, and R. S. Geha. 1998. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *The Journal of clinical investigation* 101: 1614-1622.
149. Jin, H., R. He, M. Oyoshi, and R. S. Geha. 2009. Animal models of atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 129: 31-40.
150. Savinko, T., A. Lauerma, S. Lehtimäki, M. Gombert, M. L. Majuri, N. Fyhrquist-Vanni, M. C. Dieu-Nosjean, L. Kemeny, H. Wolff, B. Homey, and H. Alenius. 2005. Topical superantigen exposure induces epidermal accumulation of CD8⁺ T cells, a mixed Th1/Th2-type dermatitis and vigorous production of IgE antibodies in the murine model of atopic dermatitis. *Journal of immunology* 175: 8320-8326.
151. Honma, K., Y. Kohno, K. Saito, N. Shimojo, T. Horiuchi, H. Hayashi, N. Suzuki, T. Hosoya, H. Tsunoo, and H. Niimi. 1996. Allergenic epitopes of ovalbumin (OVA) in patients with hen's egg allergy: inhibition of basophil histamine release by haptenic ovalbumin peptide. *Clinical and experimental immunology* 103: 446-453.

152. Mine, Y., and P. Rupa. 2003. Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. *Protein engineering* 16: 747-752.
153. Remold-O'Donnell, E. 1993. The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS letters* 315: 105-108.
154. Kimura, M., and M. Obi. 2005. Ovalbumin-induced IL-4, IL-5 and IFN-gamma production in infants with atopic dermatitis. *International archives of allergy and immunology* 137: 134-140.
155. Li, J., H. Jiang, W. Wen, J. Zheng, and G. Xu. 2010. The dendritic cell mannose receptor mediates allergen internalization and maturation involving notch 1 signalling. *Clinical and experimental immunology* 162: 251-261.
156. Burgdorf, S., V. Schuette, V. Semmling, K. Hochheiser, V. Lukacs-Kornek, P. A. Knolle, and C. Kurts. 2010. Steady-state cross-presentation of OVA is mannose receptor-dependent but inhibitable by collagen fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: E48-49; author reply E50-41.
157. Langer, K., K. Breuer, A. Kapp, and T. Werfel. 2007. Staphylococcus aureus-derived enterotoxins enhance house dust mite-induced patch test reactions in atopic dermatitis. *Experimental dermatology* 16: 124-129.
158. Laouini, D., S. Kawamoto, A. Yalcindag, P. Bryce, E. Mizoguchi, H. Oettgen, and R. S. Geha. 2003. Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112: 981-987.
159. Anthonissen, M., D. Daly, S. Fieuws, P. Massage, M. Van Brussel, J. Vranckx, and E. Van den Kerckhove. 2013. Measurement of elasticity and transepidermal water loss rate of burn scars with the Dermalab(R). *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 39: 420-428.
160. Plikus, M. V., and C. M. Chuong. 2008. Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents. *The Journal of investigative dermatology* 128: 1071-1080.
161. Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel, and A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11: 231-238.
162. Weighardt, H., J. Mages, G. Jusek, S. Kaiser-Moore, R. Lang, and B. Holzmann. 2006. Organ-specific role of MyD88 for gene regulation during polymicrobial peritonitis. *Infection and immunity* 74: 3618-3632.
163. Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature immunology* 2: 947-950.
164. Jiao, H., B. Toth, M. Erdos, I. Fransson, E. Rakoczi, I. Balogh, Z. Magyarics, B. Derfalvi, G. Csorba, A. Szaflarska, A. Megarbane, C. Akatcharian, G. Dbaibo, E. Rajnavolgyi, L. Hammarstrom, J. Kere, G. Lefranc, and L. Marodi. 2008. Novel and recurrent STAT3 mutations in hyper-IgE syndrome patients from different ethnic groups. *Molecular immunology* 46: 202-206.
165. Johnston, P. A., and J. R. Grandis. 2011. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Molecular interventions* 11: 18-26.
166. Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3801-3804.
167. Ma, C. S., G. Y. Chew, N. Simpson, A. Priyadarshi, M. Wong, B. Grimbacher, D. A. Fulcher, S. G. Tangye, and M. C. Cook. 2008. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *The Journal of experimental medicine* 205: 1551-1557.
168. Kestra, A. M., I. Godinez, M. N. Xavier, M. G. Winter, S. E. Winter, R. M. Tsolis, and A. J. Baumler. 2011. Early MyD88-dependent induction of interleukin-17A expression during Salmonella colitis. *Infection and immunity* 79: 3131-3140.
169. Zhang, X., L. Gao, L. Lei, Y. Zhong, P. Dube, M. T. Berton, B. Arulanandam, J. Zhang, and G. Zhong. 2009. A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen Chlamydia muridarum. *Journal of immunology* 183: 1291-1300.
170. Kuo, I. H., A. Carpenter-Mendini, T. Yoshida, L. Y. McGirt, A. I. Ivanov, K. C. Barnes, R. L. Gallo, A. W. Borkowski, K. Yamasaki, D. Y. Leung, S. N. Georas, A. De Benedetto, and L. A. Beck. 2013. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *The Journal of investigative dermatology* 133: 988-998.
171. Soter, N. A. 1989. Morphology of atopic eczema. *Allergy* 44 Suppl 9: 16-19.
172. Jameson, J., and W. L. Havran. 2007. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunological reviews* 215: 114-122.
173. He, R., M. K. Oyoshi, L. Garibyan, L. Kumar, S. F. Ziegler, and R. S. Geha. 2008. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 11875-11880.
174. Huang, C. H., I. C. Kuo, H. Xu, Y. S. Lee, and K. Y. Chua. 2003. Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse. *The Journal of investigative dermatology* 121: 289-293.

