

# **Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies und NF- $\kappa$ B-abhängiger Signalwege auf die kontaktallergische Reaktion der Haut**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Roman Mehling**

aus Serenda/Kasachstan

**Tübingen**

2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	26.07.2023
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter:	PD. Dr. Manfred Kneilling
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Weber

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.1.1 Das lymphatische System .....	1
1.1.2 Die angeborene Immunantwort .....	2
1.1.3 Die adaptive Immunantwort .....	4
1.2 Allergien .....	6
1.2.1 Typ-IV-Allergie .....	7
1.2.2 Kontaktallergie als experimentelles Modell der DTHR .....	8
1.3 Redoxbiologie .....	10
1.3.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies .....	11
1.3.2 ROS und RNS Quellen .....	18
1.3.3 Redox-Regulation und Signalwege .....	23
1.3.4 Antioxidative Systeme .....	25
1.3.5 Oxidativer Stress .....	28
1.3.6 ROS und RNS bei Entzündungen .....	29
1.4 NETs .....	31
1.5 NF- $\kappa$ B Signalweg .....	33
1.5.1 Der Einfluss des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf das Immunsystem .....	35
1.5.2 Die Rolle des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs im Immunsystem .....	38
1.6 Optical Imaging .....	40
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>45</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>47</b>
2.1 Material .....	47
2.1.1 Geräte .....	47
2.1.2 Biochemische Assay-Kits .....	47
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	48

2.1.4	Versuchstiere .....	49
2.1.5	Zucht- und Haltungsbedingungen .....	49
2.1.6	Mauslinien .....	49
2.1.7	Hapten-Lösungen .....	51
2.2	Methoden .....	51
2.2.1	Auslösen der Kontaktallergie .....	51
2.2.2	Therapie.....	52
2.2.3	Messung der Ohrschwellung.....	52
2.2.4	Optical Imaging .....	53
2.2.5	Durchflusszytometrie (FACS).....	54
2.2.6	Histologie und Immunhistochemie .....	58
2.2.7	Immunfluoreszenzfärbung.....	60
2.2.8	Metabolomics.....	61
2.2.9	DNA-Oxidations-Assay .....	62
2.2.10	Lipidperoxidation .....	62
2.2.11	Real-time-Polymerasekettenreaktion .....	62
2.2.12	Zytokin-Array.....	64
2.2.13	Statistische Auswertung.....	65
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
3.1	Einfluss der reaktiven Sauerstoffspezies auf die akute und chronische TNCB-spezifischen Kontaktallergiereaktion.....	66
3.1.1	Untersuchung der akuten und chronischen 1% TNCB induzierten Kontaktallergie in ROS/RNS-defizienten Mäusen .....	66
3.1.2	<i>In vivo</i> Dynamiken der ROS/RNS-Produktion .....	67
3.1.3	<i>Ex vivo</i> Cross-korrelation der <i>in vivo</i> Ergebnisse von ROS/RNS Produktion.....	69
3.1.4	Analyse der Zellpopulationen in sekundär lymphatischen Organen via Durchflusszytometrie.....	71
3.1.5	Histopathologische Analyse und die Konsequenzen von ROS/RNS-Defizienz .....	74
3.1.6	Einfluss des differenziellen ROS/RNS-Mangels auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.....	77
3.1.7	Metabolomics.....	80
3.1.8	Auswirkungen von ROS und RNS auf die Lipidperoxidation.....	82
3.1.9	Auswirkungen von ROS/RNS auf die DNA .....	83
3.1.10	Einfluss von NETs auf die Entwicklung von akuter und chronischer Kontaktallergie .....	87
3.1.11	Die Rolle der mitochondrialen ROS-Produktion in der Kontaktallergie ...	89
3.1.12	Auswirkungen einer Halbierung der TNCB Konzentrationen der TNCB-Challengelösung auf die Stärke der Kontaktallergie.....	92
3.1.13	Einfluss einer Vitamin E-Therapie auf die ROS/RNS-Produktion und den Ohreschwellungsverlauf einer TNCB-induzierten Kontaktallergie ...	94

3.1.14	Einfluss von NOX4 auf die akute und chronische Kontaktallergie .....	95
3.1.15	Untersuchung der kontaktallergischen Reaktion in NRF2 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	98
3.2	Oxazolone-induzierte Kontaktallergie .....	102
3.2.1	Ohrschwellungsverlauf in ROS/RNS-defizienten Mäusen .....	102
3.2.2	<i>In vivo</i> ROS/RNS-Produktion .....	102
3.2.3	Histopathologische Untersuchung der chronischen Kontaktallergie .....	104
3.3	Einfluss des klassischen und alternativen NF-κB-Signalwegs auf die akute und chronische TNCB-spezifische Kontaktallergiereaktion .....	107
3.3.1	Ohrschwellungsverlauf in NF-κB-Knockout- Mäusen .....	107
3.3.2	<i>In vivo</i> ROS/RNS-Produktion .....	108
3.3.3	Histopathologische Untersuchung der akuten und chronischen Kontaktallergie in NF-κB1 <sup>-/-</sup> , NF-κB2 <sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen .....	110
3.3.4	<i>Ex vivo</i> FACS-Analyse .....	112
3.3.5	Untersuchung der NF-κB-abhängigen proinflammatorischen Mediatoren während der chronischen Kontaktallergie .....	120
3.3.6	Expression von Adhäsionsmolekülen .....	122
3.3.7	Proteomanalyse der entzündeten Ohren von WT und NF-κB2 <sup>-/-</sup> Mäusen während der akuten und chronischen Kontaktallergie .....	125
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>128</b>
4.1	Einfluss unterschiedlicher ROS/RNS-Quellen auf die akute und chronische Kontaktallergie .....	128
4.1.1	iNOS-Defizienz .....	130
4.1.2	MPO-Defizienz .....	131
4.1.3	NOX-Defizienz .....	133
4.1.4	Metabolomanalysen .....	136
4.1.5	NET-Bildung während der Kontaktallergie .....	138
4.1.6	Pharmazeutische Inhibition von ROS/RNS als ein therapeutischer Ansatz .....	140
4.2	Einfluss des klassischen und alternativen NF-κB-Signalwegs auf die akute und chronische Kontaktallergie .....	144
4.2.1	Klassischer NF-κB-Signalweg .....	144
4.2.2	Alternativer NF-κB-Signalweg .....	146
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>154</b>
<b>6</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>156</b>
6.1	Erklärung zum Eigenanteil .....	156
<b>7</b>	<b>Publikation</b> .....	<b>158</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>159</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interkonversion von ROS und RNS am Beispiel vom aktivierten Neutrophilen. ....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette und der Entstehung des Superoxid-Anions. ....	19
Abbildung 3: NOX-Isoformen und ihre regulatorischen Untereinheiten. ....	20
Abbildung 4: Xanthinoxidase Metabolismus von Harnsäure. ....	23
Abbildung 5: Reaktionsmechanismus des Trx/Grx-Systems. ....	25
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs. ....	35
Abbildung 7: Grundprinzipien von Fluoreszenz und Biolumineszenz. ....	42
Abbildung 8: Absorptions-Koeffizienten von Hämoglobin und Wasser. ....	43
Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs der L-012 Reaktion mit ROS/RNS. ....	44
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Induktion einer akuten und chronischen Kontaktallergie. ....	52
Abbildung 11: Optical Imaging Messung der ROS/RNS-Produktion. ....	53
Abbildung 12: Gating-Strategie zur Differenzierung der T-Zellen und myeloiden Zellen. ....	57
Abbildung 13: ROS und RNS produzierende Proteine während einer Entzündungsreaktion. ....	66
Abbildung 14: Ohrschwellung in ROS/RNS-defizienten Mäusen. ....	67
Abbildung 15: <i>In vivo</i> Dynamiken der ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie. ....	69
Abbildung 16: <i>Ex vivo</i> ROS/RNS-Produktion. ....	71
Abbildung 17: Analyse der Zellpopulationen in den ROS/RNS-defizienten Mauslinien. ....	74
Abbildung 18: Histopathologische Analyse von akuten und chronischen Kontaktallergie. ....	76
Abbildung 19: RT-PCR-Analyse der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen während einer akuten und chronischen Kontaktallergie. ....	78
Abbildung 20: RT-PCR-Analyse der mRNA-Expression von Redox-regulierenden Proteinen sowie ROS produzierenden Proteinen während einer akuten und chronischen Kontaktallergie. ....	79
Abbildung 21: Metabolische Analyse der chronischen Kontaktallergie. ....	81
Abbildung 22: Oxidativer Stress im entzündeten Ohrgewebe. ....	83
Abbildung 23: Bildung von NETs und DNA-Oxidation während der akuten und chronischen Kontaktallergie. ....	85
Abbildung 24: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder des Ohrgewebes von WT, gp91 <sup>phox</sup> <sup>-/-</sup> und PAD4 <sup>-/-</sup> Mäusen 7 h nach der 1. TNCB-Challenge. ....	86

Abbildung 25: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von Ohrgewebe von iNOS <sup>-/-</sup> und MPO <sup>-/-</sup> Mäusen 7 h nach der 1. TNCB-Challenge.....	87
Abbildung 26: Ohrschwellungsverlauf und <i>in vivo</i> OI der ROS/RNS-Produktion in PAD4 <sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen. ....	88
Abbildung 27: Inhibition der mitochondrialen ROS-Produktion in Wildtyp-Mäusen.....	90
Abbildung 28: Inhibition der mitochondrialen ROS-Produktion in gp91 <sup>phox-/-</sup> Mäusen.....	91
Abbildung 29: Ohrschwellungsreaktion und ROS/RNS Produktion während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie unter Verwendung einer 0,5%igen TNCB-Ohr-Challenge-Lösung. ....	93
Abbildung 30: <i>In vivo</i> ROS/RNS-Produktion und Ohrschwellungsverlauf unter Therapie mit Trolox.....	95
Abbildung 31: Ohrschwellungsverlauf und <i>in vivo</i> OI-Messung der ROS/RNS-Produktion und in NOX4 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	97
Abbildung 32: <i>Ex vivo</i> FACS-Analyse der dLK und der Milz von NOX4 <sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen mit chronischer Kontaktallergie (24 h nach der 5. TNCB-Challenge). ....	98
Abbildung 33: Ohrschwellungsverlauf und <i>in vivo</i> OI-Messung der ROS/RNS-Produktion und in NRF2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	100
Abbildung 34: <i>Ex vivo</i> FACS-Analyse der dLK und der Milz von NRF2 <sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit chronischer Kontaktallergie (24 h nach der 5. TNCB-Challenge). ....	101
Abbildung 35: Ohrschwellungsverlauf und <i>in vivo</i> ROS/RNS-Produktion während der Oxazolone-induzierten Kontaktallergie. ....	104
Abbildung 36: Histopathologische Analyse von chronischen Oxazolone-induzierten Kontaktallergie. ....	106
Abbildung 37: Verlauf der Ohrschwellungen während der verschiedenen Stadien der TNCB-induzierten Kontaktallergie. ....	108
Abbildung 38: <i>In vivo</i> OI der ROS/RNS-Produktion in den entzündeten Ohren von Wildtyp, NF-κB1 <sup>-/-</sup> und NF-κB2 <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	109
Abbildung 39: Histopathologische und immunhistochemische Analyse der akuten und chronischen Kontaktallergie in NF-κB1 <sup>-/-</sup> , NF-κB2 <sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen.....	112
Abbildung 40: Leukozyten-Populationen in den dLK und Milzen von WT, NF-κB1 <sup>-/-</sup> und NF-κB2 <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	114
Abbildung 41: Lymphozyten-Populationen in den dLK und Milzen von WT, NF-κB1 <sup>-/-</sup> und NF-κB2 <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	115
Abbildung 42: Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Populationen in WT, NF-κB1 <sup>-/-</sup> und NF-κB2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	118
Abbildung 43: Aktivierung der T-Zellen in WT, NF-κB1 <sup>-/-</sup> und NF-κB2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	120
Abbildung 44: Genomische Expression von proinflammatorischen Mediatoren in entzündlichen Ohren von Wildtyp, NF-κB1 <sup>-/-</sup> und NF-κB2 <sup>-/-</sup> Mäusen während einer chronischen Kontaktallergie. ....	122

Abbildung 45: Expressionsmuster von endothelialen Adhäsionsmolekülen in entzündlichen Ohren von Wildtyp, NF- $\kappa$ B1 <sup>-/-</sup> und NF- $\kappa$ B2 <sup>-/-</sup> Mäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie.....	124
Abbildung 46: Proteomanalyse der entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2 <sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen während der akuten und chronischen Kontaktallergie.....	127

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsstellen von ROS und RNS an Proteinen.....	13
Tabelle 2: Reaktivität unterschiedlicher ROS und RNS. ....	13
Tabelle 3: Verwendete Geräte. ....	47
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	48
Tabelle 5: FACS-Antikörper. ....	54
Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Färbung. ....	59
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	61
Tabelle 8: Primer für RT-PCR .....	63
Tabelle 9: Primer für RT-PCR .....	64

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7
APCs	Antigen-präsentierende Zellen („ <i>antigen presenting cells</i> “)
BAFFR	„ <i>B cell activation factor receptor</i> “
BSA	bovines Serum Albumin
CCD	„ <i>charge coupled device</i> “
CCL	CC-Ligand (Chemokin)
CD	Differenzierungsmerkmal einer Zelle („ <i>cluster of differentiation</i> “)
CD62L	L-Selektin
Ch	Challenge
CHS	„ <i>contact hypersensitivity</i> “
CTL	cytotoxische T-Zelle („ <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> “)
CTLA4	„ <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i> “
CXCL	CXC-Ligand (Chemokin)
DAMPs	Gefahr-assoziierte molekulare Strukturen („ <i>danger associated molecular patterns</i> “)
DCs	Dendritische Zellen („ <i>dendritic cells</i> “)
DHR	Dihydrorhodamin 123
dLK	drainierender Lymphknoten
DMF	Dimethylfumarat
DNFB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
DTHR	verzögerte Hypersensitivität („ <i>delayed type hypersensitivity reaction</i> “)
DUOX	Dualoxidasen
ECM	extrazelluläre Matrix („ <i>extracellular matrix</i> “)
eNOS	endotheliale NOS
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	Durchflusszytometrie („ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “)
FCS	fetales Kälberserum
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FOXO	Forkhead-Box-Proteinen der Klasse O
FSC	„ <i>forward-scatter</i> “
GFP	„ <i>green fluorescence protein</i> “
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
Grx	Glutaredoxin
GSH	Gluthation
GSSH	Gluthathion-Disulfid
H&E	Hämatoxilin & Eosin Abkürzungsverzeichnis
HO-1	Hämoxygenase-1
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 („ <i>intracellular adhesion molecule 1</i> “)
IKK	IkappaB kinase
IgG	Immunglobulin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
LT	Lymphotoxin
LT $\beta$ R	Lymphotoxin-beta Rezeptor („ <i>inducible nitric oxide synthase</i> “)
NE	Neutrophil-Elastase
NRF2	„ <i>nuclear factor erythroid related factor-2</i> “
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
L-012	8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine- 1,4(2H,3H)dione
mAb	monoklonaler Antikörper („ <i>monoclonal antibody/antibodies</i> “)
MAP-Kinase-Weg	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Weg
MDA	Malondialdehyd
MHC	„ <i>major histocompatibility complex</i> “

MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MPO	Myeloperoxidase
mTEC	medullären Thymus-Epithelzellen
NAC	<i>N</i> -Acetylcystein
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	„ <i>neutrophil extracellular traps</i> “
NF-κB	„ <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> “
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLRs	NOD-like Rezeptoren
nNOS	neuronale NOS
NOX	NADPH Oxidase
NOX2	phagozytische NADPH-Oxidase 2
NOXA1	NOX-Aktivator 1
NOXO1	NOX-Organisator 1
OGG1	8-Oxoguaninglykosylase
OI	Optische Bildgebung („ <i>optical imaging</i> “)
PAD4	Protein-arginine deiminase type-4
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster („ <i>pathogen-associated molecular patterns</i> “)
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Acetat
PMN	neutrophile Granulozyten (Neutrophile) „ <i>polymorphonuclear leukocytes</i> “
PRR	Mustererkennungszepatoren („ <i>pathogen recognition receptor</i> “)
Prxs	Peroxiredoxine
RANK	„ <i>receptor activator of NF-κB</i> “

RFP	„red fluorescence protein“
ROI	„region of interest“
RON	Reactive Stickstoffspezies („reactive nitric species“)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
RT-PCR	„real-time-polymerase-chain-reaction“
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean“)
SLO	sekundär lymphatische Organe
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	„Sideward-Scatter“
Tc1	Interferon- $\gamma$ produzierende cytotoxische T-Zelle
Tc2	Interleukin-4 produzierende cytotoxische T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor („T-cell-receptor“)
TECs	Thymusepithelzellen
Th0	naive T-Helfer-Zelle
Th1	Interferon- $\gamma$ produzierende T-Helfer-Zelle
Th2	Interleukin-4 produzierende T-Helfer-Zelle
Th17	Interleukin-17 produzierende T-Helfer-Zelle
TNCB	2,4,6-Trinitrochlorbenzol
TLOs	tertiär lymphatische Organe
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF3	TNFR-associated factor 3
Treg	regulatorische T-Zelle
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
VCAM-1	„vascular cell adhesion protein 1“
YFP	„yellow fluorescence protein“
8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich mich beim Prof. Dr. Bernd Pichler bedanken, dafür, dass er es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit im Werner Siemens Imaging Center in Tübingen durchzuführen. Des Weiteren möchte ich ihm für die Möglichkeit der Teilnahme an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Konferenzen danken, sowie für die Organisation verschiedener Grill- und Weihnachtsfeiern, was stets zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen hat.

Ganz besonders möchte ich mich beim PD Dr. med. Manfred Kneilling bedanken, für die Bereitstellung dieses überaus interessanten Themas, die außerordentliche Betreuung und Begutachtung dieser Dissertationsarbeit. Für die etliche Zeit und Mühe, die er in den Jahren in mich investiert hat, möchte ich mich bei ihm herzlich bedanken. Vielen Dank auch für die herausragende Unterstützung und Zusammenarbeit, anregende Diskussionen sowie die tolle Arbeitsatmosphäre in der AG Kneilling.

Einen großen Dank möchte ich auch Prof. Dr. Alexander Weber für die Betreuung und bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit aussprechen. Des Weiteren gilt mein Dank unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla de Fend, Dr. Irene Gonzalez-Menendez, Frau Birgit Fehrenbacher, Frau Renate Nordin, Dr. Daniela Kramer, Antonia Kolb, Berenice Fischer, Dr. Christoph Trautwein, Laimdota Zizmare für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Natalie Hermann, Maren Harant, Dennis Haupt, Sandro Aidone und Miriam Owczorz für ihre exzellente fachliche Unterstützung bedanken.

Ein außerordentlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Werner Siemens Imaging Centers, die für eine freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre beitragen. Speziell möchte ich mich bei Dr. Fabian Schmidt, Dr. Barbara Schörg, Simone Bläß und Dimitri Stowbur bedanken, für das freundschaftliche Umfeld und die unterhaltsamen Mittagspausen.

Abschließen möchte ich mich aus vollem Herzen bei meinen Eltern Alwina und Viktor, meinen Geschwistern Tatjana und Marina und vor allem bei meiner Freundin Otilia für die unendliche Unterstützung und Liebe bedanken.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

### 1.1.1 Das lymphatische System

Das Immunsystem verfügt über ein Netzwerk von spezialisierten Immunorganen, den sogenannten lymphatischen Organen, die es ermöglichen, schnell eine große Anzahl von Immunzellen zu produzieren und so die Ausbreitung von Infektionen im Körper zu stoppen. Sie sind ein wichtiger Ort der Reifung, Aktivierung und Proliferation von Immunzellen und somit essenziell für eine adäquate Immunantwort. Knochenmark und Thymus bilden die primären lymphatischen Organe, da sie für die Bildung und Reifung von Immunzellen verantwortlich sind. So werden im Knochenmark nahezu alle Zellen des Blutes inklusive der Immunzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (Hämazytoblasten) gebildet. Die entstehenden Vorläuferzellen unterlaufen weitere Entwicklungsreihen wie Erythro-, Thrombozyto-, Lymphozyto-, Granulozyto- und Monozytopoese, die jeweils unterschiedliche Blut- bzw. Immunzellen hervorbringen, die anschließend ins Blut und ins Gewebe migrieren [1]. Während die Reifung und die somatische Rekombination der leichten und die schweren Ketten der Antikörper in B-Zellen im Knochenmark stattfindet, wandern die T-Zellen für ihre Reifung aus dem Knochenmark in den Thymus, indem sie eine positive und negative Selektion durchlaufen. Nach der Reifung siedeln sich die meisten T- und B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen (SLO) an. Diese umfassen die Lymphknoten, die Milz, die Tonsillen und das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe [2]. SLOs bilden den Ort an dem die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen (DCs) sowie die Aktivierung der B-Zellen durch die T-Zellen stattfindet, womit sie eine Art zentrale Schaltstelle für adaptive Immunantworten darstellen [2]. Der Transport von Immunzellen durch den Körper erfolgt sowohl im Blut als auch in der Lymphe durch die Lymphkapillaren die in allen Geweben mit Ausnahme des Zentralnervensystems verteilt sind. Die Lymphkapillaren drainieren über die zuführenden Lymphgefäße in die Lymphknoten, welche als Sammelstellen und Filterorgane für die Lymphe inklusive der Immunzellen dienen. Anders als der Blutkreislauf ist das lymphatische System kein geschlossenes Kreislaufsystem. Denn die gesamte Lymphe drainiert von den Lymphknoten zu den efferenten Lymphgefäßen unidirektional über den *Ductus thoracicus* in die *Vena jugularis interna* und die *Vena subclavia* in den Blutkreislauf. Auf diesem Weg werden sowohl Immunzellen als auch Krankheitserreger und Zellfragmente aus dem ganzen Körper in die lymphatischen Organe transportiert und können dort eine entsprechende Immunantwort induzieren.

### 1.1.2 Die angeborene Immunantwort

Die erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunantwort bilden die physikalischen und chemischen Barrieren wie die Haut und Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes sowie die respiratorischen Epithelien, die zahlreiche Enzyme und körpereigene antimikrobielle Peptide enthalten. Werden diese Barrieren durch die Krankheitserreger durchbrochen, kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems. Das Komplementsystem besteht aus ca. 30 verschiedenen Plasmaproteinen und kann durch spezifische Antikörper oder Antikörper-unabhängig aktiviert werden, weshalb es sowohl im Rahmen der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort eine essentielle Rolle spielt. Das Komplementsystem bindet an die Oberfläche der Krankheitserreger (Opsonisierung) und bildet den Membran-Angriffskomplex wodurch es zu Porenbildung in der Membran und Lyse des Krankheitserregers kommt. Des Weiteren lockt es die Immunzellen des angeborenen Immunsystems, darunter Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und DCs, an und leitet die Phagozytose des opsonierten Krankheitserregers oder dessen Bestandteile ein [2].

Die Aktivierung der Immunzellen des angeborenen Immunsystems erfolgt durch die Erkennung von bestimmten Strukturen von Krankheitserregern, die „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMPs), sowie durch Bestandteile von körpereigenen geschädigten Zellen die in den extrazellulären Raum entlassen werden, die „*danger-associated molecular patterns*“ (DAMPs). Die Erkennung von PAMPs und DAMPs erfolgt über spezielle Rezeptoren, die „*pattern recognition receptors*“ (PRRs). Dazu gehören vor allem die membrangebundenen Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die intrazellulären NOD-like Rezeptoren (NLRs). Die Stimulation von TLRs und NLRs löst eine Signalkaskade aus bei der pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 $\beta$ , TNF, IL-6 sowie zahlreiche Chemokine exprimiert werden, wodurch eine Entzündungsreaktion induziert wird [2].

Granulozyten sind die ersten Immunzellen die über den Blutkreislauf mittels Chemokinen zum Infektionsort gelockt werden und dort eine akute Entzündung auslösen, wodurch weitere Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems angelockt werden. Sie werden aufgrund der verschiedenen Komposition der Granulavesikel in drei Typen eingeteilt: neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Neutrophile, auch „*polymorphonuclear leukocytes*“ (PMNs) genannt, bilden mit ca. 40 – 70 % aller im Blut zirkulierenden Leukozyten die größte Population. Neben ihrer Fähigkeit Krankheitserreger zu phagozytieren und zu zerstören, können neutrophile

Granulozyten sogenannte „*neutrophil extracellular traps*“ (NETs, siehe 1.4) bilden. Dabei wird die DNA ausgestattet mit verschiedenen antimikrobiellen Proteinen und Peptiden in den extrazellulären Raum entlassen, wodurch Krankheitserreger eingefangen und abgetötet werden und deren Ausbreitung im Organismus verhindert wird [3].

Ähnlich wie Neutrophile sind Makrophagen in der Lage eingedrungene Pathogene zu phagozytieren und zu zerstören. Im Gegensatz zu Neutrophilen, die hauptsächlich im Blut vorkommen und nur wenige Stunden bis Tage leben, können sich Makrophagen in allen Geweben des Körpers ansiedeln und dort für längere Zeit persistieren. Gewebsresidente Makrophagen wie Langerhans-Zellen nehmen Veränderungen in der Gewebs-Homöostase wahr, die bei Verletzungen oder während Infektionen auftreten, worauf eine Entzündungsreaktion induziert wird. Dabei produzieren sie wiederum Zytokine und Chemokine, die andere Immunzellen an den Entzündungsort locken und deren Aktivierung induzieren [4, 5]. Makrophagen werden grob in zwei Populationen unterteilt: A) die klassisch-aktivierten (IFN- $\gamma$  + PAMPs/DAMPs) pro-inflammatorischen M1 Makrophagen, die vor allem bei der Bekämpfung von Krankheitserregern und der Initiation von Entzündungsreaktionen beteiligt sind und damit eine Komponente der angeborenen Immunantwort darstellt; B) die alternativ-aktivierten (IL-4 und IL-13) anti-inflammatorischen M2 Makrophagen die eine wichtige Rolle im Rahmen der Wundheilung und Regeneration von Geweben spielen [6]. DCs sind im Vergleich zu Neutrophilen und Makrophagen weniger an der direkten Eliminierung von Krankheitserregern beteiligt, jedoch spielen sie eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Sie nehmen Krankheitserreger und Zelltrümmer durch Phagozytose auf und prozessieren diese intrazellulär durch proteosomalen Abbau zu spezifischen Peptidsequenzen (Antigene). Anschließend wandern die aktivierten DCs in den drainierenden Lymphknoten, wo sie die spezifischen Antigene über bestimmte Rezeptoren, sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHCs) auf ihrer Zelloberfläche an die T-Zellen präsentieren und so die adaptive Immunantwort aktivieren. Die MHCs werden in zwei Klassen unterteilt: MHC der Klasse I (MHC-I) und MHC der Klasse II (MHC-II). MHC-I wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dient zur Präsentation von zell-eigenen (endogenen) Peptidsequenzen. Immunzellen wie CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und natürliche Killerzellen (NKs) können so über das MHC-I zwischen gesunden und von Virus infizierten Zellen unterscheiden. Das MHC-II wird nur von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), wie DCs, Makrophagen und B-Zellen, exprimiert. Über MHC-II werden durch Phagozytose extrazellulär

aufgenommene Antigene an CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen (Th) präsentiert, worauf eine entsprechende adaptive Immunantwort ausgelöst wird (1.1.3) [2].

### 1.1.3 Die adaptive Immunantwort

Im Gegensatz zu dem breiten Wirkungsspektrum von Immunzellen des angeborenen Immunsystems gegenüber Krankheitserregern, zeichnet sich die adaptive Immunantwort vor allem für die hohe Spezifität gegenüber bestimmten Antigenen und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Das adaptive Immunsystem wird grob in zwei Komponenten unterteilt: Die T-Zellvermittelte zelluläre Immunantwort und die von B-Zellen induzierte humorale Immunantwort, bei der antigenspezifische Antikörper produziert werden.

Nach der Reifung im Thymus wandern die naiven T-Zellen in die Lymphknoten und Milz und haben dort täglich Tausende von Kontakten mit den DCs, bis sie auf ihr spezifisches, auf einem MHC Molekül präsentiertes, Antigen treffen. Die Einwanderung von Lymphozyten in die SLOs (Homing) wie Lymphknoten und Milz wird durch die Expression von Chemokinen (CXCL2, CCL2, CCL19, CCL1 etc.) und von Adhäsionsmolekülen (Selektine, Integrine und Moleküle der Immunoglobulin-Superfamilie) vermittelt die das Rollen der Zellen an der Endotheloberfläche sowie deren feste Adhäsion und Transmigration in die T-Zell-Zonen ermöglichen. Sobald eine naive T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkannt hat, wird sie spezifisch aktiviert und zur Proliferation angeregt. Diese Antigen-spezifischen T-Zellen verbleiben zunächst in der T-Zell-Zone des SLOs. Im Anschluss verlassen die meisten Effektor-T-Zellen die lymphatischen Organe und gelangen wieder in den Blutkreislauf um von dort an den Ort der Entzündung zu migrieren. Ein Teil der aktivierten Effektor T-Zellen migriert in die germinalen Zentren der SLOs, wo sie mit B-Zellen interagieren, diese aktivieren und deren Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen induzieren [2, 7].

Eine erfolgreiche Aktivierung (Priming) von naiven T-Zellen benötigt mindestens drei unterschiedliche Signale. Den primären Stimulus bildet die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an das spezifische Antigen über das MHC-Komplex, welches die spezifische Aktivierung initiiert. Als nächstes erfolgt die Co-Stimulation durch die Interaktion des CD28 Rezeptors auf den T-Zellen mit den Liganden CD80 bzw. CD86 auf den APCs, welches das Überleben und Proliferation der T-Zelle vorantreibt. Das dritte Signal bilden die verschiedenen Zytokine wie (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-23, IL-4) die von den aktivierten APCs als auch von den T-Zellen selbst produziert und sezerniert werden

und so die Differenzierung der T-Zellen in verschiedene Subpopulationen von Effektor und Memory T-Zellen anregt und die Immunantwort zielgerichtet verstärkt [2].

Je nachdem, zu welchem Subtyp die T-Zellen gehören, werden unterschiedliche Funktionen ausgeübt. Aktivierte CD8<sup>+</sup> CTLs scannen die Umgebung auf spezifische Antigene, die auf MHC-I-Rezeptoren präsentiert werden. Bindet die aktivierte CTL an eine infizierte Zelle, sezerniert diese zytolytische Enzyme wie Granzyme und Perforin, die in die infizierte Zelle eindringen und durch Porenbildung Apoptose auslösen. Im Falle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen können diese je nach Art des Aktivierungsstimulus unterschiedliche Funktionen ausführen. Wird die CD4<sup>+</sup> T-Helferzelle (Th0-Zelle) in Gegenwart von IL-12 und IFN $\gamma$  aktiviert, differenziert diese zu einer IFN $\gamma$ -produzierenden T-Helferzelle vom Typ 1 (Th1-Zelle). Th1-Zellen orchestrieren die zelluläre Immunantwort, indem sie Zytokine wie IL-2, TNF und IFN- $\gamma$  produzieren und so die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> CTL oder Makrophagen steuern. Diese Art der zellspezifischen Immunreaktion ist als Th1-Immunantwort bekannt und richtet sich normalerweise gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren, bestimmte Bakterienarten und Tumorzellen [2]. Eine fehlgeleitete Th1-Immunantwort, die sich gegen die körpereigene Zellen richtet, ist der Haupttreiber von zahlreichen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis vulgaris, multiplen Sklerose und Diabetes mellitus Typ 1 [8]. Wenn die Th0-Zellen dagegen in Gegenwart von IL-4 aktiviert werden, polarisieren diese zu Th2-Zellen, während die Polarisierung zu Th1-Zellen gehemmt wird. Th2-Zellen initiieren die humorale Immunantwort, indem sie B-Zellen aktivieren und diese zur Produktion von antigen-spezifischen Antikörpern sowie deren Klassen-Switch zum Immunglobulin des Typs E (IgE) veranlassen. Zusätzlich werden bei der Th2-Immunantwort die Mastzellen sowie eosinophile und basophile Granulozyten stimuliert [2]. Die humorale Immunantwort dient vor allem zur Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen wie Parasiten ist jedoch auch ein zentrales Element bei der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen wie Asthma bronchiale [9].

Weitere wichtige CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen sind IL-17 produzierende Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen (Tregs) [8]. Th17-Zellen richten sich hauptsächlich gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze, indem sie zur Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen beitragen, sowie die Funktion von B-Zellen verbessern. Th17-Zellen sind mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen assoziiert [10] und spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis vulgaris [11]. Die von den Th17-Zellen sezernierte Zytokine, insbesondere IL-17A, können Keratinozyten aktivieren, wodurch

antimikrobielle Peptide produziert werden, die wiederum weitere Immunzellen rekrutieren. Des Weiteren können sie die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten verstärken oder hemmen [12].

Im Gegensatz zu den CTL, Th1, Th2 und Th17 T-Zellpopulationen deren Hauptfunktion in der Eliminierung von Krankheitserregern liegt, haben Tregs eine immunregulierende Rolle indem sie die Aktivierung und Proliferation von Effektor-T-Zellen supprimieren und so den Körper vor überschießenden Immunreaktion schützen. Patienten mit Autoimmunerkrankungen weisen oft eine geringere Anzahl bzw. Funktionsstörungen der Tregs auf [13]. Charakteristisch für die Treg-Population ist die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead P3, der essentiell für deren Entwicklung und Funktion ist. Daneben exprimieren die Tregs auf der Zelloberfläche IL-2-Rezeptor- $\alpha$  (CD25), der ebenfalls wichtig für deren Entwicklung und Funktion ist, sowie „*programmed cell death protein 1*“ (PD-1) und „*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*“ (CTLA-4) die vor allem bei der Immunsuppression eine entscheidende Rolle spielen. Tregs können auf unterschiedlichen Wegen die Immunzellen supprimieren: 1) Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10, IL-35 und TGF $\beta$ ; 2) Induktion von Apoptose; 3) Depletion von IL-2, welches für die Proliferation von Effektor-T-Zellen notwendig ist; 4) Suppression von DCs durch CTLA-4 und PD-1 [14].

Nach einer erfolgreichen Abwehr der Krankheitserreger gehen die meisten T- und B-Zellen in Apoptose, während etwa 5% davon sich zu B- oder T-Gedächtniszellen entwickeln und das immunologische Gedächtnis bilden. Diese wandern in die Lymphknoten, Milz und ins Gewebe aus wo sie über Jahrzehnte persistieren können und im Falle einer Re-Infektion mit demselben Pathogen innerhalb kürzester Zeit eine Antigen-spezifische Immunantwort auslösen können [7].

## 1.2 Allergien

Allergien (Hypersensitivität) sind überschießende Reaktionen des Immunsystems die gegen exogene körperfremde, jedoch eigentlich harmlose Umweltstoffe (Allergene).

Allergien werden gemäß der unterschiedlichen Pathomechanismen in vier Typen eingeteilt: Typ-I-Allergie (Soforttyp), Typ-II-Allergie (zytotoxischer Typ), Typ-III-Allergie (Immunkomplextyp) und Typ-IV-Allergie (verzögerter Typ) [15]. Typ-I-Allergien werden von Mastzellen und basophile Granulozyten vermittelt. Diese werden mittels Bindung von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern- und IgE-Antigen-Quervernetzung aktiviert, was zur Freisetzung von Histamin und anderen vasoaktiven Entzündungsmediatoren

führt. Krankheiten wie allergisches Asthma, Heuschnupfen und allergische Bindehautentzündung sind typische Typ-I-Allergien. Bei der Typ-II-Allergie handelt es sich um eine zytotoxische Reaktion. Hierbei binden Antigen-spezifische IgG-Antikörper an membranständige Antigene von Zellen, wodurch es zur Aktivierung der Komplementkaskade und zur Zerstörung der Zelle kommt. Des Weiteren wird die Zelle durch die Antikörper und Faktoren des Komplementsystems opsoniert, worauf sie durch Makrophagen und Neutrophile phagozytiert und eliminiert wird [16, 17]. Die Typ-III-Allergie wird auch als Arthusreaktion bezeichnet. Hierbei bilden sich wie beispielsweise bei der allergischen Vaskulitis Immunkomplexe, welche sich aus spezifischen Antigenen und spezifischen Antikörpern (zumeist IgG Antikörper) zusammensetzen, welche die Aktivierung der Komplementkaskade induzieren und Schäden an kleinen Arterien und Kapillaren verursachen [18, 19]. Bei der Typ-IV-Allergie handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Spättypreaktion. Dies ist Gegenstand dieser Promotionsarbeit und wird im Folgenden näher betrachtet (1.2.1).

### 1.2.1 Typ-IV-Allergie

Bei der Typ-IV-Allergie handelt es sich um eine von antigenspezifische T-Zell ausgelöste Entzündungsreaktion. Die ersten Symptome treten frühestens nach ca. 6 bis 12 Stunden nach dem Zweitkontakt mit dem Allergen auf, während die maximale Entzündungsreaktion nach ca. nach 24 und 72 Stunden erreicht wird, weshalb es als verzögerte Hypersensitivität „*delayed-type hypersensitivity reaction*“ (DTHR) oder Spättypreaktion bezeichnet wird [15]. Einer der prominentesten Beispiele für eine DTHR ist das allergische Kontaktekzem (Kontaktallergie). Kontaktallergien entstehen, wenn bestimmte Substanzen, sogenannte Kontaktallergene, äußerlich auf die Haut einwirken und hierdurch eine spezifische Immunreaktion auslösen. Es gehört zu den häufigsten dermatologischen Erkrankungen, mit einer Prävalenz von etwa 15-20% [20]. Bei den meisten Kontaktallergenen handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen, sogenannte Haptene, die chemisch an Proteine Binden und nur als Hapten-Proteinkomplex als Antigen wirken können. Die Proteine werden hierbei strukturell verändert und als Hapten-Proteinkomplex vom Immunsystem als fremd erkannt. Zu den häufigsten Kontaktallergenen zählen das Nickel, bestimmte Duftstoffe in Parfumes und das Uruschiol (Toxin von Giftefeu) [21].

Eine DTHR wird durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt, die eine Entzündungsreaktion gegen intrazelluläre wie auch extrazelluläre Antigene hervorrufen. Beim

Erstkontakt mit dem Antigen kommt es zum Priming von antigenspezifischen naiven T-Zellen und Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses. Dabei ist Antigenstruktur sowie das vorherrschende Zytokinmilieu entscheidend ob eine naive T-Zelle zu einer Th1-, Th2- oder Th17-Zelle differenziert. Bei einer Re-Exposition mit demselben Antigen kommt es zu einer starken lokalen zellulären Immunantwort im Bereich der Antigenreexposition durch die dann bereits im lymphatischen System vorhandenen Gedächtnis-T-Zellen sowie durch die Rekrutierung von weiteren Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und Neutrophile. Diese Immunzellen setzen Zytokine und Moleküle frei, die zu Gewebeschäden und zum Zelltod führen können. DTHRs spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Krankheitserregern wie Mykobakterien oder Viren sowie bei der antitumoralen Immunantwort [21]. Richtet sich die Immunantwort jedoch gegen die körpereigenen Strukturen (Autoantigene) kann dies zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führen. Zu den typischen Autoimmunerkrankungen die als DTHRs klassifiziert werden, gehören Rheumatoide Arthritis, Psoriasis vulgaris, Multiple Sklerose und Colitis ulcerosa [22-25].

### **1.2.2 Kontaktallergie als experimentelles Modell der DTHR**

Die Hapten-induzierte experimentelle Kontaktallergie der Maus „*contact hypersensitivity*“ (CHS), hat die typischen Charakteristika einer DTHR und ist somit ein ideales Modell zur Untersuchung der immunologischen Prozesse und Pathomechanismen von T-Zell-medierten Autoimmunerkrankungen [26].

Haptene allein rufen keine Immunreaktion hervor, da sie zu klein sind (<1kD), um vom Immunsystem erkannt zu werden. Die meisten Haptene sind elektrophil wodurch sie eine kovalente Bindung mit Proteinen eingehen (Haptenisierung) und damit neue Epitope erzeugen. Ob ein Hapten ein starkes oder schwaches Kontaktallergen darstellt, hängt von seinen elektrophilen und hydrophoben Eigenschaften ab, welche die Reaktionsgeschwindigkeit und Gewebegängigkeit bestimmen [27]. Eine weitere wichtige Eigenschaft von Haptenen ist, dass sie als Reizmittel wirken und so eine Entzündungsreaktion mittels Aktivierung der angeborenen Immunantwort auslösen [28]. Haptene wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Oxazolon, 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (DNFB) und 2,4,6-Trinitrochlorbenzol (TNCB) gehören zu den starken Kontaktallergenen, die eine sofortige und starke lokale Immunreaktion auslösen und deshalb häufig in tierexperimentelle Kontaktallergiemodellen eingesetzt werden. Des Weiteren

können je nach Eigenschaft des Haptens unterschiedliche T-Zellantworten ausgelöst werden, und somit unterschiedliche DTHR Pathomechanismen nachgeahmt werden. So lösen beispielsweise DNFB und TNCB eine Th1 dominierende und FITC eine Th2 dominierende Immunantwort aus, während Oxazolone eine Mischform aus einer Th1 und Th2 Immunantwort induziert [29, 30].

### 1.2.2.1 Sensibilisierungsphase

Die Kontaktallergiereaktion wird grundsätzlich in die Sensibilisierungsphase und Effektorphase unterteilt. In der Sensibilisierungsphase findet der Erstkontakt mit dem Hapten statt. Dies erfolgt durch eine einmalige Applikation des gelösten Haptens, in unserem Fall eines TNCB-Aceton-Öl-Gemischs, am rasierten Abdomen. Durch den Kontakt von TNCB und Aceton wird zunächst eine toxische Dermatitis ausgelöst, die zur Freisetzung von DAMPs und ROS sowie zu einer lokalen Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF und anderen entzündungsfördernden Mediatoren durch Mastzellen und Keratinozyten führt. Hierdurch werden Langerhanszellen und DCs aktiviert, migrieren anschließend in die lokalen drainierenden Lymphknoten und präsentieren dort die haptenspezifischen Peptide über die MHC-II-Moleküle an naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen, worauf es zur klonalen Expansion und Differenzierung von TNCB-spezifischen Th1-, Tc1- und Th17-Zellen kommt [29].

### 1.2.2.2 Effektorphase

Nach 5 bis 7 Tagen wird das TNCB auf das rechte Ohr aufgetragen (Challenge) um eine TNCB-spezifische Kontaktallergie auszulösen (Effektorphase). Hierbei teilt man die Kontaktallergiereaktion in eine frühe und späte Entzündungsphase ein. In der frühen Phase werden die Mastzellen und Keratinozyten durch das Hapten antigenunspezifisch aktiviert, worauf Chemokine wie CXCL-1, 2, und CCL-1, 2 und 5 sowie Zytokine TNF und IL-1 $\beta$  sezerniert werden, was zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen („*intercellular adhesion molecule 1*“ (ICAM-1), E- und P-Selektin) auf den Endothelzellen führt. Mittels Chemotaxis werden APCs wie DCs, LCs und Makrophagen sowie TNCB-spezifische T-Gedächtniszellen und Neutrophile an den Ort der Entzündungsreaktion rekrutiert.

Zur späten Effektorphase kommt es etwa 24 Stunden nach dem TNCB-Challenge. Hierbei handelt es sich um eine antigenspezifische T-Zell-mediierte Immunantwort. Aktivierte APCs, Keratinozyten, Mastzellen und Endothelzellen präsentieren die haptenspezifischen Antigene an ihrer Zelloberfläche worauf die TNCB-spezifischen T-

Gedächtniszellen aktiviert werden und sich überwiegend zu CD4<sup>+</sup> Th1- und CD8<sup>+</sup> Tc1-Effektorzellen sowie Th17-Zellen differenzieren. Die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2, IL-1b, IFN- $\gamma$  und TNF führt zu verstärkter Entzündungsreaktion, Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung von Gefäßen, Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und folglich zur vermehrten Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen [21, 31]. Das von Th17-Zellen sezernierte IL-17 verstärkt weiter die Rekrutierung von Neutrophilen ins entzündete Gewebe [31-33]. Neutrophile spielen eine zentrale Rolle bei der akuten experimentalen Kontaktallergiereaktion und repräsentieren die dominante Zellpopulation (ca. 95%) im entzündeten Ohr Gewebe. In der frühen Effektorphase schütten sie das lösliche FasL und Perforin aus was die Infiltration von T-Zellen in das entzündete Gewebe begünstigt, während sie in der späten Effektorphase eine destruktive und gewebsschädigende Rolle spielen, indem sie proentzündliche Zytokine, Proteasen, reaktive Sauerstoffspezies (siehe 1.3.5) und andere entzündliche Mediatoren sezernieren und dadurch die Zellen und die Gewebematrix zerstören [34, 35]. Um eine chronische Kontaktallergie auszulösen, wird die TNCB-Lösung wiederholt alle 48 bis 72 Stunden auf das entzündete Ohr aufgetragen. Die zunehmende chronische Entzündungsreaktion der Haut führt zur Akanthose und Hyperkeratose der Epidermis, sowie zur Angiogenese und zu einem verstärkten Immuninfiltrat, bestehend aus Makrophagen, Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen. Des Weiteren führt die fortschreitende Chronifizierung weg von einer Th1-dominierenden akuten zu einer Th2-dominierenden chronischen Kontaktallergiereaktion [21, 36, 37].

### **1.3 Redoxbiologie**

Redoxreaktionen sind chemische Reaktionen bei denen ein Reaktionspartner Elektronen auf den Anderen überträgt. Der Reaktionspartner der Elektronen abgibt wird dabei oxidiert (Oxidation), während der Reaktionspartner der Elektronen aufnimmt reduziert wird (Reduktion). Redoxreaktionen bilden das Fundament jedes Lebens, denn sie sind essenziell für die Energiegewinnung der Zellen (mitochondriale Atmungskette) und sind in zahlreichen metabolischen Prozessen involviert [38]. Der Bereich der Redoxbiologie befasst sich ausschließlich mit Oxidations- und Reduktionsprozessen in lebenden aeroben Organismen, dabei liegt ein besonderes Augenmerk auf die Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) (1.3.1) [39]. Anfangs ging man davon aus, dass die im Organismus entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies ein Nebenprodukt des aeroben Metabolismus sind, welche durch

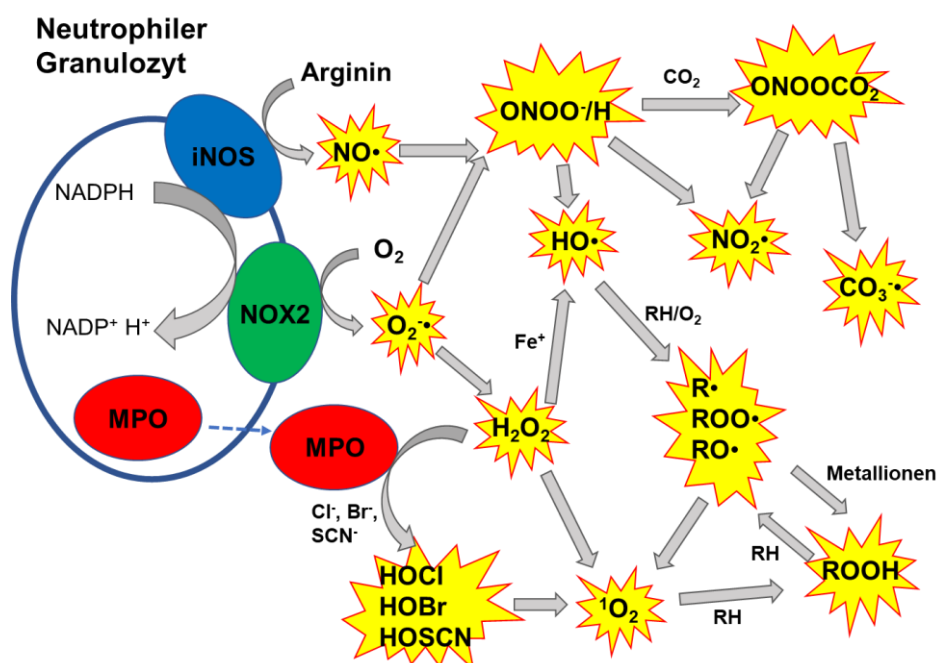
körpereigene Enzyme „Antioxidantien“ (1.3.4) neutralisiert werden, wodurch ein ausbalancierter Grundzustand „Redoxbalance“ erzielt wird. Gerät dieser Zustand aufgrund verschiedener Umwelteinflüsse oder Erkrankungen aus dem Gleichgewicht in Richtung der Oxidantien kann dies zu irreversiblen oxidativen Schäden der Proteine, Lipide und der DNA führen (1.3.5). Die Annahme das ROS generell schädlich ist hat sich inzwischen deutlich gewandelt. Die Erkenntnisse der letzten Jahre zeigten, dass ROS in der Regel keine unerwünschten Nebenprodukte sind, sondern als zelluläre Signalmoleküle essentiell für einen gesunden Organismus sind (1.3.3). Dabei spielen Redoxenzyme wie Peroxidasen und Redoxine eine wichtige Rolle, indem sie gezielt die ROS- und RNS-abhängige Oxidation von reversiblen „Redoxschaltern“ wie Thiol- und Cysteinresten an Proteinen mediiieren. Diese posttranslationalen Proteinmodifikationen können zu Aktivitätsveränderungen von Enzymen und Transkriptionsfaktoren, Bildung von Proteinaggregaten oder DNA/RNA-Proteinbindungen sowie Veränderungen der Proteinstabilität und Zell-Matrix bzw. Zell-Zell-Kommunikation führen [38, 39].

Viele Erkrankungen sind mit einer überschießenden Produktion von ROS/RNS assoziiert (1.3.6). So ist die Rolle von ROS/RNS bei Infektionskrankheiten gut erforscht, indem sie durch ihre bioziden Wirkungen zur Bekämpfung von Mikroorganismen zum Einsatz kommen. Dagegen wird die Rolle von ROS/RNS bei sterilen Entzündungen sowie Autoimmunerkrankungen stark diskutiert und ist ein Bereich intensiver Forschung. Somit haben ROS/RNS in der letzten Zeit eine breite Aufmerksamkeit als ein attraktives Therapietarget bei einer Vielzahl von Erkrankungen erfahren. Nicht nur um die Zellen und das Gewebe vor oxidativen Schäden zu bewahren, sondern auch wegen ihrer immunmodulierenden Eigenschaften.

### 1.3.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies oder abgekürzt ROS/RNS sind ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von radikal und nichtradikal Oxidantien die maßgeblich an den sauerstoffabhängigen Redoxreaktionen beteiligt sind [38]. Radikale sind chemische Verbindungen, die mindestens ein ungepaartes Elektron enthalten und dadurch chemisch hochreaktiv sind. Dazu zählen vor allem Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ), Alkoxyradikal ( $RO^{\cdot}$ ), Peroxylradikal ( $ROO^{\cdot}$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^{\cdot}$ ) und Stickstoffdioxid ( $NO_2^{\cdot}$ ). Die nichtradikalen Oxidantien, die zwei gepaarten Elektronen besitzen, umfassen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hypochlorsäure ( $HOCl$ ), Hypobromige Säure ( $HOBr$ ), Ozon ( $O_3$ ), Singulett-Sauerstoff ( $O_2^1\Delta_g$ ), Nitrit ( $NO_2^-$ ) und

Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Die nichtradikalen Oxidantien sind keine freien Radikale und an sich chemisch „stabile“ Verbindungen mit stark oxidativen Eigenschaften [39]. Darüber hinaus können viele dieser Spezies weitere Derivate mit einer anderen Reaktivität und Lebensdauer als die ursprünglichen Spezies bilden (**Abbildung 1**) [40]. Dabei bilden Superoxid und Stickstoffmonoxid die Basis für alle weiteren ROS und RNS indem sie entweder mit einander reagieren, oder wie im Falle von Superoxid durch eine spontane Reaktion oder mit Hilfe von Enzymen wie der Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Diese können wiederum zu weiteren ROS/RNS Intermediaten reagieren. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen das eine Reaktion von einem Radikal mit einem Nicht-Radikal ein anderes Radikal erzeugt [38].



**Abbildung 1: Interkonversion von ROS und RNS am Beispiel vom aktivierten Neutrophilen.** Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) Oxidase 2 (NOX2), induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), Myeloperoxidase (MPO). Abbildung nach [40].

Die einzelnen ROS/RNS Intermediate unterscheiden sich sehr stark in ihrer Reaktivität und dem daraus resultierenden Schaden. So kann  $\text{OH}\cdot$  nahezu alle Aminosäurereste von Proteinen oxidieren, während das  $\text{H}_2\text{O}_2$  hauptsächlich mit Cystein- und Selenocysteinresten reagiert (**Tabelle 1**). Auch bei der Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Spezies gibt es riesige Unterschiede. So können die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen biologisch-relevanten Oxidationsmittel mit einer festen Konzentration der Aminosäure Methionin um einen Faktor von  $>10^{10}$  variieren (**Tabelle 2**). Es kann auch enorme Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit für ein einzelnes

Oxidationsmittel mit unterschiedlichen biologischen Zielstrukturen geben. Am Beispiel der HOCl, kann die Reaktionsgeschwindigkeit mit verschiedenen Aminosäureresten der Proteine um einen Faktor von  $10^{11}$  variieren. Dagegen weist HO• kaum Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Zielstrukturen auf [40]. Des Weiteren ist die Reaktivität der einzelnen Spezies maßgeblich verantwortlich für ihre Halbwertszeit und die daraus resultierende Diffusion im Organismus, was beim Redoxsignaling und dem oxidativen Stress von großer Relevanz ist. HO• ist sehr reaktionsfreudig und besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit und weist eine Diffusion von wenigen nm auf [40, 41]. Es reagiert sofort mit den umgebenden Strukturen, wodurch die potenziellen oxidativen Schäden lokal, in der Nähe des Entstehungsorts, entstehen. Dagegen haben chemisch weniger reaktive Spezies eine längere biologische Halbwertszeit und können *in vivo* größere Entfernungen überwinden. So hat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen Diffusionsradius von bis zu 1,5 mm, zum Vergleich beträgt der Durchmesser einer normalen Zelle ca. 20 µm [40, 41]. Eine solche Diffusion hat weitreichende Auswirkungen, wodurch die Suche nach dem Mechanismus und dem Entstehungsort zusätzlich erschwert wird.

**Tabelle 1: Reaktionsstellen von ROS und RNS an Proteinen.**

Tabelle nach [40].

Oxidantien	Hauptreaktionsstellen
Hydroxylradikal (HO•)	Alle Seitenketten
Alkoxyradikal (RO•)	Die meisten Seitenketten
Hypochlorsäure (HOCl)	Cys, Met, Cystin, His, Lys, Trp, α-Aminogruppe
Singulett-Sauerstoff ( $O_2^1\Delta_g$ )	Cys, Met, Trp, Tyr und His
Peroxynitrit (ONOO <sup>-</sup> /ONOOH)	Cys, Met, Tyr, Trp, Selenocystein
Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ )	Superoxid-Dismutase, Metallionen, Fe-S, Tyr/Trp-Radikale
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Cys, Selenocystein

**Tabelle 2: Reaktivität unterschiedlicher ROS und RNS.**

Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der zweiten Ordnung von einzelnen Oxidantien mit der Aminosäure Methionin bei neutralem pH in H<sub>2</sub>O. Tabelle nach [39, 40].

Oxidantien	Geschwindigkeitskonstante (L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Hydroxylradikal (HO•)	$7 \times 10^9$

Hypochlorsäure (HOCl)	$3,8 \times 10^7$
Singulett-Sauerstoff ( $O_2^1\Delta_g$ )	$2 \times 10^7$
Ozon ( $O_3$ )	$5 \times 10^6$
Peroxynitrit ( $ONOO^-/ONOOH$ )	$3,6 \times 10^2$
Superoxidanion ( $O_2^{\bullet-}$ )	<0,3
Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )	$2 \times 10^{-2}$
Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ )	sehr langsam

### 1.3.1.1 Eigenschaften von biologisch-relevanten ROS und RNS

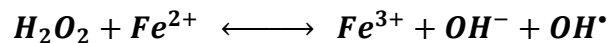
#### Superoxid

Superoxid entsteht bei physiologischen Stoffwechselprozessen im Zuge der Reduktion von molekularem Sauerstoff z.B. als Nebenprodukt in der Atmungskette aber auch durch gezielte enzymatische Prozesse wie beispielsweise die Autooxidation und die durch ionisierte Strahlung induzierte nichtenzymatische Elektronentransferreaktionen [38]. Die Hauptproduktionsquellen sind Mitochondrien und NADPH Oxidasen [42]. Weitere Superoxid-produzierende Enzyme sind Xanthinoxidasen [43], Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen (**1.3.2**) [44, 45]. Das Superoxidanion verkörpert die primäre reaktive Sauerstoffspezies und bildet den Anfang der Kaskade, gewissermaßen den „Precursor“ für weitere ROS und RNS Intermediate (**Abbildung 1**). Obwohl seine Reaktivität mit Biomolekülen in wässrigen Lösungen relativ gering ist, reagiert es sehr gut in organischen Lösungen [38]. Somit kann die Produktion von  $O_2^{\bullet-}$  in hydrophober Umgebung, z.B. in der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembranen, zu oxidativen Schäden führen. Des Weiteren reagiert Superoxid sehr schnell mit  $NO^{\bullet}$  wodurch das deutlich reaktivere Peroxynitrit gebildet werden kann. Deshalb wird der Hauptanteil von  $O_2^{\bullet-}$  in lebenden Organismen rasch von SODs zu deutlich stabileren  $H_2O_2$  umgewandelt [38].

#### Wasserstoffperoxid

$H_2O_2$  ist ein sehr starkes Oxidationsmittel mit einem Reduktionspotential ( $E^0$ ) von 1,32 V und somit sogar stärker als HOCl (1,28 V) und  $ONOO^-$  (1,2 V). Im Gegensatz zu den beiden genannten reaktiven Spezies reagiert  $H_2O_2$  schlecht oder gar nicht mit den meisten Biomolekülen (Geschwindigkeitskonstante der zweiten Ordnung ca.  $1 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), einschließlich niedermolekularer Antioxidantien. Dies liegt daran, dass eine hohe

Aktivierungsenergiebarriere überwunden werden muss um die Oxidationskraft von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu entfalten. Das heißt die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird eher kinetisch als thermodynamisch angetrieben. Allerdings gibt es Ausnahmen, so reagiert es sehr gut mit bestimmten Cysteinyresten von Peroxiredoxinen oder Selenocysteinyresten von Glutathionperoxidasen ( $10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [46]. Die neuesten Erkenntnisse zeigen, dass diese Proteine nicht nur als Antioxidantien agieren, sondern eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion erfüllen (**1.3.3**) [47-49].  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist gut wasserlöslich und kann innerhalb sowie zwischen den Zellen diffundieren. Des Weiteren kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zellmembranen mit Hilfe von Aquaporinen passieren, wodurch der Diffusionsradius weiter vergrößert wird. So kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit bestimmten Zielstrukturen weit abseits des Entstehungsortes reagieren. Aufgrund der großen Diffusion und vor allem der hohen Spezifität für biologische Targets gehört  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu den wichtigsten Signalmolekülen beim Redoxsignaling [46]. Nichtsdestotrotz können hohe Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu oxidativen Schäden von Lipiden, DNA und Proteinen führen. Vor allem durch die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Übergangsmetallen wie  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  kann es zur Bildung von hochreaktiven  $\text{HO}\cdot$  kommen. Diese Reaktion nennt man Fentonreaktion:



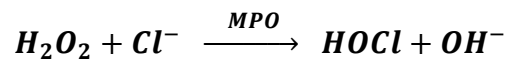
Um die Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gering zu halten wird es von Peroxidasen und Katalasen zu zwei  $\text{H}_2\text{O}$  Molekülen umgewandelt [38].

### Hydroxylradikal

$\text{HO}\cdot$  kann durch Reaktion von Metall-Ionen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder durch UV-induzierte homolytische Spaltung der O-O-Bindung in  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet werden. Weitere Quellen sind die Reaktion von  $\text{HOCl}$  mit  $\text{O}_2\cdot^-$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  oder ionisierende Strahlung (Bsp.  $\gamma$ -Strahlung) die Wasser zu  $\text{HO}\cdot$  spalten kann. So sind die entstehenden oxidativen Schäden in lebenden Organismen durch ionisierende Strahlung hauptsächlich auf die Bildung von Hydroxylradikalen zurückzuführen.  $\text{HO}\cdot$  ist das reaktivste Radikal von allen mit einem Reduktionspotential von 2,31 V, dass mit nahezu allen biologischen Molekülen reagieren kann [38].

### Hypochlorsäure und ihre Derivate

HOCl wird aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Chloranion (Cl<sup>-</sup>) durch das Enzym Myeloperoxidase (MPO), welches in Neutrophilen und Makrophagen exprimiert wird, produziert;



Es ist hochreaktiv und kann viele Biomoleküle durch Oxidation oder Chlorierung schädigen. HOCl kann die zellulären Membranen passieren und so zu Schäden an in der Zellmembran befindlichen Proteinen und Lipiden führen [38]. Es kann Seitenketten von Proteinen schädigen und damit die Fragmentierung und Aggregation von Proteinen verursachen oder durch Reaktion mit NH<sub>2</sub>-Gruppen der Proteinseitenketten auch zur Bildung von Chloraminen führen [50]. Des Weiteren kann HOCl die Metallionen aus Proteinen lösen [51, 52], die Proteinkerne extrazellulärer Glykoproteine angreifen und die extrazelluläre Matrix zerstören [53]. Es kann auch DNA- und RNA-Basen insbesondere Pyrimidin und Tyrosinreste in Proteinen chlorieren [50]. HOCl hat somit sehr starke biozide Eigenschaften und wird primär von Neutrophilen zur Bekämpfung von Mikroorganismen sezerniert [54, 55]. Neuste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass HOCl auch eine immunmodulierende Wirkung bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen hat [54, 56].

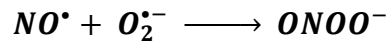
### Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid oder auch Stickoxid genannt ist ein farbloses Gas, das sich gut in Wasser und in organischen Lösungen lösen lässt. Dadurch kann NO• sehr gut durch die zellulären Membranen von Zelle zur Zelle diffundieren. NO• gehört zwar zu den Radikalen, da es ein ungepaartes Elektron besitzt, reagiert aber kaum oder sehr schlecht mit den meisten Biomolekülen. Allerdings reagiert es sehr gut mit anderen Radikalen (Geschwindigkeitskonstante der zweiten Ordnung ca. 10<sup>9</sup> bis 10<sup>10</sup> mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) [38]. So reagiert es sehr gut mit O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> wodurch das reaktivere Peroxinitrit gebildet wird. Oxidation von NO• in Wasser führt zu Bildung von Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) das in höheren Konzentrationen toxisch auf die Zellen wirkt. Dabei reagiert es mit dem Eisen des Hämoglobins wodurch die Fähigkeit des Sauerstofftransportes verlorenght. Stickstoffmonoxid wird in lebenden Organismen enzymatisch von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff synthetisiert. Die physiologische Menge an NO in Zellen liegt im Bereich von 1 bis 10 nM, kann jedoch in Ausnahmefällen zum Bsp. bei aktivierter iNOS eine Konzentration im Bereich von µM erreichen [38]. Aktivierte Neutrophile können 10-100 nmol/ 5 min/ 10<sup>6</sup> Zellen NO produzieren

[57]. NO ist zudem ein bedeutendes Signalmolekül und spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen. Vor allem im vaskulären System spielt die NO-induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur von Blutgefäßen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Blutdrucks.

### **Peroxinitrit**

Peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>) entsteht hauptsächlich durch Reaktion von NO• mit O<sub>2</sub><sup>-•</sup>;



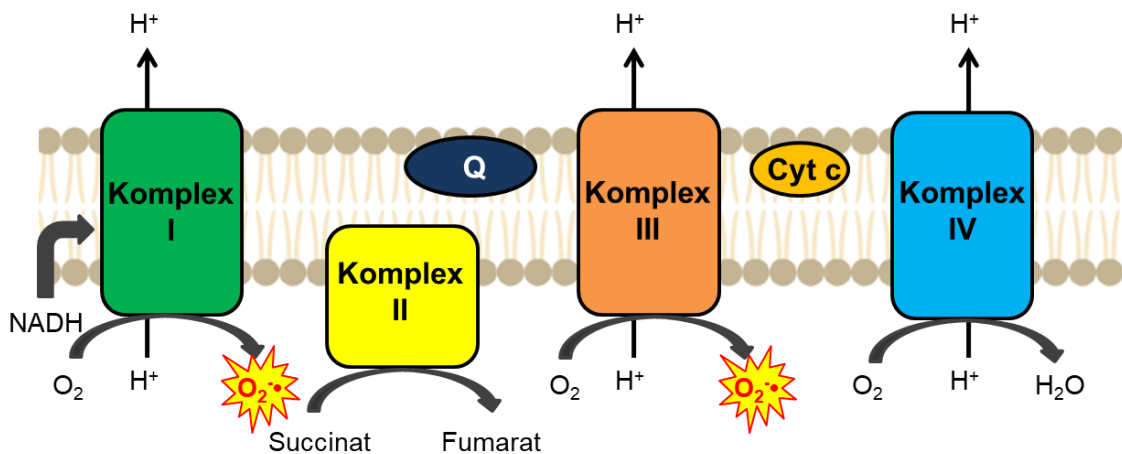
Diese Reaktion hat eine Geschwindigkeitskonstante von  $4 - 16 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und ist damit sogar größer als die von O<sub>2</sub><sup>-•</sup> mit SOD ( $1,5 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [38]. Hohe Konzentrationen von ONOO<sup>-</sup> führen zur Oxidation und Nitration von Lipiden, DNA und Proteinen sowie zu Depletion von Antioxidantien [38]. Der durch ONOO<sup>-</sup> am häufigsten verursachte Schaden an Proteinen ist die nicht reversible Umwandlung von Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin. Dies führt häufig zur Inaktivierung von Enzymen. Viele chronische und entzündliche Erkrankungen weisen erhöhte 3-Nitrotyrosinwerte auf, weshalb es auch oft als ein Biomarker für die *in vivo* ONOO<sup>-</sup> Produktion genutzt wird [58, 59]. ONOO<sup>-</sup> ist wegen seines höheren Redoxpotentials wesentlich aggressiver als seine beiden Vorläufermoleküle jedoch im Vergleich zu anderen ROS/RNS (siehe **Tabelle 2**) ein reaktiv stabiles Oxidationsmittel. Allerdings reagiert es sehr schnell mit stets vorhandenem CO<sub>2</sub> zu Nitrosoperoxycarbonat (O=NOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), welches weiter zu NO<sub>2</sub><sup>•</sup> und CO<sub>3</sub><sup>-•</sup> zerfallen kann. Beide sind hochreaktive Radikale und sind hauptverantwortlich für die oxidativen/nitrosativen Schäden von ONOO<sup>-</sup> [38]. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit (<10ms) und der hohen intrazellulären Konzentration von SODs (>10 µM), die den Großteil von O<sub>2</sub><sup>-•</sup> dismutieren, ist die basale ONOO<sup>-</sup> Konzentration relativ gering (nanomolarer Bereich). Diese kann jedoch bei aktivierten Immunzellen um zwei bis drei Größenordnungen ansteigen. Vor allem in den Phagosomen von Neutrophilen, in denen die Enzyme NADPH Oxidase (NOX) und iNOS räumlich nah beieinander liegen und die Konzentration von SOD relativ gering ist, können hohe ONOO<sup>-</sup> Konzentrationen erreicht werden. Diese können zusätzlich neben HOCl zur Bekämpfung von Mikroorganismen beitragen [59].

### 1.3.2 ROS und RNS Quellen

#### 1.3.2.1 Mitochondrien

Mitochondrien erzeugen Adenosintriphosphat durch einen elektrochemischen Protonengradienten, der durch einen Elektronentransfer durch eine Reihe von hintereinander geschalteten Redox-Molekülen erzeugt wird. Als Elektronentransportträger dienen die Enzym-Komplexe I bis IV sowie das Coenzym Q und das Cytochrom c. Diese sind räumlich in der Reihenfolge ihres zunehmenden Redoxpotentials organisiert: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinol-Cytochrom-C-Reduktase) und Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase) (Abbildung 2). Dabei werden die Elektronen von den Reduktionsäquivalenten NADH und  $\text{FADH}_2$  an molekularen Sauerstoff abgegeben der zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) reduziert wird [60]. Die Übertragung von Elektronen auf molekulares  $\text{O}_2$  ist ein streng kontrollierter Prozess. Nur 1–2 % der im Rahmen dieser Reaktion frei werdenden Elektronen reagieren mit  $\text{O}_2$ , was zur Bildung von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  führt [61]. Die Produktion von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  erfolgt hauptsächlich am Komplex I und III. Bei Skelettmuskel- und Nervenzellen überwiegend anhand von Komplex I und bei Endothelzellen überwiegend am Komplex III. Das von Mitochondrien erzeugte  $\text{O}_2^{\cdot-}$  wird rasch von Mangan-SOD in der Mitochondrienmatrix zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  dismutiert, welches wiederum die mitochondriale Außenmembran passieren kann und zu oxidativen Schäden abseits des Entstehungsortes führen kann [60].

Die mitochondriale ROS-Produktion wurde ursprünglich als ein unerwünschtes Nebenprodukt des oxidativen Metabolismus angesehen. Neuste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass das mitochondriale ROS zahlreiche Signalwege modulieren, einschließlich solcher, die Immunantworten und Autophagie regulieren. Je nach Stimulus kann die mitochondriale ROS-Produktion zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen führen, wie z. B. zelluläre Anpassung an Hypoxie, Zelldifferenzierung, Autophagie und Modulation der Immunantwort. Des Weiteren spielt der mitochondriale ROS, neben dem ROS von NOX in Immunzellen wie Makrophagen, eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen [62].

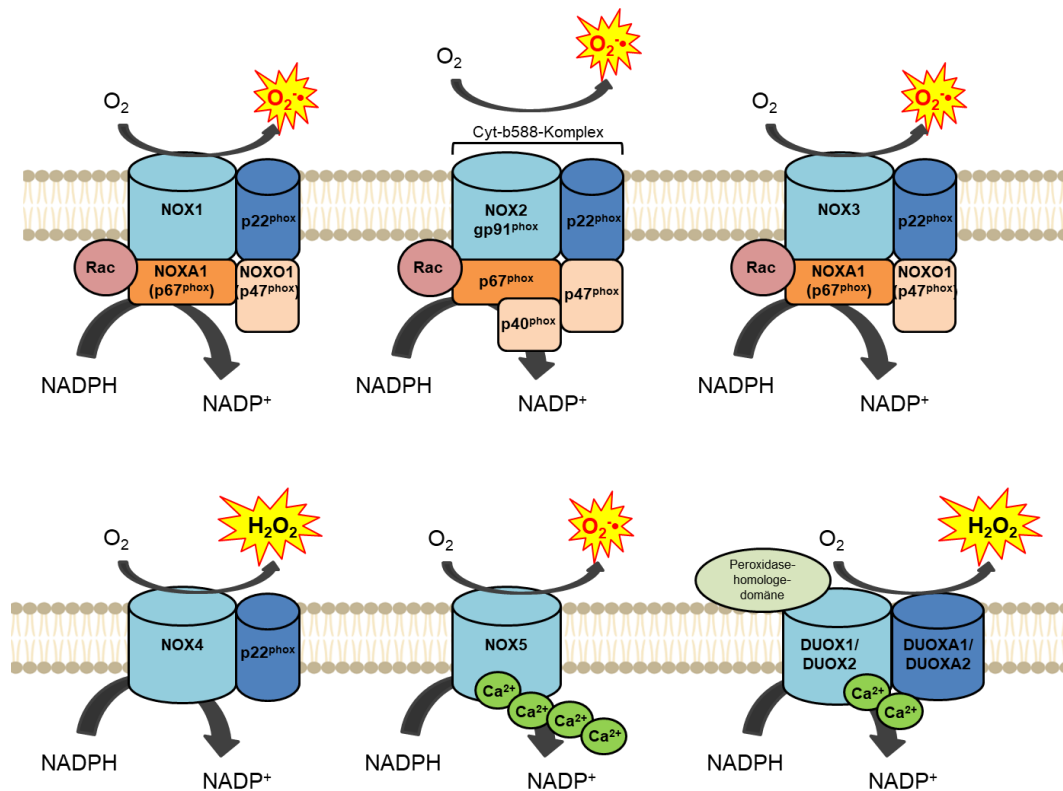


**Abbildung 2: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette und der Entstehung des Superoxid-Anions.**

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus einer Reihe von Proteinen die eine Elektronentransportkette bilden bei der die Elektronen von den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH<sub>2</sub> auf den molekularen Sauerstoff abgegeben werden der zu Wasser reduziert wird. Etwa 1-2 % des Sauerstoffs werden überwiegend am Komplex I und III nicht zu Wasser sondern zum Superoxid-Anion reduziert [61]. Q: Coenzym Q, Cyt c: Cytochrom c.

### 1.3.2.2 NADPH Oxidasen

NADPH Oxidasen sind die einzigen Enzyme deren primäre Funktion die Produktion von ROS ist. Bisher wurden sieben Isoformen der NADPH-Oxidase beschrieben, NOX1 bis NOX5 sowie die Dualoxidasen (DUOX) 1 und 2. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in ihrer Struktur, ihren Aktivierungsmechanismen und ihren Expressionsmustern in verschiedenen Geweben [63]. Der katalytische Kern der klassischen phagozytischen NADPH-Oxidase 2 (NOX2) besteht aus zwei membrangebundenen Untereinheiten, gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup>, die den Flavocytochrom-b558-Komplex bilden. Die gp91<sup>phox</sup>-Untereinheit besteht aus sechs Transmembrandomänen, darunter eine C-terminale Region welche die Bindungsstellen für Flavin-Adenin-Dinukleotid und dem Elektronendonator NADPH enthält. Alle NADPH-Oxidasen mit Ausnahme von NOX5 und DUOX1 und 2 weisen eine ähnliche topologische Struktur des katalytischen Kerns von gp91<sup>phox</sup> auf (**Abbildung 3**). NOX5 trägt eine zusätzliche intrazelluläre N-terminale Kalziumbindungsdomäne. DUOX1 und 2 tragen zudem zur katalytischen NOX5-Struktur eine weitere N-terminale Transmembran- $\alpha$ -Helix, die eine Peroxidase-homologe Domäne besitzt (**Abbildung 3**) [64].



**Abbildung 3: NOX-Isoformen und ihre regulatorischen Untereinheiten.**

NOX1-4 sind mit der membrangebundenen Untereinheit p22<sup>phox</sup> assoziiert. NOX4, NOX5 und DUOX1 und 2 benötigen für ihre Aktivität keine zytosolischen Untereinheiten. Des Weiteren ist NOX4 konstitutiv aktiv. Die Aktivierung von NOX5 und DUOX1 und 2 erfordert die Bindung von Ca<sup>2+</sup>.

NOX2 wird hauptsächlich in Phagosomen von professionellen Phagozyten wie Neutrophile, Makrophagen und Monozyten exprimiert. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist NOX2 inaktiv. Stimulation mit bestimmten Zytokinen oder mikrobiellen Peptiden aktiviert die NOX2. Dabei translozieren die zytosolischen Untereinheiten p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und Rac1 zur Plasmamembran und bilden einen Komplex mit Cytochrom-b558. Der Aufbau von zytosolischen Untereinheiten mit dem membrangebundenen Cytochrom-b558-Komplex führt zur Übertragung von Elektronen von intrazellulärem NADPH auf molekularen Sauerstoff und zur Bildung von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (**Abbildung 3**). Einmal aktiviert, produzieren Neutrophile während des oxidativen Bursts ~10 nmol/min O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pro 10<sup>6</sup> Neutrophile [65]. Die Produktion von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durch NOX2 während des respiratorischen Bursts spielt eine essentielle Rolle bei der Bekämpfung von Mikroorganismen. So können genetische Mutationen der Untereinheiten gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> oder Rac2 zu einer chronischen granulomatösen Erkrankung führen. Eine Immunschwäche, die durch eine stark erhöhte Anfälligkeit für Bakterien- und Pilzinfektionen aufgrund einer fehlenden Produktion von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> gekennzeichnet ist [66].

Im Gegensatz zu NOX2 wird NOX1 durch NOX-Organisator 1 (NOXO1) und NOX-Aktivator 1 (NOXA1) aktiviert, die homolog zu p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> sind (Abbildung 3). NOXO1 enthält keine autoinhibitorische Region und ist in den Zellen konstitutiv aktiv [67]. NOX1 wird hauptsächlich im Kolonepithel exprimiert, ist aber auch in anderen Zelltypen wie Endothelzellen, Osteoklasten, Neuronen und Mikroglia anzutreffen [68]. Die Expression von NOX3 ist ausschließlich auf das Innenohr begrenzt, wo es für die Bildung von Otolithen verantwortlich ist. NOX3 ist in der Plasmamembran lokalisiert und die Aktivierung ist wie bei NOX1 und NOX2 p22<sup>phox</sup>-abhängig (**Abbildung 3**). NOX3 zeigt eine basale Aktivität, selbst in Abwesenheit der zytosolischen Untereinheiten NOXO1 und NOXA1, welche die Aktivität weiter steigern können [67].

NOX4 wird auch als renale NADPH-Oxidase bezeichnet, da sie als erstes in den Nieren charakterisiert wurde. NOX4 ist konstitutiv aktiv und wird überwiegend durch ihren Expressionslevel gesteuert. Im Gegensatz zu NOX1, 2 und 3 ist NOX4 unabhängig von der Rac-Aktivierung oder der Anwesenheit von p47<sup>phox</sup>/p67<sup>phox</sup> oder NOXO1/NOXA1. Außerdem produziert NOX4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anstelle des für NOX-Proteine üblichen O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (**Abbildung 3**) [67]. Ein weiterer wesentlicher Unterschied von NOX4 zu NOX2 ist die Lokalisation in der Zelle. Während NOX2 in Phagosomen und Zellmembranen exprimiert wird [69], ist NOX4 hauptsächlich in den Zellmembranen von Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulum lokalisiert [70]. NOX4 wird in verschiedenen Geweben wie beispielsweise Haut, Herz, Nieren, sowie von Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten [67, 71, 72] exprimiert und gehört neben NOX2 zu den wichtigsten Proteinen die für die Bildung von ROS verantwortlich sind [73].

Nagetieren exprimieren kein NOX5. Beim Menschen ist NOX5 überwiegend in Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen anzutreffen. Die Aktivierung von NOX5 ist p22<sup>phox</sup>-unabhängig und erfolgt durch die Kalziumbindung an den N-terminalen Domänen, die vier Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen aufweisen (**Abbildung 3**) [68].

Die Dualoxidase 1 und 2 (DUOX1 und DUOX 2) wurden zum ersten Mal in der Schilddrüse identifiziert. Des Weiteren werden DUOX1 und DUOX 2 von Endothelzellen in der Lunge, dem Magen-Darm-Trakt und der Prostata exprimiert. DUOX1 und DUOX2 sind homolog zu NOX1-4, besitzen jedoch zusätzlich calciumbindende Domänen (homolog zu NOX5) sowie ein Peroxidase-ähnliche Domäne (Abbildung 3). Beide Isoformen werden durch Ca<sup>2+</sup> aktiviert und benötigen keine weiteren Aktivatoren. Ähnlich wie NOX4 produzieren DUOX1 und DUOX2 überwiegend H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [68].

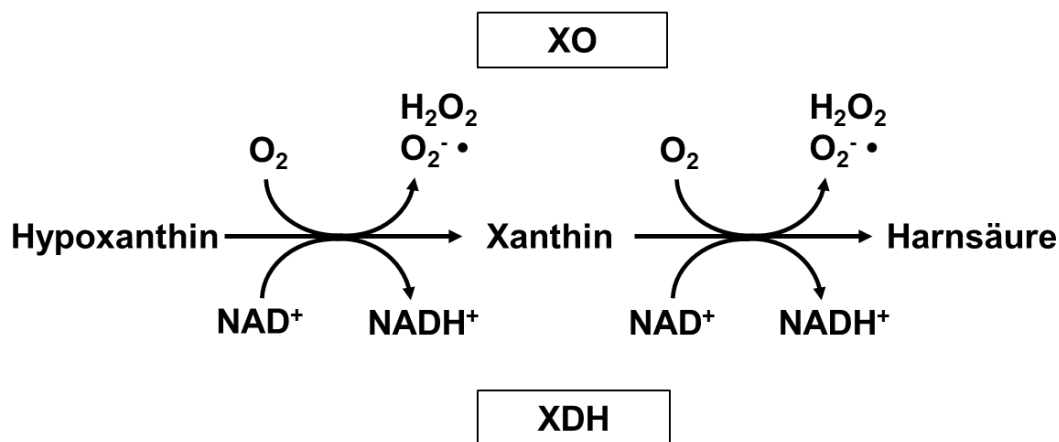
### 1.3.2.3 Stickstoffmonoxid-Synthasen

NOS sind Enzyme, die die Produktion von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin und O<sub>2</sub> katalysieren. Es sind drei Isoformen von NOS bekannt: die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). iNOS und nNOS gehören zu den löslichen Formen und sind überwiegend im Zytosol vorzufinden, dagegen liegt eNOS membrangebunden vor und ist die vorherrschende NO-Quelle in vaskulären Endothelzellen [74]. NOS existieren als Homodimere, die aus einer c-terminalen Reduktasedomäne eines Monomers bestehen, die mit der Oxygenasedomäne des anderen Monomers am N-Terminus verbunden sind. Die Reduktasedomäne bindet an NADPH, Flavinmononucleotid und Flavin-Adenin-Dinukleotid, während die Oxygenasedomäne an den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), molekularen Sauerstoff und das Substrat L-Arginin bindet. Die Elektronen werden vom gebundenen NADPH in der Reduktasedomäne auf Häm in die Oxygenasedomäne von NOS übertragen. NO wird von NOS in zwei aufeinanderfolgenden Monooxygenierungsreaktionen von L-Arginin erzeugt, die zur Bildung von L-Citrulin führen. Alle Isoformen von NOS binden Calmodulin. In nNOS und eNOS wird die Calmodulinbindung durch einen Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> (200 und 400 nM) induziert. Wenn die Calmodulin-Affinität zu NOS zunimmt, erleichtert dies den Elektronenfluss von NADPH in der Reduktasedomäne zum Häm in der Oxygenasedomäne. In iNOS bindet Calmodulin aufgrund einer anderen Aminosäurestruktur der Calmodulin-Bindungsstelle bereits bei extrem niedrigen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen (unter 40 nM) weshalb es oft als Calcium-unempfindlich beschrieben wird [75]. Für den oxidativen und nitrosativen Stress sind vor allem iNOS und eNOS verantwortlich. In nicht-aktivierten Makrophagen oder Neutrophilen ist iNOS kaum vorhanden, erst nach einer Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) von Bakterien oder proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF und IFN- $\gamma$  kommt es zu einer starken iNOS Expression. Sobald iNOS exprimiert wird, ist es konstitutiv aktiv und kann nicht durch intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> reguliert werden [75, 76]. Des Weiteren findet die iNOS-Expression bereits in einer stark oxidativen Umgebung statt. Daher können hohe NO-Konzentrationen mit Superoxid reagieren, was zur Bildung von Peroxinitrit führt, welches für die Zellen deutlich toxischer ist [59]. Dagegen wird eNOS von den Endothelzellen konstitutiv exprimiert und die Enzymaktivität überwiegend von der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert. Die eNOS-abhängige NO Produktion ist vor allem für die Vasodilatation von Blutgefäßen und die endotheliale Adhäsion von Immunzellen verantwortlich. Ein erhöhter oxidativer Stress kann jedoch zur

Entkopplung von eNOS führen. Dabei werden die Elektronen auf den molekularen Sauerstoff statt auf Arginin übertragen, was zur Produktion von  $O_2^{\bullet}$  führt und den oxidativen Stress weiter verstärkt [75].

#### 1.3.2.4 Xanthinoxidase

Xanthinoxidase ist ein lösliches Enzym mit einem hohen Molekulargewicht von 270 kD, dass die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure katalysiert. Es existiert in zwei Formen: Xanthin-Dehydrogenase und Xanthinoxidase. Xanthin-Dehydrogenase ist die überwiegende Form im Gewebe, welche  $NAD^+$  als Reduktionsmittel nutzt (**Abbildung 4**). Eine irreversible proteolytische Umwandlung von Xanthin-Dehydrogenase zu Xanthinoxidase kann durch einen ischämischen Zustand ausgelöst werden. Die Xanthinoxidase oxidiert Hypoxanthin zu Xanthin und weiter zur Harnsäure wobei  $O_2^{\bullet}$  und  $H_2O_2$  anfallen (Abbildung 4) [77]. So sind Erkrankungen wie Ischämie, Atherosklerose, Diabetes mellitus und rheumatoide Arthritis, bei denen oxidativer Stress eine wesentliche Rolle spielt, oft mit einer stark erhöhten Xanthinoxidase-Aktivität assoziiert [78].



**Abbildung 4: Xanthinoxidase Metabolismus von Harnsäure.**

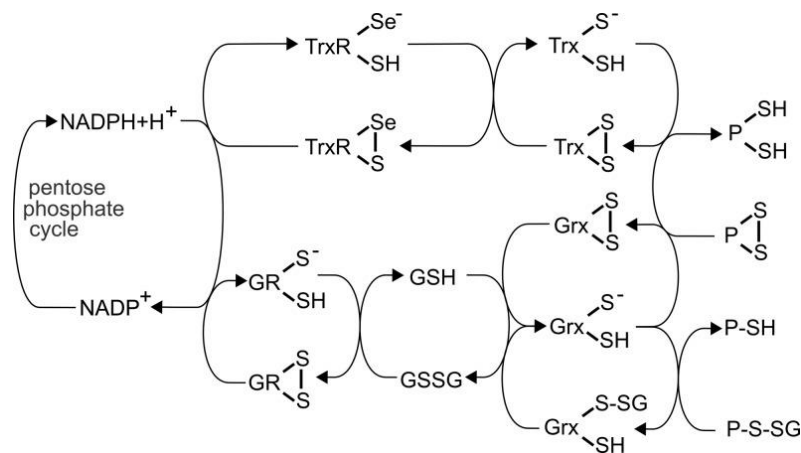
XO: Xanthinoxidase, XDH: Xanthin-Dehydrogenase, NAD: Nicotinamidadenindinukleotid. Abbildung nach [79].

### 1.3.3 Redox-Regulation und Signalwege

ROS, insbesondere  $H_2O_2$ , sind an der Redoxregulation und dem Redoxsignaling beteiligt, indem sie Proteine, Lipide und DNA modifizieren. Vor allem die Signalübertragung über Proteine, die redoxempfindliche Cysteinreste enthalten, ist mittlerweile ein etabliertes Konzept der Redoxbiologie. Die beteiligten Cysteinreste weisen häufig ungewöhnlich niedrigen pKs auf, weshalb sie unter physiologischen Bedingungen als

Thiolanionen (S-) vorliegen [47]. Sie bilden oft die aktiven Seitenketten und sind für die Bildung von tertiären und quaternären Strukturen der Proteine essenziell.  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert die Thiolanionen zu Sulfensäure (SOH) welche durch Reaktion mit einer räumlich benachbarten Thiol-Gruppe eine S-S-Brücke (Disulfid) bildet und dabei eine sehr starre kovalente Bindung herstellt, welche die Struktur und die Aktivität des Proteins verändert. Bei hohen ROS-Konzentrationen wird die Sulfensäure zu Sulfinsäure ( $\text{SO}_2\text{H}$ ) und weiter zu Sulfonsäure ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) oxidiert. Bei der letzteren handelt es sich um eine nicht reversible oxidative Modifikation [38, 48]. Eine Grundvoraussetzung für die Redoxregulation bei der Signalübertragung ist jedoch, dass sie reversibel sein muss. Dabei spielen Enzyme der Thioredoxin-Familie wie die Glutathionperoxidase (GPx), Thioredoxin (Trx), Glutaredoxin (Grx), Peroxiredoxine (Prxs), Glutathionreduktase (GR) und Thioredoxinreduktase (TrxR) eine zentrale Rolle. Die Enzyme weisen als Gemeinsamkeit eine Trx-Struktur mit Cysteinresten im aktiven Zentrum sowie eine Oxidoreduktase-Aktivität auf [49]. Die Thiolgruppen (Cysteinreste) im aktiven Zentrum sind essentiell für die Reduktion der Protein-Disulfid-Brücken um die ursprüngliche Form und Funktion des Proteins wiederherzustellen. Des Weiteren sind sie an der Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beteiligt. Damit sind die Proteine neben der Redoxsignalgebung auch an antioxidativen Abwehrprozessen maßgeblich beteiligt. Die Reduktion der Disulfid-Brücken an Proteinen wird reversibel durch die Enzyme Trx und Gpx aufgelöst, indem sie selbst eine intermolekulare S-S-Brücke bilden (**Abbildung 5**). Die Disulfidbrücke im aktiven Zentrum des Proteins von Trx wird wiederum durch das Enzym TrxR reduziert welches die Elektronen von NADPH bezieht (**Abbildung 5**). Die oxidierte Grx wird dagegen zuerst über Gluthation (GSH) reduziert wodurch ein Gluthathion-Disulfid (GSSG) gebildet wird, welches wiederum durch die GR über NADPH zu GSH reduziert wird (**Abbildung 5**) [49]. Über diesen Redoxmechanismus kann zum Beispiel die Aktivität von Proteintyrosinphosphatasen reguliert werden. Proteintyrosinphosphatasen steuern den Phosphorylierungszustand zahlreicher signaltransduzierender Proteine und regulieren somit Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Überleben, Metabolismus und Motilität. Die katalytische Region von Proteintyrosinphosphatasen beinhaltet Cysteinreste, die für eine oxidative Inaktivierung anfällig sind. Somit verringert ROS die Phosphataseaktivität und erhöht das Phosphorylierungsniveau von Proteintyrosin, wodurch die Signaltransduktion beeinflusst wird [80]. Darüber hinaus kann ROS über Proteinkinase B zur erhöhten Phosphorylierung von Forkhead-Box-Proteinen der Klasse O (FOXOs) führen. Die Phosphorylierung von FOXOs verhindert deren

Translokation in den Nukleus und damit die Transkription von Genen die für Autophagie, Proteasomeaktivität und antioxidativen Proteinen wie Katalase, SOD, GPx und Prxs verantwortlich sind [38]. Des Weiteren kann ROS den Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Weg (MAP-Kinase-Weg) aktivieren. Die MAP-Kinasen werden in drei Gruppen aufgeteilt: a) „*extracellular signal regulated kinase*“ (ERK), umfassen die Isoformen ERK-1 und ERK-2; b) p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und die c) c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK). MAP-Kinasen sind ebenfalls Enzyme die für die Phosphorylierung von zahlreichen Proteinen verantwortlich sind. Sie sind an der Zellproliferation, -differenzierung und -reaktion auf Stress beteiligt und führen zu Veränderungen in der Aktivität von Transkriptionsfaktoren und somit zur Modulation der Genexpression. Viele dieser Signalwege können gleichzeitig durch ROS/RNS aktiviert werden. So fördert die ERK-Aktivierung das Überleben der Zellen, während eine längere JNK-Aktivierung zum Zelltod durch Apoptose führt. Somit ist die Balance zwischen den beiden Signalwegen entscheidend für das Schicksal der Zelle. [38]. Weshalb die ROS/RNS Konzentration, die Halbwertszeit, die Eigenschaft der ROS/RNS Intermediate und deren intra- bzw. extrazelluläre Lokalisation eine wichtige Rolle spielen.



**Abbildung 5: Reaktionsmechanismus des Trx/Grx-Systems.**

NADPH ist der Hauptelektronendonator für das Trx-System. Es überträgt die Elektronen auf TrxR, die weiter über Trx auf das oxidierte Protein übertragen werden, wobei die S-S-Brücke aufgelöst wird und das Protein seine ursprüngliche Form und Funktion wiedererlangt. NADPH liefert ebenfalls Elektronen für das Grx-System. Elektronen werden über GR auf GSSG übertragen welches zu GSH reduziert wird. GSH dient als Kofaktor/Elektronendonator für die Reduktion von oxidiertem Grx, welches im reduzierten Zustand die Protein-Disulfid-Brücken auflöst. Glutathionperoxidase (GPx), Thioredoxin (Trx), Glutaredoxin (Grx), Glutathionreduktase (GR) und Thioredoxinreduktase (TrxR). Abbildung nach [49].

### 1.3.4 Antioxidative Systeme

Der Organismus von Säugern ist mit einer Vielzahl von Antioxidationsmolekülen ausgestattet die der Wirkung von ROS und anderen Oxidationsmitteln entgegenwirken indem sie diese neutralisieren und die Homöostase sicherstellen. Antioxidative

Schutzsysteme können in zwei Kategorien unterteilt werden: enzymatisches und nicht-enzymatisches System. Sie können auch als endogen produzierte oder exogene Antioxidantien aus der Nahrung klassifiziert werden [81, 82].

Das enzymatische antioxidative Schutzsystem umfasst SODs, Katalasen, GPxs, Prxs, und das Trx/Grx-System. Andererseits besteht das nichtenzymatische Antioxidations-system aus einer großen Anzahl von Molekülen unterschiedlicher Natur, die antioxidative Wirkungen ausüben. Diese Gruppe umfasst antioxidative Vitamine (Vitamin A, Vitamin E und Vitamin C), Carotine, Coenzym Q, Harnsäure, aus der Nahrung stammende Phenolverbindungen, Triterpensäuren und viele andere [81, 82].

### 1.3.4.1 Enzymatische Antioxidationsmechanismen

Enzyme spielen beim antioxidativen Schutzsystem die Hauptrolle und sind den niedermolekularen Verbindungen (nichtenzymatische Antioxidantien) deutlich überlegen [39, 83]. Da  $O_2^{\cdot-}$  die primäre reaktive Sauerstoffspezies darstellt, ist seine Dismutation zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid durch SODs von primärer Bedeutung. Humane SODs gibt es in drei Isoformen, die an verschiedene Cofaktoren gebunden sind: mitochondriale MnSOD, zytosolische Kupfer/Zink (CuZn)-SOD und extrazelluläre SOD (EC-SOD). SODs werden unter Bedingungen des oxidativen Stresses schnell induziert und bilden die erste Verteidigungslinie gegen freie Sauerstoffradikale [38]. Das durch die Dismutation von  $O_2^{\cdot-}$  gebildete  $H_2O_2$  wird durch Enzyme wie Katalase, GPx und Prxs weiter zu Wasser und molekularem Sauerstoff reduziert. Prxs gehören zu den häufigeren Proteinen und können bis zu 1 % des Gesamtproteins in der Zelle ausmachen. Beim Menschen sind sechs Isoformen bekannt (Prxs 1–6) die in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommen. Neben der Peroxidaseaktivität ( $H_2O_2$  Katalyse) können Prxs auch als Chaperone oder als Phospholipasen wirken [49].

GPxs gehören zu der Familie der Trx-Proteine (**1.3.3**) welche Wasserstoffperoxid, Lipoperoxide und andere organische Hydroperoxide unter Verwendung von GSH zu Wasser, bzw. zu den entsprechenden Alkoholen oder hydroxylierten Verbindungen reduzieren [38, 81-83]. Von den insgesamt acht Isotypen (GPx 1-8) spielen vor allem die GPx 1-4 eine wichtige Rolle bei der antioxidativen Abwehr. Die GPx1 ist die häufigste Form und ist beinahe in allen Zellen im Zytosol und in den Mitochondrien anzutreffen. Wohingegen die GPx2 sich überwiegend im Zytosol und im Zellkern von gastrointestinalen Epithelzellen befindet, wo es Nahrungsperoxide reduziert. GPx3 ist der einzige Isotyp, der sich ausschließlich im extrazellulären Raum und im Blutplasma befindet.

Weshalb angenommen wird, dass es eines der wichtigsten extrazellulären antioxidativen Enzyme bei Säugetieren darstellt. Dagegen ist GPx4 ein membranassoziiertes Enzym, welches die Membranen vor oxidativen Schäden schützt, indem es Phospholipidhydroperoxide reduziert [81, 82].

Das Trx/Grx-System bildet einen weiteren wichtigen antioxidativen Schutzmechanismus. Die Enzyme reduzieren überwiegend die oxidierten Thiolresten von Proteinen, ein essentieller Prozess für Redoxsignaling (**1.3.3**), können aber auch das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder andere ROS direkt neutralisieren [82]. Säugetiere weisen zwei Trx-Systeme auf: das zytosole Trx1 und TrxR1 und das mitochondriale Trx2 und TrxR2. Zusätzlich existiert eine weitere Form, das TrxR3, welche ausschließlich in den Keimzellen der Testis exprimiert wird. Bei den Grx-Proteinen wurden bis dato vier Isotypen entdeckt, Grx1, Grx2, Grx3 und Grx5. Grx1 befindet sich hauptsächlich im Zytosol, kann aber in den Nukleus oder extrazellulären Raum transportiert werden. Die Grx3 ist ebenfalls in Zytosol und Nukleus vorzufinden, während die Isotypen Grx2 und Grx5 überwiegend in Mitochondrien lokalisiert sind [83].

Das NADPH-Molekül bildet das Rückgrat des ganzen Systems. Es dient als Elektronendonator für die TrxR und GR und ist somit für die Reduktion der nachgeschalteten Enzyme/Proteine sowie die Regeneration von GSH aus GSSH verantwortlich (**Abbildung 5**) [49].

### 1.3.4.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Es gibt unzählige niedermolekulare Verbindungen, die antioxidative Eigenschaften aufweisen. Dazu zählen vor allem Vitamine, verschiedene Metaboliten und sekundäre Pflanzenstoffe. Bei den Vitaminen handelt es sich hauptsächlich um Vitamin A (Retinol), Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol). Vitamin C ist wasserlöslich und überwiegend im Zytosol und extrazellulären Raum vorzufinden, wo es Radikale wie Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) und Hydroxyl (HO•) abfängt. Dagegen ist Vitamin E aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften überwiegend in den Zellmembranen lokalisiert. Vitamin E wirkt der Lipidperoxidation entgegen, indem es ein Wasserstoffatom der Phenolgruppe an die Peroxyl-Radikale abgibt und nicht reaktive Tocopherol-Radikale bildet, wodurch die oxidative Kettenreaktion unterbunden wird [81, 82]. Des Weiteren haben viele Metaboliten wie Harnsäure, Bilirubin und Melatonin antioxidative Eigenschaften [82]. Harnsäure kann die Peroxynitrit-induzierte Proteinnitrosylierung, Lipid- und Proteinperoxidation verhindern, indem es freie Radikale abfängt und

Übergangsmetall-Ionen wie  $\text{Fe}^{2+}$  chelatiert [84]. Studien haben gezeigt, dass Melatonin eine direkte und indirekte antioxidative Wirkung hat. Es kann einerseits das Elektronen-„Leakage“ in der Atmungskette reduzieren wodurch weniger Radikale gebildet werden. Andererseits kann Melatonin selbst als Radikalfänger agieren. Dabei kann ein Melatoninmolekül bis zu 10 ROS-Moleküle neutralisieren [82, 85]. Bei den Antioxidantien, die über die Nahrung aufgenommen werden, handelt es sich hauptsächlich um sekundäre Pflanzenstoffe wie Carotinoide und Polyphenole. So kann  $\beta$ -Carotin mit Superoxid, Peroxyl- und Hydroxyl-Radikalen reagieren oder die ROS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung und somit die IL-6 und TNF Produktion inhibieren [81]. Polyphenole wie Flavonoide wirken ebenfalls als Radikalfänger oder Chelatoren. Ihre antioxidative Wirkung hängt vor allem von der Anzahl und der Anordnung der Hydroxylgruppen ab [82].

### 1.3.5 Oxidativer Stress

Das Konzept des oxidativen Stresses wurde erstmals von Helmut Sies 1985 als „Störung des Prooxidant-Antioxidant-Gleichgewichts zugunsten des Ersteren“ formuliert [39, 86]. Beim oxidativen Stress übersteigt die Menge an ROS/RNS die Kapazitäten der antioxidativen Schutzmechanismen wodurch oxidative Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen entstehen. Das führt zu Aktivierung von stressinduzierten Transkriptionsfaktoren, zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bis hin zum Zelltod. ROS/RNS kann die DNA schädigen indem es Einzel- oder Doppelstrangbrüchen verursacht und somit zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führt. Modifikationen an Purin und Pyrimidin sowie Basendeletionen können Mutationen im Genom auslösen, was zur Fehlfunktion von Proteinen führen kann. Die am meisten beobachtete und untersuchte ROS-induzierte Modifikation von DNA ist die Oxidation von Guanin zu 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG). Viele Krebserkrankungen sind mit erhöhten Konzentrationen an 8-OHdG assoziiert. Eine mögliche Ursache wie 8-OHdG zur Karzinogenese beiträgt ist die veränderte Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promoterregionen, was zu Beeinträchtigungen der Genexpression und des Metabolismus führen kann. Des Weiteren kann es bei der Exzision von 8-OHdG durch 8-Oxoguaninglykosylase (OGG1) zu einer fehlerhaften Baseninsertion kommen und somit zu einer Mutation des Genprodukts [87, 88].

Neben der DNA sind vor allem die Lipide in Form von ungesättigten Fettsäuren anfällig gegenüber ROS/RNS. Wenn Fettsäuren mit einem Radikal reagieren entstehen Fettsäureradikale. Diese können weiter mit Sauerstoff zu Lipidperoxyradikalen ( $\text{LOO}\cdot$ )

reagieren, welche wiederum mit anderen Fettsäuren reagieren können und so eine Kettenreaktion auslösen [38]. Es sei denn, diese wird durch Antioxidantien wie  $\alpha$ -Tocopherol gestoppt. Das Endprodukt der Lipidperoxidation sind Aldehyde wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal, die auch als Marker für oxidativen Stress genutzt werden können [47]. Ersteres kann ebenfalls zur Karzinogenese beitragen indem es mit der DNA reagiert und Addukte wie Deoxyguanosin und Deoxyadenosin bildet [89]. Exzessive Lipidperoxidation kann die zellulären Membranen schädigen und zum Zelltod führen. Diesen Prozess nennt man Ferroptose [90].

Da Proteine der Hauptbestandteil (abgesehen von Wasser) der Zellen sind, bilden sie das „Hauptangriffsziel“ für ROS/RNS [91]. Die reversible Oxidation von Proteinen, überwiegend von Thiolgruppen, spielt eine zentrale Rolle beim Redoxsignaling (**1.3.3**). Allerdings können hohe Konzentrationen von ROS/RNS auch zur irreversiblen Oxidation der Thiolreste und damit zu Fehlfunktion von Proteinen führen. Die Oxidation von Proteinen kann zu deren Konformationsänderung, Änderung der Bindungskapazität, Fragmentierung der Seitenketten und zu erhöhter Anfälligkeit für Proteasen führen [40].

Um den oxidativen Stress entgegenzuwirken und um mögliche Schäden zu vermeiden, reagieren die Zellen mit einer erhöhten Expression von Antioxidans-Proteinen (**1.3.4**). Der Transkriptionsfaktor Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) spielt dabei eine zentrale Rolle. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird NRF2 durch Keap1 und Cullin 3 im Zytoplasma gehalten und ubiquitiniert, worauf es durch Proteasomen schnell abgebaut wird. Beim oxidativen Stress werden die redoxsensitiven Cysteine in Keap1 oxidiert, wodurch die Degradation von NRF2 unterbunden wird. Woraufhin NRF2 in den Nukleus translozieren kann, wo es an einen DNA-Promotor bindet und die Transkription von antioxidativen Genen und deren Proteine initiiert. Dazu zählt vor allem die Produktion und Regeneration von GSH und NADPH, sowie die Expression von zahlreichen antioxidativen Proteinen wie TrxR1, Gpx, SOD, Sulfiredoxin 1 und Hämoxxygenase 1 (HO-1) [92, 93].

### **1.3.6 ROS und RNS bei Entzündungen**

Wie bereits beschrieben, abhängig von der ROS/RNS-Quelle, der Eigenschaften der ROS/RNS Intermediate, deren Halbwertszeit und deren intra-/extrazellulären Lokalisation ist ROS an normalen physiologischen Prozessen beteiligt, kann aber auch zu maladaptiven Reaktionen beitragen, die zu Stoffwechselstörungen und

Entzündungsreaktionen führen können. Viele entzündliche und chronische Erkrankungen wie Arteriosklerose, Diabetes mellitus und Apoplex sind mit erhöhter ROS/RNS Produktion und oxidativen Stress assoziiert [38, 47].

Übersteigt die ROS/RNS Produktion die antioxidative Kapazitäten der Zelle, kommt es zu oxidativen Schäden der Lipide, Proteine und der DNA was den Abbau der extrazellulären Matrix „*extracellular matrix*“ (ECM) und zum Zelltod führen kann (1.3.5). Nekrotische Zellen und geschädigte ECM setzen wiederum verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre Moleküle frei, die als DAMPs wirken, welche wiederum von verschiedenen PRRs wie TLRs und NLRs erkannt werden wodurch eine Entzündungskaskade ausgelöst werden kann [94, 95]. Die durch TLRs induzierte natürliche Immunreaktion werden hauptsächlich durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und in geringerem Maße durch MAPKs und andere Transkriptionsfaktoren, AP-1 und IRFs vermittelt [94]. Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs spielt eine zentrale Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort und ist kritisch für die Entstehung einer Entzündungsreaktion in dem es die Regulation von zahlreichen pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und Adhäsionsmolekülen steuert (1.5). Außerdem hat ROS einen direkten Einfluss auf die Aktivierung und Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs indem es die redoxsensitiven Thiolreste der einzelnen NF- $\kappa$ B Transkriptionsdomänen oxidiert. So kann ROS im Zytosol die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  inhibieren wodurch die Aktivierung und Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern verbessert wird. Andererseits reduziert die Oxidation von NF- $\kappa$ B Untereinheiten deren Bindungspotential an die DNA wodurch die Transkription gehindert wird. Daher können die Effekte von reaktiver Sauerstoffspezies auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Genexpression sehr variabel und divergent sein [38, 80]. Zusätzlich führt oxidativer Stress zu einer stärkeren Expression von TLR4 auf der Zellmembran und erhöht somit die Sensitivität gegenüber dessen Liganden wodurch die Entzündungskaskade verstärkt werden kann [94, 96, 97].

Des Weiteren kann ROS/RNS NLR-abhängige Inflammasomen, welche eine Schlüsselrolle bei den Entzündungsreaktionen spielen, modulieren und aktivieren [94]. Inflammasomen sind zytosolische Multiproteinkomplexe welche die Vorstufen der pro-inflammatorischen Zytokine pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 durch Caspase 1 abhängige proteolytische Spaltung zu IL-1 $\beta$  und IL-18 prozessieren [98]. Dabei scheint die mitochondriale ROS-Produktion eine zentrale Rolle zu spielen. Zahlreiche exogene und endogene Aktivatoren von NLRP3 verursachen Störungen des mitochondrialen Membranpotentials was mit einer erhöhten ROS-Produktion durch die Atmungskette

einhergeht. Dies führt zur Oxidation der mitochondrialen DNA und zu deren Freisetzung ins Zytoplasma wo es an NLRP3 bindet und aktiviert [94, 98-100].

Ein weiterer Mechanismus wie ROS/RNS die Entzündungsreaktion beeinflussen kann ist die Regulation von Adhäsionsmolekülen. So hat Stickstoffmonoxid eine entzündungshemmende Wirkung, indem es beispielsweise die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen hemmt, wodurch die Adhäsion von Neutrophilen und anderen Immunzellen reduziert wird [101]. Dagegen scheint  $H_2O_2$  entzündungsfördernde Eigenschaft zu haben, indem es die Expression von ICAM-1 und P-Selektin auf Endothelzellen steigert und somit die feste Adhärenz von Neutrophilen verstärkt [102, 103]. Die gesteigerte ROS Produktion infolge der Akkumulation von Neutrophilen am Entzündungsort hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Integrität des endothelialen Zellverbandes. ROS in Kombination mit pro-inflammatorischen Zytokinen (wie TNF) und Chemokinen führt zur Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen, wodurch das Endothel permeabel wird und weitere Immunzellen zum Ort der Entzündungsreaktion einwandern können. Die eingewanderten Immunzellen helfen nicht nur bei der Bekämpfung von Pathogenen, sondern können auch im Falle von sterilen Entzündungen zu Zell- und Gewebeschäden führen [60].

### **1.4 NETs**

Die Bildung von NETs wurde zum ersten Mal im Jahr 2004 beschrieben, als eine neuartige Strategie von Neutrophilen zur Bekämpfung verschiedener Pathogene. NET-Strukturen bestehen aus dekondensiertem Chromatin, ausgestattet mit antimikrobiellen Peptiden und Enzymen wie Neutrophilen-Elastase (NE), Cathepsin G, MPO und Defensine, die von aktivierten Neutrophilen als Reaktion auf Infektionen und Entzündungen freigesetzt werden. Sie sind in der Lage Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten extrazellulär zu binden um deren weitere Ausbreitung im Organismus einzudämmen. Neuere Studien zeigen allerdings die zunehmende Relevanz von NETs in der Pathogenese im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen, Autoimmunität und Krebs [3]. Es wird zwischen zwei Arten von NET-Bildung unterschieden: einmal die klassische „suizidale“ NETose bei der die Neutrophile absterben und die alternative „vitale“ nicht-lytische NETose bei der die Zellen weiterhin lebensfähig sind. Bei der klassischen NETose kommt es zu einer veränderten Aktindynamik und Depolarisation von Neutrophilen, wodurch sich die zelluläre und granuläre Membran auflöst und sich das Chromatin, zusammen mit den granulären Proteinen als NETs im extrazellulären Raum entfaltet

[104, 105]. Diese Art von NETose bildet die überwiegende Form der NET-Bildung und tritt in der Regel über 3 bis 4 Stunden nach Neutrophilen-Aktivierung auf [105]. Auf der anderen Seite findet die vitale NETose sehr schnell, innerhalb von 5 bis 60 min statt [106]. Dabei wird die nukleäre DNA, in Vesikeln verpackt, in den extrazellulären Raum exportiert, indem sich auflösen und somit das Chromatin freigesetzt wird, ohne dabei die Integrität der Zellmembran oder des Nukleus zu zerstören [106]. Beide Formen der NETose können sowohl die nukleäre wie auch die mitochondriale DNA beinhalten [107]. Allerdings hängt die Art der NET-Bildung und die Komposition der NETs sehr stark von der stimulierenden Substanz oder dem stimulierenden Mikroorganismus ab [108].