175. Ohto-Ozaki, H., K. Kuroiwa, N. Mato, Y. Matsuyama, M. Hayakawa, H. Tamemoto, and S. Tominaga. 2010. Characterization of ST2 transgenic mice with resistance to IL-33. *European journal of immunology* 40: 2632-2642.
176. Gomez de Agüero, M., M. Vocanson, F. Hacini-Rachinel, M. Taillardet, T. Sparwasser, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. Kaiserlian, and B. Dubois. 2012. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* 122: 1700-1711.
177. Bennett, C. L., F. Fallah-Arani, T. Conlan, C. Trouillet, H. Goold, L. Chorro, B. Flutter, T. K. Means, F. Geissmann, and R. Chakraverty. 2011. Langerhans cells regulate cutaneous injury by licensing CD8 effector cells recruited to the skin. *Blood* 117: 7063-7069.
178. Martin, F., and J. F. Kearney. 2001. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current opinion in immunology* 13: 195-201.
179. Kawabe, Y., and A. Ochi. 1990. Selective anergy of V beta 8+, CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *The Journal of experimental medicine* 172: 1065-1070.
180. Scharfner, J. M., A. M. Singh, P. E. Dahlberg, L. Nettenstrom, and C. M. Seroogy. 2009. Recurrent superantigen exposure in vivo leads to highly suppressive CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells with anergic and suppressive genetic signatures. *Clinical and experimental immunology* 155: 348-356.
181. Iseki, M., M. Omori-Miyake, W. Xu, X. Sun, S. Takaki, D. J. Rawlings, and S. F. Ziegler. 2012. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B-cell activation and autoimmunity are mediated by CD4+ T cells and IL-4. *International immunology* 24: 183-195.
182. Ouyang, Y., E. Fan, Y. Li, X. Wang, and L. Zhang. 2013. Clinical Characteristics and Expression of Thymic Stromal Lymphopoietin in Eosinophilic and Non-Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 75: 37-45.
183. Jessup, H. K., A. W. Brewer, M. Omori, E. A. Rickel, A. L. Budelsky, B. R. Yoon, S. F. Ziegler, and M. R. Comeau. 2008. Intradermal administration of thymic stromal lymphopoietin induces a T cell- and eosinophil-dependent systemic Th2 inflammatory response. *Journal of immunology* 181: 4311-4319.
184. Hou, B., B. Reizis, and A. L. DeFranco. 2008. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity* 29: 272-282.
185. Chen, L., L. Lei, X. Chang, Z. Li, C. Lu, X. Zhang, Y. Wu, I. T. Yeh, and G. Zhong. 2010. Mice deficient in MyD88 Develop a Th2-dominant response and severe pathology in the upper genital tract following Chlamydia muridarum infection. *Journal of immunology* 184: 2602-2610.
186. Nagarajan, U. M., J. Sikes, D. Prantner, C. W. Andrews, Jr., L. Frazer, A. Goodwin, J. N. Snowden, and T. Darville. 2011. MyD88 deficiency leads to decreased NK cell gamma interferon production and T cell recruitment during Chlamydia muridarum genital tract infection, but a predominant Th1 response and enhanced monocytic inflammation are associated with infection resolution. *Infection and immunity* 79: 486-498.
187. Pan, H., L. Zhu, Y. Deng, and J. W. Pollard. 2006. Microarray analysis of uterine epithelial gene expression during the implantation window in the mouse. *Endocrinology* 147: 4904-4916.
188. Chen, C. P., P. S. Tsai, and C. J. Huang. 2012. Antiinflammation effect of human placental multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by prostaglandin E2 via a myeloid differentiation primary response gene 88-dependent pathway. *Anesthesiology* 117: 568-579.
189. Koga, K., and G. Mor. 2010. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *American journal of reproductive immunology* 63: 587-600.
190. Tewfik, M. A., Y. Bosse, M. Lemire, T. J. Hudson, S. Vallee-Smejda, H. Al-Shemari, C. Laprise, and M. Desrosiers. 2009. Polymorphisms in interleukin-1 receptor-associated kinase 4 are associated with total serum IgE. *Allergy* 64: 746-753.
191. Davis, S. D., J. Schaller, and R. J. Wedgwood. 1966. Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses. *Lancet* 1: 1013-1015.
192. Ohameje, N. U., J. W. Loveless, and S. S. Saini. 2006. Atopic dermatitis or hyper-IgE syndrome? *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 27: 289-291.
193. Hawn, T. R., A. Ozinsky, L. M. Williams, S. Rodrigues, A. Clark, U. Pham, H. R. Hill, H. Ochs, A. Aderem, and W. C. Liles. 2005. Hyper-IgE syndrome is not associated with defects in several candidate toll-like receptor pathway genes. *Human immunology* 66: 842-847.
194. Renner, E. D., I. Pawlita, F. Hoffmann, V. Hornung, D. Hartl, M. Albert, A. Jansson, S. Endres, G. Hartmann, B. H. Belohradsky, and S. Rothenfusser. 2005. No indication for a defect in toll-like receptor signaling in patients with hyper-IgE syndrome. *Journal of clinical immunology* 25: 321-328.
195. Yeganeh, M., P. Henneke, N. Rezaei, S. Ehl, D. Thiel, N. Matamoros, C. Pietrogrande, T. Espanol, J. Litzman, J. L. Franco, O. Sanal, S. S. Kilic, A. Breborowicz, A. Plebani, E. Renner, S. Rothenfusser, T. R. Hawn, C. Woellner, and B. Grimbacher. 2008. Toll-like receptor stimulation induces higher TNF-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyper IgE syndrome. *International archives of allergy and immunology* 146: 190-194.