Der genaue Mechanismus der NET-Bildung ist noch nicht vollständig aufgeklärt und Teil intensiver Forschung. Es gibt zahlreiche Aktivatoren sowie Mechanismen der NET-Bildung, die sich in der Effektivität, Kinetik und der Morphologie unterscheiden. Die NADPH Oxidase-abhängige NET-Bildung ist dabei die am besten untersuchte. Eine Behandlung der Neutrophilen mit Phorbol-12-myristat-13-Acetat (PMA), einem Diacylglycerin-Mimetikum, führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C [109], die über den Raf-MEK-ERK Signalweg die NADPH Oxidase-abhängige ROS Produktion aktiviert [110]. ROS stimuliert die MPO wodurch die NE aus den azurophilen Granula in das Zytoplasma entlassen wird. Die NE transloziert weiter zum Nukleus wo es die Histone proteolytisch spaltet was zu einer Expansion des Chromatins führt. Dabei binden die NE und die MPO an das Chromatin was dessen Dekondensation weiter vorantreibt bis es zur Auflösung der nuklearen Membran, Zelllyse und schließlich dem Entfalten der NETs kommt [3, 111].

Bestimmte Trigger von NETs wie z.B. das Calcium-Ionophor A23187, können NET-Bildung auch unabhängig von der NADPH Oxidase auslösen [112]. Dabei scheint das Enzym „*peptidyl arginine deaminase 4*“ (PAD4) eine zentrale Rolle zu spielen, indem es die Histone citrulliniert und dadurch die Dekondensation des Chromatins auslöst [112].

Neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften können NETs die inflammatorischen Zytokine entweder direkt oder indirekt über andere Immunzellen regulieren. So können NETs im frühen Stadium der Atherosklerose die Transkription von IL-6 und IL-1 $\beta$  in Makrophagen induzieren und so die Rekrutierung von weiteren myeloiden Zellen verstärken [113]. Auf der anderen Seite können NETs anti-inflammatorisch wirken, indem die NETs-assoziierten Proteasen pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine

degradieren [114]. Des Weiteren können NETs zytotoxisch sein und das Gewebe schädigen. So kann das erhöhte Vorkommen von freizirkulierenden Histonen die Zellmembranintegrität beeinträchtigen und die Epithel- und Endothelzellen direkt abtöten [115], während die Defensine und die NE zur Zellyse und Degradation der Extrazellulären Matrix führen können [116, 117].

NETs sind mit vielen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) [118], rheumatoide Arthritis [119] und Psoriasis vulgaris [120, 121] assoziiert. Dabei können die intrazellulären Proteine wie die Histone und MPO als Selbstantigene fungieren und so zur Bildung autoreaktiver Antikörper beitragen [119, 122]. So zeigen Untersuchungen der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten eine erhöhte NET-Bildung bei den Neutrophilen sowie erhöhte Antikörpertiter gegen citrullinierte Proteine [119, 123]. Dagegen geht eine Inhibition oder Defizienz von PAD4 in experimentellen Modellen der rheumatoiden Arthritis mit einer verringerten Entzündungsreaktion und verringerten Antikörpertitern einher [124, 125]. Interessanterweise zeigen Neutrophile von SLE-Patienten eine starke Typ-I-Interferon (IFN- $\alpha$ ) getriebene Genexpression. Im Rahmen von Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass NETs hierbei eine entscheidende Rolle spielen, indem sie über TLR7 und TLR9 die plasmazytoide DCs aktivieren, welche die Expression von IFN- $\alpha$  fördern und so die Autoimmunerkrankung vorantreiben [126, 127]. Dabei ist die mitochondriale ROS Produktion von zentraler Bedeutung. Oxidierte DNA ist resistenter gegenüber Nukleasen und verstärkt zusätzlich die IFN- $\alpha$  Induktion über die Aktivierung von Transmembranprotein 173 (TMEM173), ein Stimulator von Interferon-Genen (STING) [107, 128].

Somit können NETs die Immunantwort auf unterschiedliche Weise modulieren und repräsentieren somit ein attraktives Therapietarget für eine Vielzahl von Erkrankungen dar.

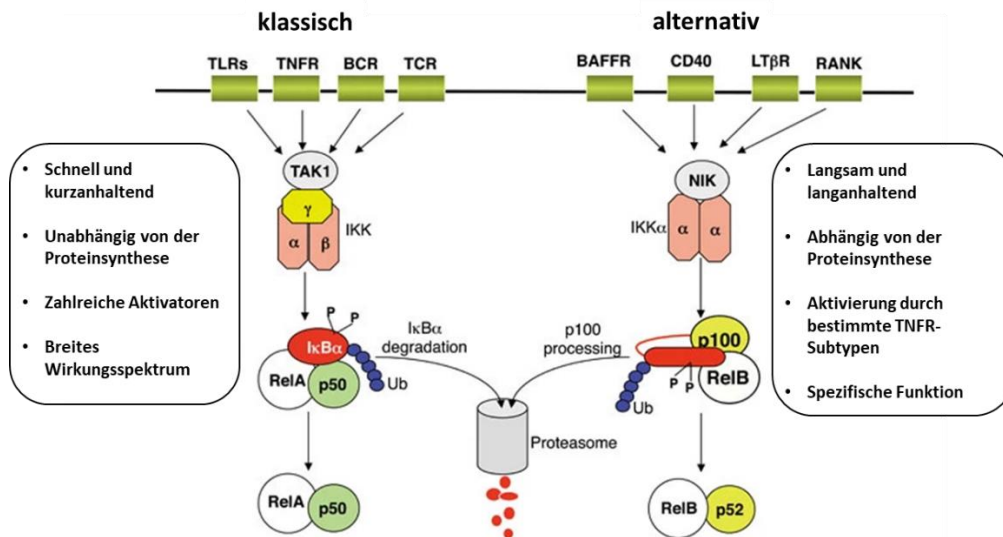
### 1.5 NF- $\kappa$ B Signalweg

NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von Genen reguliert, die an verschiedenen Prozessen des Immunsystems beteiligt sind. Der Signalweg besteht aus fünf strukturell verwandten Untereinheiten, darunter NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel, welche als Homo- oder Heterodimere an spezifische Abschnitte der DNA, die sogenannten „ *$\kappa$ B sites*“ binden und so die Transkription von bestimmten Zielgenen vermitteln [129, 130]. [129, 131]. Der NF- $\kappa$ B-Signalweg wird in den klassischen

und den alternativen Signalweg unterteilt. Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg reagiert auf zahlreiche Stimuli, darunter Liganden verschiedener Zytokinrezeptoren, TLRs, Mitglieder der TNF-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie sowie T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren [132]. Die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor initiiert eine Reihe von Signalkaskaden, die zur Aktivierung und Formation des IKK-Komplexes führen, der aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  (NEMO) besteht (**Abbildung 6**). Der IKK-Komplex phosphoryliert I $\kappa$ B $\alpha$  an zwei N-terminalen Serinresten, was zu dessen Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau führt. Dadurch können die Heterodimere, meistens p50/RelA und p50/c-Rel, in den Zellkern einwandern und an die  $\kappa$ B-Bindungsstellen binden und die Transkription von bestimmten NF- $\kappa$ B-Zielgenen aktivieren. Die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs erfolgt sehr schnell, ist jedoch nur von kurzer Dauer, da dessen Aktivierung auch die Expression von inhibitorischen Untereinheiten wie die I $\kappa$ B $\alpha$ , A20 und p50 (Vorläuferprotein p105) induziert und auf diese Weise einen negativen Rückkoppelungsmechanismus bildet [133]. Das Ergebnis auf der Transkriptionsebene hängt stark von den aktivierten Rezeptoren als auch der Kombination der verschiedenen NF- $\kappa$ B-Dimeren ab [130, 132]. Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei der angeborenen Immunität und ist für das Überleben der Zellen, die Zell-Differenzierung,-Proliferation und Apoptose mitverantwortlich [134-137].

Im Gegensatz zum klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg reagiert der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg selektiv nur auf eine bestimmte Gruppe von TNFR-Superfamilie, wie Lymphotoxin-beta Rezeptor (LT $\beta$ R), „*B cell activation factor receptor*“ (BAFFR), CD40 und „*rezeptor activator of NF- $\kappa$ B*“ (RANK) [138]. Die Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs beruht auf den proteosomalen Verdau des NF- $\kappa$ B2-Vorläuferproteins p100 zu p52 und ist I $\kappa$ B unabhängig (**Abbildung 6**). Eine zentrale Rolle spielt dabei die NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase (NIK), die unter normalen physiologischen Bedingungen durch die „*TNFR-associated factor 3*“ (TRAF3)-abhängige Ubiquitinierung proteosomally abgebaut wird. Bei der Aktivierung wird TRAF3 durch die E3 Ubiquitinligase cIAP abgebaut, was zu Akkumulation von NIK im Zytoplasma führt. NIK zusammen mit IKK $\alpha$  phosphoryliert p100 was dessen Ubiquitinierung und Prozessierung initiiert [137, 138]. Die Prozessierung von p100 zu p52 erfolgt durch den Abbau der C-terminalen, I $\kappa$ B-ähnlichen Struktur. Das freie p52 kann so in den Zellkern einwandern und dort den NF- $\kappa$ B-Komplex p52/RelB bilden und so die Transkription von bestimmten Zielgenen initiieren [137, 138]. Der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt vor allem bei der Entwicklung der sekundär und tertiär lymphoiden Organen und der Reifung von

Thymusepithelzellen (TECs), welche essentiell für die Entwicklung von T-Zellen sind, eine wesentliche Rolle [137, 139-141]. Des Weiteren scheint der NF- $\kappa$ B2 Signalweg einen großen Einfluss auf die adaptive Immunantwort als auch im Rahmen von zahlreichen chronisch-entzündlichen Erkrankungen zu haben [137, 142].



**Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs.**

Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg wird durch zahlreiche Stimuli aktiviert. Die Aktivierung führt zu Formation des IKK-Komplexes und die IKK-vermittelte I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung. I $\kappa$ B $\alpha$  wird anschließend proteasomal abgebaut, wodurch die Heterodimere RelA/p50 in den Zellkern translozieren und so die Transkription von bestimmten Zielgenen initiieren. Der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg beruht auf der Prozessierung von p100. Diese wird durch die Signalübertragung von einer Untergruppe der TNFR-Familie ausgelöst. NIK-IKK $\alpha$  vermitteln eine anhaltende Aktivierung durch den RelB/p52-Komplex. Abbildung nach [131].

### 1.5.1 Der Einfluss des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf das Immunsystem

Die meisten Prozesse des angeborenen Immunsystems hängen direkt oder indirekt mit der Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zusammen. Zahlreiche Studien haben demonstriert, dass Mäuse mit einem Doppelknockout in RelA/TNFR1 oder IKK $\beta$ /TNFR1 eine höhere Anfälligkeit für bakterielle Infektionen aufweisen [143-145]. Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, DCs und Neutrophile exprimieren auf ihrer Zellmembran unterschiedliche PRRs (TLRs und NODs) die Bestandteile von Mikroorganismen (PAMPs) oder intrazelluläre und extrazelluläre Moleküle von zerstörten Zellen (DAMPs) erkennen. Die Stimulation von PRRs führt zu Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs wodurch die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN- $\gamma$ , sowie zahlreichen Chemokinen und antimikrobiellen Proteinen wie Defensine induziert werden. Zytokine wie

TNF und IL-1 $\beta$  die in der Lage sind lokale sowie systemische Entzündungsreaktionen auszulösen, führen wieder zur Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, wodurch die Entzündungsreaktion und Zytokinproduktion verstärkt werden [137]. Des Weiteren reguliert NF- $\kappa$ B die Expression von Adhäsionsmolekülen sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen, wodurch die Extravasation von Leukozyten aus dem Blutkreislauf zum Entzündungsort ermöglicht wird [146-148]. So ist die Rekrutierung von zirkulierenden Neutrophilen zum Entzündungsort in TNFR1/RelA-defizienten Mäusen stark beeinträchtigt [144]. Des Weiteren, reguliert der klassische NF- $\kappa$ B Signalweg das Überleben und die Funktion von Neutrophilen unter den relativ toxischen Bedingungen am Entzündungsort [149].

Ein weiterer Aspekt, wie der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg die angeborene Immunantwort moduliert, ist die Regulation von ROS/RNS produzierenden Enzymen wie z.B. iNOS, nNOS, XO, sowie verschiedene NADPH Oxidasen (NOX1, NOX2, NOX4) [150, 151]. Dabei haben die resultierenden ROS/RNS Intermediate wiederum einen Einfluss auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B [151] (**1.3.6**). Enzyme wie Cyclooxygenase-2 und Lipoxygenase-5 und -12, die für die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen verantwortlich sind, werden ebenfalls vom klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert [151]. Prostaglandine und Leukotriene gehören zu der Gruppe von Eicosanoiden. Eicosanoide sind oxidierte ungesättigte Fettsäuren mit einer hormonähnlichen Wirkung die als intra- wie auch extrazelluläre Signalmoleküle fungieren und an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. Dazu gehört vor allem die Regulation von Entzündungsreaktionen [152]. Des Weiteren reguliert der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die vor allem lokal am Entzündungsort eine essentielle Rolle spielen, indem sie das Kollagen im Gewebe spalten und das Einwandern von Immunzellen zum Entzündungsort ermöglichen, sowie bei der Bildung von neuen Gefäßen (Angiogenese) [153, 154].

Neben der Initiation der Entzündungsreaktion ist der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg auch an dessen Regression beteiligt, indem es das Zytokinmilieu moduliert, die Polarisation von Makrophagen beeinflusst oder die Proliferation von NK-Zellen hemmt wird [132, 155]. Abhängig vom intrinsischen NF- $\kappa$ B-Signaling, sowie dem umgebenden Zytokinmilieu, können Makrophagen zum pro-inflammatorischen (M1) oder anti-inflammatorischen (M2) Typ differenzieren [132]. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) des

M2 Typs weisen eine Überexpression der p50 Untereinheit auf; dessen Homodimere wirken vor allem inhibierend auf den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg [156].

Neben der angeborenen Immunantwort reguliert der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg auch viele Prozesse der adaptiven Immunantwort, wie die Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Effektorfunktion von T-Zellen [132]. Die Stimulation von T-Zellen über den TCR und CD28 führt zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Komplexe mit RelA, gefolgt von einer verzögerten und anhaltenden Aktivierung über den c-Rel-Komplex [132, 157, 158].

Aktivierte T-Zellen proliferieren sehr stark und sind dadurch auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität zum Schutz vor Apoptose sowie zur Produktion von Zytokinen stark angewiesen, insbesondere auf IL-2, welches die Proliferation und Differenzierung vorantreibt. So führt eine Blockade im klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg in aktivierten T-Zellen zum Aktivierungs-induzierten Zelltod oder zur Apoptose [132, 159], während T-Zellen mit einem Knockout in c-Rel nicht in der Lage sind zu proliferieren und IFN- $\gamma$  zu produzieren, was auf eine fehlende Expression von IL-2 zurückzuführen ist [160].

Die Differenzierung von Th0 T-Zellen zu Th1, Th2, Th17 oder Tregs ist abhängig von zahlreichen Transkriptionsfaktoren wie T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t und Foxp3, welche wiederum zum Teil durch den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg beeinflusst werden. So regulieren die NF- $\kappa$ B-Untereinheiten RelA und c-Rel unter anderem die Th1-Differenzierung und die Produktion von IFN- $\gamma$ , sowie die Expression von ROR $\gamma$ t welches die Differenzierung von Th17 Zellen vorantreibt [132, 161-163]. Dagegen sind die Untereinheiten p50 und Bcl-3 essenziell für die Expression von GATA3 und die Differenzierung zu Th2 Zellen [132, 164]. Die Differenzierung und Funktion von Tregs scheint ebenfalls stark vom klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg abhängig zu sein, da dieser die Expression von Foxp3 reguliert [165]. Zudem wurde in einer Studie gezeigt, dass RelA eine wichtige Rolle bei der Stabilität und der anti-inflammatorischen Funktion von Tregs spielt [166].

Obwohl die Entwicklung von B-Zellen hauptsächlich vom alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert wird (siehe **1.5.2**), hat der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg vor allem einen Einfluss auf deren Proliferation und Aktivierung [132].

Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg ist beinahe an allen Prozessen des Immunsystems beteiligt und wird deshalb mit zahlreichen Erkrankungen, wie Krebs, Autoimmunerkrankungen und Immundefizienz in Verbindung gebracht [137].

### 1.5.2 Die Rolle des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs im Immunsystem

Wie bereits unter (1.5) erläutert, wird der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg nur von einer bestimmten Klasse von Stimuli aktiviert, was auf eine sehr spezifische Funktion im Immunsystem hindeutet.

Eine der wichtigsten Funktionen des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs ist die Entwicklung und die Organisation der sekundär lymphatischen Organe (SLOs), wie Lymphknoten, Milz und die Peyer-Plaques, wodurch er einen direkten Einfluss auf die adaptive Immunantwort hat [141]. SLOs bilden eine dreidimensionale Matrix aus Retikulumzellen in denen Lymphozyten wie T- und B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und DCs miteinander interagieren können um eine angemessene adaptive Immunantwort auszulösen. Die Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs über die Lymphotoxinrezeptor ist essentiell für die Reifung von Mesenchym- und Stromazellen und die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen die zur Bildung und Funktion der SLOs benötigt werden [137, 167]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Mäuse bei denen der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg beeinträchtigt ist, eine Störung in der Architektur der SLOs aufweisen, wie z.B. das Fehlen von Keimzentren und Marginalzonen bis hin zum vollständigen Fehlen von Lymphknoten wie bei der lymphoplasia (Aly/Aly) Maus [168-170]. Keimzentren sind spezialisierte Mikrostrukturen, die sich in SLOs bilden und langlebige Antikörper-sezernierende Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen produzieren, die vor einer Reinfektion schützen können. Innerhalb der Keimzentren findet die Selektion sowie die klonale Expansion von aktivierten B-Zellen statt. Zudem finden hier der Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zellen sowie die somatischen Mutationen des B-Zellrezeptors statt [171]. Dagegen bilden die Marginalzonen einen Zugang zu den Lymphfollikeln, indem sie den Zufluss von Antigenen, APCs und Lymphozyten ermöglichen und somit eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Antigenen spielen [172]. Mäuse mit einem Knockout im alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg sind weniger resistent gegenüber viralen Infektionen. So sind B-Zellen von Aly/Aly Mäuse, die eine Mutation im NIK haben und deshalb eine Störung in der Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs aufweisen, nicht in der Lage Virus-spezifische IgG Antikörper zu produzieren [168]. Während NF- $\kappa$ B<sup>2-/-</sup> Mäuse, die kein p100/p52 exprimieren, eine gestörte T-Zell-abhängige Immunantwort aufweisen aufgrund des fehlerhaften Primings von T-Zellen [173]. Des Weiteren orchestriert der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg die Organisation der tertiär lymphatischen Organe (TLOs). TLOs sind strukturelle Ansammlungen von lymphoiden Zellen am

Entzündungsort oder in der Umgebung von Tumoren, die einen ektoptischen Lymphfollikel bilden. Die Interaktion und Organisation von Immunzellen, Stromazellen und Endothelzellen erfolgt vor allem über die Lymphotoxinrezeptor-induzierte Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Dies reguliert die Expression von Chemokinen wie CXCL12, CXCL13, CCL19, CCL21, sowie von Adhäsionsmolekülen wie „*vascular endothelial adhesion molecule 1*“ (VCAM-1), ICAM-1, „*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*“ (MadCAM-1) [137, 174]. Diese wiederum rekrutieren weitere T- und B-Zellen und orchestrieren die Formation der TLOs [137].

Der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg wirkt nicht nur durch die strukturellen Defekte der SLOs auf das adaptive Immunsystem, sondern hat auch einen intrinsischen Effekt auf einzelne Immunzellen. So reguliert der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg das Überleben von B-Zellen während der Reifung indem er diese vor Apoptose schützt [175], als auch den Klassenwechsel und die Produktion von Immunglobulinen [137, 176, 177]. Zudem ist die Stimulation des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg über LT $\beta$ R und CD40 für die Aktivierung von DCs, Präsentation von Antigenen und Cross-Priming von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen notwendig [178]. Außerdem reguliert der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg in DCs die Expression von Indoleamine 2,3-dioxygenase, welches die Selbsttoleranz fördert, indem es die T-Zell-Proliferation unterdrückt und die Apoptose aktivierter T-Zellen induziert [179].

Während die Aktivierung von T-Zellen hauptsächlich von klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg abhängig ist, spielt der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg vor allem bei der T-Zellentwicklung im Thymus sowie bei der Bildung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen eine Rolle [137]. Störungen des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg führen zu schweren Defekten in der Entwicklung der medullären Thymus-Epithelzellen (mTEC) und zur Beeinträchtigung der Selbsttoleranz von T-Zellen [180, 181]. So ist bei Mäusen mit einem Knockout in LT $\beta$ R die Kommunikation zwischen mTECs und Thymozyten gestört, was zu einer fehlerhaften Selektion von T-Zellen und zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führt. Einer der Hauptgründe dafür ist die in den mTECs beeinträchtigte Expression des Chemokins CCL21, welches für die negative Selektion von T-Zellen verantwortlich ist [137, 182, 183]. Des Weiteren hat der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg intrinsische Effekte auf bestimmte T-Zellpopulationen und deren Differenzierung. Die Differenzierung von Th17 Zellen ist neben dem klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg auch vom alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg abhängig, was wiederum das enge Zusammenspiel der beiden Signalwege demonstriert [184, 185]. Die Entwicklung und Erhaltung

von Gedächtnis-T-Zellen ist ebenfalls auf die intrinsische Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs angewiesen [186].

Wie oben detailliert dargestellt, reguliert der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg die Entwicklung sowie zahlreiche Abläufe der adaptiven Immunantwort und ist deshalb auch an vielen verschiedenen Immunerkrankungen beteiligt. So wurde eine abnormale Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs mit der Entwicklung von Myelomen und diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen in Verbindung gebracht [187]. Patienten mit Mutationen im p100/p52-Lokus entwickeln häufig das „*Common variable immunodeficiency*“ Syndrom. Diese Erkrankung geht mit einer fehlerhaften Antikörperantwort und einer verringerten Anzahl von follikulären T-Helferzellen einher. Die Patienten leiden häufig an wiederkehrenden Infektionen [188]. Darüber hinaus zeigten verschiedene Studien eine starke Verbindung zwischen der Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, der Selbsttoleranz und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Beispielsweise entwickelten Mäuse mit einer Überexpression der p52 Untereinheit eine entzündliche Autoimmunerkrankung aufgrund des Überlebens von autoreaktiven T-Zellen [189]. Des Weiteren führt eine andauernde Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zu Lungenentzündungen, Fibrose und Alveolarschäden [190]. Bei der rheumatoiden Arthritis induziert der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, was zu chronischen Entzündungen der Synovia, Knorpelschäden und Knochendestruktion führt [191].

### 1.6 Optical Imaging

Die optische Bildgebung „*Optical Imaging*“ (OI) ist eine nicht-invasive Bildgebungstechnik, die auf Detektion von Licht basiert und damit eine hervorragende und preiswerte Methode der molekularen Bildgebung in lebenden Organismen darstellt. Die Detektion von Licht erfolgt durch den Charge Couple Device (CCD)-Sensor, bestehend aus einer Matrix von lichtempfindlichen Fotodioden. In hochsensitiven OI-Systemen werden die CCD-Sensoren im Temperaturbereich von -70 bis -100 °C gekühlt, um das thermische Rauschen so gering wie möglich zu halten. Dabei steigt die Photoneneffizienz auf bis zu 95%. Im Vergleich dazu liegt sie bei einer gewöhnlichen Digitalkamera, die ebenfalls auf dieselbe Technik beruht, nur bei ca. 45%. Dies ermöglicht eine Detektion von OI-Proben im picomolaren Konzentrationsbereich in Echtzeit [192].

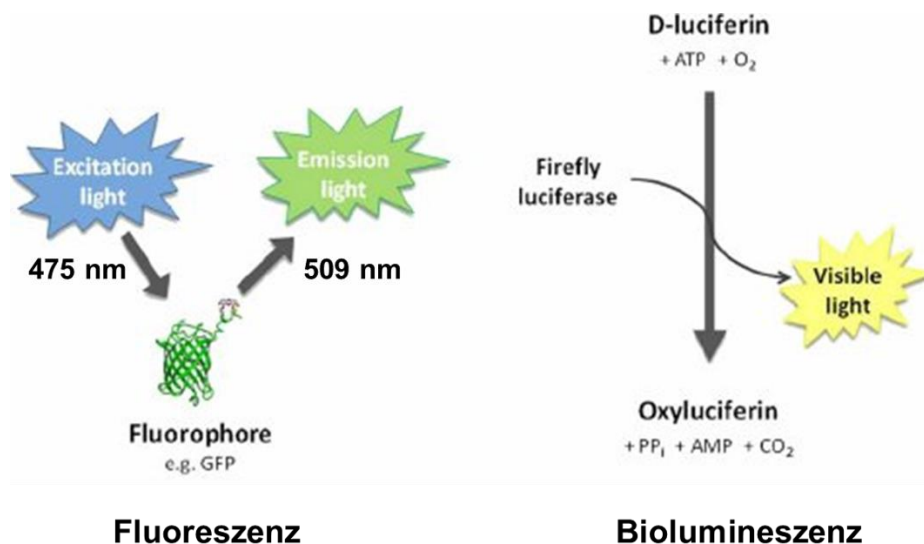
Die *in vivo* angewandte OI-Bildgebung beruht vor allem auf der Emission von Licht in Form von Fluoreszenz oder Chemi- bzw. Biolumineszenz durch Expression von Reporter-Genen oder Applikation von spezifischen Proben.

Fluoreszenz ist eine spontane Emission von Licht durch bestimmte Moleküle, sogenannte Fluorophore, die zuvor mit einem energiereicheren Licht als das Emissionslicht angeregt worden sind (**Abbildung 7**, links). Der Prozess läuft in drei Schritten ab: Als erstes wird das Fluorophor durch eine externe Lichtquelle, im Falle des OI-Systems mit Hilfe eines Lasers, mit einer für das Fluorophor charakteristischen Wellenlänge angeregt. Die Absorption der Photonen durch das Fluorophor bewirkt den Übergang der Elektronen vom Grundzustand ( $S_0$ ) in den angeregten Singulett-Zustand ( $S_1$ ). Der angeregte  $S_1$ -Zustand ist nur von einer sehr kurzen Dauer (etwa 1-10 Nanosekunden) bis das Elektron wieder in seinen Grundzustand  $S_0$  zurückfällt. Dabei wird die freiwerdende Energie in Form von Lichtquanten (Photolumineszenz) in einer höheren Wellenlänge als die Anregungswellenlänge emittiert.

Die Anregungswellenlänge „Exzitation“ und die Wellenlänge der Photonenemission sind individuell abhängig von den charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Fluorophore. Das zuerst entdeckte und das wohl bekannteste Fluorophor ist das „*Green Fluorescence Protein*“ (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*, für den Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien 2008 mit einem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet worden sind. Das natürlich vorkommende unmodifizierte GFP hat zwei Anregungsmaxima bei 395 nm und 475 nm, während die Emissionswellenlänge bei 509 nm liegt. Durch stetige Forschung und Weiterentwicklung gibt es mittlerweile zahlreiche Fluoreszenzproteine die unterschiedliche Exzitation- und Emissions-Spektren aufweisen, wie z.B. das „*Yellow Fluorescence Protein*“ (YFP) welches im gelben Bereich emittiert oder das „*Red Fluorescence Protein*“ (RFP) welches im roten Bereich emittiert [193]. Fluoreszenzproteine werden vor allem als Fusionsproteine an bestimmte Gene gekoppelt, um deren spezifische Expression optisch darzustellen (Reporter-Gen). Des Weiteren gibt es eine ganze Reihe von organischen Fluorophoren, die als niedermolekulare Verbindungen an bestimmte Amino-, Thiol- oder Carboxylgruppen von Proteinen angeknüpft werden, um anschließend in der Fluoreszenzbildgebung als spezifische Proben oder Kontrastmittel eingesetzt werden.

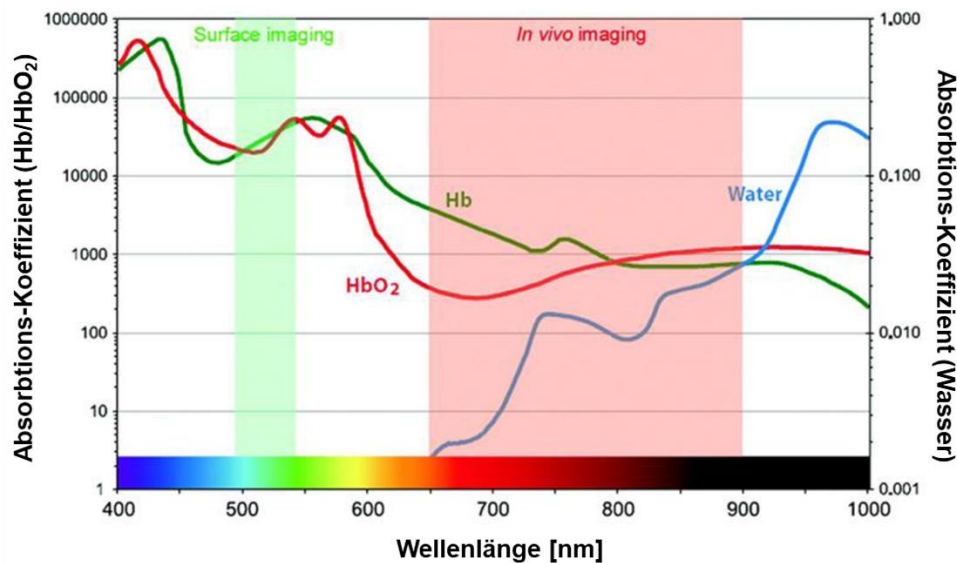
Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind Xantheme, Cyanine und Oxazole [194, 195]. Heutzutage kann damit das komplette sichtbare Lichtspektrum bis hin in den Nahinfrarotbereich abgedeckt werden.

Der Nahinfrarotbereich (650 – 900 nm) spielt eine besonders wichtige Rolle bei der Bildgebung von lebenden Organismen sowie biologischem Gewebematerial. Wellenlängen kleiner als 650 nm werden sehr stark durch das Hämoglobin absorbiert, während bei Wellenlängen oberhalb von 900 nm die Absorption durch das Wasser stark zunimmt (**Abbildung 8**). Fluorophore die im sichtbaren Lichtspektrum liegen, wie beispielsweise das GFP haben somit eine sehr geringe Penetrationstiefe von maximal 0,5 cm, weshalb diese nur für die Bildgebung der oberen Schichten wie z.B. der Haut geeignet sind. Dagegen können Nahinfrarot-Fluorophore, aufgrund der geringeren Absorption durch das Gewebe so wie die geringere Autofluoreszenz und Streuung, deutlich höhere Sensitivitäten und Penetrationstiefen von 2 bis 3 cm erreichen.



**Abbildung 7: Grundprinzipien von Fluoreszenz und Biolumineszenz.**

Bei der Fluoreszenz wird ein Fluorophor durch eine externe Lichtquelle in einer bestimmten Wellenlänge angeregt, worauf es Licht einer größeren Wellenlänge emittiert. Bei der Biolumineszenz wird D-Luciferin durch das Enzym Luciferase in Gegenwart von ATP und Sauerstoff oxidiert, wodurch sichtbares Licht emittiert wird und Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>), Adenosinmonophosphat (AMP) und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) erzeugt werden. Abbildung nach [196].

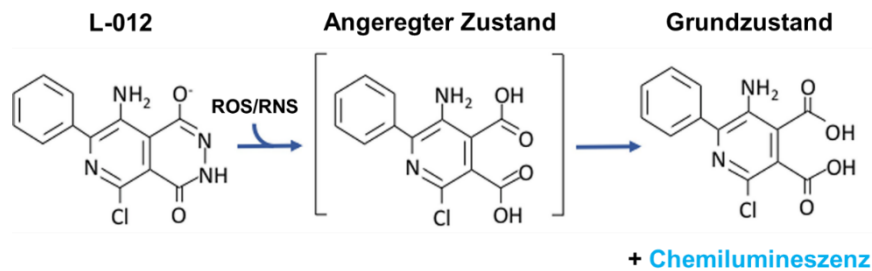


**Abbildung 8: Absorptions-Koeffizienten von Hämoglobin und Wasser.**

Hämoglobin (Hb), Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>). Abbildung nach [195]

Bei der Chemi- und Biolumineszenz entsteht die Lichtemission durch eine chemische bzw. biologische Reaktion im Bereich des sichtbaren Lichts und muss nicht zuvor durch eine externe Lichtquelle, wie es bei der Fluoreszenz der Fall ist, angeregt werden.

Chemilumineszenz ist ein Prozess, bei dem durch eine chemische Reaktion von bestimmten Molekülen, sogenannte Luminophore, elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts emittiert wird. Dabei wird das Elektron durch Energiezufuhr in einen energetisch höheren Zustand befördert und gibt, wenn es in seinen ursprünglichen Grundzustand zurückfällt, die Energie als Photon ab. Zu den bekanntesten Vertretern von Luminophoren gehört das 3-Aminophthalsäurehydrazid, besser bekannt als Luminol. Luminol wird vor allem in der Forensik zur Detektion von Blutspuren eingesetzt. Dabei reagiert das Luminol mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Gegenwart von Eisenionen (Fe<sup>2+</sup>) des Hämoglobins. Aufgrund der hohen Sensitivität gegenüber Oxidation, wird Luminol und seine Derivate oft zur Detektion von ROS/RNS in biologischen Assays sowie für das *in vivo* OI verwendet. In der hier vorgelegten Dissertation wurde für den *in vivo* Nachweis von ROS/RNS die Chemilumineszenz-Probe 8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione (L-012) verwendet (**Abbildung 9**). L-012 ist ein Derivat des Luminols mit einer deutlich höheren Sensitivität gegenüber verschiedener ROS/RNS-Intermediaten [197, 198].



**Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs der L-012 Reaktion mit ROS/RNS.**

Abbildung nach [199, 200].

Bei der Biolumineszenz handelt es sich um einen Sonderfall der Chemilumineszenz in biologischen Systemen, wie sie bei Quallen und Glühwürmchen anzutreffen ist. Das Licht entsteht durch die enzymatische Reaktion eines Luciferase-Enzyms mit seinem Substrat. Luciferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) ist die am häufigsten verwendete Luciferase für die molekulare Bildgebung. Dieses Enzym oxidiert das Substrat D-Luciferin, in einer Reaktion bei der Sauerstoff und Adenosintriphosphat verbraucht werden, wobei Licht mit einem breiten Emissionsspektrum und einem Peak bei ca. 560 nm emittiert wird [201, 202] (**Abbildung 7**, rechts). Luciferin verteilt sich nach intraperitonealer Injektion schnell im ganzen Tier und passiert dabei auch die Blut-Hirn-Schranke. Die Biolumineszenz erreicht ihren Höhepunkt ca. 10 – 12 min nach der Injektion von Luciferin und nimmt langsam innerhalb von 60 min wieder ab, wodurch ein breites Zeitfenster für die Bildgebung bereitgestellt wird. Aufgrund des fast vernachlässigbaren Hintergrundsignals *in vivo* ist das Signal-Rauschen-Verhältnis als auch die damit einhergehende Sensitivität sehr hoch, weshalb dieses Prinzip große Beliebtheit in der molekularen Bildgebung von Kleintieren hat [202]. Der Nachteil von Biolumineszenz ist, dass für diese Methode transgene Tiere oder Zellen benötigt werden.

Die optische Bildgebung hat gegenüber anderen Bildgebungsmodalitäten wie der PET und der MRT wesentliche Vorteile. OI-Systeme für Kleintiere sind günstig im Anschaffungspreis mit niedrigen Wartungskosten und einfach in der Bedienung. Zudem ist die Auswertung der Messdaten relativ einfach. Des Weiteren sind die benötigten Messzeiten verhältnismäßig kurz, wodurch longitudinale Studien mit größeren Kohorten möglich sind. Die Haupteinschränkungen der optischen Bildgebung sind jedoch ihre begrenzte Eindringtiefe aufgrund der starken Lichtstreuung im umliegenden Gewebe sowie die fehlende absolute Quantifizierung aufgrund der zweidimensionalen Bilddarstellung.

## 2 Fragestellung

Das Hauptziel dieser Dissertation ist die Erforschung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen während der Effektorphase der akuten und chronischen T-Zell-vermittelten Kontaktallergiereaktion.

Hierbei lag der Fokus auf der differentiellen Rolle der ROS/RNS und der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Sowohl ROS/RNS als auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B sind wichtige Regulationsmechanismen der Entzündungsreaktionen die sich gegenseitig beeinflussen.

1. Im ersten Teil der Dissertation wurde der Einfluss von ROS/RNS auf die akute und chronische Kontaktallergie erforscht und im Wesentlichen folgenden Fragestellungen untersucht:

- Welche ROS/RNS Quellen dominieren die akute und chronische Kontaktallergie?

Hierzu wurde die ROS/RNS Expression nicht-invasiv *in vivo* und *ex vivo* in differentiell ROS/RNS-defizienten Mauslinien (gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup>, NOX4<sup>-/-</sup>) sowie Wildtyp-Mäusen untersucht.

- Welche Konsequenzen hat die differentiell beeinträchtigte ROS/RNS Produktion auf den Verlauf der akuten und chronischen TNCB-induzierten Kontaktallergie und den oxidativen Stress in der entzündlichen Haut?

Dazu wurden der Verlauf der Ohrschwellungen, das Immuneinfiltrat, die Expression von pro-inflammatorischen als auch ROS/RNS induzierten Genen, die Metaboliten und die Oxidation der DNA und Lipide der kontaktallergischen Haut untersucht.

- Kann die systemische pharmazeutische Inhibition von ROS/RNS den Verlauf der akuten und chronischen Kontaktallergiereaktion supprimieren?

Hierzu wurden Versuchsmäuse mit Trolox (Vitamin E) oder MitoTEMPO (mitochondriale ROS Inhibition) behandelt.

- Lassen sich die Ergebnisse bezüglich der relevanten ROS/RNS Quellen auf ein anderes Kontaktallergiemodell (Haptene) übertragen

Hierzu wurden die akute und chronische Oxazolon-spezifische Kontaktallergie in differentiell ROS/RNS-defizienten Mauslinien (gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup>) untersucht

- Beeinträchtigt die NET-Bildung den Verlauf der akuten und chronischen TNCB-spezifische Kontaktallergie?

Hierzu wurde die PAD<sup>-/-</sup> Mäuse (die eine reduzierte NETs Bildung aufweisen) untersucht.

2. Im zweiten Teil der Dissertation wurde der Einfluss des klassischen und alternativen NF-κB-Signalweg auf die akute und chronische Kontaktallergie erforscht. Im Rahmen dieser Studie wurden Mäuse mit einem Knockout in NF-κB1 oder NF-κB2 während der TNCB-induzierten Kontaktallergie untersucht. Dabei wurden die Auswirkungen der Blockade des NF-κB1 oder NF-κB2 auf die Ohrschwellungsreaktion, das Immunzellinfiltrat, die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, die genomische Expression proentzündlicher Mediatoren, sowie das Proteomexpressionsmuster detailliert erforscht.

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Aus dieser Tabelle abweichende Geräte sind gesondert im Text vermerkt.

**Tabelle 3: Verwendete Geräte.**

Geräte	Modell/Typ	Hersteller
Brutschrank	Heracell 150i	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	CB150	Binder (Tuttlingen, DE)
Digitales Mikroskop	Nikon Eclipse 80i	Nikon Instruments Europe B.V. (Amsterdam, NE)
Durchflusszytometer	LSR Fortessa	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Druchflusszytometer	Calibur	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
ELISA Reader	Infinite F50 Plus	Tecan Group AG (Männedorf, CH)
Entwässerer	Leica TP 1020	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Immunostainer		Ventana Medical System (Tucson, AZ, USA)
Konfokales Lasermikroskop	LSM800	Carl Zeiss (Oberkochen, DE)
Light Cycler	1.5	Roche, (Baser, CH)
Multifuge	Heraeus Multifuge 3SR Plus	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroskop	Leica Microsystem	Leica Camera (Wetzlar, DE)
Mixer Mill		Retsch (Haan, DE)
Mikrometer	C1X018	Kroeplin (Schlächtern, DE)
NanoDrop	1000	VWR International (Radnor, USA)
Neubauer Zählkammer	0,100 nm Tiefe	Hecht GmbH & Co KG (Sondheim, DE)
Optical Imaging System	IVIS Spectrum	Perkin Elmer (Watham, MA, USA)
Paraffinausgießstation	Leica EG 1150	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Rasierer	Vetiva mini	Wahl GmbH (St. Georgen, DE)
Schüttelinkubator	MaxQ™ 6000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Sterilbank	Hera Safe KS	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Thermocycler	peqSTAR	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)
Thermomixer	Thermomixer R	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Tischzentrifuge	Mikro 220R	Hettich AG (Bäch, CH)
Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)

#### 2.1.2 Biochemische Assay-Kits

Assay-Kit	Cat. Nr.	Hersteller
DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Kit	589320	Cayman, Ann Arbor, USA

Lipid-Peroxidierung (MDA) Assay-Kit	MAK085	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array	ARY028	R&D Systems, Minneapolis, USA

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in **Tabelle 4** aufgeführt. Aus dieser Tabelle abweichende Materialien sind gesondert im Text vermerkt.

**Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.**

Materialien	Typ	Hersteller
24-Well Flachbodenplatte	24 Wells	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, DE)
6-Well Flachbodenplatte	6 Wells	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, DE)
96-Well Flachbodenplatte	96 Wells	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, DE)
96-Well Rundbodenplatte	96 Wells	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, DE)
Bluecap (40 µm)	BD Falcon™ Röhrcen mit Zellfilterklappe (40 µm)	BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)
cDNA Transkriptions Kit	iScript cDNA synthesis Kit	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
DNA Verdau	peqGOLD DNase I Digest Kit	VWR International (Radnor, USA)
Detektions Kit für die Histolo- gie	iVIEW DAB Detection Kit	Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA)
Detektions Kit für die Histolo- gie	BasicDAB Detection Kit	Ventana Medical Systems (Tucson, AZ, USA)
Falcon 15 ml und 50 ml	BD Falcon™	BD Bioscience (Franklin Lake, NJ, USA)
Insulinspritzen	BD Plastipak (20 U)	BD Bioscience (Franklin Lake, NJ, USA)
Kryoröhrcen	CRYO.S™ (1,5 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, DE)
mRNA Isolations Kit	peqGOLD Total RNA Kit	VWR International (Radnor, USA)
Reaktionsgefäße	1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Spitzenkolpen	BD Plastipak 1 ml	BD Bioscience (Franklin Lake, NJ, USA)
Zellsieb (70 µm)	BD Falcon™ 70 µm cell strainer	BD Bioscience (Franklin Lake, NJ, USA)
Neubauer-Zählkammer	C-Chip Disposable Counting Chamber	NanoEnTek (Seoul, Korea)

#### 2.1.4 Versuchstiere

#### 2.1.5 Zucht- und Haltungsbedingungen

Die C57BL/6N Mauslinie wurde von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Alle transgenen Mauslinien; B6.129S-Cybb<sup>tm1Din/J</sup> (gp91<sup>phox-/-</sup>), B6.129X1-Mpo<sup>tm1Lus/J</sup> (MPO<sup>-/-</sup>) und B6.129P2-Nos2<sup>tm1Lau/J</sup> (iNOS<sup>-/-</sup>), B6.Cg-Nfkb1<sup>tm1Bal/J</sup> (NF-κB1<sup>-/-</sup>), B6-Nfkb2<sup>tm1RSch/J</sup> (NF-κB2<sup>-/-</sup>) sowie die C57BL/6J Mauslinie entstammen aus der eigenen Zucht in der Tierhaltung von Forschungs- und Verfügungsgebäude „FORS“ der Eberhard-Karls-Universität. Die B6(Cg)-Padi4<sup>tm1.2Kmw/J</sup> (PAD4<sup>-/-</sup>) Mauslinie wurde von Prof. Wolfram Ruf, Universität Mainz, sowie die B6.129-Nox4<sup>tm1.1Ams/J</sup> (NOX4<sup>-/-</sup>) Mauslinie von Dr. Kathrin Schröder, Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt. Sämtliche Versuchstiere wurden unter spezifisch-pathogenfreien Konditionen bei standardisierten Haltungsbedingungen in „*Individually Ventilated Cages*“ vom Typ 2 Long in der Tierhaltung des Labors von Werner Siemens Imaging Center gehalten. Alle Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Tierversuchsantrag R10/15, R14/19G).

#### 2.1.6 Mauslinien

Für die Experimente wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet.

Folgende Mauslinien wurden untersucht:

**B6.129S-Cybb<sup>tm1Din/J</sup> (gp91<sup>phox-/-</sup>) Mäuse:** Das gp91<sup>phox</sup>-Protein ist einer der Heterodimere die das aktive Zentrum der NADPH Oxidase 2 (Nox2) bilden (1.3.2.2). Mäuse mit einem Knockout in gp91<sup>phox</sup> sind nicht in der Lage den respiratorischen Burst (Oxidative Burst) in Neutrophilen und Makrophagen auszulösen.

**B6.129X1-Mpo<sup>tm1Lus/J</sup> (MPO<sup>-/-</sup>):** Aufgrund der fehlenden Myeloperoxidase ist diese Mauslinie nicht in der Lage Hypochlorsäure (HOCl) (1.3.1.1) zu produzieren.

**B6.129P2-Nos2<sup>tm1Lau/J</sup> (iNOS<sup>-/-</sup>):** Die Maus hat einen Knock-out in der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (1.3.2.3) und diente zur Untersuchung des nitrosativen Stresses auf die Kontaktallergie.

**B6.129-Nox4<sup>tm1.1Ams/J</sup> (NOX4<sup>-/-</sup>):** NOX4 produziert überwiegend H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ist die primäre Quelle für ROS in den Endothelzellen (1.3.2.2). Die NOX4<sup>-/-</sup> Maus diente zur Untersuchung der endothelialen ROS-Produktion und dessen Auswirkungen auf die Entzündungsreaktion.

**B6.129X1-Nfe2l2<sup>tm1Ywk/J</sup> (NRF2<sup>-/-</sup>):** Die Maus hat einen Knockout in dem Transkriptionsfaktor NRF2 der für die Regulation der Antioxidativen Proteine verantwortlich ist (1.3.4.1). Diese Maus wurde verwendet um die Auswirkungen des oxidativen Stresses auf die Entzündungsreaktion besser zu charakterisieren.

**B6(Cg)-Padi4<sup>tm1.2Kmow/J</sup> (PAD4<sup>-/-</sup>):** PAD4<sup>-/-</sup> dienten zur Untersuchung der NETs während der akuten und chronischen Kontaktallergie. PAD4 scheint eine zentrale Rolle bei der Bildung von NETs zu spielen (1.4).

**B6.Cg-Nfkb1<sup>tm1Bal/J</sup> (NF-κB1<sup>-/-</sup>, p50<sup>-/-</sup>):** Bei den NF-κB1<sup>-/-</sup> Mäusen fehlt die Untereinheit p50, welche essentiell für die Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs (p50-RelA Heterodimer) ist (1.5.1). Die p50<sup>-/-</sup> Mäuse werden in unseren Studien zur Untersuchung des klassischen NF-κB-Signalwegs auf die akute und chronische Kontaktallergie verwendet.

**B6-Nfkb2<sup>tm1RSch/J</sup> (NF-κB2<sup>-/-</sup>, p52<sup>-/-</sup>):** Bei den NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen fehlt die Untereinheit p52, welche essentiell für die Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalwegs (p52-RelB Heterodimer) ist (1.5.2). Die p52<sup>-/-</sup> Mäuse werden in unseren Studien zur Untersuchung des alternativen NF-κB-Signalwegs auf die akute und chronische Kontaktallergie verwendet.

**C57BL/6J Mäuse** dienten als Wildtyp-Kontrollen für alle Experimente mit den transgenen Tieren.

**C57BL/6N Mäuse** wurden ausschließlich für die Therapie-Studie (Vitamin-E) verwendet.

### 2.1.7 Hapten-Lösungen

In dieser Arbeit wurde das Hapten 2,4,6-Trinitro-1-Chlorobenzen (TNCB, Sigma Aldrich, USA) und Oxazolon (Sigma Aldrich, USA) zum Auslösen einer spezifischen kontaktallergischen Reaktion benutzt.

#### **TNCB:**

Sensibilisierungslösung: 5%ige TNCB-Lösung (Aceton und Miglyol 812 (SASOL, Witten, Germany) im Verhältnis 4:1)

Challengelösung: 0,5 oder 1%ige TNCB-Lösung (Aceton und Miglyol 812 im Verhältnis 1:9)

#### **Oxazolon:**

Sensibilisierungslösung: 1%ige Oxazolon-Lösung (Aceton und Miglyol 812 im Verhältnis 4:1)

Challengelösung: 0,5%ige Oxazolon-Lösung (Aceton und Miglyol 812 im Verhältnis 1:9)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Auslösen der Kontaktallergie

Zur Sensibilisierung wurden die Mäuse zuerst am Abdomen rasiert und anschließend 80 µl Sensibilisierungslösung aufgetragen. Nach 7 Tagen wurde das rechte Ohr (ventrale und dorsale Seite) mit insgesamt 20 µl Challenge-Lösung behandelt um eine akute Kontaktallergie auszulösen. Im Weiteren erfolgten im Abstand von jeweils 48h – 72 Stunden insgesamt fünf weitere Applikationen der Challenge-Lösung am rechten Ohr um eine chronische Kontaktallergie auszulösen (**Abbildung 10**). Das linke Ohr wurde nicht behandelt und diente als Kontrolle.

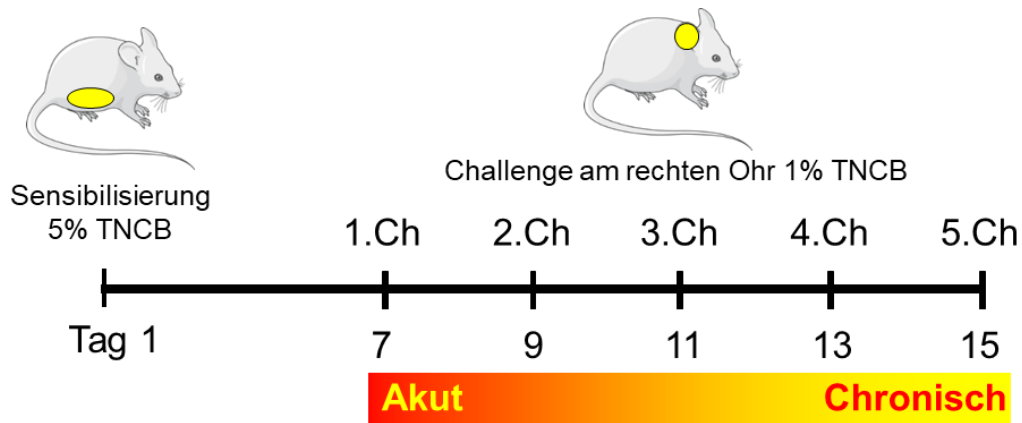


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Induktion einer akuten und chronischen Kontaktallergie.

### 2.2.2 Therapie

#### 2.2.2.1 MitoTEMPO

MitoTEMPO ist ein ROS-Scavenger der sich spezifisch in der Membran von Mitochondrien anreichert. Gp91<sup>phox-/-</sup> und Wildtyp-Mäuse wurden täglich mit 1,5 mg/kg MitoTEMPO *i.p.* gelöst in NaCl therapiert, beginnend drei Tage vor der ersten 1 %-igen TNCB-Challenge. Der Kontrollgruppe (Placebo) wurde NaCl-Lösung *i.p.* injiziert.

#### 2.2.2.2 Vitamin E

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) ist ein wasserlösliches Vitamin-E-derivat, das starke antioxidative Eigenschaften aufweist. C57BL6/N Wildtyp-Mäuse wurden täglich mit 20 mg/kg Trolox *i.p.* gelöst in NaCl therapiert, beginnend drei Tage vor der ersten 1 %-igen TNCB-Challenge. Der Kontrollgruppe (Placebo) wurde NaCl-Lösung *i.p.* injiziert.

### 2.2.3 Messung der Ohrschwellung

Um den Verlauf der Entzündungsreaktion zu erfassen, wurde die Ohrschwellung gemessen. Dazu wurden die Mäuse durch Inhalation von Isofluran-O<sub>2</sub> (1,5 % Forane, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) anästhesiert. Die Messung der Ohrschwellung erfolgte mit einem Mikrometer (Kroeplin, Schlüchtern, Deutschland) jeweils vor der ersten, dritten und fünften Challenge sowie 4 h, 12 h und 24 h danach.

## 2.2.4 Optical Imaging

### 2.2.4.1 Optical Imaging Biomarker

Für die Messung der ROS/RNS Produktion *in vivo* wurde den Versuchstieren 5 min vor der Messung 100 µl der Chemilumineszenzprobe L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenyl-pyrido[3,4-d]pyridazine-1,4(2H,3H)dione), (Wako Chemicals, Neuss, Deutschland) intraperitoneal (*i.p.*) (5 mg/kg) injiziert. L-012 ist ein Derivat von Luminol mit einer deutlich höheren Sensitivität und Intensität der Chemilumineszenz [198].

### 2.2.4.2 *In vivo* Optical Imaging

Für die *in vivo* Messungen wurden die Versuchstiere mit 1,5% Isofluran anästhesiert und die Körpertemperatur mittels einer Wärmematte konstant bei 37 °C gehalten. Um die gesamte Oberfläche des Ohres messen zu können, wurden die Ohren planar auf einer schwarzen Lagerungsplatte vorsichtig mit einem Nylonfaden fixiert (**Abbildung 11**).

Es wurden ein Hellfeldbild und ein Bild des Lumineszenzsignals aufgenommen. Die Belichtungszeit des Hellfeldbildes lag bei 0,01 s, die der Lumineszenz bei 60 s. Zur Auswertung wurde die Software Living Image (Perkin Elmer) verwendet. Für die Auswertung wurden im Hellfeldbild regions of interest (ROI) die Position der Ohren eingezeichnet. Die Daten des überlagerten Lumineszenzsignals im Bereich der ROIs wurden als durchschnittliche Radianz (Photonen/Sekunde/Quadratcentimeter/Steradian; p/s/cm<sup>2</sup>/sr) quantitativ ausgewertet.

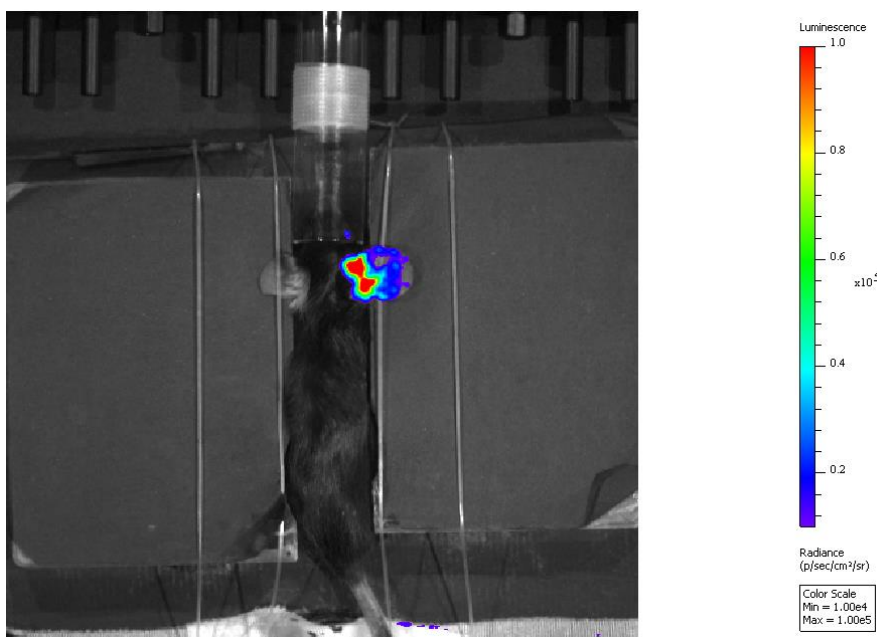


Abbildung 11: Optical Imaging Messung der ROS/RNS-Produktion.

## 2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder „*Fluorescent activated cell sorting*“ (FACS) ist eine Technologie, die einzelne Zellen oder Partikel in einer Suspension schnell analysiert, während sie an einem oder mehreren Lasern vorbeifließen. Die Zellen werden aufgrund der Lichtstreuung oder verschiedenen Fluoreszenzparametern analysiert. Die Lichtstreuung wird dabei in zwei verschiedenen Richtungen gemessen: Die Vorwärtsrichtung („*Forward Scatter*“ oder FSC), die die relative Größe der Zelle anzeigt, und bei 90° („*Side Scatter*“ oder SSC), die die Granularität der Zelle anzeigt. Der Einsatz von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern die spezifisch an bestimmte Oberflächenantigene binden, ermöglicht eine genaue Charakterisierung von unterschiedlichen Zellpopulationen.

### 2.2.5.1 Vorbereitung der Zellsuspension und Färbung.

Für die Analyse der Immunzellpopulationen wurden die Milzen und drainierende zervikale Lymphknoten durch ein 70 µm Zellsieb gepresst um eine Einzelzellsuspension zu bekommen und anschließend mit FACS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) + 1 % Fetales Kälberserum) gewaschen. Das Zellhomogenat aus der Milz wurde zusätzlich für 5 min mit 1-3 ml ACK-Lysepuffer (BioWhittaker, Basel, Schweiz) inkubiert um die Erythrozyten zu lysieren. Nach einem anschließenden Waschschrift mit 10 ml FACS-Puffer wurden die Zellen resuspendiert und durch ein 40 µm Zellsieb („*Blue Caps*“) in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit der Zählkammer (C-Chip) gezählt und  $5 \times 10^6$  Zellen pro Probe für die Antikörperfärbung verwendet und anschließend in 50 µl Antikörpercocktails (Tabelle 5) resuspendiert und für 30 min bei 4° C im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Proben zweimal in 200 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 4°C im Dunkeln bis zur darauffolgenden Messung gelagert.

**Tabelle 5: FACS-Antikörper.**

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
<b>T-Zellpanel</b>			
CD3	FITC	500A2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD4	PerCP	GK 1.5	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD8	Alexa Fluor 700	53-6.7	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD25	BV 421	PC61	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD44	BV 510	IM7	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD62L	PE/Cy7	MEL-14	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD127 (IL-7 Ra)	BV 785	A7R34	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CTLA-4 (CD152)	PE/Dazzle	UC10-4B9	Biolegend (San Diego, CA, USA)

LAG-3 (CD223)	APC	C9B7W	Biolegend (San Diego, CA, USA)
PD-1 (CD279)	BV 711	29F.1A12	Biolegend (San Diego, CA, USA)
TIM-3 (CD366)	BV 605	RMT3-23	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD16/32 (FC Block)	ohne	93	Biolegend (San Diego, CA, USA)
freie Amine (tote Zellen)	Zombie NIR™	-	Biolegend (San Diego, CA, USA)
<b>Myeloides Panel</b>			
CD3	BV 421	145-2C11	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD11b	BV 510	M1/70	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD11c	APC	N418	Biolegend (San Diego, CA, USA)
B220 (CD45R)	BV 785	RA3-6B2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD69	BV 650	H1.2F3	Biolegend (San Diego, CA, USA)
PD-L1 (CD274/B7-H1)	BV 605	10F.9G2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
NKp46 (CD335)	PE	29A1.4	Biolegend (San Diego, CA, USA)
MHC-II (I-A/I-E)	PerCP	M5/114.15.2	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Ly-6C	PE/Cy7	HK1.4	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Ly-6G	FITC	1a8	Biolegend (San Diego, CA, USA)
CD16/32 (FC Block)	ohne	93	Biolegend (San Diego, CA, USA)
freie Amine (tote Zellen)	Zombie NIR™	-	Biolegend (San Diego, CA, USA)

### 2.2.5.2 FACS-Analyse und Auswertung

Die Einzelzellsuspensionen wurden auf einem BD LSR Fortessa (BD Biosciences) Durchflusszytometer gemessen und mit der FlowJo Software (FlowJo, Ashland, USA) analysiert. Die Gating-Strategie für die T-Zellen und myeloide Zellen ist in **Abbildung 12** dargestellt.

Um die Immunzellen besser einzugrenzen wurde die Zellgröße (FSC-Signal) gegen die Granularität (SSC-Signal) in einem Dot-Plot-Diagramm aufgetragen (**Abbildung 12**, I). Als Nächstes wurden die Dubletten (II) sowie die toten Zellen (III) ausgeschlossen. Zur Analyse der T-Zellpopulation wurden die CD3<sup>+</sup> Zellen verwendet, für die myeloiden Zellen die CD3<sup>-</sup> Zellen (IV). Für die weitere Charakterisierung der Immunzellen wurden die verschiedenen Fluoreszenzsignale gegeneinander aufgetragen (V und VI).

Die Charakterisierung der einzelnen Immunzellpopulationen erfolgte anhand der folgenden Kriterien:

### **Myelodes Panel:**

B-Zellen	(CD3 <sup>neg</sup> /B220 <sup>pos</sup> )
NK Zellen	(CD3 <sup>neg</sup> /NKp46 <sup>pos</sup> )
Dendritische Zellen (DCs)	(CD3 <sup>neg</sup> /CD11c <sup>pos</sup> /MHCII <sup>pos</sup> )
Granulozyten (PMNs)	(CD3 <sup>neg</sup> /CD11b <sup>pos</sup> /Ly6G <sup>high</sup> /Ly6C <sup>low</sup> )
Monozyten/Makrophagen	(CD3 <sup>neg</sup> /CD11b <sup>pos</sup> /Ly6G <sup>low</sup> /Ly6C <sup>high</sup> )

### **Z-Zellpanell:**

CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	(CD3 <sup>pos</sup> /CD4 <sup>pos</sup> )
Aktivierung	(CD69 <sup>pos</sup> )
Regulation	(PD-1)
Regulatorische T-Zellen	(CD25 <sup>pos</sup> /CD127 <sup>neg</sup> )
Effektor/Gedächtnis-T-Zellen	(CD44 <sup>pos</sup> /CD62L <sup>neg</sup> )
Zentrale Gedächtnis-T-Zellen	(CD44 <sup>pos</sup> /CD62L <sup>pos</sup> )
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	(CD3 <sup>pos</sup> /CD8 <sup>pos</sup> )
Aktivierung	(CD69 <sup>pos</sup> )
Regulation	(PD-1)
Regulatorische T-Zellen	(CD25 <sup>pos</sup> /CD127 <sup>neg</sup> )
Effektor/Gedächtnis-T-Zellen	(CD44 <sup>pos</sup> /CD62L <sup>neg</sup> )
Zentrale Gedächtnis-T-Zellen	(CD44 <sup>pos</sup> /CD62L <sup>pos</sup> )

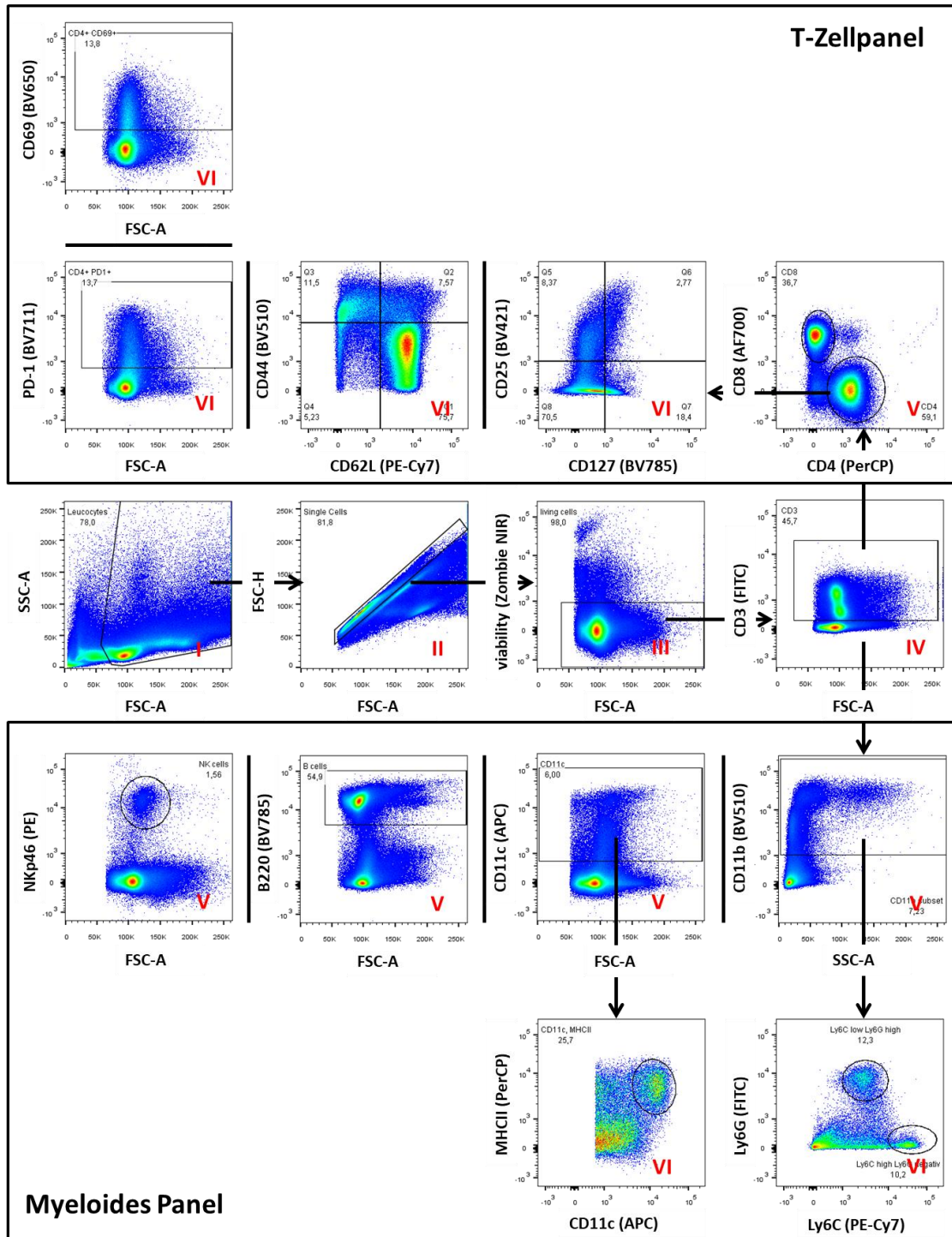


Abbildung 12: Gating-Strategie zur Differenzierung der T-Zellen und myeloiden Zellen.

Repräsentative Plots der FACS-Analyse von T-Zellen und myeloiden Zellen.

(I) SSC und FSC, (II) einzelne Zellen, (III) lebende Zellen. **T-Zell-Panel:** (IV) CD3<sup>+</sup> Zellen, (V oben) CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Zellen wurden wie folgt definiert: T-Gedächtniszellen wurden als CD62L<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> definiert; naive T-Zellen wurden als CD62L<sup>high</sup>/CD44<sup>low</sup> definiert; regulatorische T-Zellen wurden als CD127<sup>low</sup>/CD25<sup>high</sup> definiert. **Myeloide Zellpanel:** (IV) CD3-Zellen. Die Zellen wurden wie folgt definiert: NK-Zellen als NKp46<sup>+</sup>; B-Zellen als B220<sup>+</sup>; DCs als CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>; Monozyten als CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>; Neutrophile als CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup>/Ly6C<sup>low</sup>.

### 2.2.5.3 Ex vivo ROS-Messung mittels FACS.

Zur Bestimmung der ROS-Produktion *ex vivo* wurden die Zellen aus dem entzündeten Ohrgewebe (n = 5) und den drainierenden Lymphknoten (dLKs; n = 5) isoliert. Dazu wurde das frischgewonnene Ohren mit einer kleinen Schere zerkleinert und in Verdauungsmedium (RPMI-Medium, 1,5 mg/ml Collagenase IV, 0,4 mg/ml DNase, 10 mM HEPES und 10 % fötales Rinderserum) bei 37 °C im Schüttelinkubator für 45 min vorverdaut. Der Verdau wurde anschließend mit jeweils 20 µl EDTA (0,5 µM) gestoppt. Das verdaute Zellhomogenisat sowie die frisch isolierten drainierenden zervikalen Lymphknoten wurden durch ein 70 µm Zellsieb gepresst um eine Einzelzellsuspension zu bekommen. Nach anschließendem Waschschrift mit 10 ml FACS-Puffer wurden die Zellen resuspendiert und durch ein 40 µm Zellsieb („Blue Caps“) in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mittels Zählkammer (C-Chip) gezählt und  $5 \times 10^4$  Zellen pro Probe für die Dihydrorhodamin 123 (DHR)-färbung verwendet [203]. Die Zellen wurden für 30 min mit 0,5 µg/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) bei 37 °C stimuliert und mit 30 µg/ml DHR gefärbt und anschließend in FACS-Puffer mit 0,5% Formalin (Roti®-Histofix, Carl Roth GmbH, Karlsruhe DE) fixiert. Die Fluoreszenzsignalintensität (FI) wurde mittels Durchflusszytometrie (FACSCalibur) quantifiziert und mit FlowJo analysiert.

### 2.2.6 Histologie und Immunhistochemie

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E Färbung) ist die am weitesteten verbreitete Routinefärbemethode zur Beurteilung der Zusammensetzung, Struktur und Eigenschaften von gesundem und pathologischem Gewebe. Hämatoxylin färbt alle sauren (basophilen) Strukturen wie die DNA in den Zellkernen oder Ribosomen im rauen endoplasmatischen Retikulum blau während Eosin basische (eosinophile) Strukturen wie Zellplasmaproteine, Kollagen und Mitochondrien unspezifisch rosa färbt und damit die Extrazelluläre-Matrix und das Zytoplasma der Zellen sichtbar macht.

Für die histopathologische Analyse wurde die Ohren von Versuchsmäusen unmittelbar nach Opferung der Tiere für 48 Stunden in 4,5 % Formalin eingelegt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach der Entwässerung wurde das Ohrgewebe senkrecht zur späteren Schnittfläche in Paraffin eingebettet. Das Schneiden von Paraffinblöcken sowie histologische und immunhistochemische Färbungen der Schnitte wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Leticia Quintanilla de Fend (Department für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum

Tübingen) in der Pathologie durchgeführt. Für die H&E-Färbung wurden die in Paraffin eingebetteten Ohrproben in 3-5 µm dünne Schnitte geschnitten. Die Färbung erfolgte nach einem Standardprotokoll der AG Fend.

Um T-Zellen (CD3), Neutrophile (MPO), Makrophagen (Iba1) oder Blutgefäße (CD31) im entzündeten Ohrgehörwebe zu detektieren wurde eine immunhistochemische-Färbung (ICH) durchgeführt. Dazu wurden die 3-5 µm dünnen Paraffinschnitte zuerst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 80%; jeweils 8 min) inkubiert und mit Wasser gewaschen. Als Nächstes wurden die Schnitte in Methanol-Peroxid (Sigma Aldrich) für 10 min inkubiert um das Paraffin zu entfernen. Um die Antigene freizusetzen, wurden die Schnitte in einer 0,1 % Tween 0,01M Citratpufferlösung für 20-30 min in der Mikrowelle erhitzt und anschließend in einem Tris-Puffer mit 5 % FCS für 20 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für mindestens 2 Stunden mit den Primärantikörpern (Tabelle 6) inkubiert und anschließend 10 Mal in Tris-Puffer gewaschen. Die weiteren Schritte der Färbung erfolgten in einem automatisierten Immunostainer (Ventana Medical Systems, Inc., Oro Valley, USA) nach dem Protokoll des Herstellers mit leichten Modifikationen. Für die Aufnahme der Bilder wurde ein Zeiss Axioskop 2 plus Mikroskop, ausgestattet mit einer Jenoptik ProgRes C10 plus Kamera und Software (Laser Optik System, Jena, Deutschland) verwendet. Zur besseren Beurteilung der Entzündungsreaktion und des Immuninfiltrats wurde ein histopathologischer Score etabliert und zur semi-quantitativen Analyse verwendet. Der histopathologische Score setzt sich aus der Anzahl der epidermalen Abszesse und Krusten pro Ohrgehörwebeschnitt (0 = keine Krusten oder Abszesse; 1 = Abszesse, keine Krusten; 2 = zwischen 1 und 5 Krusten, 3 = zwischen 6 und 10 Krusten, 4 = mehr als 11 Krusten) zusammen. Die Häufigkeit von Neutrophilen (MPO) und T-Zellen (CD3) in den Ohrgehörwebeschnitten wurde semi-quantitative bestimmt (0 = kein entzündliches Infiltrat; 1 = minimales entzündliches Infiltrat; 2 = mildes entzündliches Infiltrat; 3 = mäßiges entzündliches Infiltrat; und 4 = schwer entzündliches Infiltrat). Die Quantifizierung der Neutrophilen in MPO<sup>-/-</sup> Mäusen wurde morphologisch bestimmt.

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Färbung.**

	<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Cat-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
	Kaninchen-Anti-CD3	1:150	CI597	DCS Diagnostik
	Kaninchen-Anti-MPO	1:100		Lab Vision
	Kaninchen-Anti-Iba1	1:50	ab178846	Abcam
	Kaninchen-Anti-CD31	1:50	Ab21595	DCS Diagnostik

### 2.2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Detektion und Analyse der NETs und Adhäsionsmolekülen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbungen sowie die Analyse wurden in Kooperation von der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Schaller (Universitäts-Hautklinik Tübingen) durchgeführt. Dazu wurde das frisch isolierte Ohrgewebe in RPMI (Biochrom, Berlin, Deutschland) eingelegt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Als erstes wurden die in RPMI eingefrorenen Ohren in 5 µm-Schnitte geschnitten und mit Periodat-Lysin-Paraformaldehyd (0,1 M L-Lysin-HCl, 2 % Paraformaldehyd, 0,01 M Natriummetaperiodat pH 7,4) fixiert und anschließend mit Eselserum (1:20 Verdünnung) geblockt. Die Schnitte wurden für eine Stunde mit den folgenden Primäranantikörpern inkubiert:

- Zur Detektion von NETs: Anti-OGG1-Ak, Anti-TOMM20, Anti-F4/80-Ak, Anti-Elastase, Anti-H2A.X-Ak, Anti-H3-Citrulinierung und Anti-MPO-Ak;
- Zur Detektion von endothelialen Adhäsionsmolekülen: Anti-P-Selektin, Anti-E-Selektin, Anti-ICAM-1, Anti-VCAM-1, Anti-Typ IV-Kollagen.

Für detaillierte Angaben siehe **Tabelle 7**.

Für die Detektion der gebundenen Primäranantikörper wurden die Schnitte zuerst dreimal gewaschen und anschließend mit den passenden Sekundäranantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert: Esel-Anti-Ziegen-Alexa 488-Ak, Esel-Anti-Kaninchen-Cy3-Ak, Esel-Anti-Ratte-Cy3-Ak, Esel-Anti-Ziegen-Cy3-Ak und Esel-Anti-Kaninchen-Alexa 488-Ab. Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI oder YOPRO durchgeführt (siehe Tabelle 7). Die Objektträger wurden mit Mowiol (Hoechst, Frankfurt, Deutschland) montiert und mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM800 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Die Verarbeitung sowie Analyse der Bilder erfolgten mit der Software ZEN 2.3 (blaue Edition) und dem Image Analysis Module (Zeiss®). Die NET-Bildung wurde semiquantitativ analysiert, indem die Fläche [µm<sup>2</sup>] der OGG1-Färbung außerhalb der Kerne dividiert durch die Anzahl der Kerne bestimmt wurde. Die Akkumulation von OGG1 im Zellkern wurde durch Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) analysiert. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wurde semiquantitativ ausgewertet. Dazu wurde ein Expressions-Score anhand der Anzahl der positiven Gefäße für das entsprechende Adhäsionsmolekül pro Ohrgewebeschnitt erstellt: Ø = keine positiven Gefäße; 1 = einzelne positive Gefäße; 2 = 50% der Gefäße sind positiv; 3 = über 50% der Gefäße sind positiv; 4 = Alle Gefäße sind positiv

**Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.**

	Primärantikörper	Verdünnung	Cat-Nr.	Hersteller
<b>NETS</b>	Kaninchen-Anti-OGG1	1:50	NB100-106	Novus Biologicals
	Kaninchen-Anti-TOMM20	1:50	NBP1-81556	Novus Biologicals
	Kaninchen-Anti-H3-Cit.	1:100	Ab5103	Abcam
	Kaninchen-Anti-Elastase	1:50	Ab21595	Abcam
	Ziege-Anti-H2A.X	1:100	Ab140498	Abcam
	Ziege-Anti-MPO	1:50	AF 3667	R&D Systems
	Ratte-Anti-F4/80	1:50	14-4801-82	eBioscience
	DAPI (Zellkernfärbung)	1:10000	D9542	Sigma Aldrich
<b>Adhäsionsmoleküle</b>	Ratte-Anti-P-Selektin	1:50	553742	BD Bioscience
	Ratte-Anti-ICAM-1	1:50	14-0542	Thermo Fisher
	Ratte-Anti-VCAM-1	1:50	553330	BD Bioscience
	Ratte-Anti-E-Selektin	1:50	553749	BD Bioscience
	Ziege-Anti-Typ IV-Kollagen	1:20	1340-01	SouthernBiotech
	YO-PRO (Zellkernfärbung)	1:2000	Y 3603	Thermo Fisher
<b>Detektion</b>	<b>Sekundärantikörper</b>			
	Esel-Anti-Kaninchen-Cy3	1:250	715-166-151	Dianova
	Esel-Anti-Kaninchen-Alexa 488	1:250	711-546-152	Dianova
	Esel-Anti-Ziege-Alexa 488	1:250	705-546-147	Dianova
	Esel-Anti-Ziege-Cy3	1:250	705-166-147	Dianova
	Esel-Anti-Ratte-Cy3	1:250	712-166-153	Dianova

### 2.2.8 Metabolomics

Um die Auswirkungen von ROS/RNS auf den Metabolismus zu untersuchen, wurden metabolische Analysen „Metabolomics“ vom Ohrgewebe von naiven Wildtyp-Mäusen sowie von Wildtyp, gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie (4 h nach 5. Challenge) durchgeführt. Die Durchführung und Analyse wurden mit freundlicher Unterstützung der AG Trautwein (Werner Siemens Imaging Center, Tübingen) durchgeführt. Nach der Opferung der Versuchstiere wurde das frisch isolierte Ohrgewebe in Kryoröhrchen im flüssigen Stickstoff (-195,82°C) schockgefroren. Das tiefgefrorene Ohrgewebe wurde im tiefgefrorenen Zustand pulverisiert (Covaris cryo-PREP CP02, Woburn, USA) und das Homogenisat in 300 µL „ultrapure“ Methanol und 1000 µL Methyl-tert-butylether resuspendiert. Die gelösten Metaboliten wurden mit Hilfe eines Ultraschallgeräts (Adaptive Focused Acoustics; AFA™) unter Verwendung eines 5-minütigen Ultraschallprogramms (Covaris E220 Evolution, Woburn, USA) extrahiert. Nach der Extraktion wurden 250 µl „ultrapure“ Wasser zur Phasentrennung zugegeben und die polare Phase über Nacht zum Trocknen eingedampft. Die Pellets wurden in einem deuterierten Phosphatpuffer (pH 7,4) mit 1 mM eines internen

Quantifizierungsstandards resuspendiert. Die NMR-Spektren wurden auf einem 600 MHz (14,10) Tesla ultra-shielded NMR-Spektrometer (Avance III HD, Bruker BioSpin, Karlsruhe, Deutschland) mit einer 1,7 mm Dreifachresonanz-Raumtemperatursonde bei 298 K aufgenommen. Abhängig vom Signal-Rausch-Verhältnis wurden mit einem Wasserunterdrückungspulsprogramm pro Messung 1024 oder 2048 Scans durchgeführt. Die Metaboliten wurden mit einer kommerziellen Datenbank (ChenomX NMR Suite 8.3) annotiert und quantifiziert.

### **2.2.9 DNA-Oxidations-Assay**

Genomische DNA wurde aus Ohrgewebe von naiven Wildtyp-Mäusen sowie aus Wildtyp-, gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen mit akuter (24h, 1 Challenge) und chronischer Kontaktallergie (4h, 5 Challenge, n = 4 pro Gruppe) unter Verwendung des NucleoSpin Tissue Kit (Takara Bio Inc, Kusatsu, Japan) isoliert. Die isolierte DNA wurde zuerst mit DNase I (Sigma Aldrich) und S1 Nuclease (Thermo Fisher) verdaut und anschließend mit alkalischer Phosphatase (Thermo Fischer) inkubiert, gemäß dem Protokoll von Huang et al. [25]. Die 8-OHdG-Konzentration wurde mit dem kommerziellen DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Kit (Cayman, Ann Arbor, USA), nach Protokoll des Herstellers bestimmt. Die Messung erfolgte am ELISA Reader (Infinite F50 Plus).

### **2.2.10 Lipidperoxidation**

Um den Oxidativen Stress in entzündeten Ohren von Wildtyp-, gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie (24h nach der 5. Challenge, n = 5 pro Gruppe) zu bestimmen, wurde die Menge an MDA, einem Marker für die Lipidperoxidation, bestimmt. Die Analyse der Ohrgewebelysate wurde unter Verwendung eines kommerziellen Lipidperoxidation-Assay-Kits (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für MDA wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Die Messung erfolgte am ELISA Reader (Infinite F50 Plus).

### **2.2.11 Real-time-Polymerasekettenreaktion**

Die Untersuchung der Expression von proinflammatorischen Mediatoren in ROS/RNS defizienten und Wildtyp-Mäusen wurde mittels quantitativer Real-time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in Kooperation mit Arbeitsgruppe von Dr. Daniela Kramer (Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Das Ohrgewebe wurde 24 h nach

der ersten und 4 h nach der fünften TNCB-Challenge unmittelbar nach der Tötung der Versuchsmäuse gewonnen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Gewebeproben wurden in Qiazol (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert und die Gesamt-RNA nach Herstellerangaben extrahiert.

Um die genomische DNA zu entfernen wurde ein DNase I-Verdau (EN0523, Thermo Fisher) durchgeführt. Die gewonnene mRNA wurde unter Verwendung von Revert Aid reverser Transkriptase (EP0441, Thermo Fisher) und Oligo(dT)-Primern (SO132, Thermo Fisher) revers in cDNA transkribiert.

RT-PCR Analysen wurden mittels Green Master Mix (M3023, Genaxxon, Ulm Deutschland) und selbst entworfenen Primern (Tabelle 8) durchgeführt. Die Proben wurden für eine anfängliche Denaturierung für 15 min bei 95 °C inkubiert, gefolgt von 45 Zyklen bei 95 °C für 15 s und 60 °C für 45 s. Die relative mRNA-Menge jeder Probe wurde durch Normalisierung auf das „housekeeping gene“  $\beta$ -Actin unter Verwendung der 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet.

**Tabelle 8: Primer für RT-PCR**

Gen	forward Primer	reverse Primer
<i><math>\beta</math>-Actin</i>	AGGAGTACGATGAGTCCGGC	GGTGTAAAACGCAGCTCAGTA
<i>Tnf</i>	AAGTTCCCAAATGGCCTCCC	TTGCTACGACGTGGGCTAC
<i>Il1b</i>	AGCTGAAAGCTCTCCACCTC	GCTTGGGATCCACACTCTCC
<i>Il6</i>	GTCCGGAGAGGAGACTTCAC	GCAAGTGCATCATCGTTGTTC
<i>Ccl2</i>	CTGGAGCATCCACGTGTTGG	CCCATTCTTCTTGGGGTCAG
<i>Cxcl1</i>	ACGTGTTGACGCTTCCCTTG	TCCTTTGAACGTCTCTGTCCC
<i>Cxcl2</i>	CGCCCAGACAGAAGTCATAGC	CTTTGGTTCTTCCGTTGAGGG TGTCTTGCCTCCAAAGGAT- GTC
<i>Nrf2</i>	TAGTTCTCCGCTGCTCGGAC	AAGTGACGCCATCTGTGAGG
<i>Hmox1</i>	TGACACCTGAGGTCAAGCAC	TAAAGAGCGGGTGAGCCTTC
<i>Gpx1</i>	GTTCCGGACACCAGGAGAATGG	CCAGGTCTCCAACATGCCTC AGTACTTGTGTAGGGTTT- CCAGC
<i>Sod1</i>	ACTTCGAGCAGAAGGCAAGC	
<i>Ogg1</i>	AGCTTCTGGACAGTCCTTCCG	
<i>Xhd</i>	TGACGAGGACAACGGTAGATG	TCTGAAGGCGGTCATACTTGG

Das Ohrgewebe von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> und NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen sowie Wildtyp Kontrollen wurde anhand eines in unserem Labor etablierten Protokolls 4 h nach der fünften Challenge gewonnen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Die Gewebeproben wurden mittels Mixer Mill homogenisiert und mit dem peqGOLD Total RNA Kit nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Anschließend wurde die

Konzentration mittels eines Nanodrops bestimmt und 2 µg der mRNA für das Umschreiben in die cDNA verwendet. Entsprechende Mengen an Oligo (dT) Primer (Eurofins, Ebersberg, DE) und H<sub>2</sub>O wurden für jede Probe zugegeben und bei 65°C für 5 min erhitzt. Anschließend wurde Nukleosidtriphosphat (20 mM, dNTPs, Amersheim, UK), 5x Puffer mit Superscript II Reverse Transcriptase (18064-014, Invitrogen, Carlsbad, USA), β-Mercaptoethanol (Carl Roth, Karlsruhe, DE) und rekombinante RNase-Inhibitor (Promega, Madison, USA) zugegeben und die Proben bei 37°C für 55 min inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen wurden die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt und die cDNA in destilliertem Wasser eluiert (10 ng/µl). Für die quantitativen Analysen wurden jeweils 10 ng der cDNA mit 5 pmol forward Primer, 5 pmol reverse Primer, 3 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl SYBR® Green PCR Master Mix (Quiagen) eingesetzt. Die RT-PCR wurde mit einem LightCycler Real-Time PCR System durchgeführt. Die relative mRNA-Menge jeder Probe wurde durch Normalisierung auf das „housekeeping gene“ β-Actin unter Verwendung der 2-ΔΔCT-Methode berechnet.

**Tabelle 9: Primer für RT-PCR**

Gen	forward Primer	reverse Primer
<i>β-Actin</i>	AGGAGTACGATGAGTCCGGC	GGTGTAACGACGCTCAGTA
<i>Tnf</i>	AAGTTCCCAAATGGCCTCCC	TTGCTACGACGTGGGCTAC
<i>Il1b</i>	AGCTGAAAGCTCTCCACCTC	GCTTGGGATCCACACTCTCC
<i>Il6</i>	GTCCGGAGAGGAGACTTCAC	GCAAGTGCATCATCGTTGTTC
<i>Ccl2</i>	CTGGAGCATCCACGTGTTGG	CCCATTCTTCTTGGGGTCAG

**Light-Cycler Programm:**

Aktivierung: 95°C, 15 min, 20°C/s  
 Amplifikation: 95°C, 15 s, 20°C/s  
 61°C, 25 s, 20°C/s  
 72°C, 15 s, 20°C/s  
 Schmelzkurve: 65°C, 15 s, 20°C/s  
 Kühlung: 40°C, 30vs, 20°C/s

**2.2.12 Zytokin-Array**

Die Expressionsmuster von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Daniela Kramer (Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz), mittels des Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Arrays (ARY028, R&D Systems, Minneapolis, USA) für 111 Proteine, untersucht. Dazu wurde zuerst das

tiefgefrorene Ohrgewebe von NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit chronischer Kontaktallergie (24h nach der 5. Ch) in 400  $\mu$ L Lysepuffer\* unter Verwendung von gentleMACS™ M-Tubes (130-093-236, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE) auf dem gentleMACS Octo Dissociator (130-095-937, Miltenyi Biotec) homogenisiert. Anschließend wurden die Lysate kurz mittels Ultraschalls bearbeitet um die DNA-Protein-Komplexe aufzubrechen. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Fisher) bestimmt. Für die Zytokin-Array-Analyse wurde 20  $\mu$ g des Proteins verwendet. Die Durchführung des Zytokin-Arrays erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

\* Lysepuffer: 20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM Na<sup>2</sup>EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 2 M Urea und 1x Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche).

### 2.2.13 Statistische Auswertung

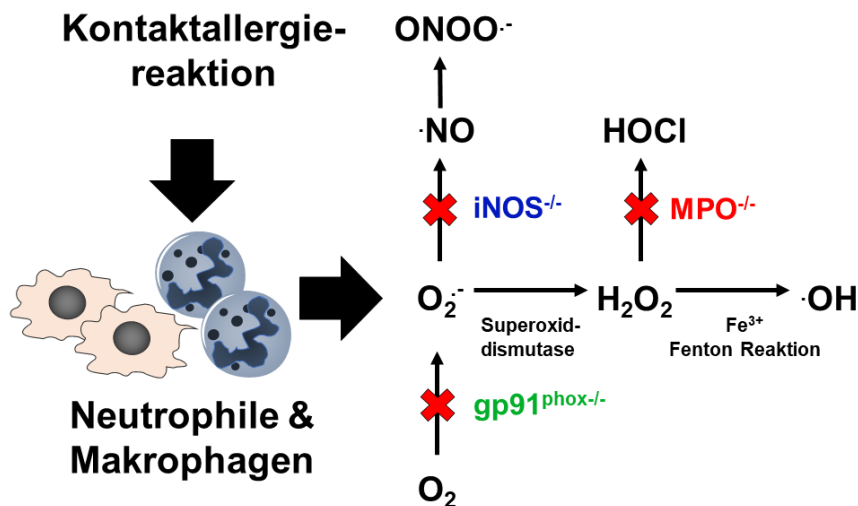
Die Ergebnisse der Ohrschwellungen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes („*standard error of the mean*“; SEM) dargestellt. Alle anderen *in vivo* und *ex vivo* Ergebnisse wurden, wenn nicht anders erwähnt, als Mediane mit Interquantilbereichen abgebildet. Für den Vergleich von unabhängigen Stichproben wurde der zweiseitige Student's t-Test verwendet. Der Vergleich von mehreren Gruppen zu der entsprechenden Kontrollgruppe erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test oder dem One-way ANOVA Test, beide in Kombination mit dem post-hoc-Dunn-Test zur Korrektur des Mehrfachtestens. Das entsprechende statistische Testverfahren in den einzelnen Experimenten ist in der dazugehörigen Bildunterschrift angegeben. Ein p Wert < 0,05 wird als statistisch signifikant erachtet. Die statistische Analyse erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Eichner (Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie, Universität Tübingen). Statistische Analysen und das Grafikdesign wurden mithilfe von GraphPad Prism (Version 9, GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Die statistische Analyse der Metabolomics-Ergebnisse erfolgte mithilfe des Webserver MetaboAnalyst 4.0. Die Metaboliten-Konzentrationen wurden mit dem Perzentil-Quantil-Normalisierungsansatz (PQN) normalisiert um Verdünnungseffekte zu berücksichtigen. Anschließend wurden die Daten vor der statistischen Analyse nach dem Pareto-Verfahren skaliert [204, 205] und eine zweidimensionalen Hauptkomponentenanalyse („*principal component analysis*“ PCA) und eine hierarchische Clusteranalyse (HCA) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der reaktiven Sauerstoffspezies auf die akute und chronische TNCB-spezifischen Kontaktallergiereaktion

##### 3.1.1 Untersuchung der akuten und chronischen 1% TNCB induzierten Kontaktallergie in ROS/RNS-defizienten Mäusen

Um den Einfluss von ROS und RNS auf die akute und chronische Kontaktallergie zu untersuchen, wurden transgene Mauslinien bei denen die ROS/RNS-Kaskaden an entscheidenden Schnittstellen blockiert verwendet:  $gp91^{phox-/-}$  (NOX2),  $MPO^{-/-}$  und  $iNOS^{-/-}$  (**Abbildung 13**). C57BL6/J (Wildtyp) Mäuse wurden als Kontrolle verwendet.

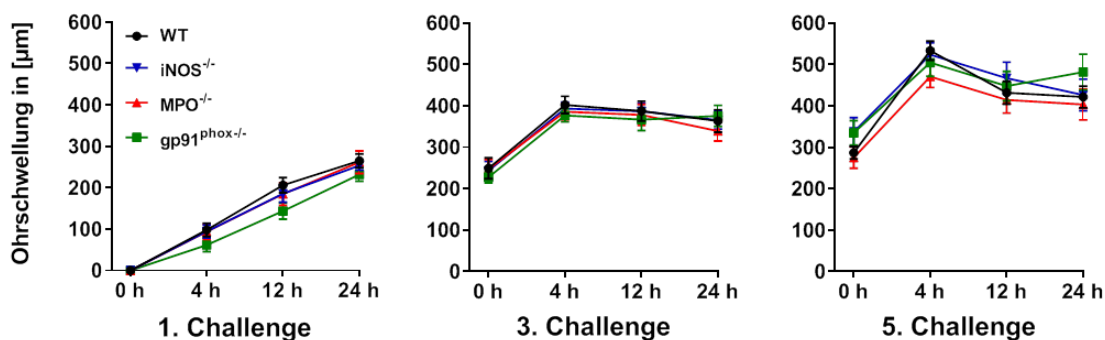


**Abbildung 13: ROS und RNS produzierende Proteine während einer Entzündungsreaktion.**

Abbildung nach [206].

Um eine akute Kontaktallergie auszulösen wurden die Mäuse mit 80  $\mu l$  5% TNCB-Aceton-Mygliol Lösung am Abdomen sensibilisiert und nach 7 Tagen mit 20  $\mu l$  1% TNCB-Aceton-Mygliol Lösung am rechten Ohr gechallenged. Durch das wiederholte Auftragen der 1%igen TNCB-Aceton-Mygliol Lösung alle 48-72 Stunden bis zu fünf Challenges wurde eine chronische Kontaktallergie ausgelöst. Dabei wurde die Ohrschwellung als Parameter für die Stärke der Entzündungsreaktion vor jeder TNCB-Challenge sowie 4, 12 und 24 Stunden danach bestimmt.

Während der akuten Kontaktallergie wurde die maximale Ohrschwellung in Wildtyp-Mäusen 24 Stunden nach der ersten Challenge erreicht ( $265 \pm 57,6 \mu\text{m}$ ; Abbildung 14). Wohingegen während der frühen chronischen (3 Challenge) und chronischen (5 Challenge) Phase die maximale Ohrschwellung bereits 4 Stunden nach der TNCB-Challenge erreicht wurde (3 Ch.:  $402,5 \pm 72,4 \mu\text{m}$ ; 5 Ch.:  $533,3 \pm 78,7 \mu\text{m}$ ; **Abbildung 14**), was auf eine bereits aktivierte T-Zell-vermittelte Immunantwort zurückzuführen ist. Beim Vergleich der Ohrschwellungen von  $i\text{NOS}^{-/-}$ ,  $\text{MPO}^{-/-}$  und  $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$  Mäusen mit den Wildtyp-Mäusen während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, was auf eine ähnlich starke Entzündungsreaktion hindeutet.



**Abbildung 14: Ohrschwellung in ROS/RNS-defizienten Mäusen.**

Die Ohrschwellungen werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angezeigt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ohrschwellungen der WT-Mäuse ( $n = 12$ ) und  $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$  ( $n = 11$ ),  $\text{MPO}^{-/-}$  ( $n = 11$ ) oder  $i\text{NOS}^{-/-}$  ( $n = 12$ ) Mäuse erfasst (Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test). Abbildung nach [206].

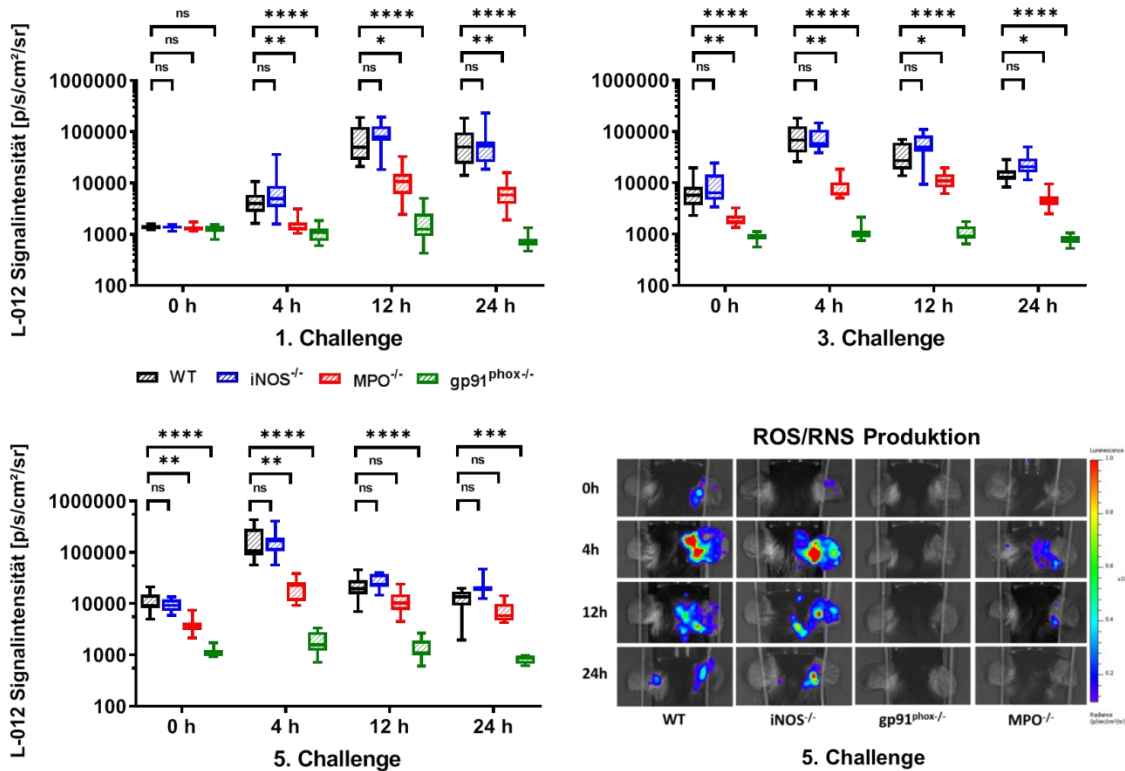
### 3.1.2 *In vivo* Dynamiken der ROS/RNS-Produktion

Simultan zur Ohrschwellungsreaktion wurden die *in vivo* ROS/RNS-Produktion während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie mittels nicht-invasiver optischer Bildgebung untersucht. Dazu wurde den  $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ ,  $\text{MPO}^{-/-}$ ,  $i\text{NOS}^{-/-}$  und Wildtyp-Mäusen eine ROS/RNS-sensitive Chemilumineszenz-Probe L-012 (siehe 1.6) *i.p.* injiziert, und anschließend unter Isofluran Narkose die Signalintensität (SI) der Chemilumineszenz am entzündeten rechten Ohr gemessen.

Die OI-Messungen von den entzündeten Ohren der Wildtyp-Mäusen ergaben eine stark erhöhte L-012-Signalintensität bereits 12 Stunden ( $49550 (28250 - 124750)$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr) und 24 Stunden ( $50700 (23725 - 96700)$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr) nach der ersten TNCB-Challenge im Vergleich zu dem Basiswert ( $1395 (1285 - 1457,5)$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr) vor der Challenge, was eine stark erhöhte ROS/RNS-Produktion während der akuten

Entzündungsphase darstellt. Im Vergleich dazu wurde die maximale ROS/RNS-Produktion während der frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie bereits 4 Stunden nach der TNCB-Challenge erreicht (3 Ch.: 68500 (38800 – 125925) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; 5. Ch.: 106000 (87525 – 286750) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; **Abbildung 15**). Somit korreliert die maximale ROS/RNS-Produktion exakt mit der maximalen Ohrschwellungsreaktion.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen konnte in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen keine Zunahme in der ROS/RNS-Produktion während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie detektiert werden. Die L-012-Signalintensität verblieb zu allen Untersuchungszeitpunkten auf dem Basiswert (1335 (1099,5 – 1477,5) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; **Abbildung 15**) ähnlichem Niveau. Die entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten ebenfalls eine 4,7 - 6,3-fache Reduktion der L-012-Signalintensität zu den Zeitpunkten der höchsten ROS/RNS-Produktion (12 Stunden 1 Ch.: 10700 (6035 – 15050) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; 4 Stunden 3 Ch.: 10900 (8105 – 14750) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; 4 Stunden 5 Ch.: 22600 (11150 – 26150) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) im Vergleich zu den entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen. Dagegen wurde keine signifikanten Unterschiede der L-012-Signalintensität in den entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen ermittelt (**Abbildung 15**). Allerdings wurde die maximale ROS/RNS-Produktion in der akuten Phase bereits 12 Stunden nach der ersten Challenge erreicht (80500 (65900 – 127000) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Auf ähnlichem Niveau und marginal früher als in den entzündlichen Ohren von Wildtyp-Mäusen.



**Abbildung 15: *In vivo* Dynamiken der ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie.**

L-012 wurde 5 Minuten vor den OI-Messungen in WT (n = 12), gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> (n = 11), MPO<sup>-/-</sup> (n = 11) und iNOS<sup>-/-</sup> Mäuse (n = 12) injiziert. Die ROS/RNS-Produktionswerte werden als Mediane mit Interquartilbereichen der durchschnittlichen SI (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) angezeigt; Whiskers geben die Min- und Max-Werte an. Repräsentative nicht-invasive *in vivo* OI Aufnahmen des zeitlichen Verlaufs der L-012-SI in den einzelnen Versuchsgruppen nach dem 5. TNCC-Challenge. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001, ns = nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche). Abbildung nach [206].

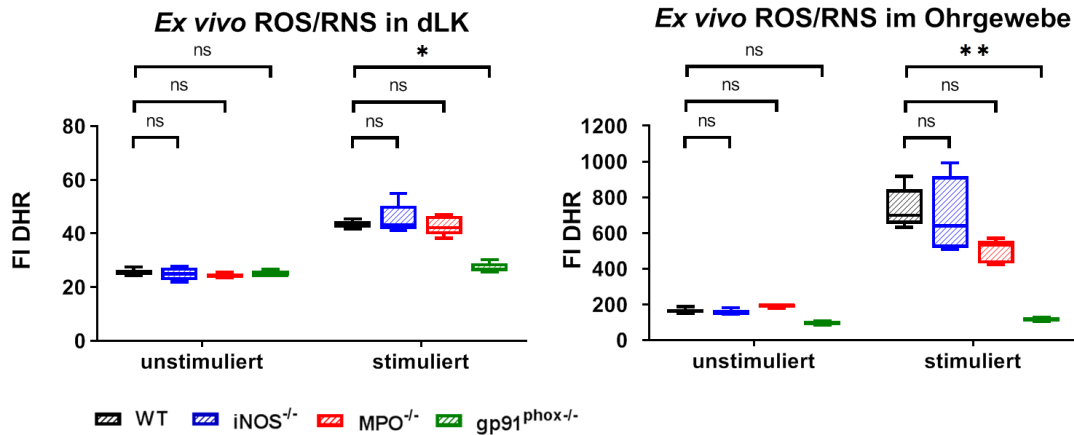
### 3.1.3 *Ex vivo* Cross-korrelation der *in vivo* Ergebnisse von ROS/RNS Produktion.

Um unsere *in vivo* OI-Ergebnisse zu validieren, wurde eine *ex vivo* Dihydrorhodamin 123 (DHR) Durchflusszytometrieanalyse (FACS) der ROS/RNS-Produktion der Immunzellen in den entzündeten Ohren und den drainierenden zervikalen Lymphknoten (dLK) 24 Stunden nach der ersten TNCC-Challenge durchgeführt. Dabei reagiert das Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 das fluoreszent ist, mit einem Spektrum von 508 nm Exzitation und 529 nm Emission. Die dabei ermittelte Fluoreszenzintensität (FI) ist proportional zu der ROS/RNS-Produktion [207]. Dazu wurden die Zellsuspensionen aus dem frischen Gewebe gewonnen und entweder nur mit DHR gefärbt um die Baseline ROS/RNS-Produktion zu bestimmen oder vor der DHR-Färbung mit PMA

stimuliert. PMA aktiviert die Proteinkinase C wodurch der respiratorische Burst in Neutrophilen ausgelöst wird [208].

Nicht stimulierte Immunzellen aus den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen zeigten eine bis zu 50% geringere ROS/RNS-Produktion (Median: 97 (Interquartilbereich: 89 – 102) FI) im Vergleich zu iNOS<sup>-/-</sup> (150 (147 – 167) FI), MPO<sup>-/-</sup> (196 (200 – 179) FI) und Wildtyp-Mäuse (161 (154 – 175) FI) (**Abbildung 16**). Dagegen wurden keine signifikanten Unterschiede in den dLK zwischen den experimentellen Gruppen beobachtet. Dies ist vor allem auf eine geringe Anzahl von Neutrophilen im Lymphknoten zurückzuführen.

Die Stimulation mit PMA induzierte einen enormen Anstieg der ROS/RNS-Produktion in den Immunzellen der entzündlichen Ohren und der dLK in MPO<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen. Wohingegen die Immunzellen aus den entzündeten Ohren der gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen nur einen leichten Anstieg der ROS/RNS Produktion (113 (105 – 127) FI) im Vergleich zu den nicht stimulierten Immunzellen aufwiesen. Die ROS/RNS-Produktion der Immunzellen der entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (640 (515 – 919) FI) war ähnlich hoch wie in den Ohren von Wildtyp-Mäusen (700 (652 – 845) FI), während die ROS/RNS-Produktion in den Immunzellen aus entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen (531 (429 – 555) FI) um ca. 25% reduziert war (**Abbildung 16**). Somit spiegeln die Ergebnisse der DHR-FACS-Analyse unsere *in-vivo*-OI-Ergebnisse wieder. Beide Methoden demonstrierten die fehlende ROS/RNS-Produktion in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen, reduzierte ROS/RNS-Produktion in Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen und eine nahezu uneingeschränkte ROS/RNS-Produktion in entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Das lässt darauf schließen, dass NOX2 und MPO die dominanten Quellen für die ROS-Produktion während der akuten und chronischen Kontaktallergie sind.



**Abbildung 16: Ex vivo ROS/RNS-Produktion.**

Ex vivo DHR-FACS-Analyse der ROS/RNS Produktion im entzündlichen Ohrgehörte und den dLK 24 h nach der ersten Challenge. Die Immunzellen wurden mit 30 ug/ml DHR für 15 min inkubiert. Stimulierte Zellen wurden vor der Inkubation mit 30 ug/ml DHR mit 0,5 µM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) behandelt. FI: Fluoreszenzintensität. Die Daten der ROS/RNS Produktion werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ns = nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc-Dunn-Test; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche  $n = 5$  in jeder Gruppe); Abbildung nach [206].

### 3.1.4 Analyse der Zellpopulationen in sekundär lymphatischen Organen via Durchflusszytometrie

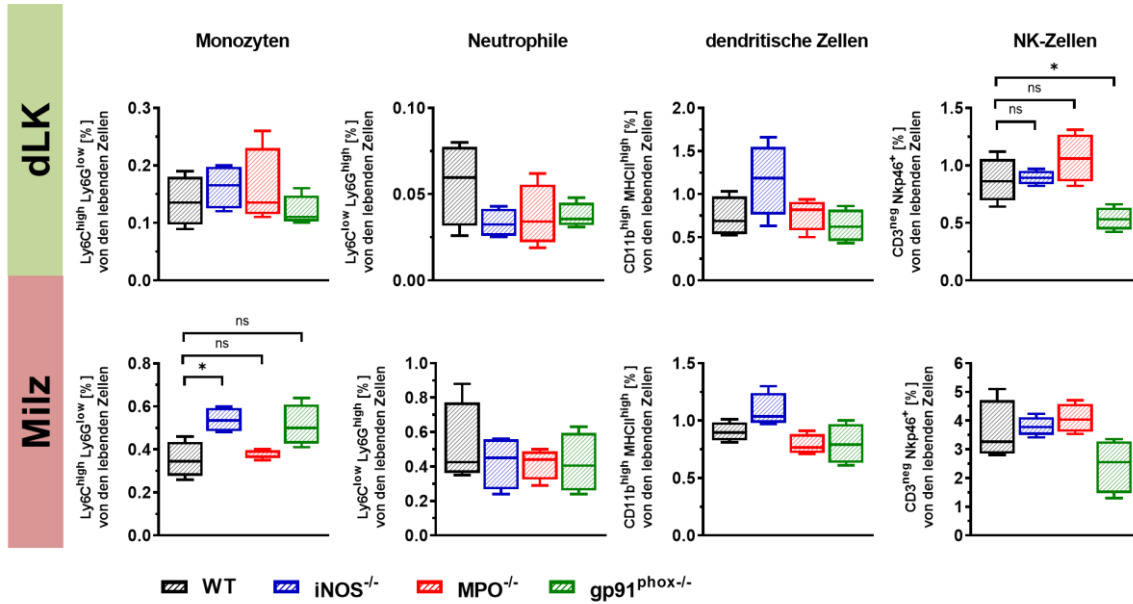
Um zu prüfen ob die differentielle Reduktion von ROS/RNS in den transgenen Mauslinien Auswirkungen auf bestimmte Immunzellpopulationen hat, wurden die dLK und Milzen 24 Stunden nach dem fünften Challenge entnommen, aufbereitet und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Gating Strategie siehe **Abbildung 12**).