196. Fukata, M., K. Breglio, A. Chen, A. S. Vamadevan, T. Goo, D. Hsu, D. Conduah, R. Xu, and M. T. Abreu. 2008. The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4+ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease. *Journal of immunology* 180: 1886-1894.
197. Al-Herz, W., R. Ragupathy, M. J. Massaad, R. Al-Attayah, A. Nanda, K. R. Engelhardt, B. Grimbacher, L. Notarangelo, T. Chatila, and R. S. Geha. 2012. Clinical, immunologic and genetic profiles of DOCK8-deficient patients in Kuwait. *Clinical immunology* 143: 266-272.
198. Chu, E. Y., A. F. Freeman, H. Jing, E. W. Cowen, J. Davis, H. C. Su, S. M. Holland, and M. L. Turner. 2012. Cutaneous manifestations of DOCK8 deficiency syndrome. *Archives of dermatology* 148: 79-84.
199. Watanabe, H., K. Numata, T. Ito, K. Takagi, and A. Matsukawa. 2004. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 22: 460-466.
200. Suarez-Farinas, M., S. J. Tintle, A. Shemer, A. Chiricozzi, K. Nogales, I. Cardinale, S. Duan, A. M. Bowcock, J. G. Krueger, and E. Guttman-Yassky. 2011. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127: 954-964 e951-954.
201. Stutte, S., T. Quast, N. Gerbitzki, T. Savinko, N. Novak, J. Reifemberger, B. Homey, W. Kolanus, H. Alenius, and I. Forster. 2010. Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8736-8741.
202. Gregorio, J., S. Meller, C. Conrad, A. Di Nardo, B. Homey, A. Lauerma, N. Arai, R. L. Gallo, J. Digiovanni, and M. Gilliet. 2010. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *The Journal of experimental medicine* 207: 2921-2930.
203. Haley, K., B. Z. Igyarto, D. Ortner, A. Bobr, S. Kashem, D. Schenten, and D. H. Kaplan. 2012. Langerhans cells require MyD88-dependent signals for *Candida albicans* response but not for contact hypersensitivity or migration. *Journal of immunology* 188: 4334-4339.
204. Klekotka, P. A., L. Yang, and W. M. Yokoyama. 2010. Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity. *The Journal of investigative dermatology* 130: 184-191.
205. Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang. 2007. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445: 648-651.
206. Sevilla, L. M., R. Nachat, K. R. Groot, J. F. Klement, J. Uitto, P. Djian, A. Maatta, and F. M. Watt. 2007. Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier. *The Journal of cell biology* 179: 1599-1612.
207. Franzke, C. W., C. Cobzaru, A. Triantafyllopoulou, S. Loffek, K. Horiuchi, D. W. Threadgill, T. Kurz, N. van Rooijen, L. Bruckner-Tuderman, and C. P. Blobel. 2012. Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *The Journal of experimental medicine* 209: 1105-1119.
208. Yang, J., M. Meyer, A. K. Muller, F. Bohm, R. Grose, T. Dauwalder, F. Verrey, M. Kopf, J. Partanen, W. Bloch, D. M. Ornitz, and S. Werner. 2010. Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. *The Journal of cell biology* 188: 935-952.
209. Elentner, A., D. Finke, M. Schmuth, S. Chappaz, S. Ebner, B. Malissen, A. Kissenpfennig, N. Romani, and S. Dubrac. 2009. Langerhans cells are critical in the development of atopic dermatitis-like inflammation and symptoms in mice. *Journal of cellular and molecular medicine* 13: 2658-2672.
210. Nakajima, S., B. Z. Igyarto, T. Honda, G. Egawa, A. Otsuka, M. Hara-Chikuma, N. Watanabe, S. F. Ziegler, M. Tomura, K. Inaba, Y. Miyachi, D. H. Kaplan, and K. Kabashima. 2012. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 129: 1048-1055 e1046.
211. Shklovskaya, E., B. J. O'Sullivan, L. G. Ng, B. Roediger, R. Thomas, W. Weninger, and B. Fazekas de St Groth. 2011. Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 18049-18054.
212. McCurdy, J. D., T. J. Lin, and J. S. Marshall. 2001. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *Journal of leukocyte biology* 70: 977-984.
213. Selander, C., C. Engblom, G. Nilsson, A. Scheynius, and C. L. Andersson. 2009. TLR2/MyD88-dependent and -independent activation of mast cell IgE responses by the skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *Journal of immunology* 182: 4208-4216.
214. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology* 13: 251-276.
215. Wang, L. F., H. C. Chiu, C. J. Hsu, C. Y. Liu, Y. H. Hsueh, and S. C. Miaw. 2009. Epicutaneous sensitization with a protein antigen induces Th17 cells. *Journal of dermatological science* 54: 192-197.
216. Kudo, M., A. C. Melton, C. Chen, M. B. Engler, K. E. Huang, X. Ren, Y. Wang, X. Bernstein, J. T. Li, K. Atabai, X. Huang, and D. Sheppard. 2012. IL-17A produced by alphabeta T cells drives airway hyper-

- responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nature medicine* 18: 547-554.
217. Mills, K. H., L. S. Dungan, S. A. Jones, and J. Harris. 2013. The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. *Journal of leukocyte biology* 93: 489-497.
 218. Desel, C., K. Werninghaus, M. Ritter, K. Jozefowski, J. Wenzel, N. Russkamp, U. Schleicher, D. Christensen, S. Wirtz, C. Kirschning, E. M. Agger, C. P. da Costa, and R. Lang. 2013. The Mincle-activating adjuvant TDB induces MyD88-dependent Th1 and Th17 responses through IL-1R signaling. *PloS one* 8: e53531.
 219. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage, and A. L. Gurney. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry* 278: 1910-1914.
 220. Sutton, C. E., L. A. Mielke, and K. H. Mills. 2012. IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. *European journal of immunology* 42: 2221-2231.
 221. Siednienko, J., T. Gajanayake, K. A. Fitzgerald, P. Moynagh, and S. M. Miggin. 2011. Absence of MyD88 results in enhanced TLR3-dependent phosphorylation of IRF3 and increased IFN-beta and RANTES production. *Journal of immunology* 186: 2514-2522.
 222. Zhang, X., J. Jin, Y. Tang, D. Speer, D. Sujkowska, and S. Markovic-Plese. 2009. IFN-beta1a inhibits the secretion of Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation. *Journal of immunology* 182: 3928-3936.
 223. Spadoni, I., I. D. Iliev, G. Rossi, and M. Rescigno. 2012. Dendritic cells produce TSLP that limits the differentiation of Th17 cells, fosters Treg development, and protects against colitis. *Mucosal immunology* 5: 184-193.
 224. Bogiatzi, S. I., M. Guillot-Delost, A. Cappuccio, J. C. Bichet, O. Chouchane-Mlik, M. H. Donnadieu, E. Barillot, P. Hupe, K. Chlichlia, E. I. Efremidou, S. Aractingi, O. Bayrou, and V. Soumelis. 2012. Multiple-checkpoint inhibition of thymic stromal lymphopoietin-induced TH2 response by TH17-related cytokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 130: 233-240 e235.
 225. Bouabe, H. 2012. Cytokine reporter mice: the special case of IL-10. *Scandinavian journal of immunology* 75: 553-567.
 226. Gavin, A. L., N. Barnes, H. M. Dijkstra, and P. M. Hogarth. 1998. Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. *Journal of immunology* 160: 20-23.
 227. Quintana, F. J., A. Solomon, I. R. Cohen, and G. Nussbaum. 2008. Induction of IgG3 to LPS via Toll-like receptor 4 co-stimulation. *PloS one* 3: e3509.
 228. Barr, T. A., S. Brown, P. Mastroeni, and D. Gray. 2009. B cell intrinsic MyD88 signals drive IFN-gamma production from T cells and control switching to IgG2c. *Journal of immunology* 183: 1005-1012.
 229. Niebuhr, M., C. Lutat, S. Sigel, and T. Werfel. 2009. Impaired TLR-2 expression and TLR-2-mediated cytokine secretion in macrophages from patients with atopic dermatitis. *Allergy* 64: 1580-1587.
 230. Shortman, K., and W. R. Heath. 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological reviews* 234: 18-31.
 231. Autenrieth, S. E., and I. B. Autenrieth. 2009. Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* 127: 523-529.
 232. Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, and C. Kurts. 2006. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *Journal of immunology* 176: 6770-6776.
 233. Burgdorf, S., A. Kautz, V. Bohnert, P. A. Knolle, and C. Kurts. 2007. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316: 612-616.
 234. Popa, I., I. Zubkova, M. Medvedovic, T. Romantseva, H. Mostowski, R. Boyd, and M. Zaitseva. 2007. Regeneration of the adult thymus is preceded by the expansion of K5+K8+ epithelial cell progenitors and by increased expression of Trp63, cMyc and Tcf3 transcription factors in the thymic stroma. *International immunology* 19: 1249-1260.
 235. Teunissen, M. B., C. W. Koomen, R. de Waal Malefyt, E. A. Wierenga, and J. D. Bos. 1998. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 111: 645-649.
 236. Piskin, G., R. M. Sylva-Steenland, J. D. Bos, and M. B. Teunissen. 2006. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *Journal of immunology* 176: 1908-1915.
 237. Del Rio, L., B. A. Butcher, S. Bennouna, S. Hieny, A. Sher, and E. Y. Denkers. 2004. Toxoplasma gondii triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. *Journal of immunology* 172: 6954-6960.