Beim Vergleich der verschiedenen Immunzellpopulation zeigte sich eine leicht vermehrte Monozytenpopulation in den Milzen von  $iNOS^{-/-}$  Mäusen ( $iNOS^{-/-}$ : 0,54 (0,48 – 0,6)%; WT: 0,35 (0,26 – 0,46, Interquartilbereich)%), während die  $gp91^{phox^{-/-}}$  Mäuse eine signifikant niedrigere NK-Zellpopulation in den dLK aufwiesen ( $gp91^{phox^{-/-}}$ : 0,53 (0,66 – 0,42)%; WT 0,86 (1,12 – 0,64)%) (**Abbildung 17 A**). Untersuchungen der B-Zell-, der  $CD4^{+}$  T-Zell- und der  $CD8^{+}$  T-Zell-Population in den dLK und Milzen der verschiedenen Versuchsgruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 17 B**).

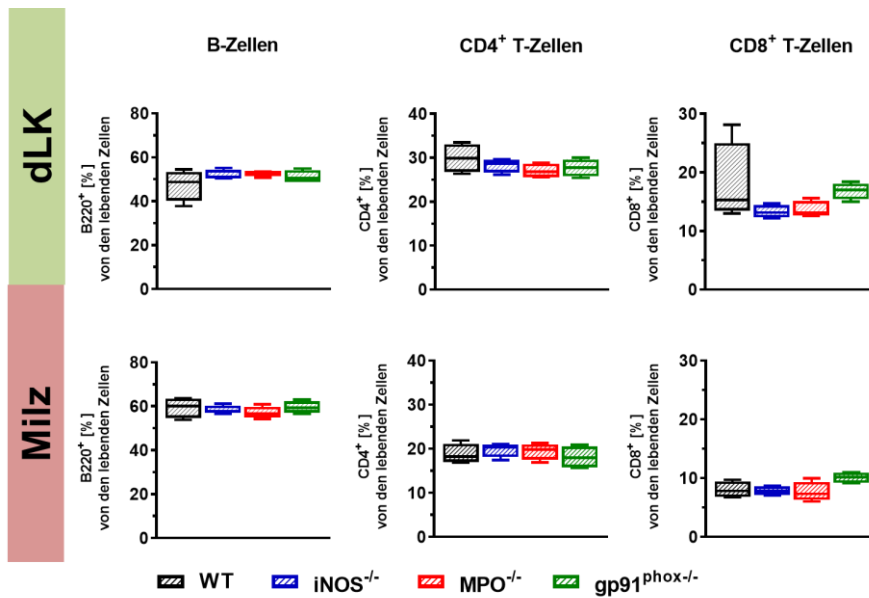
Des Weiteren zeigten die  $iNOS^{-/-}$  Mäuse eine etwas geringere Anzahl an naiven  $CD4^{+}$  (67,1 (63,8 – 68,9)%) und  $CD8^{+}$  (71,1 (67,1 – 72,9)%) T-Zellen in den dLK im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ( $CD4^{+}$ : 72,7 (68,4 – 79,9)%;  $CD8^{+}$ : 76,8 (73,5 – 84,6)%) (**Abbildung 17 C**). Beim Vergleich des T-Zellaktivierungsmarkers CD69 und des Immuncheckpoints PD-1 zwischen den transgenen Mauslinien und den Wildtyp-Mäusen

wurden ebenfalls keinerlei signifikanten Unterschiede festgestellt (**Abbildung 17 D**). Dies spricht für eine normale Sensibilisierungsphase mit erfolgreichem T-Zell-Priming in den ROS/RNS-defizienten Mäusen.

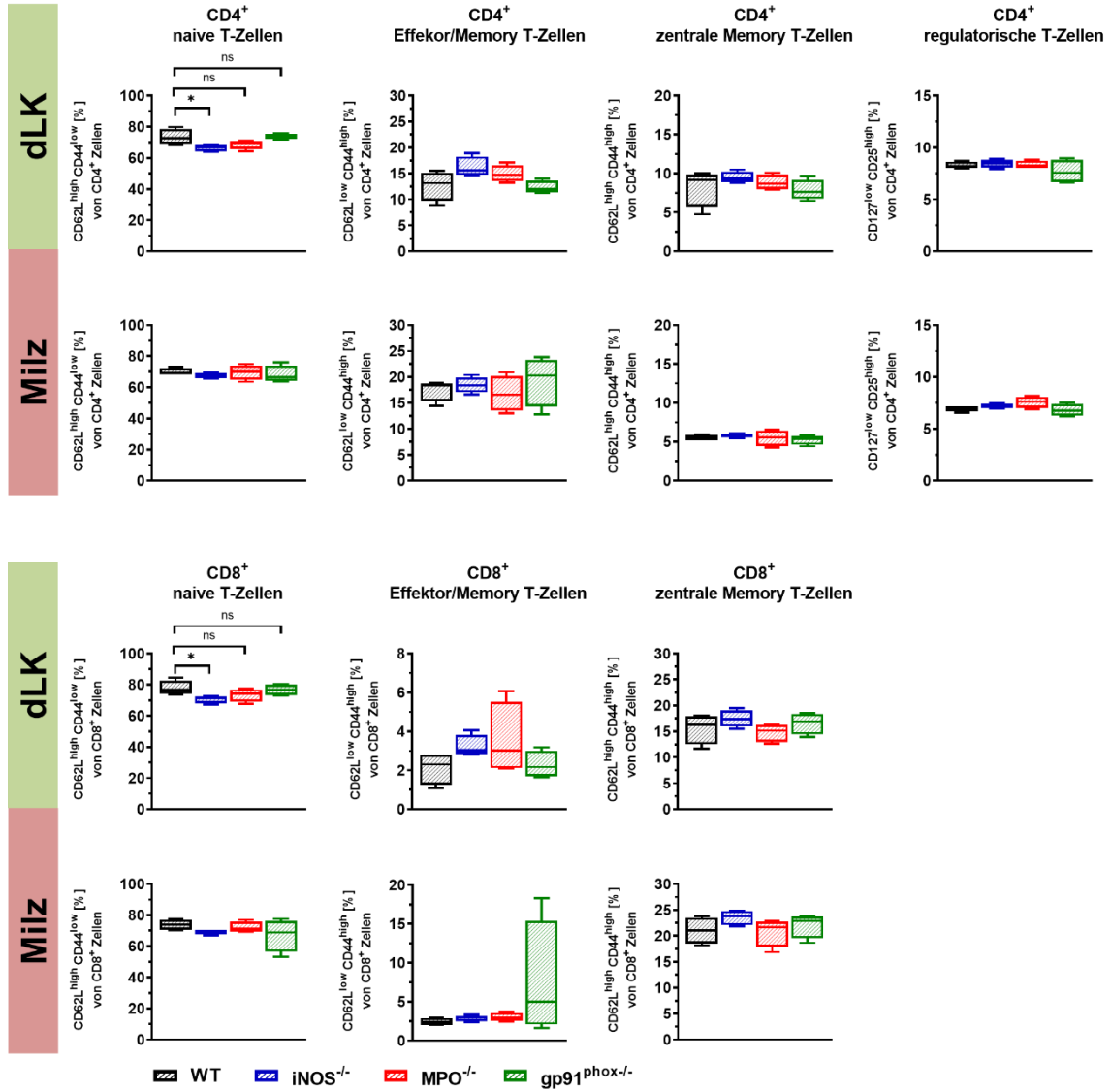
**A**



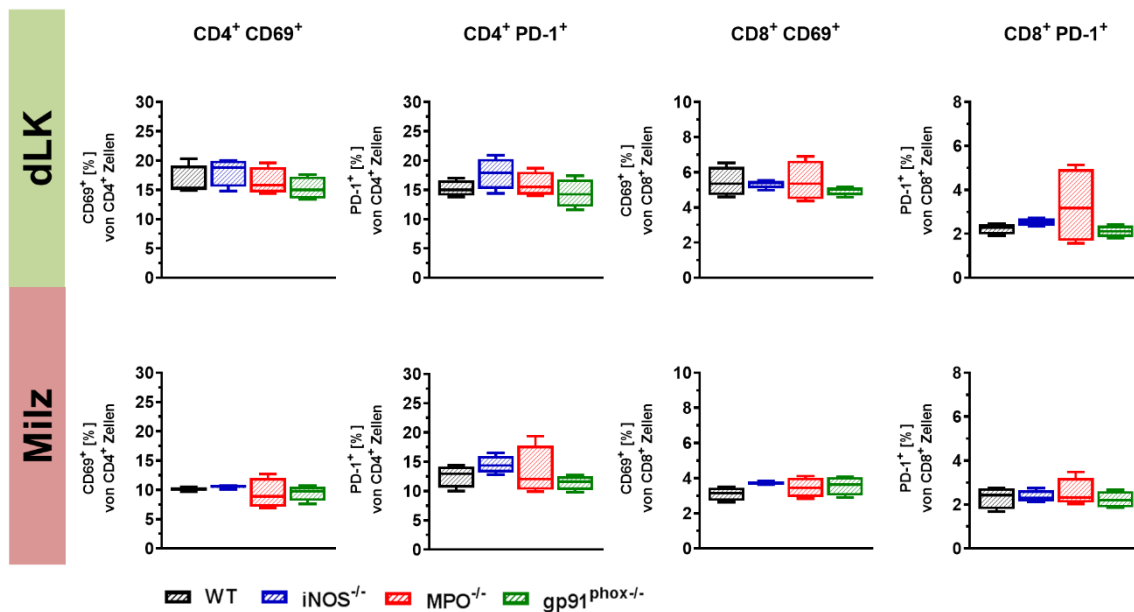
**B**



C



D



**Abbildung 17: Analyse der Zellpopulationen in den ROS/RNS-defizienten Mauslinien.**

FACS-Analyse der Immunzellpopulation in den dLK und den Milzen von Versuchsmäusen mit chronischer Kontaktallergie (24 h nach der 5. TNCB-Challenge). (A) Population der Leukozyten; (B) Population der B- und T-Zellen; (C) Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen; (D) Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD69 und des regulatorischen Checkpoints PD-1 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an; \*  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Tests mit Post-hoc-Dunn-Tests  $n = 5$  in jeder Gruppe). Abbildung nach [206].

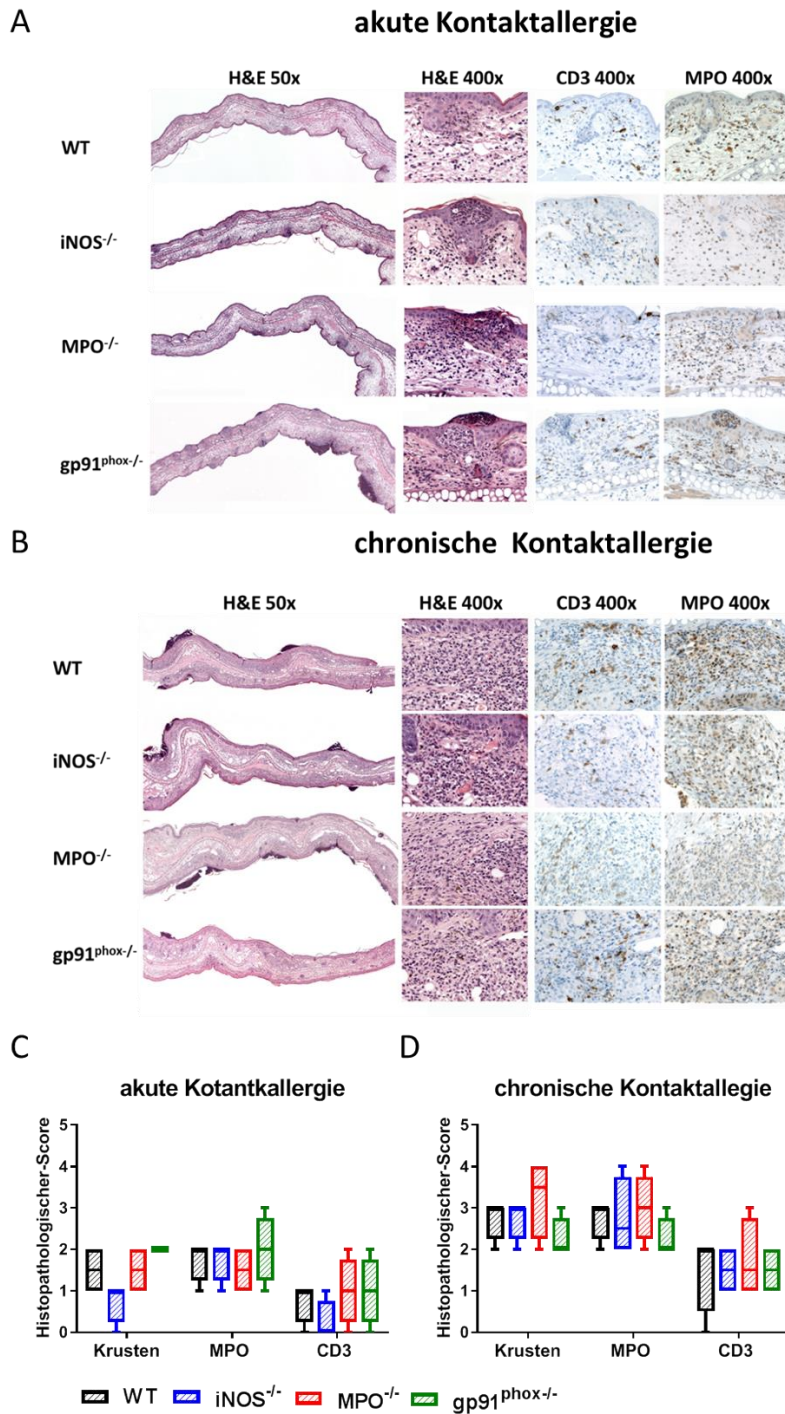
### 3.1.5 Histopathologische Analyse und die Konsequenzen von ROS/RNS-Defizienz

Um den Entzündungsprozess und die Immunreaktion besser zu charakterisieren, wurden die entzündeten Ohren mit akuter und chronischer Kontaktallergie, von Wildtyp,  $gp91^{phox-/-}$ ,  $MPO^{-/-}$  und  $iNOS^{-/-}$  Mäusen in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und zur histopathologischen Evaluation mittels H&E gefärbt. Zusätzlich wurden von den Ohrgewebeschnitten immunhistochemische Analysen unter Verwendung von CD3- und MPO-mAb durchgeführt um die Verteilung und Akkumulation der T-Zellen und Neutrophilen im entzündeten Ohrgewebe zu untersuchen. Bei den  $MPO^{-/-}$  Mäusen mussten die Neutrophilen aufgrund der fehlenden Expression von MPO morphologisch bestimmt werden.

Die histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen von Wildtyp-Mäusen mit akuter Kontaktallergie ergaben eine regelmäßige Epidermis ohne Hyperkeratose ohne Krustenbildung, mit nur wenigen kleinen Neutrophilen-Abszessen (Munrow-Abszesse). Die Dermis wies leichte Ödeme und erweiterte Kapillaren mit

entzündlichem Immuninfiltrat auf, das hauptsächlich aus Neutrophilen bestand. Die vereinzelt T-Zellen waren hauptsächlich auf die Epidermis beschränkt und kaum in der Dermis vorhanden. Während der chronischen Kontaktallergie entwickelte sich eine Hyperkeratose sowohl auf der dorsalen als auch auf der ventralen Seite der entzündeten Ohren, mit starker Krustenbildung und vereinzelt Neutrophilen-Abszessen. Die Dermis wies eine verstärkte Ödembildung und eine Erweiterung der Blut- und Lymphgefäße mit einer erhöhten Anzahl an T-Zellen und einem dichten Immunzellinfiltrat aus MPO positiven Neutrophilen auf. Im Gegensatz zur akuten Kontaktallergie beinhaltete das Immunzellinfiltrat zusätzlich große Mengen an mononuklearen Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, die typisch für eine chronische Entzündung sind. Trotz der ähnlichen Ohrschwellungsreaktion während der akuten Kontaktallergie zeigten die Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen eine etwas stärkere entzündliche Immunreaktion mit multiplen Läsionen, Krusten, Neutrophilen-Abszessen der Epidermis sowie einem verstärkten entzündlichem Immunzellinfiltrat im Vergleich zu MPO<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 18 A und C**). Die immunhistochemische Untersuchung der entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen bestätigte ebenfalls eine leicht erhöhte Anzahl der T-Zellen und Neutrophilen in der Epidermis und der Dermis im Vergleich zu den anderen experimentellen Gruppen. Die Anzahl der T-Zellen in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> war vergleichbar zu den gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 18 A und C**).

Die Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten die geringste Entzündungsreaktion, mit einer geringeren Anzahl an Neutrophilen-Abszessen und reduzierter Anzahl an T-Zellen während der akuten Phase der Kontaktallergie (**Abbildung 18 A und C**). Während der chronischen Kontaktallergie war die Entzündungsreaktion in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen am stärksten ausgeprägt und wies schwere Schädigungen der Epidermis und große Neutrophilen-Abszesse auf (**Abbildung 18 B und D**). Im Gegensatz dazu war die Entzündungsreaktion in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen während der chronischen Kontaktallergie, mit einer verringerten Ödembildung und reduziertem Neutrophilen-Infiltrat, am schwächsten ausgeprägt (**Abbildung 18 B und D**). Zusammenfassend muss jedoch festgestellt werden, dass die histopathologischen Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsgruppen sich auf einem geringen Niveau verhielten. Dies zeigt sich insbesondere bei Betrachtung des histopathologischen Scores (**Abbildung 18 C und D**).



**Abbildung 18: Histopathologische Analyse von akuten und chronischen Kontaktallergie.**

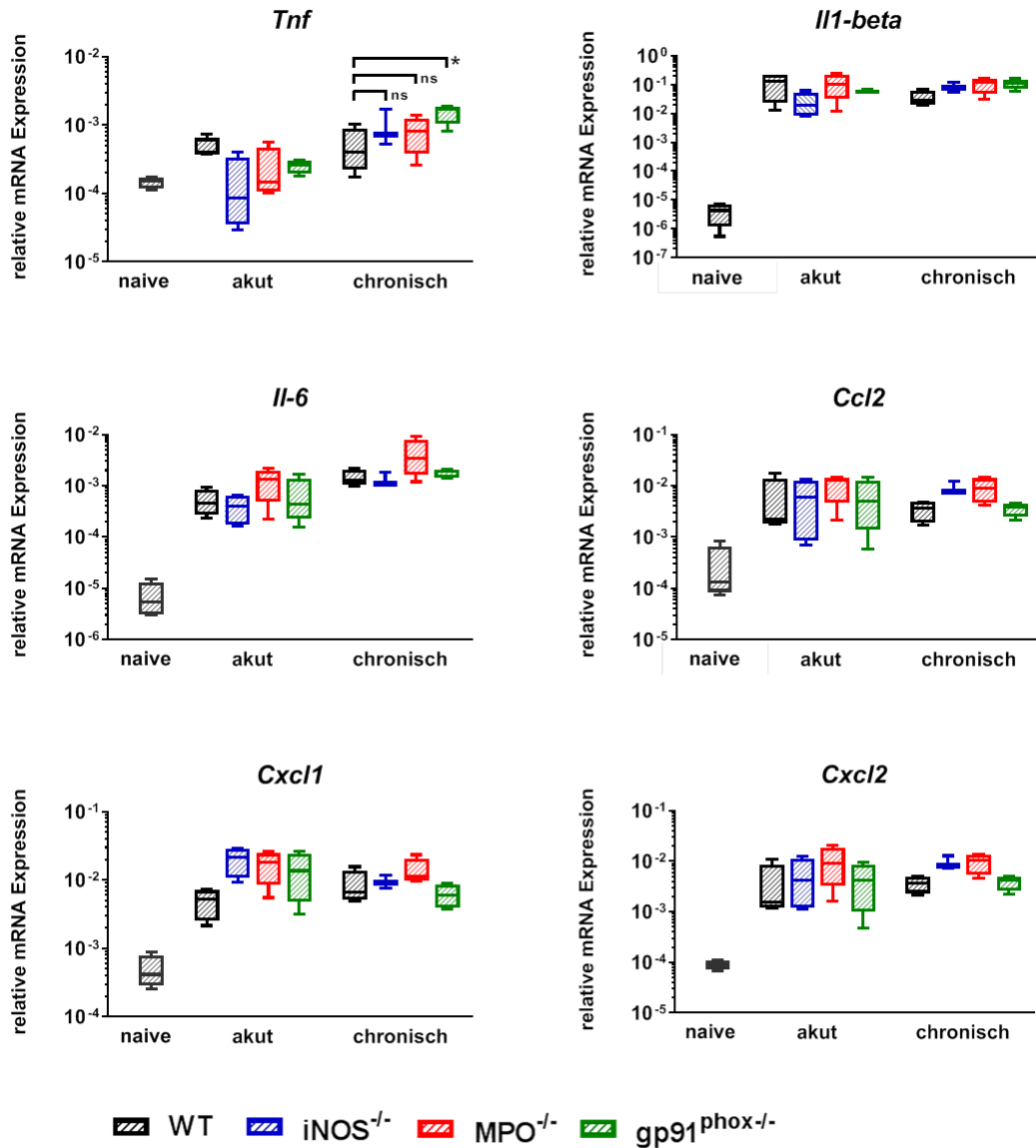
Repräsentative Bilder von entzündetem Ohrgehör mit (A) akute Kontaktallergie (24 h nach der 1. Challenge) und (B) chronische Kontaktallergie (24 h nach der 5. Challenge). Histopathologische Analyse von (C) akute und (D) chronische Kontaktallergie. Der histopathologische Score wurde anhand der Anzahl der epidermalen Abszesse und Krusten pro Ohrgehörbeschnitt bewertet (0 = keine Krusten oder Abszesse; 1 = Abszesse, keine Krusten; 2 = zwischen 1 und 5 Krusten, 3 = zwischen 6 und 10 Krusten, 4 = mehr als 11 Krusten). Die Anwesenheit von Neutrophilen (MPO) und T-Zellen (CD3) in den Ohrgehörbeschnitten wurde semiquantitative bestimmt (0 = kein entzündliches Infiltrat; 1 = minimales entzündliches Infiltrat; 2 = mildes entzündliches Infiltrat; 3 = mäßiges entzündliches Infiltrat; und 4 = schwer entzündliches Infiltrat). Die Quantifizierung der Neutrophilen in MPO<sup>-/-</sup> Mäusen erfolgte morphologisch. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an (n = 4 für jede Versuchsgruppe). Abbildung nach [206].

### 3.1.6 Einfluss des differenziellen ROS/RNS-Mangels auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen

Als nächstes wurden die Genexpressionsmuster der NF- $\kappa$ B-regulierten proinflammatorischen Zytokine *Il-6*, *Il-1beta* und *Tnf* sowie der Chemokine *Cxcl1*, *Cxcl2* und *Ccl2*, die für die Rekrutierung von Neutrophilen, T-Zellen und DCs verantwortlich sind, bestimmt [209-212]. Für die Analyse mittels RT-PCR wurde das entzündete Ohrgewebe von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen zu den Zeitpunkten der stärksten Ohrschwellungsreaktion verwendet (akut 24 h 1. Challenge und chronisch 4 h 5. Challenge).

Der Vergleich von entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen mit denen von Wildtyp-Mäusen während der akuten Kontaktallergie zeigte keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Dagegen war die *Tnf* mRNA-Expression in gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen während der chronischen Phase signifikant erhöht. Dies steht im Kontrast zu den histopathologischen Untersuchungen, welche eine reduzierte Entzündung aufwiesen (**Abbildung 19**).

Entzündliche Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten die stärkste *Il-6*, *Ccl2* und *Cxcl2* mRNA-Expression sowie eine tendenziell erhöhte mRNA-Expression von *Cxcl1* während der akuten und chronischen Kontaktallergie im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, welche jedoch nicht signifikant waren. Die vermehrte mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäuse bestärkt unsere vorangegangenen histopathologischen Ergebnisse. Die Analyse von entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen während der akuten Kontaktallergie ergab eine tendenziell reduzierte mRNA-Expression von *Il-1beta* und *Tnf* und eine erhöhte *Cxcl1* mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dagegen war die mRNA-Expression von Chemokinen *Ccl2* und *Cxcl2* während der chronischen Phase leicht erhöht.

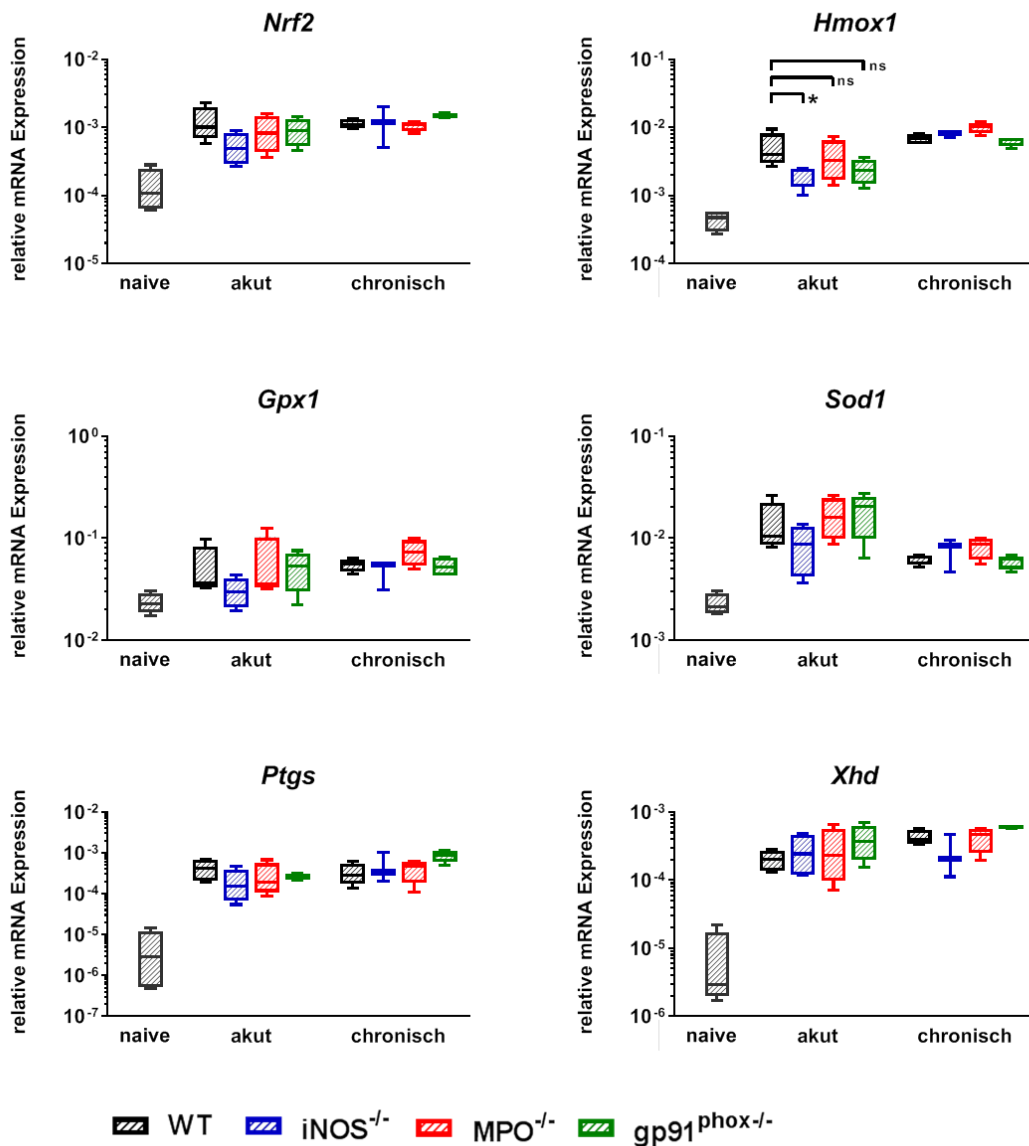


**Abbildung 19: RT-PCR-Analyse der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen während einer akuten und chronischen Kontaktallergie.**

Entzündetes Ohrgewebe wurde 24 h nach der 1. TNCB-Challenge (akute Kontaktallergie) und 4 h nach der 5. Challenge (chronischer Kontaktallergie) entnommen. Als Kontrolle wurde das Ohrgewebe von naiven Wildtyp-Mäusen verwendet. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an (n = 4). \* p < 0,05, ns = nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche). Abbildung nach [206].

Überraschender Weise ergab die Untersuchung der mRNA-Expression von *Nrf2*, einem Transkriptionsfaktor, der die Expression von antioxidativen Proteinen reguliert, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (**Abbildung 20**). Allerdings zeigten die iNOS<sup>-/-</sup> Mäuse in der akuten Phase eine Tendenz zu einer verminderten Expression von *Nrf2*, *Gpx1* und *Sod1*, während die mRNA-Expression von *Hmox1* sogar signifikant verringert war im Vergleich zu den entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen. Weiterhin wurde die mRNA-Expression von ROS/RNS-

produzierenden Proteinen verglichen. Dabei war die mRNA-Expression von Xanthinoxidase (*Xhd*) und Cyclooxygenase 2 (*Ptgs2*) in allen Versuchsgruppen während der akuten und chronischen Kontaktallergie ähnlich stark exprimiert, während die mRNA-Expression von *iNos*, *eNos*, *Mpo* und *Nox4* unter der Nachweisgrenze von 32 Zyklen lag und deshalb nicht weiter auswertbar war.



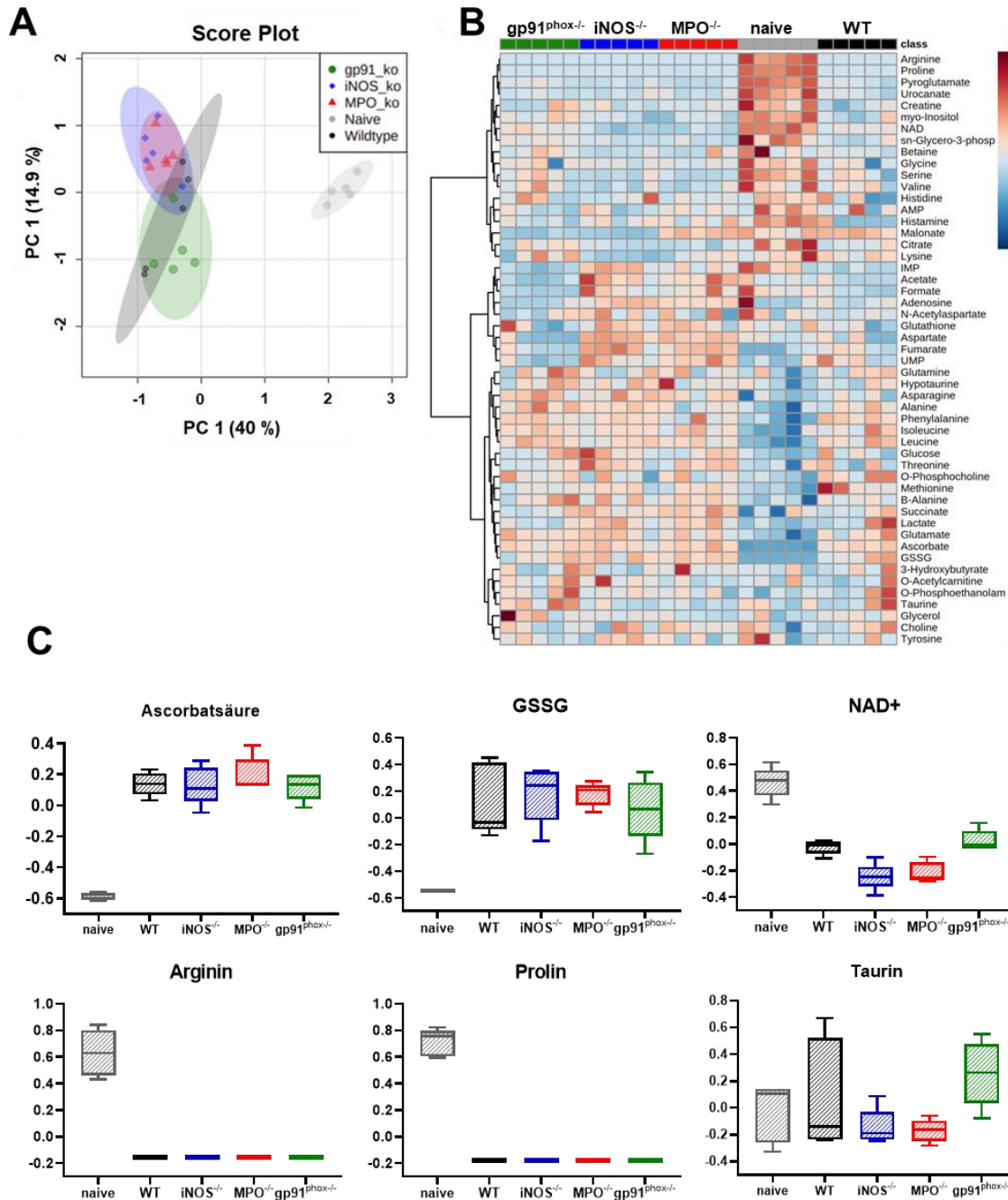
**Abbildung 20: RT-PCR-Analyse der mRNA-Expression von Redox-regulierenden Proteinen sowie ROS produzierenden Proteinen während einer akuten und chronischen Kontaktallergie.**

Entzündetes Ohrgehäuse wurde 24 h nach der 1. TNCB-Challenge (akute Kontaktallergie) und 4 h nach der 5. Challenge (chronischer Kontaktallergie) entnommen. Als Kontrolle wurde das Ohrgehäuse von naiven Wildtyp-Mäusen verwendet. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an (n = 4). \* p < 0,05, ns = nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche). Abbildung nach [206].

### 3.1.7 Metabolomics

Um zu überprüfen ob die unterschiedliche ROS/RNS-Produktion in den entzündeten Ohren von Wildtyp-, gp91<sup>phox-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie Auswirkungen auf den Metabolismus hat wurde eine 1H-NMR-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Die Hauptkomponentenanalyse „*principal component analysis*“ (PCA) der normalisierten Metabolitendaten zeigte eine deutliche Trennung aller Versuchsgruppen mit chronischer Kontaktallergie entlang der Hauptkomponente 1 (PC1)-Dimension im Vergleich zu den nicht entzündeten Ohren von naiven Mäusen (**Abbildung 21 A**). Im Gegensatz hierzu gab es keine klare Trennung des Metabolitenprofils zwischen den ROS/RNS-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen, was auf die starke Varianz zwischen den einzelnen Individuen in der Wildtypgruppe zurückzuführen ist (**Abbildung 21 A**). Dennoch zeigten entzündliche Ohren der gp91<sup>phox-/-</sup>-Mäuse eine deutliche Trennung in ihrem metabolischen Profil verglichen zu den Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> und MPO<sup>-/-</sup>-Mäusen entlang der PC2-Dimension.

Als nächstes wurden die Datensätze der 48 analysierten Metaboliten für die hierarchische Clusteranalyse und die Erstellung einer Heatmap verwendet, um die Clusterbildung aller Proben in jeder Versuchsgruppe zu visualisieren (**Abbildung 21 B**). Der Fokus auf redox-aktiven Metaboliten, Ascorbat, GSSG, Nicotinamidadenindinukleotid (NAD), Arginin, Prolin und Taurin zeigte die auffälligsten Veränderungen (**Abbildung 21 C**). Im Detail zeigten alle Versuchsgruppen mit chronischer Kontaktallergie stark erhöhte Ascorbat- und GSSG-Spiegel im Vergleich zu naiven Mäusen. Im scharfen Gegensatz dazu waren die NAD-, Arginin- und Prolinspiegel stark erschöpft (**Abbildung 21 C**). Interessanterweise war die Konzentration von Taurin, welches als Antioxidans fungieren kann, nur in gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen deutlich erhöht.



**Abbildung 21: Metabolische Analyse der chronischen Kontaktallergie.**

(A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) der normalisierten Metabolitendaten von entzündeten Ohren mit chronischer Kontaktallergie. Die schattierten Bereiche repräsentieren die 95 % Konfidenzintervalle der jeweiligen Gruppencluster (naive WT-, WT-, iNOS<sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und gp91<sup>phox-/-</sup> Mäuse). (B) Hierarchische Clusteranalyse (HCA) und Heatmap der 48 analysierten Metaboliten. Die Farbskala veranschaulicht die Konzentration der einzelnen Metaboliten. Rot: hohe Konzentration, Blau: niedrige Konzentration. (C) Unterschiede in redox-aktiven Metaboliten; Ascorbat, Glutathiondisulfid (GSSG), oxidiertes Nicotinadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>), Arginin, Prolin und Taurin. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilsspannen dargestellt; Whiskers zeigen die Min- und Max-Werte an (n = 5 je Versuchsgruppe). Abbildung nach [206].

### 3.1.8 Auswirkungen von ROS und RNS auf die Lipidperoxidation

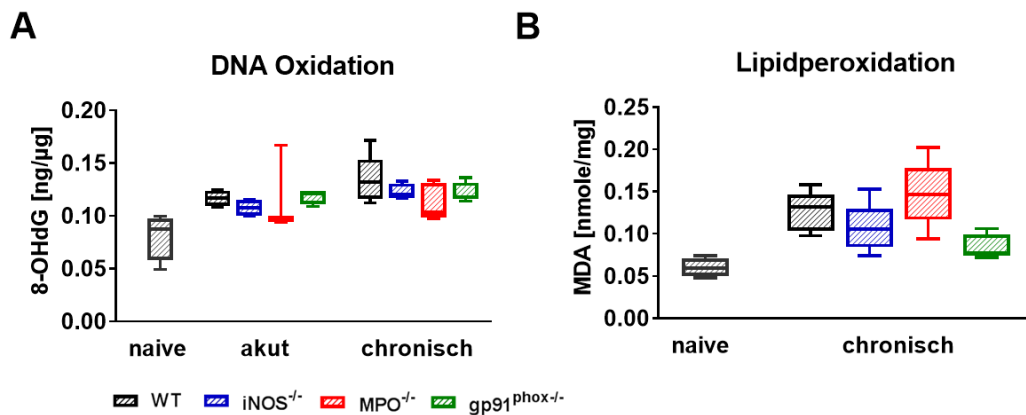
Hohe ROS/RNS Produktion kann zum oxidativen Stress führen. ROS/RNS oxidiert Proteine, DNA und Lipide, wodurch die Funktion der Zellen geschädigt wird. Lipidperoxidation kann z.B. dazu führen, dass die Zellen ihr Membranpotential nicht mehr aufrechterhalten können und dadurch absterben, während die Oxidation der DNA zur Karzinogenese beitragen kann (siehe 1.3.5).

Da die L-012 OI- und DHR-FACS-Analysen keine ROS/RNS-Produktion in den gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen nachweisen konnte, stellte sich die Frage, ob diese verringerte ROS/RNS-Produktion zu einer verringerten Oxidation der DNA und der Lipide in entzündeten Ohrgehörte von Mäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie führt. Um diese Frage zu beantworten wurde die Menge an 8-OHdG (DNA-Oxidation) und MDA (Lipidperoxidation) als Marker für den oxidativen Stress in den entzündeten Ohren von Wildtyp, gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht.

Alle Versuchsgruppen zeigten erhöhte 8-OHdG-Konzentrationen bei akuter und chronischer Kontaktallergie im Vergleich zu unbehandelten naiven Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 22 A**). Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in den 8-OHdG-Konzentrationen zwischen den entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen und den entzündeten Ohren von ROS/RNS-defizienten Mäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie festgestellt werden (**Abbildung 22 A**).

Die Analyse der Lipidperoxidation während der chronischen Kontaktallergie ergab eine leicht verringerte MDA Konzentration in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (5B; p = 0,065: nicht signifikant) (**Abbildung 22 B**), was auf einen reduzierten ROS/RNS Stress hindeutet. Wohingegen es kaum Unterschiede in MDA Konzentrationen zwischen den entzündeten Ohren von Wildtyp, MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen gab. Jedoch zeigten alle experimentellen Gruppen einen erhöhten oxidativen Stress im Vergleich zu den naiven Mäusen (**Abbildung 22 B**).

Zusammengefasst, deutet die Analyse der DNA-Oxidation, Lipidperoxidation, redoxaktiven Metaboliten und der Regulation von ROS/RNS-regulierenden Genen auf einen ähnlich hohen oxidativen Stress in den entzündeten Ohren von Wildtyp- und ROS/RNS-defizienten Mäusen während der akuten und chronischen kutanen Kontaktallergie hin.



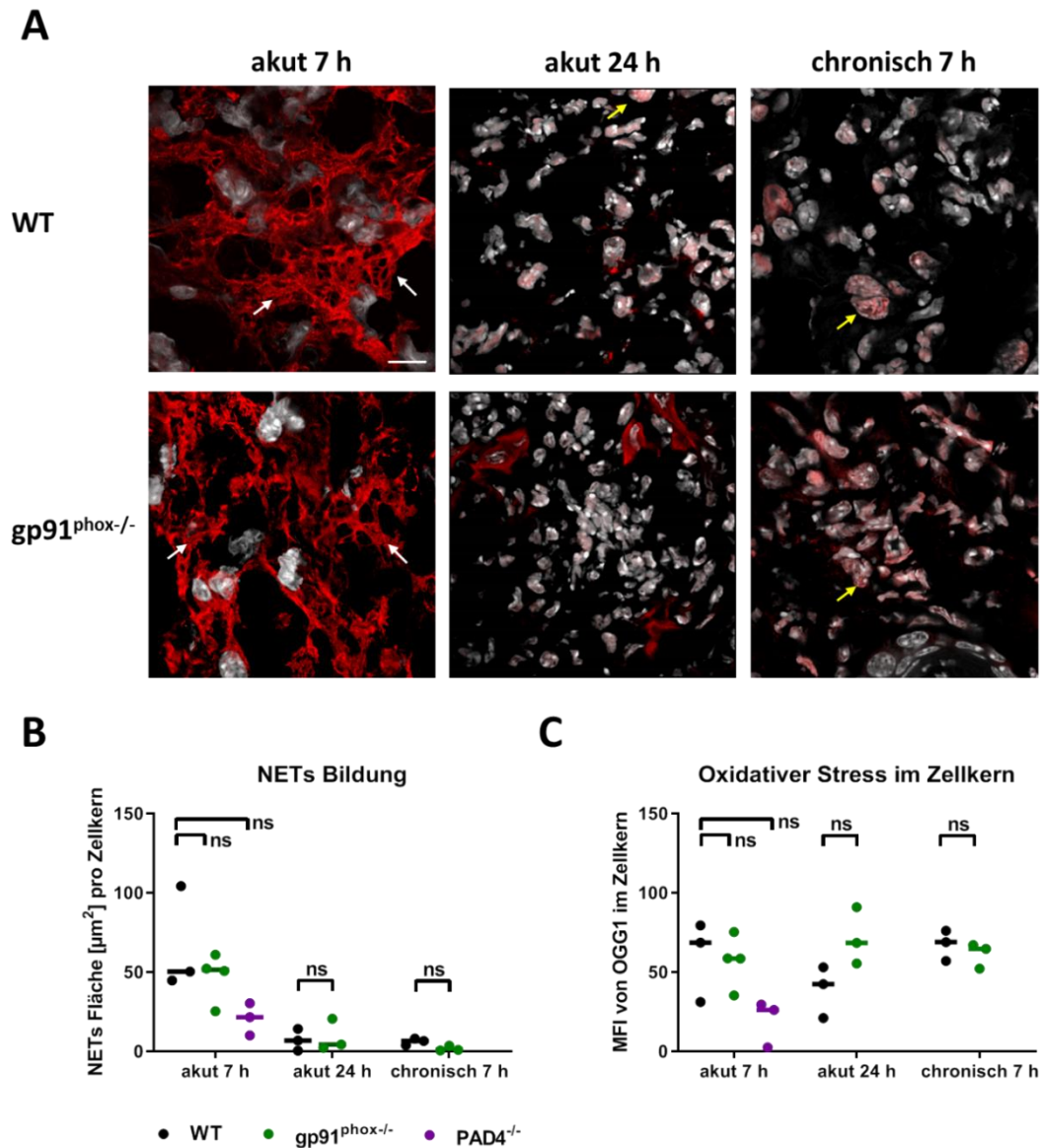
**Abbildung 22: Oxidativer Stress im entzündeten Ohrgewebe.**

Ohrproben von WT-, iNOS<sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen wurden 24 h nach der 1. und 5. TNCB-Challenge gewonnen. Als Kontrolle dienten die Ohren von unbehandelten naiven Mäusen. **(A)** Oxidative DNA-Schädigung im Ohr von Versuchsmäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie. 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OHdG) ng/μg DNA (n = 4). **(B)** Lipidperoxidation in entzündlichen Ohren mit chronischer Kontaktallergie. Malondialdehyd (MDA) in nmol/mg Ohrgewebe (n = 5). Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den WT und anderen Versuchsgruppen beobachtet (Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test). Abbildung nach [206].

### 3.1.9 Auswirkungen von ROS/RNS auf die DNA

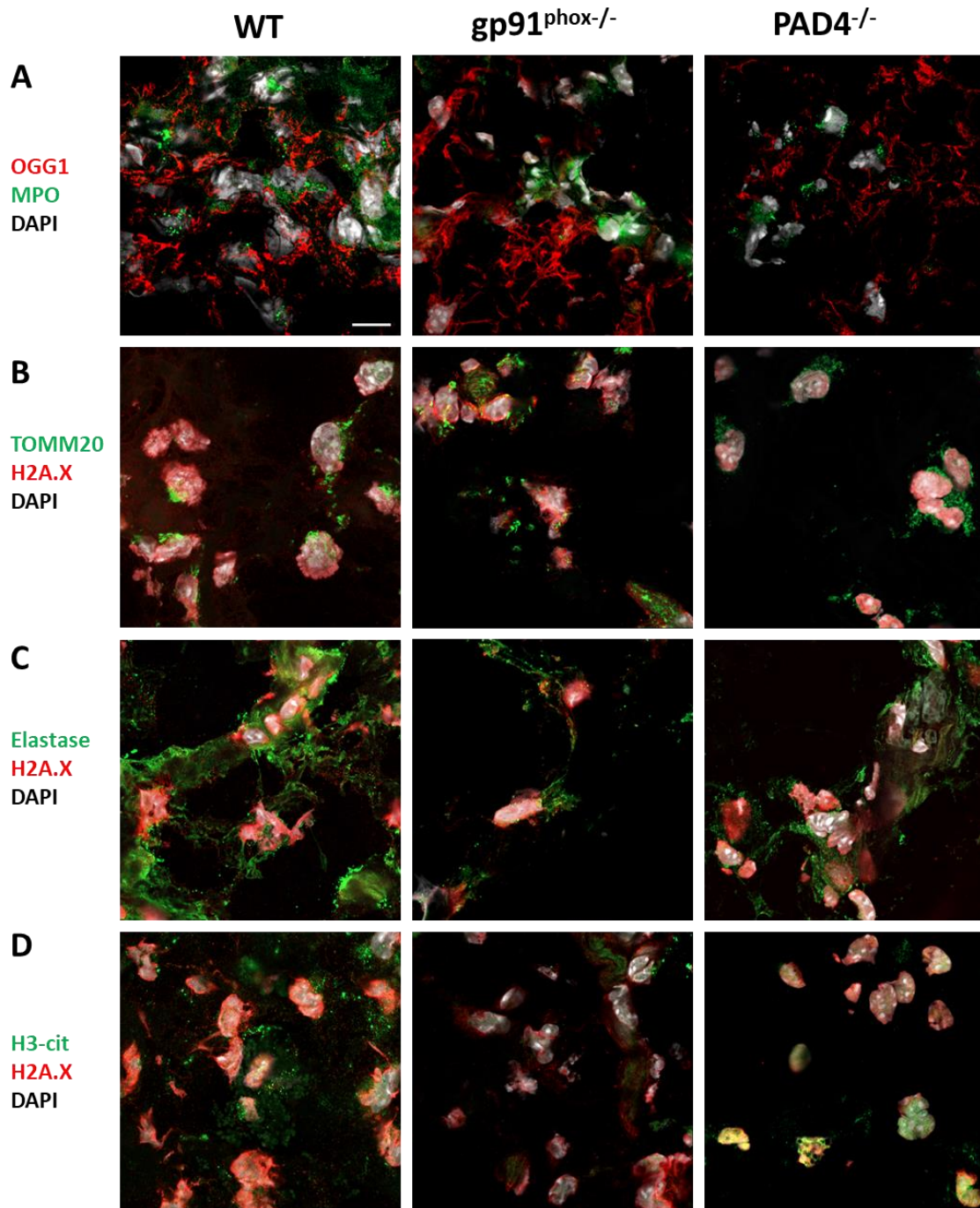
Aktuelle Studien zeigen, dass oxidative DNA-Schäden und die OGG1-Expression mit einer proinflammatorischen Immunantwort assoziiert sind [87, 88, 213, 214]. Obwohl die entzündeten Ohren von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie eine stark reduzierte ROS/RNS-Produktion aufwiesen, war die Konzentration von 8-OHdG- und *Ogg1*-mRNA-Expression ähnlich hoch wie in den Wildtyp-Mäusen. Deshalb wurden zusätzlich OGG1 Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebsschnitten der entzündeten Ohren von gp91<sup>phox-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie angefertigt. OGG1 ist ein Enzym, das für die Beseitigung der mutagenen Base 8-Oxoguanin verantwortlich ist welche im Rahmen der Oxidation von Guanin entsteht [215]. Die entzündeten Ohren von Wildtyp- und gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen mit akuter Kontaktallergie zeigten bereits 7 h nach der 1. TNCB-Challenge eine ausgeprägte Akkumulation von OGG1-positiven Netz-ähnlichen Strukturen im extrazellulären Raum (**Abbildung 23 A**). Um zu überprüfen, ob es sich bei den Netz-ähnlichen Strukturen tatsächlich um NETs handelt, wurden zusätzliche Färbungen für NETs-assoziierte Proteine und Marker wie MPO, Elastase, H2A.X, TOMM20 (mitochondriale Importrezeptor-Untereinheit) und die H3-Citrullinierung durchgeführt. Die Netz-ähnlichen Strukturen in den entzündeten Ohren von Wildtyp- und gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen entstammen MPO-positiven Neutrophilen und exprimierten Elastase und Histon H2A.X, jedoch kein

TOMM20 (**Abbildung 24 A, B und C**). Dies legt nahe, dass es sich tatsächlich um nukleäre und nicht mitochondriale NETs handelt. Des Weiteren zeigten die NETs in den Wildtyp-Mäusen eine intensive Färbung für die H3-Citrullinierung, die in den NETs von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen kaum nachweisbar war (**Abbildung 24 D**). Im Gegensatz zur akuten Kontaktallergie konnten während der chronischen Kontaktallergie keine NETs nachgewiesen werden (**Abbildung 23 A und B**). Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte zudem, dass OGG1 überwiegend in den NETs und in viel geringerem Maße in den Zellkernen präsent war (**Abbildung 23 A**). Die zusätzlichen OGG1-Färbungen in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen 7 Stunden nach der 1. TNCB-Challenge bestätigten ebenfalls die Bildung von NETs (**Abbildung 25**). Eine semi-quantitative Analyse der OGG1-Färbung in den Zellkernen ergab keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung von oxidativem Stress in den entzündeten Ohren von Wildtyp- und gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen während einer akuten und chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 23 C**). Die entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen zeigten 24 Stunden nach der ersten Challenge sogar eine Tendenz zu reduzierten Akkumulation von OGG1 im Vergleich zu den Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 23 C**).



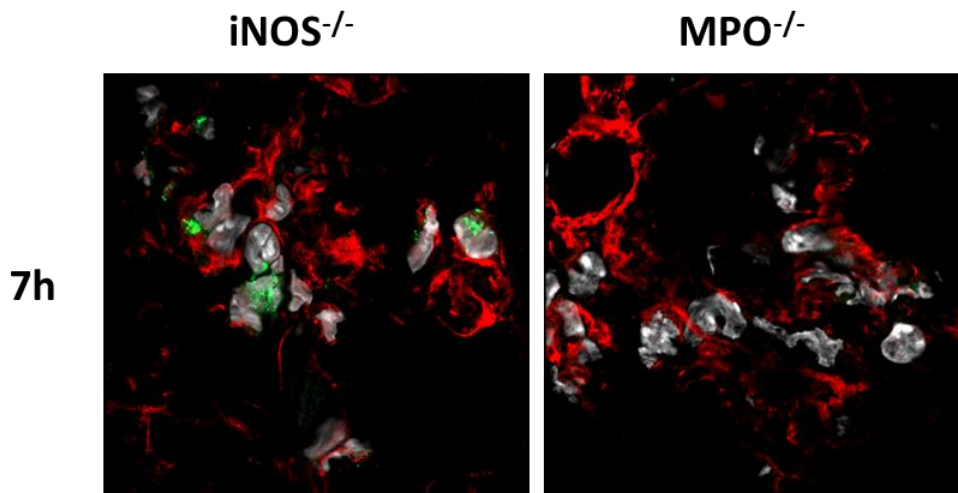
**Abbildung 23: Bildung von NETs und DNA-Oxidation während der akuten und chronischen Kontaktallergie.**

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder des Ohrgewebes von WT- und gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen mit akuter Kontaktallergie (7 h und 24 h nach der ersten Challenge) und chronischer Kontaktallergie (7 h nach dem fünften Challenge). Weiße Pfeile zeigen NETs; gelbe Pfeile zeigen die OGG1-Akkumulation im Zellkern an. Rot = OGG1, Grau = DAPI (n = 3). Messbalken = 10 µm. (B) Bildung von NETs während der akuten (7h, 24 h) und chronischen (7 h) Kontaktallergie in WT-, gp91<sup>phox-/-</sup> und PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Bildung von NETs wurde semiquantitativ analysiert, dazu wurde die Fläche [µm<sup>2</sup>] von OGG1 außerhalb der Zellkerne durch die Anzahl der Zellkerne geteilt. (C) Oxidativer Stress im Zellkern während einer akuten (7h, 24 h) und chronischen (7 h) Kontaktallergie in Ohren von WT-, gp91<sup>phox-/-</sup> und PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen. Der Oxidative Stress wurde semiquantitativ analysiert, indem die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von OGG1 in den Zellkernen ermittelt wurde. Horizontale Linien zeigen die Mediane an, Punkte die einzelnen Versuchstiere. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp-, gp91<sup>phox-/-</sup> und PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet (Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche). Abbildung nach [206].



**Abbildung 24: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder des Ohrgewebes von WT, gp91<sup>phox-/-</sup> und PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen 7 h nach der 1. TNCB-Challenge.**

(A) rot = OGG1; grün = MPO; und grau = DAPI. (B) rot = HA2.X; grün = TOMM20; und grau = DAPI. (C) rot = HA2.X; grün = Elastase; grau = DAPI. (D) rot = HA2.X; grün = H3-Citrullinierung; grau = DAPI. Für jede Versuchsgruppe und Färbung. Messbalken = 10 µm. Abbildung nach [206].



**Abbildung 25:** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von Ohrgewebe von  $iNOS^{-/-}$  und  $MPO^{-/-}$  Mäusen 7 h nach der 1. TNCB-Challenge.

Rot = OGG1; grün = MPO; grau = DAPI. Abbildung nach [206].

### 3.1.10 Einfluss von NETs auf die Entwicklung von akuter und chronischer Kontaktallergie

Jüngste Studien haben gezeigt, dass NETs bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen, akuten Verletzungen und Krebs eine wesentliche Rolle spielen könnten [3, 216-219]. Um zu untersuchen, ob die Bildung von NETs einen Einfluss auf die Entzündungsreaktion während der akuten und chronischen Kontaktallergie hat, wurden im Weiteren  $PAD4^{-/-}$  Mäuse untersucht. PAD4 ist ein Protein, das für die Deiminierung (Citruillinierung) der Histone H3 und H4 verantwortlich ist, indem es Peptidylargininreste in Peptidylcitrulline umwandelt. Es wird angenommen, dass dieser Prozess für die Bildung von NETs eine Rolle bei vielen Erkrankungen spielt [220, 221].

Überraschenderweise kam es in den entzündeten Ohren von  $PAD4^{-/-}$  Mäusen, sieben Stunden nach der ersten TNCB-Challenge, ebenfalls zu NETs-Bildung, jedoch im deutlich geringeren Ausmaß als in den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 23, B**). Sowohl die NETs als auch die Zellkerne der Neutrophilen zeigten eine schwach positive Färbung für die H3-Citruillinierung (**Abbildung 24, D**). Dies lässt darauf schließen, dass die Bildung von NETs während einer akuten Kontaktallergie unabhängig von NOX2 und teilweise unabhängig von PAD4 ist (**Abbildung 23 B; Abbildung 24**). Des Weiteren war die Menge an OGG1 in den Zellkernen von  $PAD4^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stark reduziert (**Abbildung 23 C**). Zudem konnte kein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Ohrschwellung und der ROS/RNS-Produktion (*in vivo* L-012 OI-Messungen) zwischen den  $PAD4^{-/-}$  und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden

(Abbildung 26 A und B). Die histopathologische Analyse von den entzündeten Ohren von PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie zeigte eine ähnlich starke Krustenbildung und Anzahl an Neutrophilen-Abszessen wie die entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen, jedoch war die Anzahl der T-Zellen und MPO-positiven Neutrophilen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen leicht erhöht (Abbildung 26 C und D).

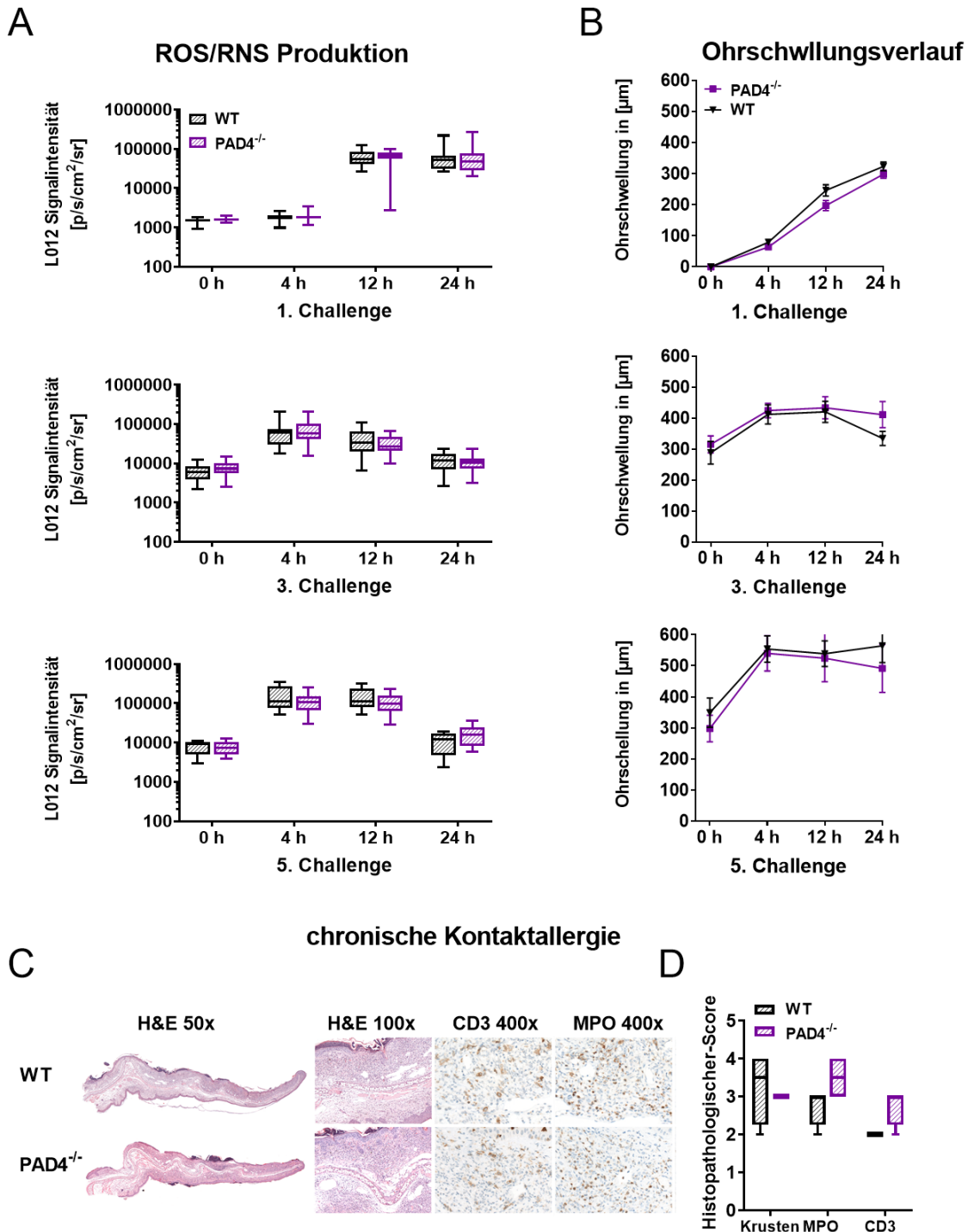


Abbildung 26: Ohrschwellungsverlauf und *in vivo* OI der ROS/RNS-Produktion in PAD4<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen.

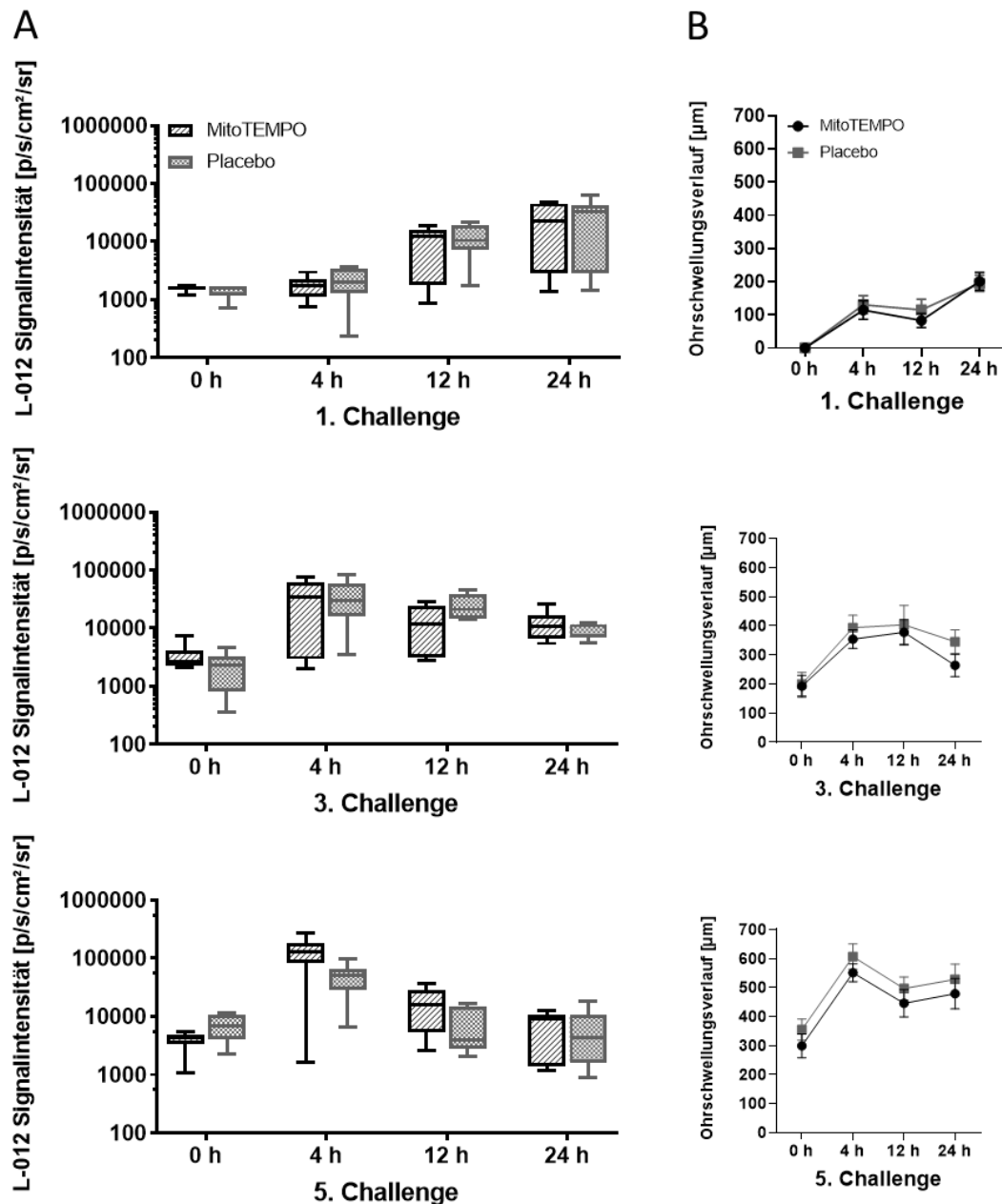
(A) *In vivo* OI der ROS/RNS-Produktion in den Ohren von Versuchsmäusen. L-012 wurde 5 Minuten vor der OI-Messung in Wildtyp- (n = 10) und PAD4<sup>-/-</sup> Mäuse (n = 10) *i.p.* injiziert. Die L-012 SI werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion zwischen PAD4<sup>-/-</sup> und WT-Mäusen beobachtet (Mann-Whitney-Test). (B) Ohrschwellungsverlauf von PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen während einer akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie. Die Daten werden als Mittelwerte ± SEM angezeigt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in dem Ohrschwellungsverlauf von PAD4<sup>-/-</sup> gegenüber Wildtyp-Mäusen beobachtet (PAD4<sup>-/-</sup>: n = 10; Wildtyp: n = 10, unabhängiger, zweiseitiger Student's t-Test). (C) Repräsentative Aufnahmen der H&E und immunhistochemischen Färbungen von T-Zellen (CD3) und Neutrophilen (MPO) im Ohrgewebe 24 h nach der 5. Challenge. (D) Der histopathologische Score wurde anhand der Anzahl der epidermalen Neutrophilen-Abszesse und Krusten pro Ohrgewebeschnitt bewertet (0 = keine Krusten oder Abszesse; 1 = Abszesse, keine Krusten; 2 = zwischen 1 und 5 Krusten, 3 = zwischen 6 und 10 Krusten, 4 = mehr als 11 Krusten). Die Anzahl von Neutrophilen (MPO) und T-Zellen (CD3) in den Ohrgewebeschnitten wurde semiquantitative bestimmt (0 = kein entzündliches Infiltrat; 1 = minimales entzündliches Infiltrat; 2 = mildes entzündliches Infiltrat; 3 = mäßiges entzündliches Infiltrat; und 4 = schwer entzündliches Infiltrat). Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen angezeigt. Whisker zeigen Min- und Max-Werte an (n = 4). Abbildung nach [206].

### 3.1.11 Die Rolle der mitochondrialen ROS-Produktion in der Kontaktallergie

Mitochondrien sind in vielen chronischen Erkrankungen eine der Hauptquellen der endogene ROS-Produktion und oxidativen Stress [222-225]. Um zu überprüfen ob die mitochondriale ROS-Produktion einen Einfluss auf die akute und chronische Kontaktallergie hat, wurden Wildtyp-Mäuse einmal täglich mit 1,5 mg/kg MitoTEMPO, einem ROS-Scavenger der sich spezifisch in Mitochondrien anreichert [226] behandelt, während die Kontrollgruppe (Placebo) mit NaCl-Lösung behandelt wurden. Der Vergleich der Ohrschwellungsreaktionen ergab hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen (**Abbildung 27 B**). Die *in vivo* OI-Messungen zeigten während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie keine signifikanten Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren von MitoTEMPO und Placebo behandelten Versuchsmäusen (**Abbildung 27 A**).

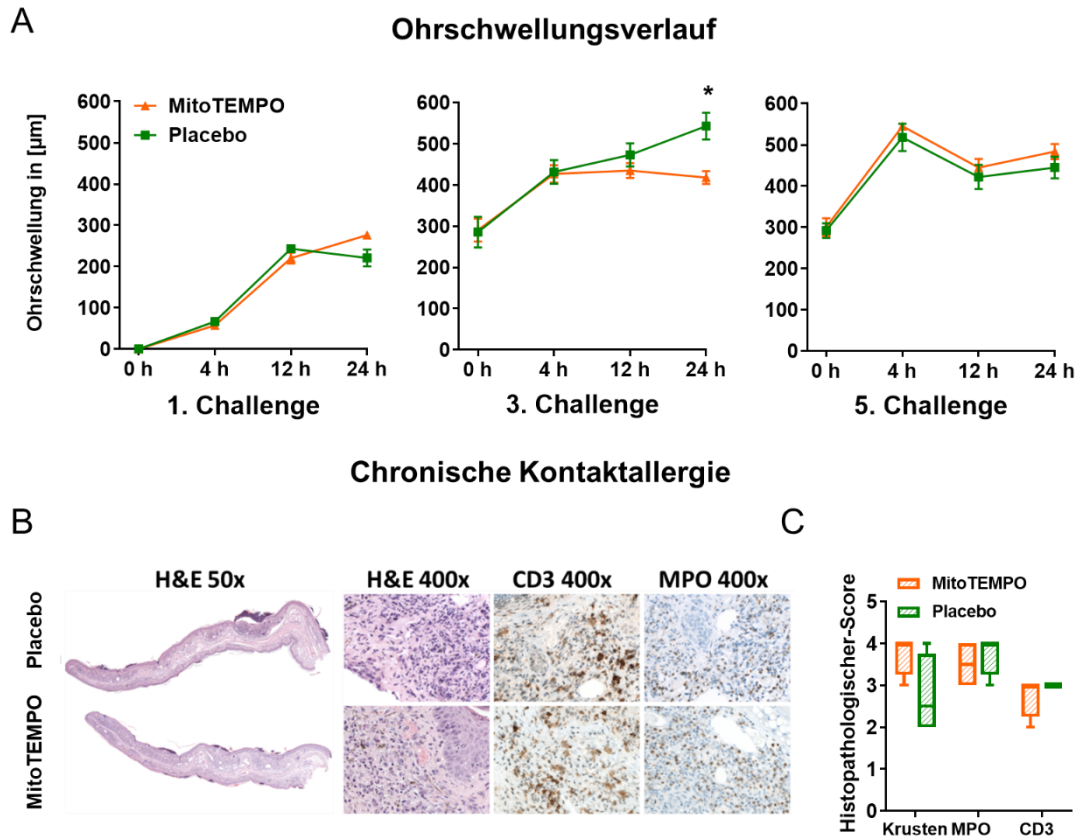
Obwohl in den *in vivo* OI- und *ex vivo* DHR-FACS-Messungen keine ROS/RNS-Produktion in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 15**; **Abbildung 16**) gelang es mittels Lipidperoxidation-Assays und OGG1-Färbung die Folgen von oxidativem Stress nachzuweisen (**Abbildung 22**; **Abbildung 23**). Deshalb wurde in einem weiteren *in vivo* Versuchsansatz die mitochondriale ROS-Produktion in gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen therapeutisch inhibiert. Die Therapie mit MitoTEMPO hatte keinen Einfluss auf den Ohrschwellungsverlauf während der akuten, früh chronischen und chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 28 A**). Ausschließlich 24 h nach der 3. Challenge zeigte sich in der MitoTEMPO Versuchsgruppe eine signifikant verringerte Ohrschwellungsreaktion. Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung der entzündeten Ohren mit chronischer Kontaktallergie konnten keine

Unterschiede in der Stärke der Entzündung sowie im entzündlichen Immuninfiltrat zwischen den MitoTEMPO und Placebo behandelten Tieren festgestellt werden (**Abbildung 28 B und C**). Somit scheint die mitochondriale ROS-Produktion keinen wesentlichen Einfluss auf die akute und chronische Kontaktallergie zu haben.



**Abbildung 27: Inhibition der mitochondrialen ROS-Produktion in Wildtyp-Mäusen.**

(A) *In vivo* OI der ROS/RNS-Produktion in den Ohren von Versuchsmäusen. L-012 wurde 5 Minuten vor der OI-Messung *i.p.* injiziert. Die L-012 SI werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion zwischen den MitoTEMPO und Placebo behandelten Tieren beobachtet; Mann-Whitney-Test. (B) Ohrschwellungsverlauf von MitoTEMPO und Placebo behandelten Mäusen während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angezeigt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Ohrschwellungsverlauf zwischen den MitoTEMPO und Placebo behandelten Tieren beobachtet; unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test. MitoTEMPO (n = 6), Placebo (n = 6).



**Abbildung 28: Inhibition der mitochondrialen ROS-Produktion in gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen.**

Beginnend drei Tage vor der ersten TNCB-Challenge wurden sensibilisierte gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen einmal täglich mit 1,5 mg/kg MitoTEMPO oder Placebo (NaCl-Lösung) mittels *i.p.* Injektion behandelt. Die Behandlung erfolgte bis zur fünften TNCB-Challenge. **(A)** Ohrschwellungsverlauf während der Therapie. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM angezeigt. Der einzige signifikante Unterschied in der Ohrschwellungsreaktion zwischen den MitoTEMPO- und Sham-Behandlungsgruppen wurde 24 h nach der dritten Challenge beobachtet. MitoTEMPO (n = 9); Placebogruppe (n = 8), \* p > 0,05, unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test. **(B)** Exemplarische Aufnahmen von H&E und immunhistochemischen Färbungen von T-Zellen (CD3) und Neutrophilen (MPO) im Ohrgewebe 24 h nach der fünften Challenge. **(C)** Der histopathologische Score wurde anhand der Anzahl der epidermalen Neutrophil-Abszesse und Krusten pro Ohrgewebeschnitt bewertet (0 = keine Krusten oder Abszesse; 1 = Abszesse, keine Krusten; 2 = zwischen 1 und 5 Krusten, 3 = zwischen 6 und 10 Krusten, 4 = mehr als 11 Krusten). Die Häufigkeit von Neutrophilen (MPO) und T-Zellen (CD3) in den Ohrgewebeschnitten wurde semiquantitative bestimmt (0 = kein entzündliches Infiltrat; 1 = minimales entzündliches Infiltrat; 2 = mildes entzündliches Infiltrat; 3 = mäßiges entzündliches Infiltrat; und 4 = schwer entzündliches Infiltrat). Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen angezeigt. Whisker zeigen Min- und Max-Werte an (n = 4). Abbildung nach [206].

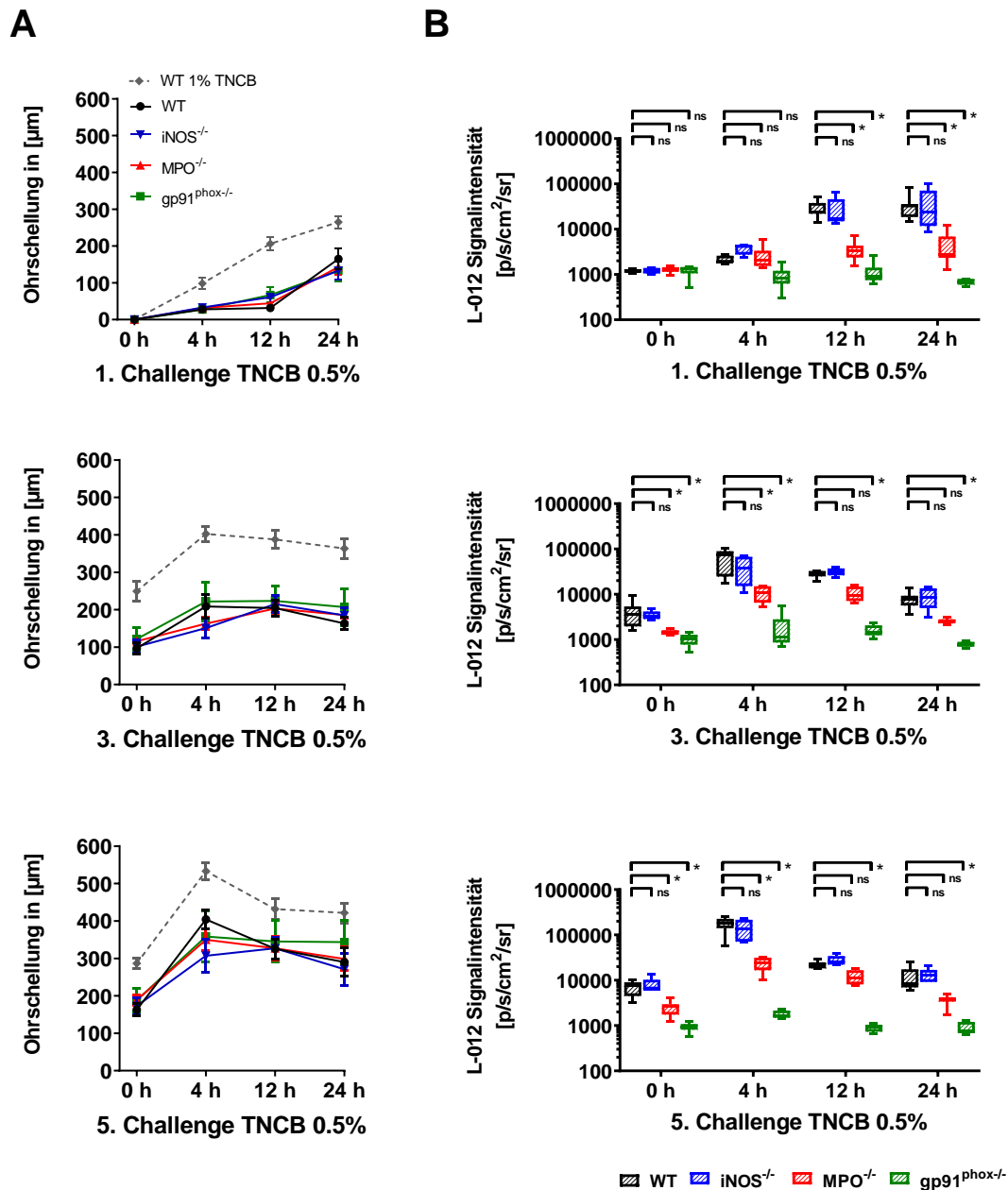
### 3.1.12 Auswirkungen einer Halbierung der TNCB Konzentrationen der TNCB-Challengelösung auf die Stärke der Kontaktallergie

Eine 1%ige TNCB Ohr-Challenge-Lösung führt zu einer starken Entzündungsreaktion und ausgeprägter Ohrschwellung und entzündlichem Infiltrat. Aufgrund der Stärke der Entzündungsreaktion könnte es sein, dass die vermutlich deutlich moderateren immunmodulierenden Wirkungen von ROS/RNS auf den Verlauf der Entzündung nicht zur Ausprägung kommen. Um eine weniger ausgeprägte, abgeschwächte, Entzündungsreaktion auszulösen wurde die Konzentrationen von TNCB-Challenge-Lösungen auf 0,5 % halbiert.

Alle Versuchsgruppen entwickelten unter Verwendung der 0,5%igen TNCB Ohr-Challenge-Lösung eine verringerte Ohrschwellungsreaktionen, begleitet von einer reduzierten ROS/RNS-Produktion (ausgenommen 4 h nach der 5. Challenge) (**Abbildung 29**) im Vergleich zu 1%igen TNCB-Challenge (**Abbildung 14**; **Abbildung 15**). Zur Visualisierung der deutlich verringerten Entzündungsreaktion wird in der **Abbildung 30 A** der Ohrschwellungsverlauf von mit 1% TNCB Challenge-Lösung behandelten Wildtyp-Mäusen dargestellt.

Die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren  $gp91^{phox-/-}$  Mäusen war ab 12 Stunden nach der ersten Challenge (0,5% TNCB; akute Kontaktallergiereaktion), sowie zu allen Messzeitpunkten während der frühen chronischen und chronischen Kontaktallergiereaktion signifikant reduziert (**Abbildung 29 A**), ähnlich wie unter Verwendung der 1%igen TNCB-Ohr-Challenge-Lösung (**Abbildung 15**).

In den entzündlichen Ohren von  $MPO^{-/-}$  Mäusen zeigte sich 12 und 24 Stunden nach der ersten Challenge sowie vor und 4 Stunden nach der dritten und fünften TNCB-Ohr-Challenge eine signifikant niedrigere ROS/RNS-Produktion. Dagegen konnten keine signifikanten Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion in entzündlichen Ohren von  $iNOS^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu Ohren von Wildtyp-Mäusen detektiert werden (**Abbildung 29 A**). Trotz der deutlich verringerten Entzündungsreaktion und der daraus resultierenden verringerten ROS/RNS-Produktion, unter Verwendung einer 0,5%-igen TNCB-Challenge-Lösung, konnten erneut keine signifikanten Unterschiede in den Ohrschwellungsreaktionen der ROS/RNS-defizienten Mäuse verglichen zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 29 A**).

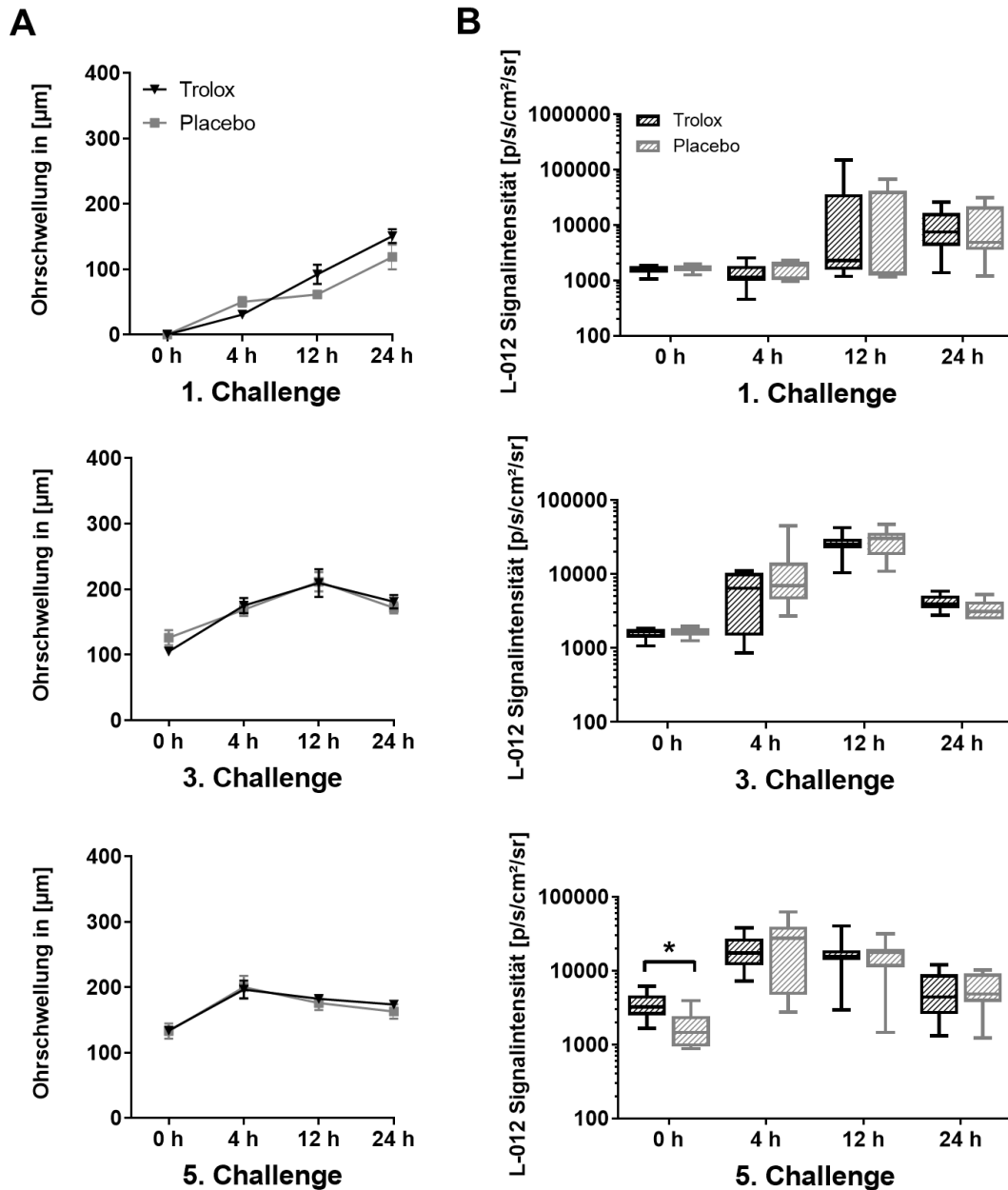


**Abbildung 29: Ohrschwellungsreaktion und ROS/RNS Produktion während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie unter Verwendung einer 0,5%igen TNCB-Ohr-Challenge-Lösung.**

(A) Ohrschwellungsverlauf während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie. Ohrschwellungsverlauf bei Wildtyp-Mäusen unter Verwendung einer 1%igen TNCB Challenge-Lösung (grau-gestrichelt). Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angezeigt, keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> oder iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen wurden festgestellt; Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test. (B) *In vivo* OI der ROS/RNS-Produktion in den Ohren der Versuchsmäuse. L-012 wurde 5 Minuten vor der OI-Messung in WT (n = 7), iNOS<sup>-/-</sup> (n = 5), MPO<sup>-/-</sup> (n = 7) und gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> (n = 6) Mäuse injiziert. Die ROS/RNS-Werte werden als Mediane mit Interquartilbereichen der durchschnittlichen SI (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) angezeigt; Whiskers geben die Min- und Max-Werte an. \* p < 0,05, ns = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche. Abbildung nach [206].

### **3.1.13 Einfluss einer Vitamin E-Therapie auf die ROS/RNS-Produktion und den Ohreschwellungsverlauf einer TNCB-induzierten Kontaktallergie**

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) ist ein wasserlösliches Vitamin-E-derivat, das starke antioxidative Eigenschaften aufweist. C57BL6/N Wildtyp-Mäuse wurden täglich mit 20 mg/kg Trolox *i.p.* therapiert, beginnend drei Tage vor der ersten 1%igen TNCB-Challenge. Der Placebogruppe wurde NaCl-Lösung injiziert. Beim Vergleich der Ohrschwellungsreaktionen der Trolox-therapierten Tiere mit den Ohrschwellungen der Tiere der Placebo-Gruppe (während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie) wurden zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede festgestellt (**Abbildung 30 A**). Zudem hatte die Troloxtherapie keine Auswirkungen auf die ROS/RNS-Produktion während der akuten und frühen chronischen Phase der Kontaktallergie (**Abbildung 30 B**). Während der chronischen Phase der Kontaktallergie, unmittelbar (0h) vor dem fünften TNCB-Ohr-Challenge war die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren der Trolox-Therapiegruppe sogar signifikant höher als in der Placebo-Gruppe (**Abbildung 30 B**).



**Abbildung 30: *In vivo* ROS/RNS-Produktion und Ohrschwellungsverlauf unter Therapie mit Trolox.**

(A) Ohrschwellungsverlauf von Trolox und Placebo behandelten Versuchstieren während einer akuten, früher chronischen und chronischen Kontaktallergie. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angezeigt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Ohrschwellungsverlauf zwischen den Trolox und Placebo behandelten Tieren beobachtet; unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test. Trolox ( $n = 7$ ), Placebo ( $n = 7$ ). (B) *In vivo* OI der ROS/RNS-Produktion in den Ohren der Versuchsmäuse. Die L-012 SI werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion zwischen den Trolox- und Placebo-behandelten Tieren beobachtet; unabhängiger, zweiseitiger Student's t-Test.

### 3.1.14 Einfluss von NOX4 auf die akute und chronische Kontaktallergie

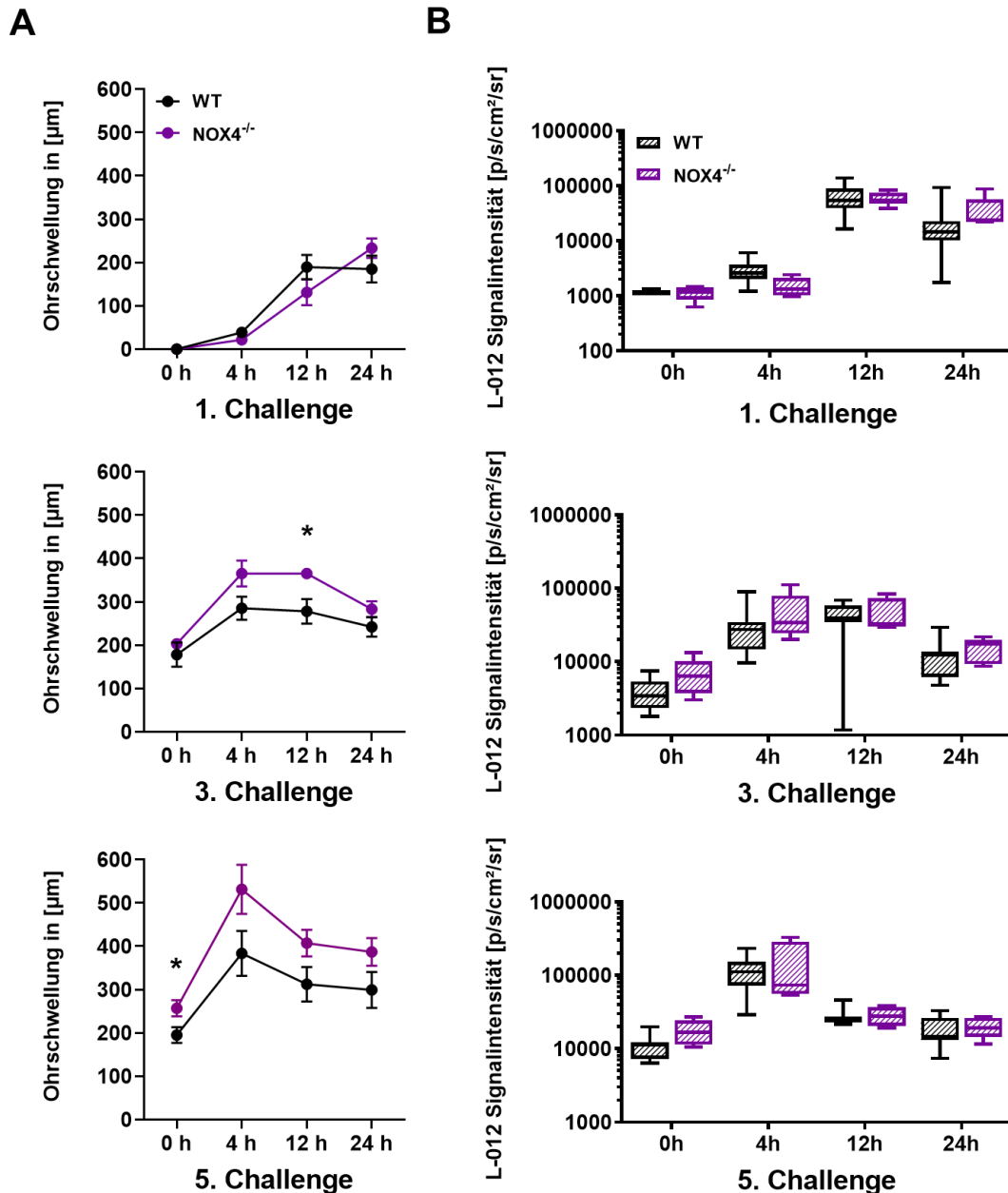
Die NOX4 ist neben NOX2 eine weitere wichtige Quelle der ROS-Produktion [73] und wird in verschiedenen Geweben wie Haut, Herz, Nieren und Endothelzellen,

Fibroblasten und Keratinozyten exprimiert [71, 72]. Im Vergleich zu anderen NOX-Isoformen, ist NOX4 konstitutiv aktiv und ist nicht auf Aktivatoren angewiesen. Außerdem produziert NOX4 als Produkt Wasserstoffperoxid anstelle des für NOX-Proteine üblichen Superoxids [65, 227]. Ein weiterer wesentlicher Unterschied von NOX4 zu NOX2 ist die Lokalisation in der Zelle. Während NOX2 in Phagosomen und Zellmembranen exprimiert wird [69], ist NOX4 hauptsächlich in den Zellmembranen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert [70].

NOX4<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten während der akuten Phase der Kontaktallergie eine ähnliche Ohrschwellungsreaktion wie die Wildtyp-Mäuse (**Abbildung 31 A**). Dagegen zeigten die NOX4<sup>-/-</sup> Mäuse während der frühen chronischen und chronischen Phase der Kontaktallergie eine tendenziell stärkere Ohrschwellungsreaktion als die Wildtyp-Mäuse mit einem signifikanten Unterschied 12 Stunden nach der dritten Challenge (NOX4<sup>-/-</sup>: 365  $\mu\text{m} \pm 11$  SEM vs. WT: 278  $\mu\text{m} \pm 28,5$  SEM) und vor der fünften Challenge (NOX4<sup>-/-</sup>: 257  $\mu\text{m} \pm 18,7$  SEM vs. WT: 195  $\mu\text{m} \pm 18,3$  SEM) (**Abbildung 31 A**).

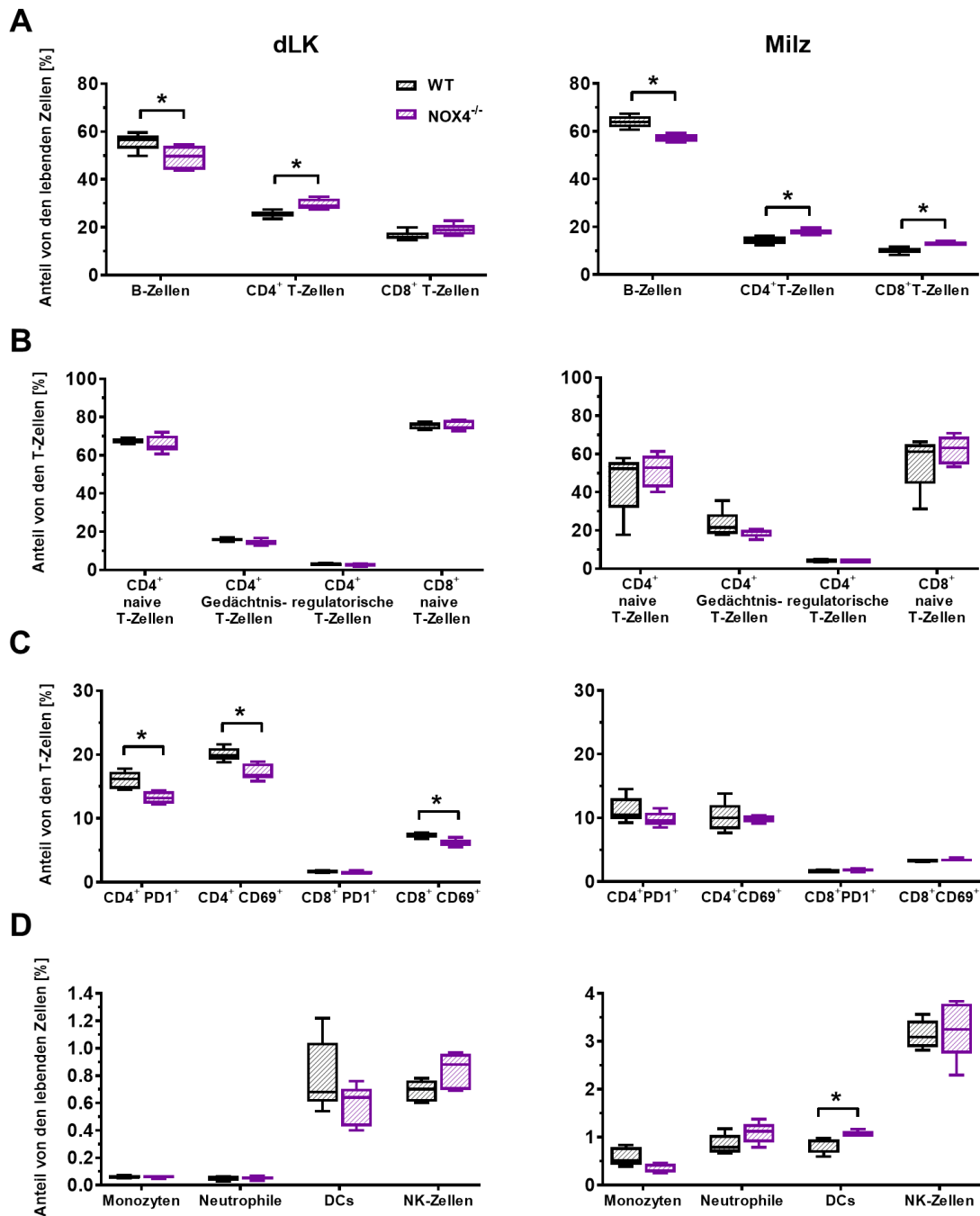
Untersuchungen der ROS/RNS-Produktion in entzündlichen Ohren von NOX4<sup>-/-</sup> Mäusen mittels *in vivo* L-012-OI-Messungen während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie zeigte keinerlei signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 31 B**). Die auffällig große Varianz der Messdaten der Wildtyp-Mäuse, 12 Stunden nach der 3. TNCB-Ohr-Challenge ist vermutlich auf eine fehlerhafte *i.p.* Injektion von L-012 zurückzuführen.

Die FACS-Analyse der dLK und Milzen von NOX4<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte eine signifikant reduzierte B-Zellpopulation (dLK, NOX4<sup>-/-</sup>: 49,7% vs. WT: 56,6%; Milz, NOX4<sup>-/-</sup>: 57,4% vs. WT: 63,8%) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 32 A**). Dagegen war die CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation in den dLK und Milzen der NOX4<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant erhöht (dLK, NOX4<sup>-/-</sup>: 28,8% vs. WT: 25,6%; Milz, NOX4<sup>-/-</sup>: 17,9% vs. WT: 14,1%), während die CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation ausschließlich in den Milzen (NOX4<sup>-/-</sup>: 13,3% vs. WT: 10,3%) signifikant erhöht war (**Abbildung 32 A**). Entgegen der stärkeren Ohrschwellungsreaktion der NOX4<sup>-/-</sup> Mäuse wurde eine geringere Anzahl von aktivierten CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (NOX4<sup>-/-</sup>: 16,8% vs. WT: 19,9%) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (NOX4<sup>-/-</sup>: 6,2% vs. WT: 7,2%) in den dLK detektiert (**Abbildung 32 C**). Des Weiteren war die Expression des Immuncheckpoints PD-1 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der dLK in NOX4<sup>-/-</sup> Mäusen schwächer als in Wildtyp-Mäusen (NOX4<sup>-/-</sup>: 13,2% vs. WT: 16,2%). Zudem war die Anzahl an DCs in den Milzen von NOX4<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Milzen von Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (NOX4<sup>-/-</sup>: 1,1% vs. WT: 0,9%) (**Abbildung 32 D**).



**Abbildung 31: Ohrschwellungsverlauf und *in vivo* OI-Messung der ROS/RNS-Produktion und in NOX4<sup>-/-</sup> Mäusen.**

(A) Ohrschwellungsverlauf von NOX4<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen während einer akuten, früher chronischen und chronischen Kontaktallergie. Die Daten werden als Mittelwerte ± SEM angezeigt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Ohrschwellungsverlauf zwischen den NOX4<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen beobachtet; \*  $p > 0,05$ , unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test. (B) L-012 wurde 5 Minuten vor der OI-Messung in WT (n = 7) und NOX4<sup>-/-</sup> (n = 5) injiziert. ROS/RNS-Werte der entzündlichen Ohren werden als Mediane mit Interquartilbereichen der durchschnittlichen Signalintensität (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) angezeigt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion zwischen den NOX4<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen beobachtet; unabhängiger, zweiseitiger Student's t-Test.



**Abbildung 32: Ex vivo FACS-Analyse der dLK und der Milz von NOX4<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen mit chronischer Kontaktallergie (24 h nach der 5. TNCB-Challenge).**

(A) B- und T-Zell-Population. (B) T-Zell-Subpopulationen. (C) Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Immuncheckpoints PD-1 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (D) Zusammensetzung der Leukozytenpopulation. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an; \* p < 0,05, ns = nicht signifikant; \* p > 0,05, unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test). WT (n = 5), NOX4<sup>-/-</sup> (n = 5).

### 3.1.15 Untersuchung der kontaktallergischen Reaktion in NRF2<sup>-/-</sup> Mäusen

Die bisherigen Untersuchungen von ROS/RNS-defizienten Mauslinien haben gezeigt, dass die Reduktion von ROS/RNS nur sehr geringe Auswirkungen auf das

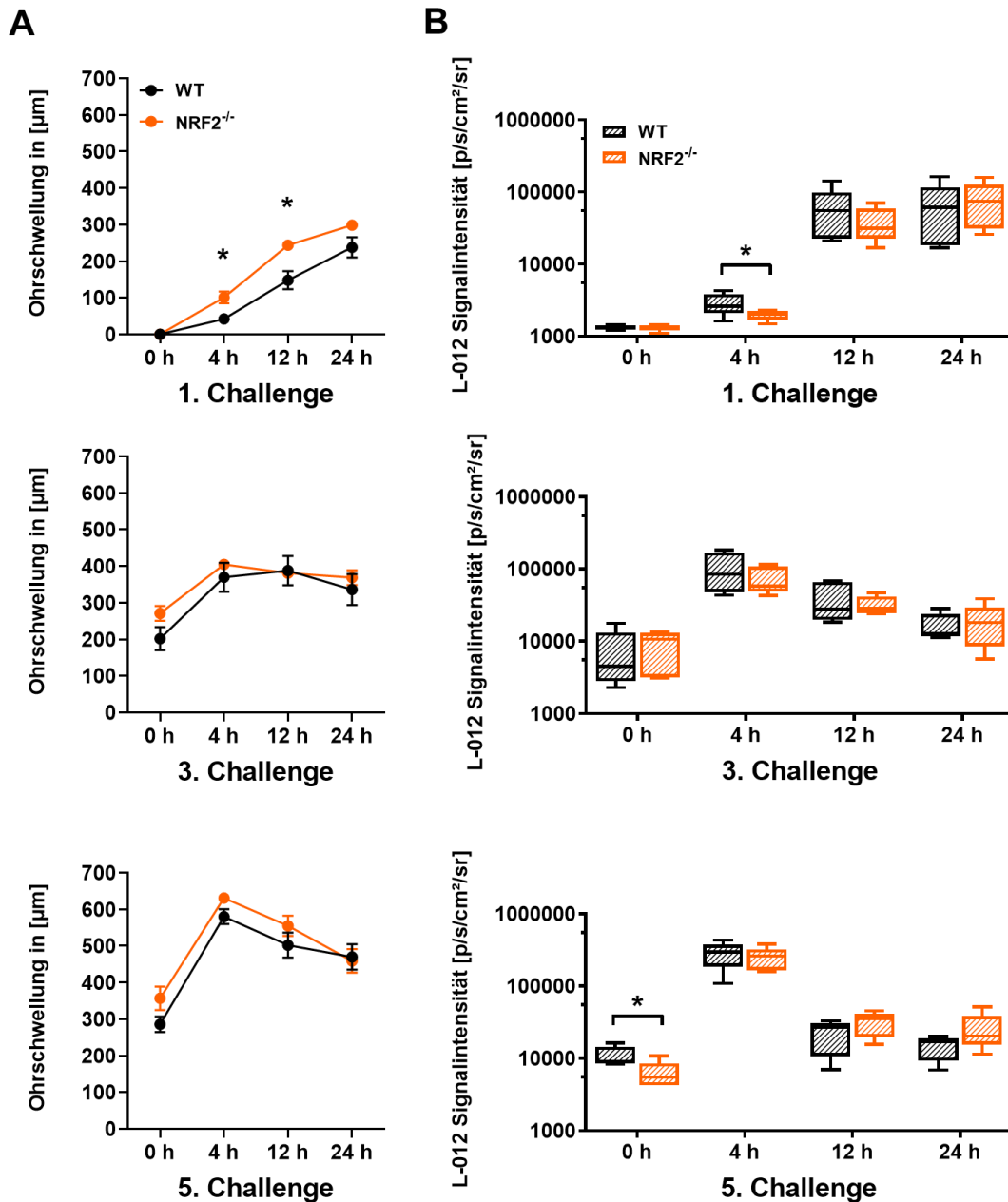
Entzündungsgeschehen während der akuten und chronischen Kontaktallergie hat. Um zu überprüfen ob im Gegenzug ein erhöhter oxidativer Stress die Kontaktallergie beeinflusst, wurde im folgenden Versuch die NRF2<sup>-/-</sup> Mauslinie untersucht. NRF2 ist der primäre Transkriptionsfaktor bei der Regulation von antioxidativen Proteinen (1.3.4.1). Die NRF2<sup>-/-</sup> Mäuse sind anfälliger gegenüber oxidativem Stress, aufgrund der verminderten Kapazität ROS/RNS zu neutralisieren. Somit ist die Mauslinie ideal, um die Auswirkungen eines erhöhten oxidativen Stresses auf die akute und chronische Kontaktallergie zu untersuchen.

Die NRF2<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten eine etwas stärkere akute kontaktallergische Reaktion, mit einer signifikant erhöhten Ohrschwellungsreaktion 4 Stunden (NRF2<sup>-/-</sup>: 101  $\mu\text{m} \pm 12,5$  SEM vs. WT: 42  $\mu\text{m} \pm 4,6$  SEM) und 12 Stunden (NRF2<sup>-/-</sup>: 235  $\mu\text{m} \pm 11,4$  SEM vs. WT: 148  $\mu\text{m} \pm 24,8$  SEM) nach der ersten Challenge (**Abbildung 33 A**). Beim Vergleich der Ohrschwellungen während der frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (**Abbildung 33 A**).

Dagegen zeigten *in vivo* OI-Messungen, entgegen der Hypothese der vermehrten ROS/RNS Produktion in NRF2<sup>-/-</sup> Mäusen, eine signifikant reduzierte ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren von NRF2<sup>-/-</sup> Mäusen zu den Zeitpunkten 4 Stunden nach der ersten Challenge (NRF2<sup>-/-</sup>: 2030 (1705 – 2245) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; WT: 2620 (2085 – 3860) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) sowie (0 h) vor der fünften Challenge (NRF2<sup>-/-</sup>: 5480 (4235 – 8480) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; WT: 8990 (8510 – 14450) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) (**Abbildung 33 B**). Zu den Zeitpunkten der höchsten ROS/RNS-Produktion wurden keine Unterschiede zwischen den NRF2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen festgestellt (**Abbildung 33 B**).

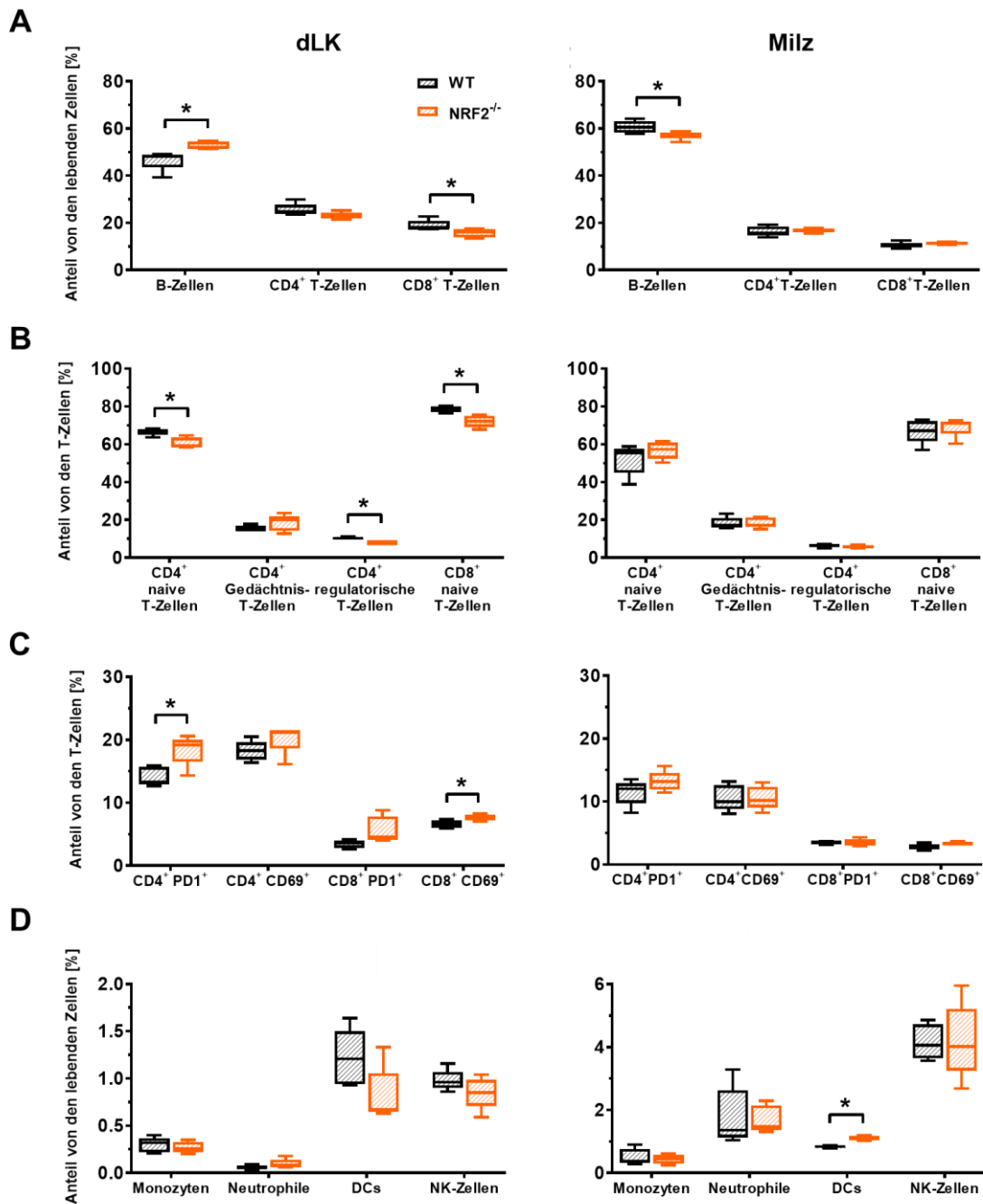
Als Nächstes wurden die Immunzellpopulationen in den drainierenden Lymphknoten und Milzen mittels FACS-Analyse 24 Stunden nach der fünften Challenge untersucht. Die NRF2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine signifikant erhöhte B-Zellpopulation in den dLK (NRF2<sup>-/-</sup>: 51,9% vs. WT: 48,3%), während diese in den Milzen signifikant reduziert war (NRF2<sup>-/-</sup>: 57,4% vs. WT: 60,5%) (**Abbildung 34 A**). Des Weiteren, war die Population von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (NRF2<sup>-/-</sup>: 62,7% vs. WT: 67,1%) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (NRF2<sup>-/-</sup>: 72,1% vs. WT: 77,7%) sowie die regulatorischen T-Zellen (NRF2<sup>-/-</sup>: 7,9% vs. WT: 10,3%) in den dLK signifikant reduziert (**Abbildung 34 B**). Allerdings zeigte sich in den dLK von NRF2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Expression des Immuncheckpoints PD-1 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (NRF2<sup>-/-</sup>: 19,2% vs. WT: 13,3%) und des „frühen“ Aktivierungsmarker CD69 auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen (NRF2<sup>-/-</sup>: 7,8% vs.