238. De Filippo, K., R. B. Henderson, M. Laschinger, and N. Hogg. 2008. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *Journal of immunology* 180: 4308-4315.
239. Eigenbrod, T., J. H. Park, J. Harder, Y. Iwakura, and G. Nunez. 2008. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *Journal of immunology* 181: 8194-8198.
240. Khameneh, H. J., S. A. Isa, L. Min, F. W. Nih, and C. Ruedl. 2011. GM-CSF signalling boosts dramatically IL-1 production. *PloS one* 6: e23025.
241. Willart, M. A., K. Deswarte, P. Pouliot, H. Braun, R. Beyaert, B. N. Lambrecht, and H. Hammad. 2012. Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *The Journal of experimental medicine* 209: 1505-1517.
242. Min, L., S. A. Isa, W. N. Fam, S. K. Sze, O. Beretta, A. Mortellaro, and C. Ruedl. 2012. Synergism between curdlan and GM-CSF confers a strong inflammatory signature to dendritic cells. *Journal of immunology* 188: 1789-1798.
243. Guttman-Yassky, E., M. Suarez-Farinas, A. Chiricozzi, K. E. Nogales, A. Shemer, J. Fuentes-Duculan, I. Cardinale, P. Lin, R. Bergman, A. M. Bowcock, and J. G. Krueger. 2009. Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124: 1235-1244 e1258.
244. Proksch, E., R. Folster-Holst, and J. M. Jensen. 2006. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *Journal of dermatological science* 43: 159-169.
245. de Koning, H. D., M. Kamsteeg, D. Rodijk-Olthuis, I. M. van Vlijmen-Willems, P. E. van Erp, J. Schalkwijk, and P. L. Zeeuwen. 2011. Epidermal expression of host response genes upon skin barrier disruption in normal skin and uninvolved skin of psoriasis and atopic dermatitis patients. *The Journal of investigative dermatology* 131: 263-266.
246. Jiang, X., R. A. Clark, L. Liu, A. J. Wagers, R. C. Fuhlbrigge, and T. S. Kupper. 2012. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 483: 227-231.
247. Clark, R. A., R. Watanabe, J. E. Teague, C. Schlapbach, M. C. Tawa, N. Adams, A. A. Dorosario, K. S. Chaney, C. S. Cutler, N. R. Leboeuf, J. B. Carter, D. C. Fisher, and T. S. Kupper. 2012. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Science translational medicine* 4: 117ra117.
248. Bartnikas, L. M., M. F. Gurish, O. T. Burton, S. Leisten, E. Janssen, H. C. Oettgen, J. Beaupre, C. N. Lewis, K. F. Austen, S. Schulte, J. L. Hornick, R. S. Geha, and M. K. Oyoshi. 2013. Epicutaneous sensitization results in IgE-dependent intestinal mast cell expansion and food-induced anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131: 451-460 e451-456.
249. Albanesi, C., C. Scarponi, S. Sebastiani, A. Cavani, M. Federici, S. Sozzani, and G. Girolimoni. 2001. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *Journal of leukocyte biology* 70: 617-623.
250. Vu, A. T., T. Baba, X. Chen, T. A. Le, H. Kinoshita, Y. Xie, S. Kamijo, K. Hiramatsu, S. Ikeda, H. Ogawa, K. Okumura, and T. Takai. 2010. Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *The Journal of allergy and clinical immunology* 126: 985-993, 993 e981-983.
251. Zhang, Z., P. Hener, N. Frossard, S. Kato, D. Metzger, M. Li, and P. Chambon. 2009. Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 1536-1541.
252. Zhou, B., M. R. Comeau, T. De Smedt, H. D. Liggitt, M. E. Dahl, D. B. Lewis, D. Gyarmati, T. Aye, D. J. Campbell, and S. F. Ziegler. 2005. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nature immunology* 6: 1047-1053.
253. Han, H., M. B. Headley, W. Xu, M. R. Comeau, B. Zhou, and S. F. Ziegler. 2013. Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages. *Journal of immunology* 190: 904-912.
254. Hanke, M. L., A. Angle, and T. Kielian. 2012. MyD88-dependent signaling influences fibrosis and alternative macrophage activation during Staphylococcus aureus biofilm infection. *PloS one* 7: e42476.
255. Stein, M., S. Keshav, N. Harris, and S. Gordon. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 176: 287-292.
256. Reardon, C., M. Lechmann, A. Brustle, M. G. Gareau, N. Shuman, D. Philpott, S. F. Ziegler, and T. W. Mak. 2011. Thymic stromal lymphopoietin-induced expression of the endogenous inhibitory enzyme SLPI mediates recovery from colonic inflammation. *Immunity* 35: 223-235.