WT: 6,5%) (**Abbildung 34 C**). Zugleich war die DC-Population in den Milzen von NRF2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (NRF2<sup>-/-</sup>: 1,1% vs. WT: 0,8%) (**Abbildung 34 D**).



**Abbildung 33: Ohrschwellungsverlauf und *in vivo* OI-Messung der ROS/RNS-Produktion und in NRF2<sup>-/-</sup> Mäusen.**

(A) Ohrschwellungsverlauf von NRF2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen während der akuten, frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie. Die Daten werden als Mittelwerte ± SEM angezeigt. \* p > 0,05, unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test. (B) L-012 wurde 5 Minuten vor der OI-Messung in WT (n = 5) und NRF2<sup>-/-</sup> (n = 5) injiziert. ROS/RNS-Werte der entzündlichen Ohren werden als Mediane mit Interquartilbereichen der durchschnittlichen Signalintensität (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) angezeigt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an. \* p > 0,05, unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test.



**Abbildung 34: Ex vivo FACS-Analyse der dLK und der Milz von NRF2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit chronischer Kontaktallergie (24 h nach der 5. TNCB-Challenge).**

(A) Population von B- und T-Zellen. (B) Subpopulationen von T-Zellen. (C) Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD69 und des Immuncheckpoints PD-1 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (D) Zusammensetzung der Leukozytenpopulation. Die Daten werden als Mediane mit Inter-quartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an; \* p < 0,05, ns = nicht signifikant; \* p > 0,05, unabhängiger zweiseitiger Student's t-Test). WT (n = 5), NRF2<sup>-/-</sup> (n = 5).

## 3.2 Oxazolone-induzierte Kontaktallergie

### 3.2.1 Ohrschwellungsverlauf in ROS/RNS-defizienten Mäusen

Zur Validierung der vorherigen Ergebnisse der TNCB-induzierten Kontaktallergie wurde zusätzlich die Wildtyp- und ROS/RNS-defizienten Mäusen während der Oxazolone-induzierten Kontaktallergie untersucht. Im Gegensatz zu TNCB, welches eine Th1-dominierende T-Zellantwort auslöst, löst Oxazolone eine gemischte T-Zellantwort bestehend aus Th1- und Th2-Zellen aus [228].

Während der akuten und frühen chronischen Phase wurde die maximale Ohrschwellung in Wildtyp-Mäusen bereits 12 Stunden nach der ersten bzw. dritten Oxazolone-Challenge erreicht (1. Ch:  $33,9 \mu\text{m} \pm 6,2 \text{ SEM}$ ; 3. Ch:  $174,4 \mu\text{m} \pm 14,5 \text{ SEM}$ ) (**Abbildung 35 A**), war jedoch deutlich geringer als in Wildtyp-Mäusen mit TNCB-induzierter Kontaktallergie (1% TNCB). In der chronischen Phase wurde die maximale Ohrschwellung ebenfalls 12 Stunden nach der fünften Oxazolone-Challenge erreicht ( $393 \mu\text{m} \pm 40,4 \text{ SEM}$ ) und lag auf einem ähnlichen Niveau wie bei den Wildtyp-Mäusen mit TNCB-induzierter Kontaktallergie (**Abbildung 35 A**). Dagegen wurde die maximale Ohrschwellung in den ROS/RNS-defizienten Mäusen während der akuten Oxazolone-induzierten Kontaktallergie erst nach 24 Stunden erreicht, war allerdings im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ( $33,3 \mu\text{m} \pm 4,8 \text{ SEM}$ ) nur in den *iNOS*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht ( $82,5 \mu\text{m} \pm 17,3 \text{ SEM}$ ) (**Abbildung 35 A**). Während der frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie war die Ohrschwellungsreaktion in den *iNOS*<sup>-/-</sup> Mäusen tendenziell erhöht, während die *MPO*<sup>-/-</sup> Mäuse in der chronischen Phase eine tendenziell niedrigere Ohrschwellungsreaktion aufwiesen (**Abbildung 35 A**). Insgesamt waren die Ohrschwellungsreaktionen während der akuten und frühen chronischen Oxazolone-induzierten Kontaktallergie deutlich schwächer ausgeprägt als bei der TNCB-induzierten Kontaktallergie.

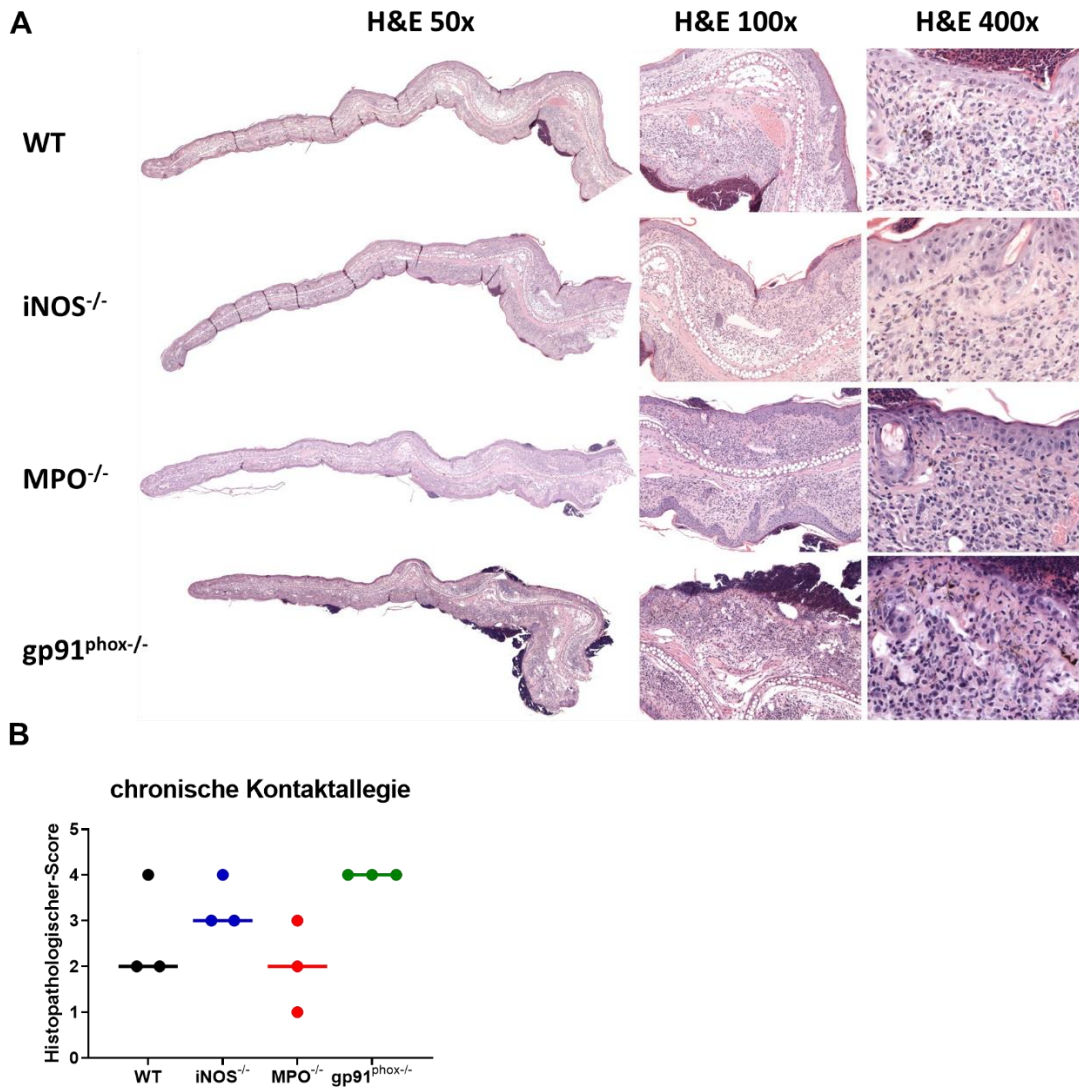
### 3.2.2 *In vivo* ROS/RNS-Produktion

Die *in vivo* OI-Messungen zeigten einen leichten Anstieg in der ROS/RNS-Produktion in den Ohren von Wildtyp-Mäusen 12 Stunden nach der ersten Challenge (2270 (1490 - 2465) p/s/cm<sup>2</sup>/sr), welche aber 24 Stunden nach der ersten Oxazolone-Challenge wieder abnahm (710 (583,5 - 977,5) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) und sogar unter dem Ausgangswert (1260 (1175 - 1385) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; 0h = unmittelbar vor dem ersten Oxazolone-Challenge) lag (**Abbildung 35 B**). Während der frühen chronischen und chronischen

Kontaktallergie erreichte die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren von Wildtyp-Mäusen bereits nach 4 Stunden das Maximum (3. Ch: 11300 (7200 – 19500) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; 5. Ch: 28000 (9620 – 85050) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) und verblieb auf einem ähnlich hohen Niveau bis 12 Stunden nach der dritten (10600 (8880 – 17500) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) und fünften Challenge (27500 (23350 – 80650) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Im Gegensatz hierzu, hat sich die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen wie bereits in der TNCB-induzierten Kontaktallergie (**Abbildung 15**) im Vergleich zum Basiswert kaum verändert (1170 (1125 – 1210) p/s/cm<sup>2</sup>/sr), mit der Ausnahme von 24 Stunden nach der ersten Challenge (1810 (996 – 2660) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) wo diese leicht erhöht war (**Abbildung 35 B**). Die entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten hingegen 24 Stunden nach der ersten Oxazolone-Challenge eine signifikant erhöhte ROS/RNS-Produktion (3690 (2245 – 8690) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (710 (583,5 - 977,5) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Auch während der frühen chronischen Oxazolone-induzierten Kontaktallergie war die ROS/RNS-Produktion tendenziell erhöht, erreichte jedoch ihren Peak erst 12 Stunden nach der dritten Challenge (27000 (11200 – 45750) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Während der chronischen Kontaktallergie zeigten die entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen die stärkste ROS/RNS-Produktion vier Stunden nach der Oxazolone-Challenge (iNOS<sup>-/-</sup>: 53900 (49025 – 121475) vs WT: 28000 (11910 – 85050) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Obwohl die ROS/RNS-Produktion in entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen doppelt so hoch ausfiel, war der Unterschied aufgrund der großen Varianz innerhalb der Versuchsgruppen statistisch nicht signifikant. Beim Vergleich zu entzündlichen Ohren von MPO<sup>-/-</sup> mit den Wildtyp-Mäusen wurde eine signifikant erhöhte ROS/RNS-Produktion 24 Stunden nach der ersten Oxazolone-Challenge beobachtet (MPO<sup>-/-</sup>: 2890 (2700 – 6800) vs. WT: 710 (583,5 - 977,5) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Dagegen war die maximale ROS/RNS-Produktion während der frühen chronischen (12 h; MPO<sup>-/-</sup>: 6360 (4055 – 14420) vs. WT: 10600 (8880 – 17500) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) und chronischen Kontaktallergie (4 h; MPO<sup>-/-</sup>: 19600 (14300 – 25850) vs. WT: 28000 (9620 – 85050) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) ca. um ein Drittel reduziert (**Abbildung 35 B**).



ein mildes Ödem und dilatierte Blutgefäße. Das entzündliche Immunzellinfiltrat in der Dermis bestand hauptsächlich aus mononukleären Zellen und nur 20 - 30% entsprachen morphologisch den Neutrophilen (**Abbildung 36 A, B**). Die entzündeten Ohren von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäuse zeigten die stärkste chronische Entzündungsreaktion mit einer inhomogenen Epidermis, ausgeprägten Hyperkeratose, sehr großen intraepithelialen Neutrophilen-Abszessen mit mittleren bis großen Krusten und Ulzerationen (**Abbildung 36 A, B**). Die Dermis zeigte auch hier fokal eine leichte Ödembildung und erweiterte Blutkapillare. Des Weiteren wurden viele pigmentierte Makrophagen detektiert. Das entzündliche Infiltrat in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäuse beinhaltete primär mononukleäre Zellen, jedoch auch reichlich Neutrophile (**Abbildung 36 A, B**). Dagegen war die chronische Entzündung in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen am schwächsten ausgeprägt (**Abbildung 36 A, B**). Es zeigte sich eine homogene Epidermis mit mehreren klein bis mittelgroße Krusten. Es wurden keine Ulzerationen und nur wenige Neutrophilen-Abszesse beobachtet. Die Dermis der entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen wies nur ein schwaches chronisches Immunzellinfiltrat (mononukleäre Zellen) mit leichter Ödembildung und erweiterten Kapillaren auf (**Abbildung 36 A, B**). Die entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie-reaktion zeigten ebenfalls eine homogene Epidermis mit mehreren kleinen bis mittelgroße Krusten (**Abbildung 36 A, B**). Es wurden keine Ulzerationen und nur wenige kleine Neutrophilen-Abszesse detektiert. Die Dermis zeigte ein leichtes Ödem sowie ein primär chronisch entzündliches Immunzellinfiltrat (**Abbildung 36 A, B**). Insgesamt zeigte sich eine relativ starke Variabilität innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen.



**Abbildung 36: Histopathologische Analyse von chronischen Oxazolon-induzierten Kontaktallergie.**

(A) Repräsentative H&E Aufnahmen der entzündlichen Ohren mit chronischer Kontaktallergie von WT-, gp91<sup>phox-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup> und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (24 h nach dem 5. Challenge). (B) Histopathologischer Score der chronischen Kontaktallergie. Dieser wurde anhand der Anzahl der epidermalen Abszesse und Krusten pro Ohrgewebeschnitt ermittelt (0 = keine Krusten oder Abszesse; 1 = Abszesse, keine Krusten; 2 = zwischen 1 und 5 Krusten, 3 = zwischen 6 und 10 Krusten, 4 = mehr als 11 Krusten). Die horizontalen Linien zeigen die Mediane an, die Punkte die einzelnen Versuchstiere (n = 3 je Versuchsgruppe).

### 3.3 Einfluss des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die akute und chronische TNCB-spezifischen Kontaktallergiereaktion

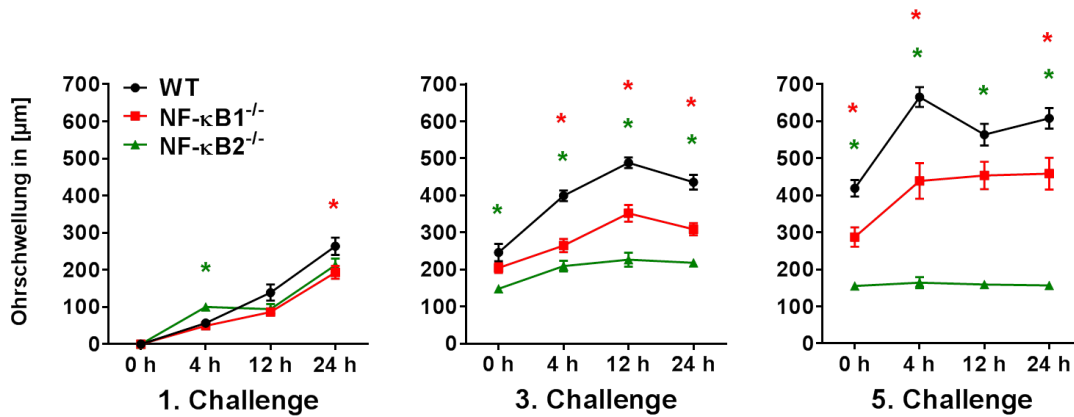
#### 3.3.1 Ohrschwellungsverlauf in NF- $\kappa$ B-Knockout-Mäusen

Um den Einfluss des NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die akute und chronische TNCB-spezifische Kontaktallergie zu bestimmen, wurden Mäuse mit einem Knockout des klassischen (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>) und des alternativen (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>) NF- $\kappa$ B-Signalweg untersucht.

Die NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten 24 Stunden nach der ersten Challenge eine signifikant reduzierte Ohrschwellung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 193,5  $\mu$ m  $\pm$  55,7 SEM vs. WT: 264  $\mu$ m  $\pm$  73,8 SEM) (Abbildung 37). Während der frühen chronischen Kontaktallergie war die Ohrschwellung in den NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen bereits ab 4 Stunden nach der dritten Challenge signifikant reduziert. Dabei wurde die maximale Ohrschwellung (351,5  $\mu$ m  $\pm$  72,9 SEM) nach 12 Stunden erreicht, während sie in der chronischen Phase erst nach 24 Stunden erreicht wurde (458,5  $\mu$ m  $\pm$  135,4 SEM) und war zu den Zeitpunkten 0, 4 und 24 Stunden nach dem fünften Challenge signifikant niedriger als in den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 37**).

Die NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten bereits 4 Stunden nach der ersten Challenge eine signifikant erhöhte Ohrschwellung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 100,6  $\mu$ m  $\pm$  18,9 SEM vs. WT: 57  $\mu$ m  $\pm$  30,8 SEM). Insgesamt waren die Unterschiede während der akuten Phase jedoch relativ gering. Dagegen war die Ohrschwellung in den NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen während der frühen chronischen Kontaktallergie zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant niedriger und waren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in etwa um die Hälfte reduziert (12 h 3. Ch; NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 226,9  $\mu$ m  $\pm$  53,3 SEM vs. WT: 488  $\mu$ m  $\pm$  45,5 SEM). Im Verlauf der chronischen Kontaktallergie zeigten die NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäuse keine weitere Zunahme der Ohrschwellung; diese war tendenziell sogar rückläufig. Während der chronischen Kontaktallergie betrug die maximale Ohrschwellung NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäuse weniger als ein Drittel der maximalen Ohrschwellung der Wildtyp-Mäuse (4 h 5. Ch; NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 164,4  $\mu$ m  $\pm$  42,5 SEM vs. WT: 665  $\mu$ m  $\pm$  85,2 SEM).

Während der chronischen Kontaktallergie entwickeln die Wildtyp-Mäuse die maximale Ohrschwellung bereits nach 4 Stunden. Dies wurde auch im Rahmen der Studien zur Untersuchung der Rolle von reaktiver Sauerstoffspezies beobachtet (**Abbildung 14**). Im Gegensatz hierzu zeigte sich weder bei den NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> noch bei den NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen ein vergleichbarer Peak der Ohrschwellungsreaktion.



**Abbildung 37: Verlauf der Ohrschwellungen während der verschiedenen Stadien der TNCB-induzierten Kontaktallergie.**

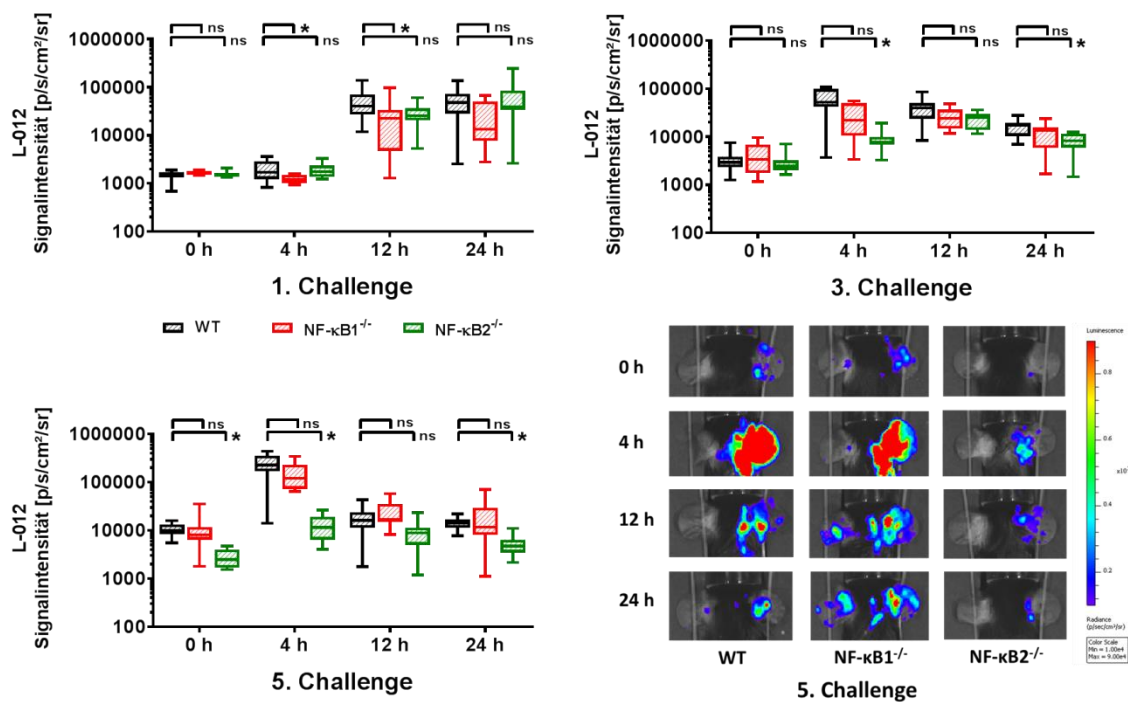
Ohrschwellungsverlauf der verschiedenen Versuchsgruppen unter Verwendung einer 1%igen TNCB-Challenge-Lösung. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angezeigt, Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test. WT (n = 10), NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> (n = 10), NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> (n = 8).

### 3.3.2 *In vivo* ROS/RNS-Produktion

Die *in vivo* OI-Messungen zeigten eine signifikant reduzierte ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>-Mäusen 4 und 12 Stunden nach der ersten Challenge im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (4 h, NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 1215 (1014,75 – 1505) p/s/cm<sup>2</sup>/sr vs. WT: 1720 (1227,5 – 2897,5) p/s/cm<sup>2</sup>/sr; 12 h, NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 22550 (4740 – 33900) p/s/cm<sup>2</sup>/sr vs. WT: 40250 (27050 – 71450) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) (**Abbildung 38**, oben links). Trotz der reduzierten Ohrschwellungsreaktion der NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden keine signifikanten Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion während der frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie beobachtet (**Abbildung 38**, oben rechts; unten links).

Während der akuten Kontaktallergie zeigten die NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>-Mäuse eine ähnliche ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren wie die Wildtyp-Mäuse (**Abbildung 38**, oben links). Im Gegensatz dazu, war die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren 4 Stunden nach der dritten Challenge ca. um das 7-fache geringer als in den Wildtyp-Mäusen (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 7465 (7165 – 9962,5) p/s/cm<sup>2</sup>/sr vs. WT: 52500 (41900 – 99475) p/s/cm<sup>2</sup>/sr) (**Abbildung 38**, oben rechts). Des Weiteren wurde die maximale ROS/RNS-Produktion während der frühen chronischen Kontaktallergie erst nach 12 Stunden erreicht (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 25150 (13875 – 30250) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Während der chronischen Kontaktallergie war die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren der NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits vor der fünften Challenge (48 Stunden nach der vierten Challenge) ca. um das 4-fache geringer als in Wildtyp-Mäusen (0 h, NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 2470

(1685 – 4030) p/s/cm<sup>2</sup>/sr vs. WT: 10125 (8407,5 – 13300) p/s/cm<sup>2</sup>/sr (**Abbildung 38**, unten links). Der größte Unterschied in der ROS/RNS-Produktion wurde 4 Stunden nach der fünften Challenge verzeichnet; zu diesem Zeitpunkt war die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren von NF-κB2<sup>-/-</sup>-Mäusen ca. 20-fach niedriger als in den Ohren von Wildtyp-Mäusen (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 11500 (6415 – 19350) p/s/cm<sup>2</sup>/sr vs. WT: 228500 (167750 – 359250) p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Ähnlich wie die Ohrschwellungsreaktion, war auch die ROS/RNS-Produktion in den entzündlichen Ohren von NF-κB2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit chronischen Kontaktallergie geringer als während der frühen chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 38**, oben rechts; unten links).



**Abbildung 38: In vivo OI der ROS/RNS-Produktion in den entzündeten Ohren von Wildtyp, NF-κB1<sup>-/-</sup> und NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen.**

L-012 wurde 5 Minuten vor der OI-Messung in WT (n = 10), NF-κB1<sup>-/-</sup> (n = 10) und NF-κB2<sup>-/-</sup> (n = 8) Mäuse injiziert. Die ROS/RNS-Werte werden als Mediane mit Interquartilbereichen der durchschnittlichen SI (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) angezeigt; Whiskers geben die Min- und Max-Werte an. \* p < 0,05, ns = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Dunn-Test; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche. Unten rechts: repräsentative Aufnahmen der L-012 SI in entzündeten Ohren der verschiedenen Versuchsgruppen während der chronischen Kontaktallergie.

### 3.3.3 Histopathologische Untersuchung der akuten und chronischen Kontaktallergie in NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>, NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen

Die histopathologische Untersuchung der entzündeten Ohren während der akuten Kontaktallergie ergab nur geringe Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (**Abbildung 39 A und B**; akute Kontaktallergie).

Dabei fanden sich in den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen schwerwiegendere pathologische Veränderungen der Epidermis mit mehreren Läsionen, Krusten und eine leicht erhöhte T-Zell-Infiltration in der Dermis im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

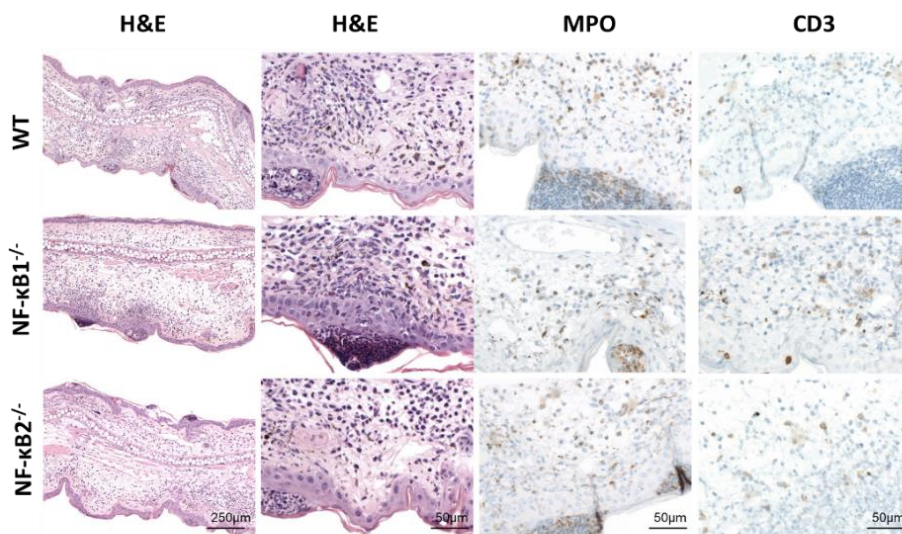
Dagegen war die Epidermisschicht in den entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen meist homogen und es wurden nur wenige kleine Mikroabszesse und Krusten beobachtet. Das T-Zell-Infiltrat (CD3) in der Epidermis und der Dermis war ebenfalls geringer als in den entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen. In Bezug auf das entzündliche Infiltrat zeigten alle drei experimentellen Gruppen ein ähnliches akutes Immunzellinfiltrat, das hauptsächlich aus Neutrophilen (MPO) bestand.

Während der chronischen Kontaktallergie wiesen die Wildtyp-Mäusen eine stark ausgeprägte Krustenbildung mit vielen Neutrophilen-Abszessen auf (**Abbildung 39 A und B**; chronische Kontaktallergie). Das Epithel zeigte eine ausgeprägte Hyperplasie des Stratum granulosum und Parakeratose. In der Dermis fanden sich zahlreiche Melanophagen, was auf eine Schädigung der Epidermis hinweist. Passend zur chronischen Entzündungsreaktion fand sich eine vermehrte Ansammlung von Lymphozyten und Histiozyten (Iba1). Das Immuninfiltrat bestand allerdings größtenteils aus Neutrophilen was eher auf eine akute Entzündungsreaktion hindeutet (**Abbildung 39 C**). Die Infiltration von Neutrophilen ist vermutlich auf die initiale akute Entzündungsreaktion im Rahmen des wiederholten Auftragens der TNCB-Challenge-Lösung zurückzuführen. Im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion zeigte sich im Vergleich zur akuten Kontaktallergie eine deutlich verringerte Ödembildung jedoch auch stark dilatierte Lymph- und Blutgefäße (CD31). Die entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die Wildtyp-Mäuse mit einer ähnlich stark ausgeprägten chronischen Entzündung und T-Zellinfiltration, allerdings mit einer etwas geringfügigen Ausprägung des akuten Immunzell-Infiltrats, bestehend aus Neutrophilen. Im Gegensatz hierzu fanden sich keinerlei Zeichen einer chronischen Entzündungsreaktion in den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen. Es wurde keine Krustenbildung beobachtet und das Entzündungsinfiltrat wies nur wenige Neutrophile, T-Zellen

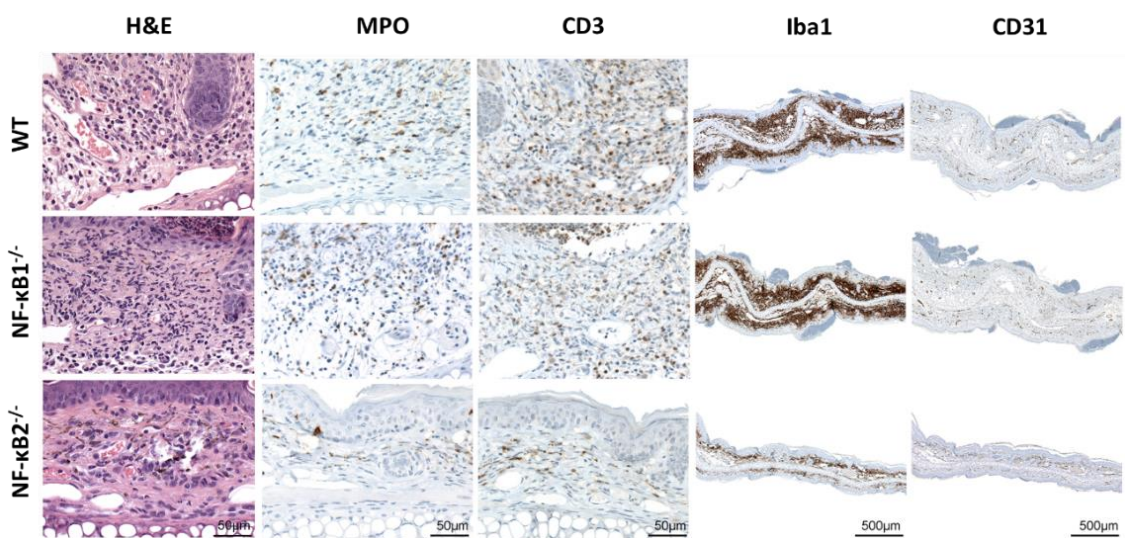
und Histozyten in der Dermis auf (**Abbildung 39 C**). Zudem wurden keine Ödeme oder Melanophagen angetroffen. Die Epidermis war marginal verdickt und zeigte eine leichte Hyperkeratose. Des Weiteren zeigte sich eine deutlich verringerte Anzahl an Blutgefäßen (CD31) im Vergleich zu entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 39 D**), was auf eine Hemmung der Angiogenese hindeutet.

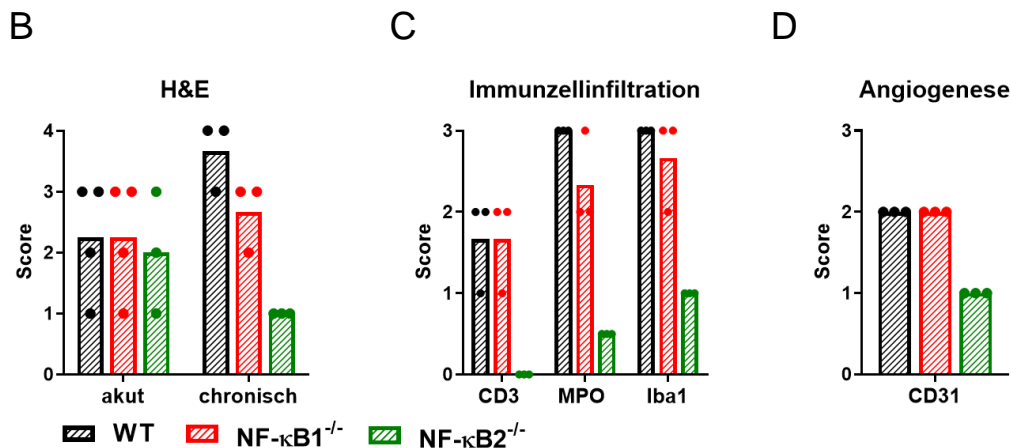
A

**Akute Kontaktallergie**



**Chronische Kontaktallergie**





**Abbildung 39: Histopathologische und immunohistochemische Analyse der akuten und chronischen Kontaktallergie in NF-κB1<sup>-/-</sup>, NF-κB2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen.**

(A) Repräsentative Aufnahmen von entzündetem Ohrgehörte der verschiedenen Versuchsgruppen mit akuter (24 h nach der 1. Challenge) und chronischer Kontaktallergie (24 h nach der 5. Challenge). Immunohistochemische Färbung für MPO, CD3, Iba1 und CD31 zur Darstellung von Neutrophilen, T-Zellen, Histiozyten (Makrophagen) und der Blutgefäße im entzündeten Ohrgehörte. (B) Der histopathologische Score wurde anhand der Anzahl der epidermalen Abszesse und Krusten pro Ohrgehörtebeschnitt bewertet (0 = keine Krusten oder Abszesse; 1 = Abszesse, keine Krusten; 2 = zwischen 1 und 5 Krusten, 3 = zwischen 6 und 10 Krusten, 4 = mehr als 11 Krusten) (n = 4). (C, D) Immunohistochemische Färbung des Ohrgehörtebeschnittes mit chronischer Kontaktallergie. Die Häufigkeit von Neutrophilen (MPO), T-Zellen (CD3), Makrophagen (Iba1) und Blutgefäßen (CD31) in den Ohrgehörtebeschnitten wurde semiquantitative bestimmt (0 = kein entzündliches Infiltrat; 1 = mildes entzündliches Infiltrat; 2 = mäßiges entzündliches Infiltrat; und 3 = schwer entzündliches Infiltrat). Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (n = 3 je Versuchsgruppe).

### 3.3.4 Ex vivo FACS-Analyse

Da der NF-κB-Signalweg von großer Bedeutung für die Entwicklung des Immunsystems und der lymphatischen Organe sowie die Proliferation von Immunzellen ist, wurden mittels FACS-Analyse die unterschiedlichen Immunzellpopulationen in den sekundären lymphatischen Organen von NF-κB1<sup>-/-</sup>, NF-κB2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen untersucht und verglichen. Hierzu wurden die dLK und Milzen von naiven Mäusen sowie von Mäusen mit chronischer Kontaktallergie analysiert. Details bezüglich der FACS-Gating-Strategie siehe bitte (Abbildung 12).

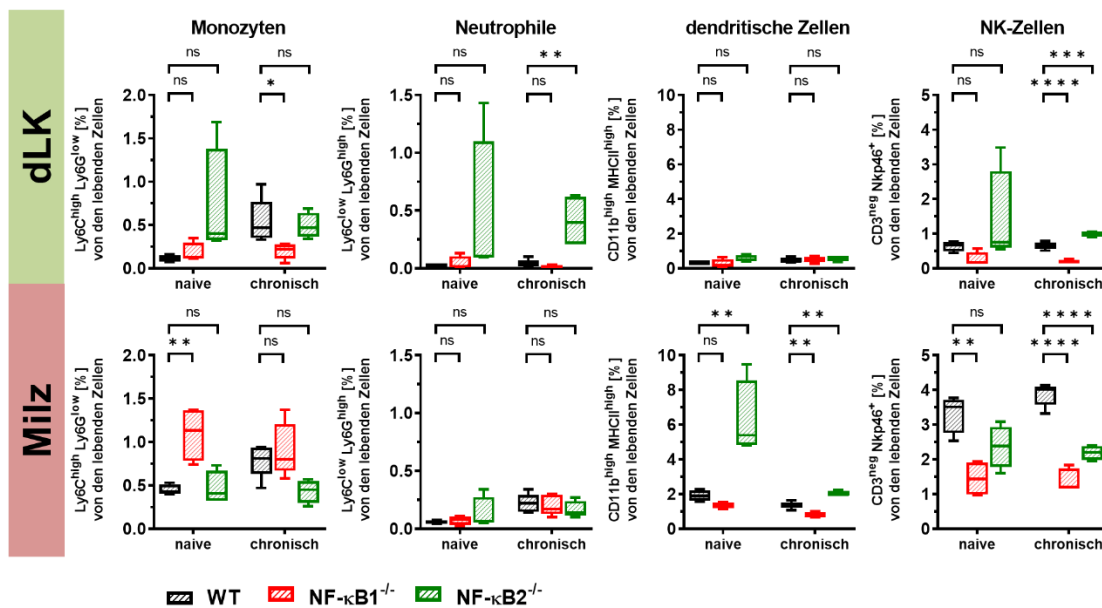
#### 3.3.4.1 Leukozyten-Populationen

Die FACS-Analyse der Leukozyten der dLK und den Milzen von Wildtyp-Mäusen zeigte eine starke Zunahme der Monozyten während der chronischen Kontaktallergie (dLK, naive: 0,1% vs. chronisch: 0,47%; Milz, naive: 0,43% vs. chronisch: 0,81%) (Abbildung 40). Des Weiteren wurde in den Milzen eine prozentuale Zunahme von Neutrophilen (naive: 0,05% vs. chronisch: 0,22%) und eine nahezu unveränderte NK-Zell-Population (naive: 3,51% vs. chronisch: 4,01%) beobachtet. In den dLK zeigte sich

eine unveränderte Neutrophilen-, NK- und DC-Zellpopulation (Neutrophile, naive: 0,03% vs. chronisch: 0,03%; NK-Zellen, naive: 0,66% vs. chronisch: 0,64%; DCs: naiv: 0,32% vs. chronisch: 0,4%) während sich in der Milz eine leichte Abnahme der DCs zeigte (naiv: 1,9% vs. chronisch: 1,38%).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen wiesen Milzen von naiven NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen einen signifikant erhöhten prozentuellen Anteil an Monozyten (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 1,14% vs. WT: 0,43%) auf während die NK-Zell-Population nur ca. ein Drittel (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 1,4% vs. WT: 3,51%) betrug (**Abbildung 40**). Im Verlauf der chronischen Kontaktallergie wurde ebenso wie in den Milzen auch in den dLK signifikant weniger NK-Zellen detektiert (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>, dLK: 0,18%, Milz: 1,2% vs. WT, dLK: 0,66%, Milz: 4,01%). Des Weiteren wurden während der chronischen Kontaktallergie in den Milzen von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen weniger DCs (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 0,71% vs. WT: 1,38%) und in den dLK signifikant weniger Monozyten (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 0,22% vs. WT: 0,47%) beobachtet.

Die Untersuchung der DC-Population in den Milzen von naiven NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte bereits einen 3-fach erhöhten Basiswert (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 5,39% vs. WT: 1,9%) (**Abbildung 40**). DC-Population in den Milzen nahm zwar während der chronischen Kontaktallergie stark ab, war jedoch immer noch signifikant höher als in den Wildtyp-Mäusen (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 1,96% vs. WT: 1,38%). Des Weiteren war die Neutrophilen- und NK-Zell-Population in den dLK während der chronischen Kontaktallergie im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht (Neutrophile, NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 0,4% vs. WT: 0,03%; NK-Zellen, NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 1% vs. WT: 0,64%). Dagegen zeigte sich während der chronischen Kontaktallergie eine signifikant verringerte NK-Zell-Population in den Milzen von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 2,2% vs. WT: 0,64%).



**Abbildung 40: Leukozyten-Populationen in den dLK und Milzen von WT, NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> und NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen.**

FACS-Analyse der verschiedenen Leukozyten-Populationen in den dLK und Milzen von unbehandelten (naive, n = 4 je Versuchsgruppe) NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>, NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen sowie Versuchstieren mit chronischer Kontaktallergie (4 h nach der 5. TNCB-Challenge, n = 5 je Versuchsgruppe). Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001, ns = nicht signifikant (one-way ANOVA mit Post-hoc-Dunn-Tests, p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche).

### 3.3.4.2 Lymphozyten-Populationen

Als nächstes wurden die prozentuellen Anteile der B-Zell- und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen verglichen. Während der chronischen Kontaktallergie zeigte sich in den dLK von Wildtyp-Mäusen eine ca. 2-fache Zunahme der B-Zellen (naive: 28,1% vs. chronische: 50,9%), während die prozentuellen Anteil der B Zellen in den Milzen nahezu unverändert blieb (naive: 60,2% vs. chronische: 57,6%) (**Abbildung 41**). Des Weiteren zeigte sich in den dLK eine starke Reduktion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD4<sup>+</sup>, naive: 34,7% vs. chronisch: 25,9%; CD8<sup>+</sup>, naive: 28,3% vs. chronisch: 16,1%), während diese in den Milzen unverändert waren (CD4<sup>+</sup>, naive: 16,25% vs. chronisch: 14,7%; CD8<sup>+</sup>, naive: 6,87% vs. chronisch: 6,75%).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, war die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population in den dLK von naiven NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant niedriger (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 16,1% vs. WT: 28,3%). Während der chronischen Kontaktallergie nahm der prozentuelle Anteil an B-Zellen in den dLK von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu naiven Mäusen zu (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>, naive: 38,1% vs. chronisch: 46,1%), während die B-Zell-Population in den Milzen tendenziell abnahm (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>, naive: 55,8% vs. chronisch: 46,7%). Im Vergleich zu den Wildtyp-

Mäusen war der prozentuelle Anteil der B-Zellen in den Milzen von  $\text{NF-}\kappa\text{B1}^{-/-}$  Mäusen während der chronischen Kontaktallergie signifikant niedriger ( $\text{NF-}\kappa\text{B1}^{-/-}$ : 46,7% vs. WT: 50,9%). Dagegen war die Population der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen in den dLK von  $\text{NF-}\kappa\text{B1}^{-/-}$  Mäusen während der chronischen Kontaktallergie signifikant höher im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ( $\text{NF-}\kappa\text{B1}^{-/-}$ : 32,8% vs. WT: 25,9%).

Die Untersuchung der dLK und Milzen von naiven  $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$  Mäusen zeigte im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine stark reduzierte B-Zell-Population ( $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$ , dLK: 4,59%; Milz: 24,9% vs. WT, dLK: 28,1%; Milz: 60,2%) (**Abbildung 41**). Dagegen war der prozentuelle Anteil an  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in dLK ( $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$ : 42,5% vs. WT: 28,3%) sowie  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in der Milz von naiven  $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$  Mäusen signifikant erhöht ( $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$ :  $\text{CD4}^+$ : 34%;  $\text{CD8}^+$ : 23,4% vs. WT:  $\text{CD4}^+$ : 16,25%;  $\text{CD8}^+$ : 6,87%). Auch während der chronischen Kontaktallergie war der Anteil an  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in den dLK ( $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$ ,  $\text{CD4}^+$ : 47,7%;  $\text{CD8}^+$ : 36,3% vs. WT,  $\text{CD4}^+$ : 25,9%;  $\text{CD8}^+$ : 16,1%) und Milzen ( $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$ ,  $\text{CD4}^+$ : 33,5%;  $\text{CD8}^+$ : 15,9% vs. WT,  $\text{CD4}^+$ : 14,7%;  $\text{CD8}^+$ : 6,75%) von  $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$  Mäusen signifikant höher als in den Wildtyp-Mäusen. Während der prozentuelle Anteil an B-Zellen in den Milzen von Wildtyp- und  $\text{NF-}\kappa\text{B1}^{-/-}$  Mäusen während der chronischen Kontaktallergie leicht abnahm, nahm die B-Zell-Population in den Milzen von  $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$  Mäusen zu 31,7%). Dennoch war der prozentuelle Anteil der B-Zellen in den Milzen von  $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$  Mäusen signifikant geringer als in Wildtyp-Mäusen ( $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$ : 31,7% vs. WT: 50,9%).

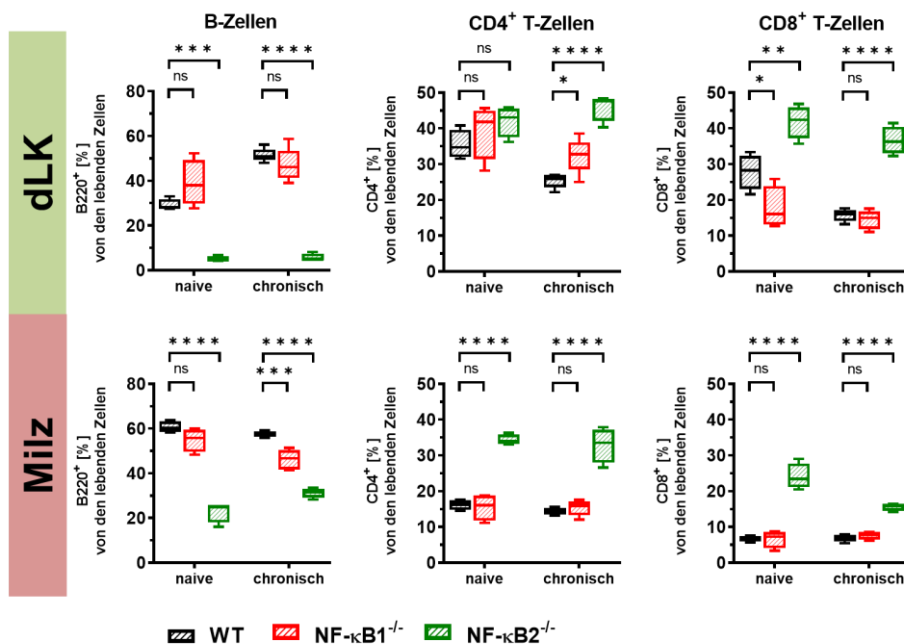


Abbildung 41: Lymphozyten-Populationen in den dLK und Milzen von WT,  $\text{NF-}\kappa\text{B1}^{-/-}$  und  $\text{NF-}\kappa\text{B2}^{-/-}$  Mäusen.

FACS-Analyse der B-Zell- und T-Zell-Populationen in den dLK und Milzen von unbehandelten (naive, n = 4 je Versuchsgruppe) NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>, NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen und Versuchstieren mit chronischer Kontaktallergie (4 h nach der 5. TNCB-Challenge, n = 5 je Versuchsgruppe). Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001, ns = nicht signifikant (one-way ANOVA mit Post-hoc-Dunn-Tests, p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche).

### 3.3.4.3 Differenzierung der T-Zellen

Als nächstes wurden die Auswirkungen des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die Differenzierung der T-Zellen untersucht.

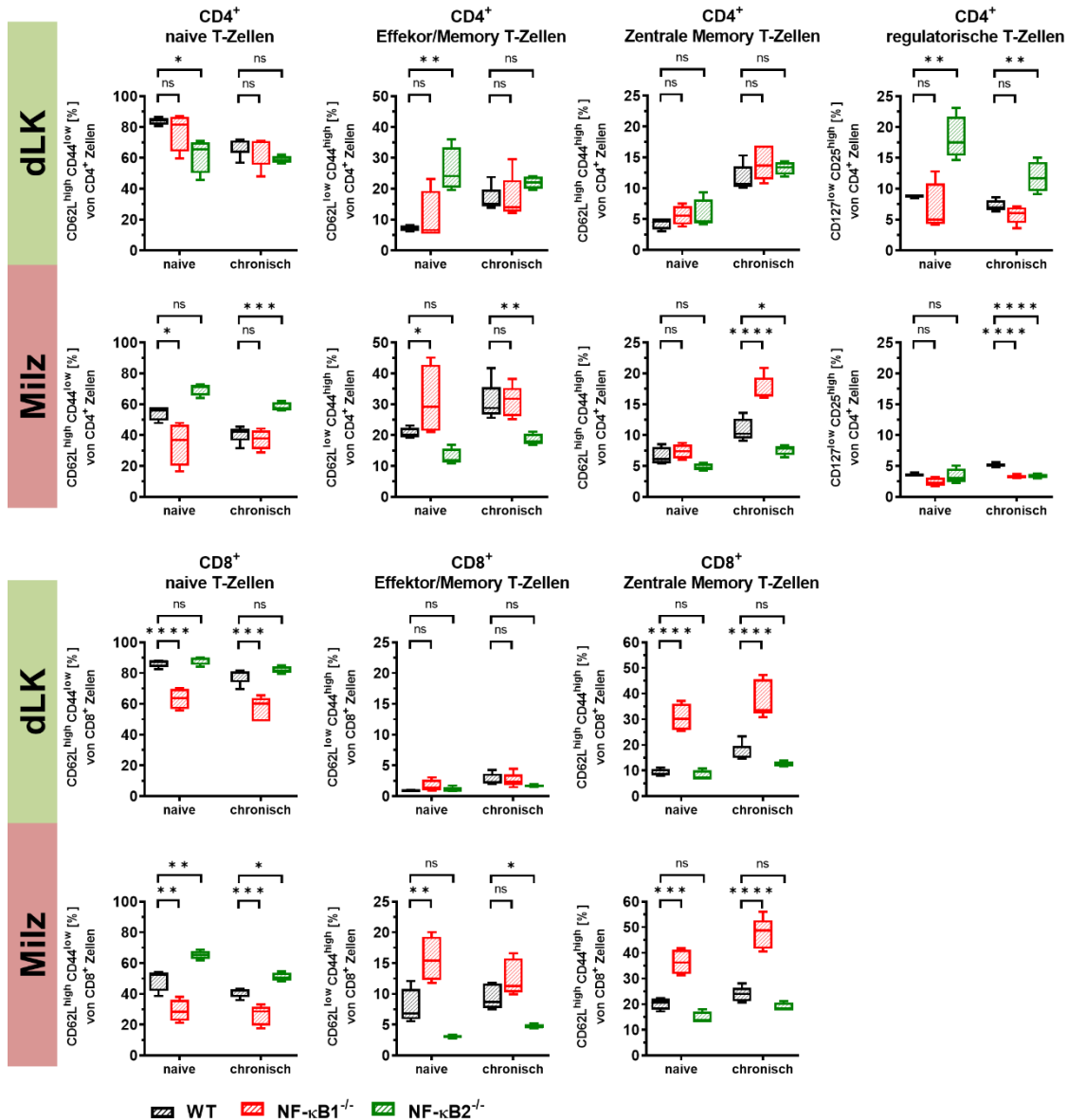
Während der chronischen Kontaktallergie zeigten die dLK und Milzen von Wildtyp-Mäusen eine tendenzielle Abnahme der Population der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (dLK, naive: 84,4% vs. chronisch: 70,6%; Milz, naive: 56,2% vs. chronisch: 42,2%) und naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen (dLK, naive: 87,8% vs. chronisch: 80,3%; Milz, naive: 52,5% vs. chronisch: 42%) (**Abbildung 42**). Dagegen nahm CD4<sup>+</sup> Effektor/Memory-T-Zell-Population in den dLK von Wildtyp-Mäusen um das 2-fache zu (dLK, naive: 7,14% vs. chronisch: 15,1%) und war in den Milzen ebenfalls stark erhöht (naive: 20% vs. chronisch: 28,8%). Die CD8<sup>+</sup> Effektor/Memory-T-Zell-Population nahm ebenfalls leicht zu (dLK, naive: 0,84% vs. chronisch: 2,23%; Milz, naive: 6,82% vs. chronisch: 8,7%). Des Weiteren zeigte sich in den dLK und Milzen von Wildtyp-Mäusen eine starke Zunahme der CD4<sup>+</sup> zentralen Memory-T-Zell-Population (dLK, naive: 4,69% vs. chronisch: 10,7%; Milz, naive: 6,09% vs. chronisch: 10,2%). Zudem wurde eine Verdopplung der CD8<sup>+</sup> zentralen Memory-T-Zellen in den dLK (naive: 8,63% vs. chronisch: 15,3%) und eine deutliche Zunahme in den Milzen (naive: 20,7 %; chronisch: 24 %) verzeichnet. Dagegen nahm die regulatorische T-Zell-Population in den dLK während der chronischen Phase der Kontaktallergiereaktion leicht ab (naive: 8,83% vs. chronisch: 6,91%), während diese in den Milzen tendenziell zunahm (naive: 3,51% vs. chronisch: 5,2%) (**Abbildung 42**).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zeigten die naiven NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant niedrigere Population an naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 63,7% vs. WT: 87,8%) und Milzen (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 28,4% vs. WT: 52,5%), sowie eine deutlich verringerte Population von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 36,9% vs. WT: 56,2%) (**Abbildung 42**). Dagegen war der Anteil an CD8<sup>+</sup> zentralen Memory-T-Zellen in den dLK (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 30,1% vs. WT: 8,63%) von naiven NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen um fast das Vierfache erhöht und in den Milzen nahezu verdoppelt (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 36,2% vs. WT: 20,7%). Auch im Verlauf der chronischen Kontaktallergie war die CD8<sup>+</sup> zentrale Memory-T-Zell-Population in den NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen (dLK: 33,5%; Milz: 48,7%) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verdoppelt (dLK: 15,3%;

Milz: 24%), während die naive CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population in den dLK (NF-κB1<sup>-/-</sup>: 60,3% vs. WT: 80,3%) und Milzen (NF-κB1<sup>-/-</sup>: 28,5% vs. WT: 42%) signifikant reduziert war (**Abbildung 42**).