257. Zeuthen, L. H., L. N. Fink, and H. Frokiaer. 2008. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* 123: 197-208.
258. Bell, B. D., M. Kitajima, R. P. Larson, T. A. Stoklasek, K. Dang, K. Sakamoto, K. U. Wagner, B. Reizis, L. Hennighausen, and S. F. Ziegler. 2013. The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nature immunology* 14: 364-371.
259. Allakhverdi, Z., M. R. Comeau, H. K. Jessup, B. R. Yoon, A. Brewer, S. Chartier, N. Paquette, S. F. Ziegler, M. Sarfati, and G. Delespesse. 2007. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *The Journal of experimental medicine* 204: 253-258.
260. Moniaga, C. S., S. K. Jeong, G. Egawa, S. Nakajima, M. Hara-Chikuma, J. E. Jeon, S. H. Lee, T. Hibino, Y. Miyachi, and K. Kabashima. 2013. Protease activity enhances production of thymic stromal lymphopoietin and basophil accumulation in flaky tail mice. *The American journal of pathology* 182: 841-851.
261. Chu, D. K., A. Llop-Guevara, T. D. Walker, K. Flader, S. Goncharova, J. E. Boudreau, C. L. Moore, T. Seunghyun In, S. Wasserman, A. J. Coyle, R. Kolbeck, A. A. Humbles, and M. Jordana. 2013. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131: 187-200 e181-188.
262. Zhu, Z., M. H. Oh, J. Yu, Y. J. Liu, and T. Zheng. 2011. The Role of TSLP in IL-13-induced atopic march. *Scientific reports* 1: 23.
263. Leyva-Castillo, J. M., P. Hener, H. Jiang, and M. Li. 2013. TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice. *The Journal of investigative dermatology* 133: 154-163.
264. Demehri, S., M. Morimoto, M. J. Holtzman, and R. Kopan. 2009. Skin-derived TSLP triggers progression from epidermal-barrier defects to asthma. *PLoS biology* 7: e1000067.
265. Yu, J., M. H. Oh, J. U. Park, A. C. Myers, C. Dong, Z. Zhu, and T. Zheng. 2012. Epicutaneous exposure to staphylococcal superantigen enterotoxin B enhances allergic lung inflammation via an IL-17A dependent mechanism. *PloS one* 7: e39032.
266. Vu, A. T., X. Chen, Y. Xie, S. Kamijo, H. Ushio, J. Kawasaki, M. Hara, S. Ikeda, K. Okumura, H. Ogawa, and T. Takai. 2011. Extracellular double-stranded RNA induces TSLP via an endosomal acidification- and NF-kappaB-dependent pathway in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 131: 2205-2212.
267. Negishi, H., S. Miki, H. Sarashina, N. Taguchi-Atarashi, A. Nakajima, K. Matsuki, N. Endo, H. Yanai, J. Nishio, K. Honda, and T. Taniguchi. 2012. Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 21016-21021.
268. Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R. A. Flavell, M. S. Diamond, and M. Colonna. 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8459-8464.
269. Simberg, D., S. Weisman, Y. Talmon, and Y. Barenholz. 2004. DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 21: 257-317.
270. Kolakofsky, D., E. Kowalinski, and S. Cusack. 2012. A structure-based model of RIG-I activation. *Rna* 18: 2118-2127.
271. Demehri, S., Z. Liu, J. Lee, M. H. Lin, S. D. Crosby, C. J. Roberts, P. W. Grigsby, J. H. Miner, A. G. Farr, and R. Kopan. 2008. Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. *PLoS biology* 6: e123.
272. Hartgring, S. A., C. R. Willis, C. E. Dean, Jr., F. Broere, W. van Eden, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber, and J. A. van Roon. 2011. Critical proinflammatory role of thymic stromal lymphopoietin and its receptor in experimental autoimmune arthritis. *Arthritis and rheumatism* 63: 1878-1887.
273. Nishiura, H., M. Kido, N. Aoki, S. Iwamoto, R. Maruoka, A. Ikeda, T. Chiba, S. F. Ziegler, and N. Watanabe. 2012. Increased susceptibility to autoimmune gastritis in thymic stromal lymphopoietin receptor-deficient mice. *Journal of immunology* 188: 190-197.
274. Kim, K. H., J. H. Han, J. H. Chung, K. H. Cho, and H. C. Eun. 2006. Role of staphylococcal superantigen in atopic dermatitis: influence on keratinocytes. *Journal of Korean medical science* 21: 315-323.
275. Woods, A., P. Soulas-Sprauel, B. Jaulhac, B. Arditi, A. M. Knapp, J. L. Pasquali, A. S. Korganow, and T. Martin. 2008. MyD88 negatively controls hypergammaglobulinemia with autoantibody production during bacterial infection. *Infection and immunity* 76: 1657-1667.
276. Christensen, S. R., J. Shupe, K. Nickerson, M. Kashgarian, R. A. Flavell, and M. J. Shlomchik. 2006. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25: 417-428.

277. Nickerson, K. M., S. R. Christensen, J. Shupe, M. Kashgarian, D. Kim, K. Elkon, and M. J. Shlomchik. 2010. TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *Journal of immunology* 184: 1840-1848.
278. Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. Calderon Gomez, C. H. Sweenie, Y. Hao, A. A. Freitas, U. Steinhoff, S. M. Anderton, and S. Fillatreau. 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *Journal of immunology* 180: 4763-4773.
279. Isnardi, I., Y. S. Ng, I. Srdanovic, R. Motaghedi, S. Rudchenko, H. von Bernuth, S. Y. Zhang, A. Puel, E. Jouanguy, C. Picard, B. Z. Garty, Y. Camcioglu, R. Doffinger, D. Kumararatne, G. Davies, J. I. Gallin, S. Haraguchi, N. K. Day, J. L. Casanova, and E. Meffre. 2008. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. *Immunity* 29: 746-757.
280. Ozcan, E., L. D. Notarangelo, and R. S. Geha. 2008. Primary immune deficiencies with aberrant IgE production. *The Journal of allergy and clinical immunology* 122: 1054-1062; quiz 1063-1054.
281. Walter, A., M. Schafer, V. Cecconi, C. Matter, M. Urosevic-Maiwald, B. Belloni, N. Schonewolf, R. Dummer, W. Bloch, S. Werner, H. D. Beer, A. Knuth, and M. van den Broek. 2013. Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nature communications* 4: 1560.
282. Ayres, J. G., R. Boyd, H. Cowie, and J. F. Hurley. 2011. Costs of occupational asthma in the UK. *Thorax* 66: 128-133.
283. Inoue, J., and Y. Aramaki. 2007. Suppression of skin lesions by transdermal application of CpG-oligodeoxynucleotides in NC/Nga mice, a model of human atopic dermatitis. *Journal of immunology* 178: 584-591.
284. Fuchs, B., S. Knothe, S. Rochlitz, M. Nassimi, M. Greweling, H. D. Lauenstein, C. Nassenstein, M. Muller, T. Ebensen, A. M. Dittrich, N. Krug, C. A. Guzman, and A. Braun. 2010. A Toll-like receptor 2/6 agonist reduces allergic airway inflammation in chronic respiratory sensitisation to Timothy grass pollen antigens. *International archives of allergy and immunology* 152: 131-139.
285. Rodriguez, D., A. C. Keller, E. L. Faquim-Mauro, M. S. de Macedo, F. Q. Cunha, J. Lefort, B. B. Vargaftig, and M. Russo. 2003. Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *Journal of immunology* 171: 1001-1008.
286. Sener, A. G., and I. Afsar. 2012. Infection and autoimmune disease. *Rheumatology international* 32: 3331-3338.

Abkürzungsverzeichnis

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt.

Für gängige Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, Summenformeln oder die darauf beruhenden Namen benutzt (z. B. NaCl/ Natriumchlorid).

Weitere Abkürzungen und Symbole, die mehrfach verwendet wurden, sind im Folgenden aufgelistet:

+	positiv
-	negativ
α	anti
A. dest.	<i>Lat. aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AV	Avidin
B-Zelle	B-Lymphozyt: <i>bone marrow lymphocyte</i> (im Knochenmark reifend)
bio	Biotin
BMDC	<i>Bone Marrow-Derived Dendritic Cells</i> (Knochenmarks-generierte dendritische Zellen)
BMMph	<i>Bone Marrow-Derived Macrophages</i> (Knochenmarks-generierte Makrophagen)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	<i>C-C motif</i> Ligand
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotide
Cre	<i>cyclization recombination</i>
CXCL	<i>C-X-C motif</i> Ligand
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>Dendritic Cell</i> (dendritische Zelle)
DeltaOD	Differenz der optischen Dichte bei zwei Wellenlängen (bei Absorptionsmessungen)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
endoOva	<i>Endograde Ova</i> (Endotoxin-frei)
et al.	<i>Lat. et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)

FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
flox	<i>Flanked by loxP</i>
Fox	<i>Forkhead box</i>
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulation Factor</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-17	IL-17A
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
K	Keratin
K5 ^{ind} MyD88	Keratin-5-Cre-induzierte MyD88-Re-Expression
KC	<i>Keratinocyte-derived Chemokine</i> (CXCL1)
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i>
m	Maus
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulation Factor</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> (magnetische Zellsortierung)
MCDB	<i>Molecular, Cellular, and Developmental Biology</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i> (= CCL2)
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMR	<i>Macrophage Mannose Receptor</i> (Mannoserezeptor; ursprünglich auf Makrophagen identifiziert)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, (<i>Thiazolyl blue formazan</i>)
MW	Mittelwert
MyD	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
Ova	Ovalbumin
p	loxP
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)

pur.	<i>purified</i> (aufgereinigt, unkonjugierte Antikörper)
R	Rezeptor
Rantes	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i> (=CCL5)
Rig-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
SAV	Streptavidin
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumlaurylsulfat oder Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SSC	<i>Side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Stabw	Standardabweichung
StdF	Standardfehler
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T-Zelle	T-Lymphozyt (Thymus-abhängig)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tarc	<i>Thymus and Activation Regulated Chemokine</i> (= CCL17)
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered Saline-Tween 20</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEWL	<i>Transepidermal Water Loss</i> (Transepidermaler Wasserverlust)
T _{H1} / 2/ 17-Zelle	T-Helferzellen vom Typ 1/ 2/ 17
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor (alt TNF- α)
T _{reg} -Zelle	Regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Seite
1 Schema der Hämatopoese	7
2 Proteinstruktur eines aktivierten TLR-Dimers	9
3 Übersicht aller bei der Maus bekannten MyD88-abhängigen Rezeptoren	10
4 Diversität von T-Helferzellen	13
5 Vergleichende Histologie der Rückenhaut von Maus und Mensch	14
6 Schematische Darstellung der Epidermis	15
7 Der Aktivierungszyklus von Keratinozyten	16
8 Epidemiologie allergischer Erkrankungen	18
9 Typisches Erscheinungsbild von Hautläsionen bei AD	20
10 Schema der Entwicklung von AD	21
11 Zelltyp-spezifische Re-Expression von MyD88 in epidermalen Keratinozyten	37
12 Epikutane Sensibilisierung von Mäusen	40
13 Prinzip der TEWL-Messung (transepidermaler Wasserverlust)	42
14 Vergleich der Mauslinien MyD88knock-out und MyD88LSL	55
15 Zytokinproduktion von BMMph durch SEB-Stimulation	56
16 Expression des Mannoserezeptors auf BMMph nach Allergen-Stimulation	57
17 Immunglobulinspiegel von naiven MyD88-profizienten und –defizienten Mäusen	59
18 IgE-Spiegel bei STAT3-defizienten Mäusen	60
19 Transepidermaler Wasserverlust nach AD-Induktion	61
20 Epidermisdicke des behandelten Hautareals nach AD-Induktion	62
21 Langerhanszellen in der Epidermis nach AD-Induktion	63
22 Epidermale T-Zellen nach AD-Induktion	63
23 Dermale Mastzellen nach AD-Induktion	64
24 Makrophagen in der Dermis nach AD-Induktion	65
25 T-Helferzellen in der Dermis nach AD-Induktion	66
26 Zellzahl der Haut-drainierenden brachialen Lymphknoten nach AD-Induktion	67
27 Zytokinproduktion restimulierter Lymphknotenzellen nach AD-Induktion	68
28 IL-23-Produktion von dendritischen Zellen	69
29 Treg-Zellen in restimulierten Lymphknotenzellen nach AD-Induktion	69
30 Milzgewicht nach AD-Induktion	71
31 Natürliche Antikörper nach AD-Induktion	71
32 Gesamt-IgE-Spiegel nach AD-Induktion	72
33 Ova-spezifische Immunglobulinspiegel nach AD-Induktion	72
34 Transepidermaler Wasserverlust nach SEB-Sensibilisierung	74
35 Histologie der Epidermis nach SEB-Sensibilisierung	75
36 CD8 α -Expression auf epidermalen Immunzellen nach SEB-Sensibilisierung	76
37 Entzündungszellen in der Dermis nach SEB-Sensibilisierung	77
38 Zellzahl der Haut-drainierenden brachialen Lymphknoten nach SEB-Sensibilisierung	77
39 Zytokinproduktion restimulierter Lymphknotenzellen nach SEB-Sensibilisierung	80
40 Treg-Zellen in restimulierten Lymphknotenzellen nach SEB-Sensibilisierung	81
41 Milzgewicht nach SEB-Sensibilisierung	82
42 Natürliche Antikörper nach SEB-Sensibilisierung	83
43 Gesamt-IgE-Spiegel nach SEB-Sensibilisierung	83
44 Ova- und SEB-spezifische Immunglobulinspiegel nach SEB-Sensibilisierung	84
45 Organ-spezifische Expression von MyD88 in K5 ^{ind} MyD88-Mäusen im <i>Western Blot</i>	85
46 Immunglobulinspiegel von naiven K5 ^{ind} MyD88-Mäusen	87
47 Ausschluss eines unerwünschten Effektes des K5Cre-Transgens auf die Epidermis	88
48 Ausschluss eines unerwünschten Effektes des K5Cre-Transgens auf AD-Induktion	89
49 Entzündungszeichen in der Haut nach AD-Induktion in K5 ^{ind} MyD88-Mäusen	90
50 CCL17-Sekretion restimulierter Lymphknotenzellen nach AD-Induktion	91

51	Haut-drainierende Lymphknoten und Antikörperreaktion von K5 ^{ind} MyD88-Mäusen	92
52	Reinheit isolierter und kultivierter Keratinozyten	93
53	Kinetik der Zytokinproduktion von Keratinozyten im Verlauf der Kultivierung	94
54	Proliferation / Viabilität primärer Keratinozyten	95
55	Entzündungsmediatoren kultivierter primärer Keratinozyten	96
56	Zellausbeute bei der Keratinozyten-Isolation naiver und AD-vorbehandelter Mäuse	98
57	Proliferation / Viabilität von Keratinozyten aus AD-vorbehandelten Mäusen	99
58	Entzündungsmediatoren kultivierter Keratinozyten aus AD-vorbehandelten Mäusen	100
59	Anti-epidermale Autoimmun-Antikörper vor und nach AD-Induktion	101
60	Anti-epidermale Autoimmun-Antikörper bei K5 ^{ind} MyD88-Mäusen	102
61	Eosinophile in unbehandelter und akut gereizter Haut	102

Tabellenverzeichnis

Tab.		Seite
1	Verwendete Geräte	26
2	Verbrauchsmaterial	27
3	Chemikalien	28
4	Selbst hergestellte Lösungen, Puffer, Gele	29
5	Zellkulturreagenzien	30
6	Supplementierung der Zellkulturmedien	31
7	Antikörper für Histologie und Durchflusszytometrie	32
8	Antikörper für <i>Western Blot</i>	32
9	<i>ELISA</i> -kits	33
10	Weitere Immunglobulin- <i>ELISA</i>	33
11	Antigen-spezifische Immunglobulin- <i>ELISA</i>	34
12	Verwendete Mauslinien	36
13	Schematische Darstellung der PCR-Produktbanden bei Genotypisierung	38
14	Reaktionsansatz, Primersequenzen und <i>PCR</i> -Zyklen für die Genotypisierung	39
15	Relative Quantifizierung Antigen-spezifischer Immunglobuline	52
16	Zelluläre Zusammensetzung brachialer Lymphknotenzellen nach AD-Induktion	67
17	Zelluläre Zusammensetzung brachialer Lymphknotenzellen nach SEB-Sensibilisierung	78

Danksagung

Mein sehr herzlicher Dank an Frau PD Dr. Weighardt und Frau Professor Dr. Förster für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Projektes, die kompetente fachliche Beratung und die Motivation und Unterstützung in schwierigen Phasen der Arbeit.

Ebenfalls herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. Westhoff für die Übernahme des Korreferates und das Interesse an meiner Arbeit.

Allen meinen zahlreichen ehemaligen und jetzigen Düsseldorfer und Bonner Kollegen vielen lieben Dank für das motivierende Arbeitsklima, das angenehme Miteinander, den hilfreichen Austausch und vielfältige Unterstützung. Ganz besonderer Dank geht dabei an Friederike Opitz und Stephanie Zwicker für tolle freundschaftliche Zusammenarbeit und Geduld, sowie an Tamara Groß, Markus Korkowski, Maria Schneeweiß und Gabi Schoder für exzellente Unterstützung im Labor.

Weiterhin den Mitgliedern der Düsseldorfer Manchot-Graduiertenschule „MOI“ (Molecules of Infection) vielen Dank für den lehrreichen und motivierenden Austausch und das freundliche Miteinander.

Meiner Familie und Schwiegerfamilie ein unendliches Dankeschön für stete Unterstützung und Verständnis in allen Lebenslagen. Ohne euch wäre meine Promotion kaum möglich gewesen. Und natürlich meinen Freunden ein großes Dankeschön für viel Verständnis und Motivation.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Forschungskommission der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf, sowie der Stiftung zur Erforschung infektiös-immunologischer Erkrankungen der Universität Düsseldorf danke ich für finanzielle Unterstützung des Projektes.