Die Analyse der naiven NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäuse ergab einen signifikant niedrigeren Anteil von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 65,5% vs. WT: 84,4%), während die CD4<sup>+</sup> Effektor/Memory-T-Zellen (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 24,2% vs. WT: 7,14%) und die regulatorische T-Zellen (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 17,5% vs. WT: 8,83%) im Vergleich zu naiven Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht waren. Dagegen waren die naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen von naiven NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen stark erhöht (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 65,2% vs. WT: 52,5%). Während der chronischen Kontaktallergie zeigten die Milzen von NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant erhöhte naive CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 57,7% vs. WT: 42,2%) und erhöhte naive CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 50,5% vs. WT: 42%). Dagegen waren die Populationen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor/Memory-T-Zellen (NF-κB2<sup>-/-</sup>, CD4<sup>+</sup>: 18%; CD8<sup>+</sup>: 4,55% vs. WT, CD4<sup>+</sup>: 28,8%; CD8<sup>+</sup>: 8,7%) sowie die Population von CD4<sup>+</sup> zentralen Memory-T-Zellen (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 7,8% vs. WT: 10,2%) in den Milzen von NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert (**Abbildung 42**).

Obwohl der Anteil an regulatorischen T-Zellen in den dLK während der chronischen Kontaktallergie abnahm (NF-κB2<sup>-/-</sup>, naiv: 17,5% vs. chronisch: 11,7%), war er weiterhin signifikant höher als in den Wildtyp-Mäusen (WT, naiv: 8,83% vs. chronisch: 6,91%). Dagegen zeigten die Milzen von NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen einen deutlich niedrigeren Anteil an regulatorischen T-Zellen verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 3,4% vs. WT: 5,2%).



**Abbildung 42: Differenzierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen in WT, NF-κB1<sup>-/-</sup> und NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen.**

FACS-Analyse der unterschiedlichen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellsub-Population in den dLK und Milzen von unbehandelten (naive, n = 4 je Versuchsgruppe) NF-κB1<sup>-/-</sup>, NF-κB2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen und Versuchstieren mit chronischer Kontaktallergie (4 h nach der 5. TNCB-Challenge, n = 5 je Versuchsgruppe). Charakterisierung der verschiedenen T-Zellpopulation: CD62L<sup>high</sup> CD44<sup>low</sup> = naive T-Zellen; CD62L<sup>low</sup> CD44<sup>high</sup> = Effektor/Memory-T-Zellen; CD127<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup> = regulatorische T-Zellen; CD62L<sup>high</sup> CD44<sup>high</sup> = Zentrale Memory-T-Zellen. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001, ns = nicht signifikant (one-way ANOVA mit Post-hoc-Dunn-Tests, p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche).

### 3.3.4.4 Aktivierung der T-Zellen

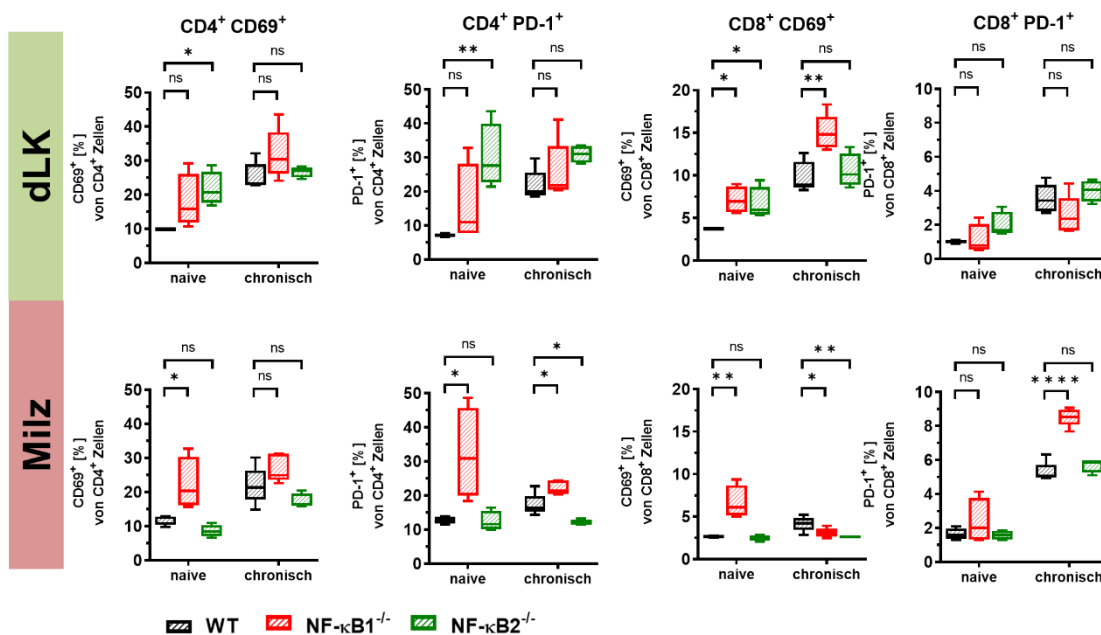
Als nächstes wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Immuncheckpoints PD-1 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.

Die Untersuchung der Wildtyp-Mäuse zeigten eine ca. 2-fach erhöhte Expression von CD69 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK (naiv: 9,9% vs. chronisch: 23,1%) und den Milzen (naiv: 12,5% vs. chronisch: 21,3%) während der chronischen Kontaktallergie im Vergleich zu den naiven Mäusen (**Abbildung 43**). Während die Expression von CD69 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK ebenfalls um mehr als das Doppelte zunahm (naiv: 3,73% vs. chronisch: 8,93%), war die Expression in den Milzen deutlich schwächer ausgeprägt (naiv: 2,66% vs. chronisch: 4,22%). Zudem zeigte sich in den dLK während der chronischen Kontaktallergie eine beinahe dreifach erhöhte Expression von PD-1 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen (7,07% vs. chronisch: 20%) sowie eine deutliche Zunahme in den Milzen (naiv: 12,9% vs. chronisch: 16,4%). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten ebenfalls eine in etwa dreifach erhöhte Expression von CD69 in den Milzen (naiv: 1,59% vs. chronisch: 5,06%) und den dLK (naiv: 1,04% vs. chronisch: 3,43%) während der chronischen Kontaktallergie.

Die naiven NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten dagegen bereits in der Ausgangsbasis eine signifikant erhöhte Expression von CD69 auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 6,95% vs. WT: 3,73%) und Milzen (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 6,1% vs. WT: 2,66%), während die Expression von CD69 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur in den Milzen signifikant erhöht war (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 20,4% vs. WT: 12,5%) (**Abbildung 43**). Auffällig zeigte sich auch die stark erhöhte Expression von PD-1 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 30,9% vs. WT: 12,9%) verglichen zu naiven Wildtyp-Mäusen. Während der chronischen Kontaktallergie verdoppelte sich die Expression von CD69 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen und war verglichen zu Wildtyp-Mäusen weiterhin signifikant erhöht (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 14,8% vs. WT: 8,93%). Dagegen nahm die Expression von CD69 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen ab und war signifikant niedriger als in den Milzen von Wildtyp-Mäusen (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>: 3,13% vs. WT: 4,22%). Zudem war die PD-1 Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der chronischen Kontaktallergie nur in den Milzen von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht (NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>, CD4<sup>+</sup>: 21,4%; CD8<sup>+</sup>: 8,53% vs. WT: CD4<sup>+</sup>: 16,4%; CD8<sup>+</sup>: 5,06%).

Naive NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten in den dLK basal eine signifikant erhöhte Expression von CD69 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>, CD4<sup>+</sup>: 20,7%; CD8<sup>+</sup>: 5,93% vs. WT: CD4<sup>+</sup>: 9,9%; CD8<sup>+</sup>: 3,73%). Ähnlich hierzu war die Expression von PD-1 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen beinahe um das Vierfache erhöht (NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>: 27,6% vs. WT: 7,07%) (**Abbildung 43**). Passend zu der deutlich schwächeren chronischen Entzündung in Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup>

Mäusen, stieg die CD69-Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK während der chronischen Kontaktallergie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weniger stark an und war dadurch auf einem ähnlich hohem Niveau wie in den Wildtyp-Mäusen (NF-κB2<sup>-/-</sup>, CD4<sup>+</sup>: 27%; CD8<sup>+</sup>: 10,1% vs. WT: CD4<sup>+</sup>: 23,1%; CD8<sup>+</sup>: 8,93%). Allerdings zeigten die NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant verringerte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 2,59% vs. WT: 4,22%). Während keine signifikanten Unterschiede in der Expression von PD-1 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK detektiert werden konnten, zeigten die Milzen von NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant niedrigere Expression von PD-1 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen (NF-κB2<sup>-/-</sup>: 11,8% vs. WT: 21,3%).



**Abbildung 43: Aktivierung der T-Zellen in WT, NF-κB1<sup>-/-</sup> und NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen.**

FACS-Analyse des Immuncheckpoints PD-1 und des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK und Milzen von unbehandelten (naive, n = 4 je Versuchsgruppe) NF-κB1<sup>-/-</sup>, NF-κB2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen und Versuchstieren mit chronischer Kontaktallergie (4 h nach der 5. TNCC-Challenge, n = 5 je Versuchsgruppe). Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001, ns = nicht signifikant (one-way ANOVA mit Post-hoc-Dunn-Tests, p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche).

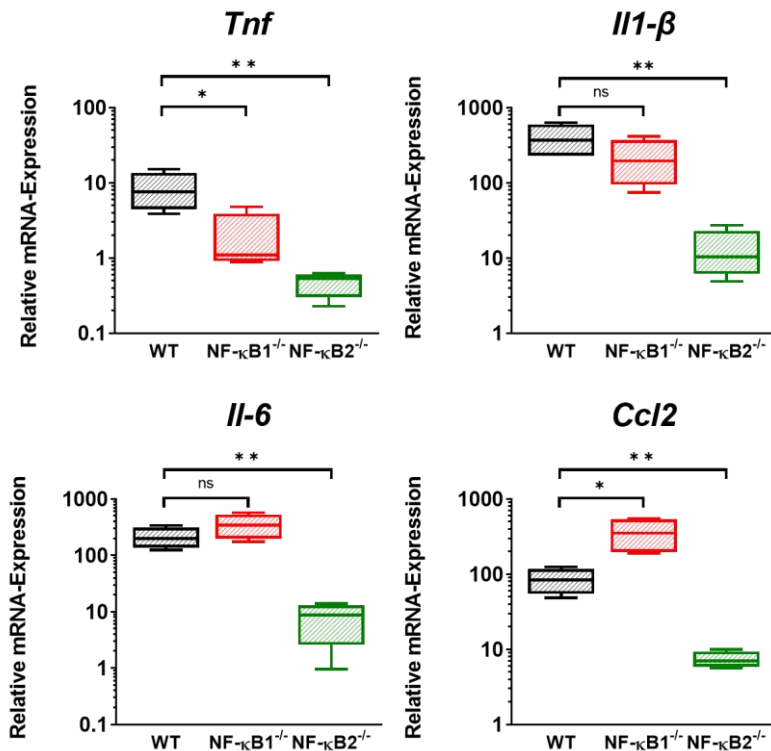
### 3.3.5 Untersuchung der NF-κB-abhängigen proinflammatorischen Mediatoren während der chronischen Kontaktallergie

Als nächstes wurden die genomische Expression der NF-κB-abhängigen proinflammatorischen Zytokine *Il1-β*, *Il6* und *Tnf* sowie des Chemokins *Ccl2* während der chronischen Kontaktallergie (4 h nach der 5. Challenge, dem Gipfel der Entzündungsreaktion) in den entzündeten Ohren von NF-κB1<sup>-/-</sup>, NF-κB2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen

untersucht. Die mRNA-Expression der einzelnen Gene wurde auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin normiert und als relative Expression in Verhältnis zur Expression in unbehandelten Ohren von naiven Mäusen dargestellt.

Die entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen mit chronischer Kontaktallergie zeigten eine stark erhöhte mRNA-Expression aller vier getesteten proinflammatorischen Mediatoren im Vergleich zu unbehandelten naiven Ohren. Hierbei war der entzündungsbedingte Anstieg der *Tnf* mRNA-Expression (7,5 fach (3,9 – 15,1)) am schwächsten ausgeprägt, während der Anstieg der mRNA-Expression von *Il1- $\beta$*  (369,5 fach (228,6 – 628,8)), *Il-6* (199 fach (124,6 – 338,1)) und *Ccl2* (83,5 fach (48,4 – 124,3)) deutlich stärker ausgeprägt war (**Abbildung 44**).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zeigten die entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen eine ca. 7-fach reduzierte *Tnf* mRNA-Expression (1,1 fach (0,9 – 4,8)), während die mRNA-Expression von *Il1- $\beta$*  (195,8 fach (74,4 – 414,9)) und *Il-6* (343,6 fach (173,8 – 568,6)) keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (**Abbildung 44**). Die entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten eine sogar ca. 4-fach höhere *Ccl2* mRNA-Expression (352,1 fach (187,1 – 551,6)) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dagegen war die genomische Expression der vier proinflammatorischen Mediatoren in den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert. Die relative mRNA-Expression von *Il1- $\beta$*  (10,3 fach (4,9 – 27,2)), *Il-6* (8,7 fach (1 – 14)) und *Ccl2* (7 fach (5,6 – 9,8)) war um vielfaches niedriger als in den entzündlichen Ohren von Wildtyp-Mäusen, während die *Tnf* mRNA-Expression (0,5 fach (0,2 – 0,6)) sogar unter der basalen Expression (< 1) der unbehandelten Ohren von naiven Wildtyp-Mäusen lag (**Abbildung 44**).



**Abbildung 44: Genomische Expression von proinflammatorischen Mediatoren in entzündlichen Ohren von Wildtyp, NF-κB1<sup>-/-</sup> und NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen während einer chronischen Kontaktallergie.**

RT-PCR Analysen des entzündlichen Ohrgewebes 4 h nach der 5. Challenge. Als Kontrolle wurde das Ohrgewebe von naiven Wildtyp-Mäusen verwendet. Die *Tnf*, *Il1-β*, *Il-6* und *Ccl2* mRNA-Expression in den entzündlichen Ohren wurde auf das Housekeeping-Gen *β-Aktin* normalisiert und als relative Expression zu den Ohren von naiven Wildtyp-Kontrollen dargestellt. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereichen dargestellt. Whisker zeigen die Min- und Max-Werte an (n = 4). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, ns = nicht signifikant (One-way ANOVA mit Post-hoc-Dunn-Tests; p-Werte angepasst für Mehrfachvergleiche).

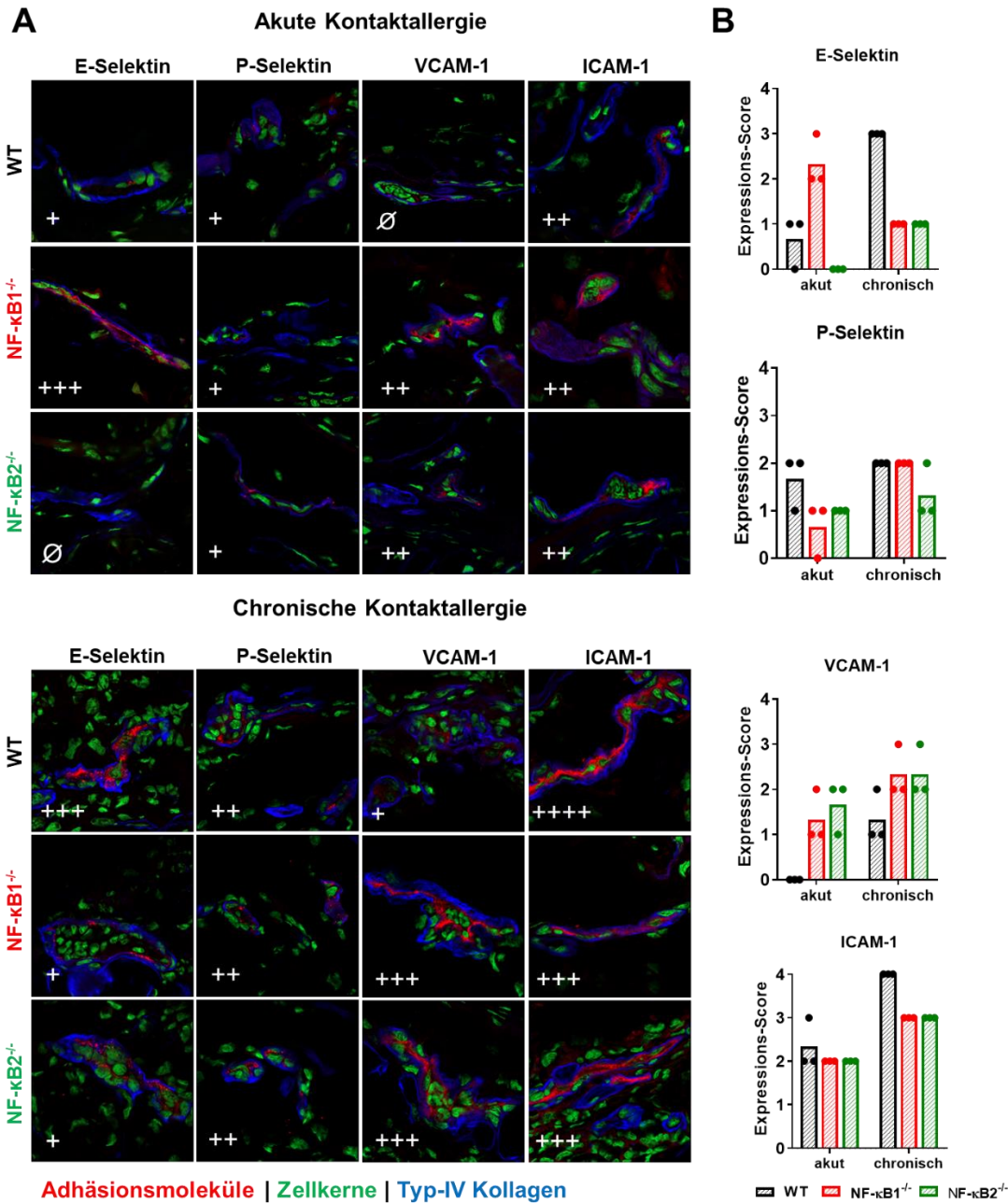
### 3.3.6 Expression von Adhäsionsmolekülen

Aufgrund des schwächer ausgeprägten Immunezellinfiltrats in den entzündlichen Ohren von NF-κB1<sup>-/-</sup> und NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen, wurden die entzündeten Ohren mit akuter und chronischer Kontaktallergie auf Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Endotheliale Adhäsionsmoleküle sind essentiell für das Rollen und die feste Adhäsion von Immunzellen sowie deren Transmigration in das entzündete Gewebe.

Während der akuten Kontaktallergie war die endotheliale Expression von P-Selektin und ICAM-1 in den Blutgefäßen von Wildtyp-Mäusen am stärksten ausgeprägt, dagegen war die Expression von VCAM-1 nicht detektierbar (**Abbildung 45 A und B**). Im Gegensatz zeigten die entzündeten Ohren von NF-κB1<sup>-/-</sup> Mäusen die stärkste endotheliale Expression von E-Selektin, während die Expression von VCAM-1 in den entzündeten Ohren von NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen am stärksten ausgeprägt war.

Während der chronischen Kontaktallergie zeigten sowohl NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> als auch Wildtyp-Mäuse eine deutliche Zunahme in der Expression aller vier endothelialen Adhäsionsmoleküle. Im Einklang hierzu war auch in entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen ein ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Expression von P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 zu verzeichnen, während der Anstieg von E-Selektin ausblieb (**Abbildung 45 A und B**).

In den entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen waren in beinahe allen Gefäßen E-Selektin und ICAM-1 nachweisbar. Die Expression dieser beiden Adhäsionsmoleküle war in den auf den Endothelien von Wildtyp-Mäusen deutlich stärker exprimiert als in den entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> und NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dagegen fiel die endotheliale Expression von VCAM-1 in den entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> und NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen während der chronischen Kontaktallergie deutlich schwächer aus (**Abbildung 45 A und B**). Hingegen zeigten die entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen die geringste endotheliale P-Selektin Expression.



**Abbildung 45: Expressionsmuster von endothelialen Adhäsionsmolekülen in entzündlichen Ohren von Wildtyp, NF-κB1<sup>-/-</sup> und NF-κB2<sup>-/-</sup> Mäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie.**

(A) Repräsentative Darstellung der Expressionsmuster der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 in entzündlichen Ohren von NF-κB1<sup>-/-</sup>, NF-κB2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen mit akuter (4 h nach der 1. Ch.) und chronischer (4 h nach der 5. Ch.) Kontaktallergie. Adhäsionsmoleküle = Rot, Zellkerne = Grün, Typ IV-Kollagen = Blau. (B) Expressionsstärke von endothelialen Adhäsionsmolekülen. Der Expressions-Score wurde semiquantitativ anhand der Anzahl der positiven Gefäße (Typ-IV Kollagen) für Adhäsionsmoleküle pro Ohrgewebschnitt erstellt (∅ = keine positiven Gefäße; 1 = einzelne positive Gefäße; 2 = 50% der Gefäße sind positiv; 3 = über 50% der Gefäße sind positiv; 4 = alle Gefäße sind positiv), n = 3 für jede Versuchsgruppe.

### 3.3.7 Proteomanalyse der entzündeten Ohren von WT und NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen während der akuten und chronischen Kontaktallergie

Die zuvor aufgeführten Untersuchungen zeigten im entzündeten Ohrgewebe von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen während der chronischen Kontaktallergie eine deutlich reduzierte Immunzellinfiltration, verringerte Anzahl von Blutgefäßen und verminderte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen. Dies deutet auf eine Störung der Immunzellrekrutierung und Angiogenese hin.

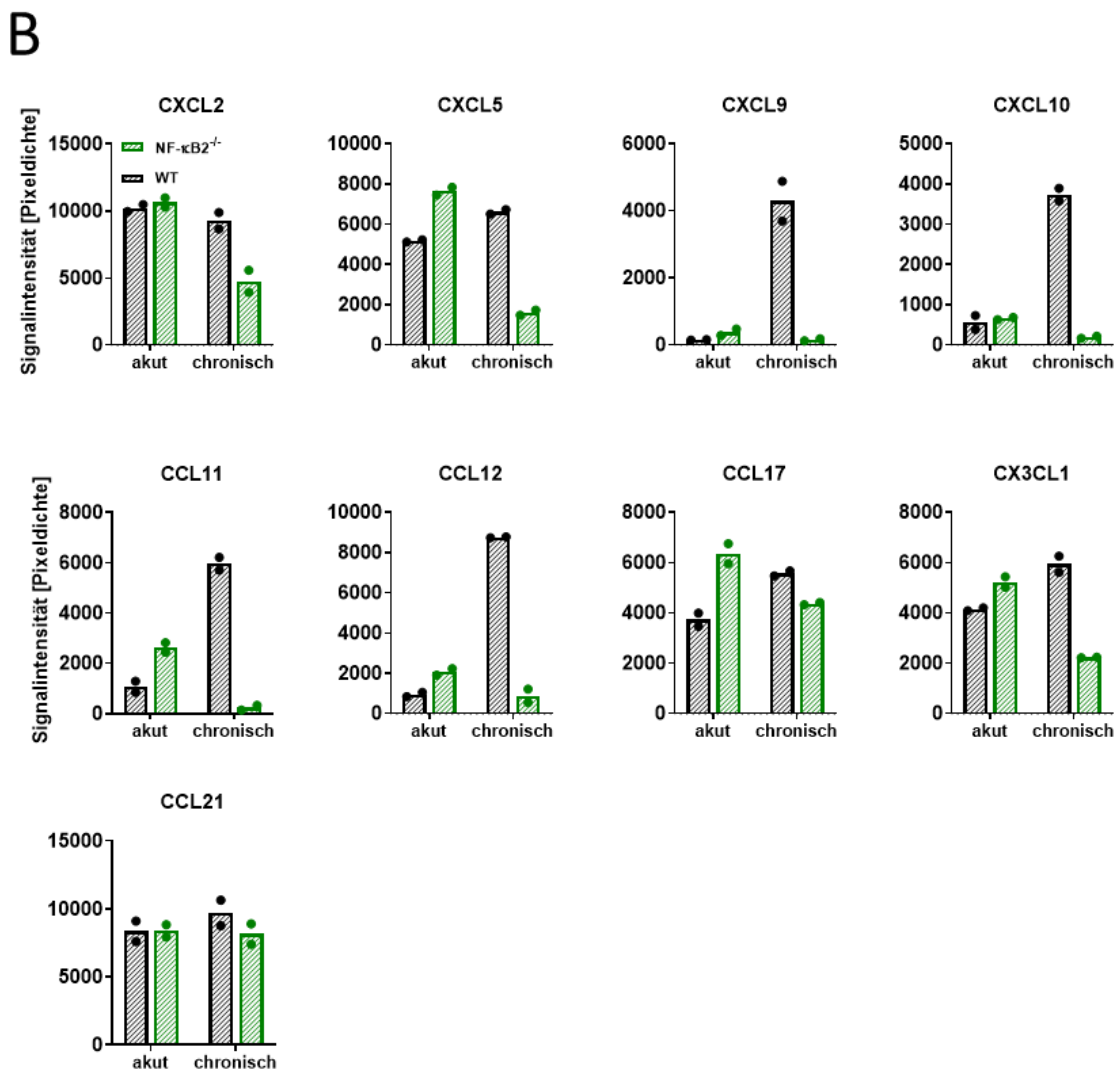
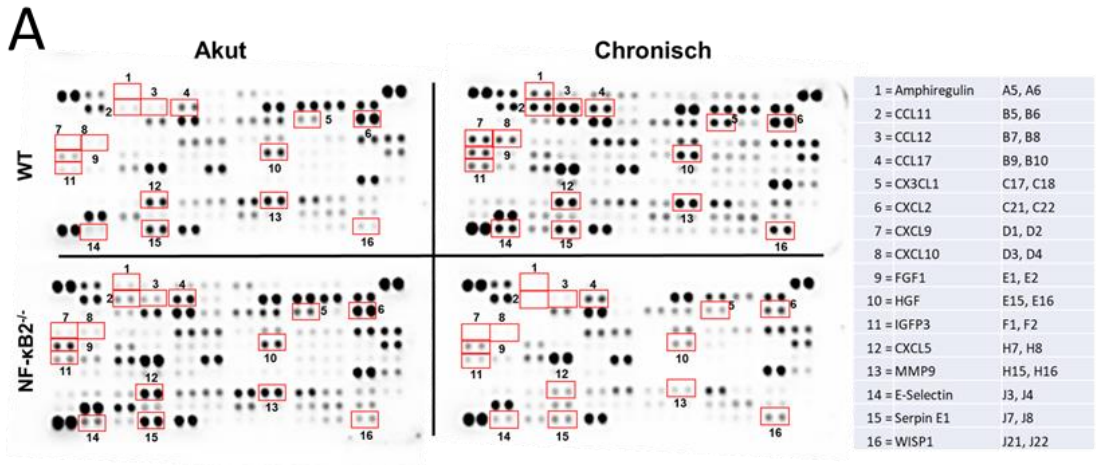
Um die Auswirkungen der Unterbrechung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf das Expressions-Muster von verschiedenen proentzündlichen Zytokinen, Chemokinen, Proteasen und Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurde in Kooperation mit der AG Kramer (Mainz) eine Proteom-Analyse des Ohrgewebes von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen mit akuter und chronischer Kontaktallergie durchgeführt.

Während der akuten Kontaktallergie zeigten die entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen ein sehr ähnliches Zytokin-Expressionsmuster wie die entzündeten Ohren von Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 46 A**). Von den 111 getesteten Proteinen, waren in den entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen mit akuter Kontaktallergie verglichen zu Wildtyp-Mäusen lediglich die Chemokine CXCL5, CCL11, CCL12, CCL17 sowie Wachstumsfaktoren Amphiregulin, FGF1 und IGFBF3 verstärkt exprimiert (**Abbildung 46 B und C**). Alle anderen Mediatoren waren während der akuten Kontaktallergie in den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen nicht beeinträchtigt.

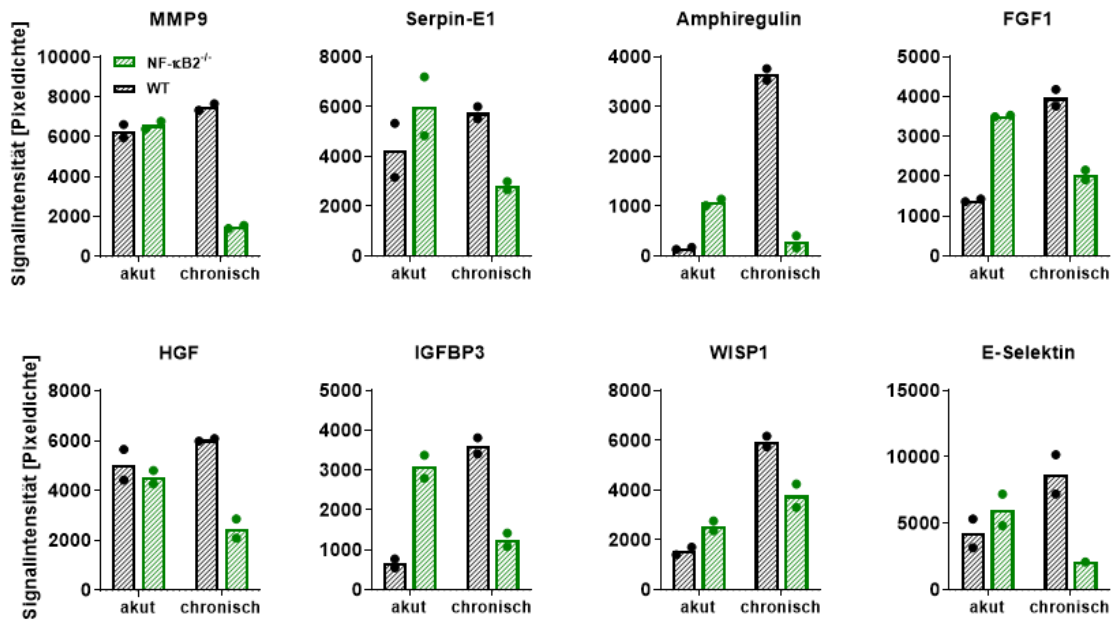
Dagegen war die Expression von Chemokinen (CXCL5, CCL11, CCL12, CCL17) und Wachstumsfaktoren (Amphiregulin, FGF1 und IGFBF3) die in entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen während der akuten Kontaktallergie verstärkt exprimiert waren während der chronischen Kontaktallergie verringert (**Abbildung 46 B und C**).

Zudem zeigte sich in entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine deutlich verringerte Expression der Chemokine (CXCL2, CX3CL1, CXCL9, CXCL10) und der Angiogenese-fördernden Mediatoren (HGF, Serpin E1, WISP1, MMP9, E-Selektin) (**Abbildung 46 B und C**).

Die entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B 2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten jedoch keinen Unterschied in der Expression des Chemokins CCL21, welches durch den alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert wird, während der akuten und chronischen Kontaktallergie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 46 B**).



C



**Abbildung 46: Proteomanalyse der entzündlichen Ohren von NF-κB2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen während der akuten und chronischen Kontaktallergie.**

(A) Proteomanalyse des entzündlichen Ohrgewebes von NF-κB2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen mit akuter (24h nach der 1. Ch) und chronischer (24h nach der 5. Ch) TNCB-induzierter Kontaktallergie. (B) Quantitative Darstellung der Expression von Chemokinen und (C) Angiogenese-fördernden Mediatoren. Pro Versuchsgruppe wurden (n = 4) Versuchstiere gepoolt und in Duplikaten analysiert. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt. Die Punkte stellen die einzelnen Werte der Duplikate dar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss unterschiedlicher ROS/RNS-Quellen auf die akute und chronische Kontaktallergie

Die folgende Diskussion (4.1) entstammt der Diskussion aus der Studie von Mehling R. *et al.* 2021 [206]. Direkte sowie sinnesgemäße Übersetzungen sind mit „Anführungsstrichen“ kenntlich gemacht und mit einer Fußnote vermerkt.

Die *in vivo* OI-Ergebnisse zeigten, dass die maximale ROS/RNS-Produktion während der frühen chronischen und chronischen Kontaktallergie deutlich früher erreicht wird als in der akuten Phase der Kontaktallergie. Dies hängt primär mit der Infiltration und Aktivierung von Neutrophilen zusammen. „Während der akuten Kontaktallergie besteht das leukozytäre Infiltrat zu ca. 95% aus Neutrophilen, während bei der chronischen Kontaktallergie der prozentuale Anteil an Neutrophilen ab und der prozentuale Anteil an Makrophagen, T- und B-Zellen sowie anderen Immunzellen zunimmt [229, 230]“<sup>1</sup> [206]. Während der akuten Kontaktallergie infiltrieren die ersten Neutrophilen bereits nach ca. 4 Stunden das entzündete Ohrgehör und erreichen die maximale Anzahl etwa nach 24 Stunden nach dem Challenge, was die zunehmende ROS/RNS-Produktion erklärt (**Abbildung 15**). In der chronischen Phase sind Neutrophile und Makrophagen bereits vor der fünften Challenge im Gewebe anzutreffen. Durch die erneute Applikation von TNCB werden die Neutrophilen direkt aktiviert weshalb es deutlich früher zum oxidativen Burst kommt als während der akuten Kontaktallergie [206, 231]. Des Weiteren korreliert die ROS/RNS-Produktion exakt mit der Ohrschwellungsreaktion, womit die ROS/RNS Produktion einen idealen Syrogatmarker für die Entzündungsreaktion während von Neutrophilen-dominierten Erkrankungen wie der Psoriasis vulgaris, der Colitis ulcerosa und der rheumatoiden Arthritis darstellt.

Die Untersuchung der differentiell ROS/RNS-defizienten Mäuse, zeigte dass die L-012- Signalintensität in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen um bis zu 90 % reduziert war (**Abbildung 15 und Abbildung 16**). Somit ist die Hypochlorsäure, ein Primärprodukt der MPO [55], die dominante reaktive Sauerstoffspezies während der Kontaktallergie. „Die Bildung von Hypochlorsäure durch die MPO beruht auf die

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al.* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

katalytische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chloridanionen. Wasserstoffperoxid entsteht wiederum durch die von Superoxid-Dismutase katalysierte Reaktion von Superoxid-Anion mit Wasserstoffprotonen. NOX2 ist die Primärquelle von Superoxid-Anionen in Neutrophilen und Makrophagen [232]. Aktuelle Studien haben jedoch auch die Bedeutung von NOX2 für die Funktion von B- und T-Zellen demonstriert [233-235]<sup>1</sup> [206]. Dies könnte die vollständige Depletion der L-012-Signalintensität und die niedrige DHR-Fluoreszenzintensität in den Ohren von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen erklären (**Abbildung 15 und Abbildung 16**). „L-012 eignet sich ideal zur Darstellung von ROS und RNS in Neutrophilen, da es eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Hypochlorsäure, Hydroxylradikalen und Peroxynitrit aufweist, welche in sehr hohen Konzentrationen während des oxidativen Bursts entstehen und die chemilumineszierende Probe direkt oxidieren können [197, 236-238]. Obwohl bisher angenommen wurde, dass L-012 hochsensitiv gegenüber Superoxid ist [200], reagiert es nicht direkt mit Superoxid, da es zuerst von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidasen oder anderen ROS/RNS-Intermediaten oxidiert werden muss [200]. Des Weiteren ist L-012 kein sehr effizientes Substrat für die direkte Reaktion mit den Peroxidasen, da hierzu sehr hohen Konzentration von L-012 benötigt werden [200]. Dagegen reagiert DHR, zusätzlich zu den oben genannten ROS/RNS-Intermediaten, sehr gut mit Wasserstoffperoxid [207, 239, 240]. Die ineffiziente Reaktion von L-012 mit Wasserstoffperoxid könnte der Grund für die Unterschiede in der ROS/RNS-Produktion zwischen der *in vivo* OI-Messung und der *ex vivo* DHR-Messung in den entzündlichen Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen sein. Des Weiteren, zeigte Schürmann N. *et al.* das MPO-defiziente Neutrophile eine erhöhte Akkumulation von Wasserstoffperoxid aufweisen [241]. Somit könnten die L-012 OI-Messungen, die eventuell erhöhte Produktion an Wasserstoffperoxid oder Superoxid in den Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen nicht vollständig erfassen, und somit nicht die tatsächliche ROS/RNS Produktion widerspiegeln. Der Vergleich von *in vivo* Messungen mit *ex vivo* Messungen ist jedoch immer schwierig, da aus den entzündeten Ohren stammende Leukozyten durch die Homogenisierung des Ohrgewebes erheblich beeinträchtigt werden, was bei *in vivo* Messungen nicht der Fall ist“<sup>1</sup> [206].

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

#### 4.1.1 iNOS-Defizienz

„Die Ergebnisse in dieser Arbeit legen nahe, dass iNOS eher eine untergeordnete Rolle bei der ROS/RNS-Produktion während der akuten und chronischen Kontaktallergie spielt. Eine Studie von Abu-Soud et al. zeigte, dass Stickoxid die katalytische Peroxidaseaktivität von MPO durch zwei Mechanismen modulieren kann: 1) niedrige Stickoxidkonzentrationen verstärken die Peroxidaseaktivität indem sie die Akkumulation von Komplex II minimieren; 2) hohe Stickoxidkonzentrationen fördern die Bildung des Nitrosylkomplexes MPO-Fe(III)-NO, wodurch die katalytische Aktivität von MPO verringert wird [242]. Darüber hinaus kann Stickstoffmonoxid die Superoxidproduktion verringern indem es die Aktivität von NOX2 herunterreguliert [243-245]. Daher könnte die iNOS Defizienz die Bioverfügbarkeit von Superoxid für die Bildung von anderen ROS-Intermediaten erhöhen, wodurch die niedrigere RNS-Konzentration kompensiert werden könnte. Stickstoffmonoxid spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen. Es wirkt vasorelaxierend auf die Blutgefäße [246] und hat eine hemmende Wirkung auf die Adhäsion von Blutplättchen und Neutrophilen, indem es die Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, P-Selektin und  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA-4) herunterreguliert [245, 247-250]. Mäusen die mit dem spezifischen iNOS-Inhibitor L-N<sup>6</sup>-Iminoethyllysin therapiert worden sind, entwickelten eine stärkere FITC- und DNFB-induzierte Kontaktallergie aufgrund der verbesserten Migration und des verlängerten Überlebens von dendritischen Zellen in der Haut [251]. Nichtsdestotrotz zeigte Ross *et al.* in einer Studie, dass die akute Kontaktallergie durch die Verabreichung von Aminoguanidin, welches das iNOS-Isozym bevorzugt hemmt, signifikant reduziert werden kann [252]. Diese Daten sind im Einklang mit den histopathologischen Befunden der entzündeten Ohren von iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen in dieser Arbeit, die ebenfalls eine etwas geringere akute Kontaktallergie aufwiesen. Jedoch hatte die iNOS-Defizienz keinen Einfluss auf den Verlauf der Ohrschwellungsreaktion sowie die Rekrutierung von Neutrophilen in das entzündete Ohrgewebe“<sup>1</sup> [206] (**Abbildung 14 und Abbildung 18**). „Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von anderen Gruppen beschrieben. Die therapeutische Reduktion von Stickstoffmonoxid durch Aminoguanidin während der experimentellen Sepsis erhöhte die Neutrophilen-Migration, während iNOS<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen keine Unterschiede in der Neutrophilen-Migration aufwiesen [253, 254]“<sup>1</sup> [206].

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

#### 4.1.2 MPO-Defizienz

„Untersuchungen von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass die MPO Defizienz und die damit einhergehende Beeinträchtigung der ROS-Produktion mit einer erhöhten chronischen Entzündung assoziiert ist, was auf eine entzündungshemmende Rolle von MPO während der chronischen Kontaktallergie hindeutet. MPO-abhängige ROS sind Hauptmediatoren für Gewebeschäden und Organentzündungen in einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen [255-257]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass MPO-Defizienz die Atherosklerose und Autoimmunerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose verstärken, indem sie die adaptive Immunantwort forcieren [56, 258]. Odobasic *et al.* zeigte, dass Mäuse mit einer MPO-Defizienz eine stärkere Ovalbumin-induzierte Kontaktallergie und Antigen-induzierte Arthritis entwickeln. MPO-Defizienz führte zu einer gesteigerten DC-Aktivierung, Antigenprozessierung und Migration zu den Lymphknoten was mit einer erhöhten T-Zell-Aktivierung und Proliferation einherging [259]. Ähnliche Ergebnisse wurden in einem experimentellen Modell der Lupus-Nephritis beobachtet. MPO-Defizienz führte zu einer verstärkten Nierenschädigung, die ebenfalls mit einer gesteigerten DC-Aktivierung und Migration in die sekundär lymphatischen Organen sowie einer erhöhten Akkumulation von Neutrophilen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Makrophagen in die Glomeruli einherging [260]. Der genaue Mechanismus, wie MPO die dendritischen Zellen moduliert, ist allerdings noch unklar und bedarf weiterer Forschung. Jedoch suggerieren unterschiedliche Studien, dass von MPO gebildete Hypochlorsäure zur Konformationsänderungen „*Macrophage-1 antigen*“ Mac-1 (CD11b/CD18) führt, einem inhibitorischen Rezeptor von DCs, welche die Funktion von DCs hemmt und dadurch die nachfolgende adaptive Immunantwort beeinträchtigt [56]. Obwohl die entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen eine erhöhte Neutrophilen- und T-Zell-Akkumulation aufwiesen (**Abbildung 18**), zeigten die Studien der hier vorgelegten Arbeit keine Unterschiede in der Aktivierung und der relativen Anzahl von T-Zellen sowie in der Akkumulation von DCs in die dLNs und Milzen im Vergleich zum Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 17**). Diese Ergebnisse suggerieren, dass die pro-inflammatorische Wirkung der MPO-Defizienz während der chronischen Kontaktallergie hauptsächlich auf die veränderte Funktion der Neutrophilen zurückzuführen ist [258]. Mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass MPO-defiziente Neutrophile welche mit Zymosan, einem Antagonisten für TLR-2 ähnlich wie das TNCB, stimuliert wurden eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aufwiesen [261-263]. Tateno *et al.* zeigte, dass die exogene Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

zusätzlich zu Zymosan die Phosphorylierung von ERK1/2 verstärkt. Im Gegensatz dazu führt eine exogene Applikation von HOCl zu einer Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität. Somit könnte der Mangel an HOCl als auch die verstärkte Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufgrund einer MPO-Defizienz zur gesteigerten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen in den Neutrophilen führen [263]. Des Weiteren kann HOCl die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen hemmen als auch die adhäsiven Eigenschaften der subendothelialen Matrix stören [264-266]. Dies könnte auch der Grund für die verstärkte Infiltration von Neutrophilen in die entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen sein (**Abbildung 18 D**)<sup>1</sup> [206].

Die Analyse des oxidativen Stresses in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen ergab eine leicht erhöhte Lipidperoxidation (MDA) und eine ähnliche DNA-Oxidation (8-OHdG) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 22**). „Brovkovych *et al.* zeigte, dass MPO-Defizienz zu einer erhöhten Konzentration an Stickstoffmonoxid und anderen RNS-Intermediaten führt, indem es die Expression und die Aktivität von iNOS erhöht [267]“<sup>1</sup> [206]. Somit könnte die fehlende Produktion von Hypochlorsäure und anderer MPO-abhängiger ROS durch die erhöhte Produktion von RNS kompensiert werden und so zu einem ähnlich hohen oxidativen Stress in den entzündeten Ohren von MPO<sup>-/-</sup> Mäusen führen [206]. Allerdings konnten im Rahmen dieser Promotionsarbeit keine Hochregulation der mRNA-Expression von iNOS mittels RT-PCR-Analyse festgestellt werden (negativer Nachweis: Signaldetektion über 32 Zyklen). „Des Weiteren zeigten MPO<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer akuten Lipopolysaccharid-induzierten Lungenentzündung eine ähnliche Expression von HO-1, einem Indikator für oxidativen Stress, wie die Wildtyp-Mäuse [268]“<sup>1</sup> [206]. Zusammengefasst deuten die aufgeführten Studien als auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Mäuse mit MPO-Defizienz in der Lage sind einen ähnlich hohen oxidativen Stress zu entwickeln wie die Wildtyp-Mäuse.

In der Tat zeigten MPO-defiziente Mäuse, welche mit Salmonellen infiziert wurden, erhöhte das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Level im Gewebe sowie eine erhöhte Lipidperoxidation und verstärkte oxidative DNA-Schäden (8-OHdG) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen [241]. Während des oxidativen Bursts produzieren die Neutrophilen über NOX2 große Mengen an Superoxid, das zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dismutiert. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist sehr stabil und kann leicht in das umgebende Wirtsgewebe diffundieren und somit das Risiko für durch oxidativen Stress

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al.* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

indizierte Kollateralschaden erheblich erhöhen. MPO wandelt das stabile diffusionsfähige  $\text{H}_2\text{O}_2$  in HOCl, welches sehr schnell innerhalb weniger Nanometer mit den umgebenen Biomolekülen reagiert. Des Weiteren kann MPO direkt an die Oberflächen von verschiedenen Mikroorganismen binden und somit gezielt Krankheitserreger durch Oxidation, bei geringem Risiko von oxidativen Stress induzierten Kollateralschäden, bekämpfen [241]. „Nichtsdestotrotz scheint ein MPO-Mangel bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neuronalen Erkrankungen, Lungen- und Nierenentzündungen von Vorteil zu sein [258]. Dies lässt vermuten, dass die Balance der MPO-induzierter lokaler Gewebeschädigung und der MPO-assoziiertes Inhibition der adaptiven Immunantwort bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedlich ausfällt und somit den Krankheitsverlauf begünstigen oder verschlimmern kann [56]“<sup>1</sup> [206]. Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten histopathologischen Untersuchungen ergaben widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses von ROS/RNS auf die chronische Kontaktallergie. Obwohl die entzündlichen Ohren von  $\text{MPO}^{-/-}$  wie auch  $\text{gp91}^{\text{phox}^{-/-}}$  Mäuse eine starke Reduktion der ROS/RNS Produktion aufwiesen, entwickelten die  $\text{MPO}^{-/-}$  Mäusen eine eher stärkere chronische Entzündung. Im Gegensatz hierzu entwickelten  $\text{gp91}^{\text{phox}^{-/-}}$  Mäuse eine mildere chronische Kontaktallergie (**Abbildung 18 D**). Dies betont erneut den spezifischen und selektiven Einfluss der einzelnen ROS- und RNS-Intermediate auf die Entzündungsprozesse als auch deren Kompensationsmechanismen.

### 4.1.3 NOX-Defizienz

Obwohl die *Tnf* mRNA-Expression in den entzündeten Ohren von  $\text{gp91}^{\text{phox}^{-/-}}$  Mäusen mit chronischer Kontaktallergie signifikant erhöht war, zeigten diese Mäuse einen moderaten entzündlichen Phänotyp (**Abbildung 18** und **Abbildung 19**). „Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass ROS die TNF-induzierte Apoptose als auch die Transkription von NF- $\kappa$ B regulieren kann [269-271]. Somit kann ROS, durch die anhaltende Aktivierung von JNK als auch durch die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, die TNF-induzierte Apoptose vermitteln, wodurch inflammatorische Prozesse und die daraus resultierenden Gewebsschädigungen verstärkt werden [272-275]. Daher könnte eine beeinträchtigte ROS/RNS-Produktion in den Ohren von  $\text{gp91}^{\text{phox}^{-/-}}$  Mäusen die Wirkung von TNF abmildern und zu einer verringerten Entzündung beitragen. Des Weiteren zeigten die

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al*. (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

Untersuchungen dieser Dissertationsschrift, dass ein Knockout in NOX2 die Tiere während der chronischen Kontaktallergie nicht vor oxidativen Stress schützt (**Abbildung 22**). Eine Studie von Sundqvist *et al.* zeigte, dass Patienten mit chronischer Granulomatose die kein funktionelles NOX2 besitzen, eine erhöhte mitochondriale ROS-Produktion und oxidativen Stress aufwiesen [276]. Eine zusätzliche Inhibition von mitochondrialen ROS mittels MitoTEMPO bei gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen hatte jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der akuten und chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 28**). Dies deutet darauf hin, dass vermutlich andere ROS/RNS-Quellen für den oxidativen Stress verantwortlich waren. In der Tat zeigten alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten differentiell ROS defizienten Mäuse während der akuten und chronischen Kontaktallergie eine erhöhte Xanthinoxidase mRNA-Expression (**Abbildung 20**). In einem experimentellen Modell der Lipopolysaccharid-induzierten Dermatitis, welches unabhängig von einer adaptiven Immunantwort ist, konnte Nakai *et al.* zeigen, dass nicht NOX2, sondern Xanthinoxidase und iNOS die Hauptquellen für ROS/RNS darstellen [277]. Andere NOX-Isoformen könnten ebenfalls zu oxidativem Stress beitragen. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass NOX4 die Hauptquelle für ROS in humanen Fibroblasten aus läsionaler Haut von Psoriasis vulgaris Patienten essenziell für die Redox-vermittelte Modulation des Metabolismus in Keratinozyten ist [278]. Des Weiteren führt eine Inhibition von NOX1 in Keratinozyten aus läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis zu einer signifikant reduzierten ROS Produktion [279]. Darüber hinaus wird NOX4 sehr stark von Endothelzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei vielen entzündlichen Prozessen und Erkrankungen wie zum Beispiel bei entzündlichen Veränderungen im Rahmen der Arthrose, der Nephritis sowie der durch Ischämie ausgelösten Hypoxie und Angiogenese [73, 280, 281]. Daher könnten residente Zellen wie Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen auch durch andere NOX-Isoformen zur lokalen ROS/RNS-Produktion und zu oxidativem Stress in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen beitragen. Ob die *in vitro* Befunde auch auf lebende Organismen übertragbar sind, bedarf weiterer Forschung. Denn die Wechselwirkung zwischen verschiedenen residenten und infiltrierenden Immunzellen kann deren Metabolismus und Funktion erheblich beeinflussen<sup>1</sup> [206]. So konnten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Studie keine Unterschiede in der ROS-Produktion in den entzündlichen Ohren von NOX4<sup>-/-</sup> Mäusen aufzeigen. Allerdings zeigten die NOX4<sup>-/-</sup>

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al.* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

Mäuse eine etwas stärkere Ohrschwellung während der chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 31**), was im Widerspruch zu der reduzierten T-Zellaktivierung in den dLK steht (**Abbildung 32**). Die Expression von CD69 reflektiert die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen [282, 283]. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus jedoch auf der CD69 Expression von T-Zellen. Dem CD69 scheint allerdings auch eine immunsuppressive Rolle zugeschrieben, indem es die Produktion von IL-10 in regulatorischen T-Zellen vorantreibt [284]. Des Weiteren reguliert CD69 die Retention von T-Zellen im Gewebe sowie deren Produktion der Chemokine CCL-1, CXCL-10 und CCL-19 [285]. Dies könnte die Chemotaxis und Migration von T-Zellen aus den dLK in die entzündeten Ohren von NOX4<sup>-/-</sup> Mäuse begünstigen und so die chronische Entzündung vorantreiben. Um dies zu überprüfen bedarf es jedoch detaillierter immunhistochemischer Analysen der dLK und des entzündlichen Ohrgewebes. Aufgrund der marginalen Unterschiede in der klinischen Ausprägung der Entzündungsreaktion (Ohrschwellung) zwischen den NOX4<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen wurde auf weiterführende histopathologische Analysen verzichtet.

„Die aktuelle Studienlage zeigt, dass NOX2-Defizienz bei Menschen und Nagetieren oft mit Autoimmunität und immunvermittelten inflammatorischen Erkrankungen assoziiert ist [286-288]. Beispielsweise entwickeln Mäuse mit einem Defekt in *Ncf1*, einer zytosolischen Untereinheit von NOX2, aufgrund einer verstärkten Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen eine schwere kollageninduzierte Arthritis und EAE [289]. Ein möglicher Mechanismus, wie NOX2 die Immunantwort regulieren kann, ist die Redox-abhängige Modifikation der Oberflächenmoleküle von T-Zellen [290]. ROS kann die T-Zellen direkt regulieren, indem es die ζ-Kette des T-Zell-Rezeptor oder Cofilin, welches die Depolymerisierung des Aktins im Zytoskelett reguliert, oxidiert, was zu einer Hyporeaktivität von T-Zellen führt [291, 292]. Im Gegensatz dazu können von NOX2 abstammende ROS-Intermediate durch eine verstärkte Lipidperoxidation und Zellmembranzerstörung ein Antigenleck im Endosomen hervorrufen, wodurch die Kreuzpräsentation von Antigenen durch MHC-Klasse-I an CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt wird [293]. Obwohl die Lipidperoxidation in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen leicht verringert war (p = 0,065; nicht signifikant), wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit keine Unterschiede in der T-Zell-Aktivierung und-Differenzierung (**Abbildung 17**) beobachtet, was darauf hindeutet, dass diese durch

die reduzierte ROS/RNS-Produktion in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt waren“<sup>1</sup> [206].

Beim Vergleich der beiden Kontaktallergiemodelle, zeigten die gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäuse während der Oxazolone-induzierten Kontaktallergie eine deutlich stärkere chronische Entzündung mit stärkerem Immuninfiltrat als die Wildtyp-Mäuse (**Abbildung 36**). Dagegen waren die Entzündungsreaktion und das Immunzellinfiltrat deutlich schwächer ausgeprägt als bei der chronischen TNCB-induzierten Kontaktallergie. Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Th1- und Th2- Balance der T-Zellabhängigen Immunantwort sein. Generell zählen TNCB und Oxazolone zu den Haptenen die tendenziell eher eine Th1-dominante Immunantwort auslösen. Jedoch zeigen einige Studien, dass das Oxazolone tendenziell eine etwas stärker Th2-polarisierte Immunantwort auslöst, mit erhöhter IL-4 und IL-10 Produktion [30, 294]. Des Weiteren führen wiederholte Kontakte mit den entsprechenden Haptenen zu einer Verschiebung der Th1-Th2-Balance in Richtung einer Th2-Polarisierung [36, 37]. Studien in NOX2-defizienten Mäusen und in CGD-Patienten die keine funktionelle NOX2 besitzen, haben gezeigt, dass NOX2-Defizienz mit einer stärkeren Th2-Immunantwort einhergeht [295, 296]. Somit könnte die Th2-Immunantwort in den gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen durch das Oxazolone stärker ausfallen wodurch sich auch die chronische Entzündungsreaktion verstärken würde.

#### 4.1.4 Metabolomanalysen

Die metabolische Analyse von entzündeten Ohren mit chronischer TNCB-spezifischer Kontaktallergie ergab ähnlich stark erhöhte GSSH-Spiegel in allen Versuchsgruppen mit differentiell beeinträchtigten ROS/RNS im Vergleich zu gesunden naiven Mäusen, was auf einen ähnlich hohen oxidativen Stress in allen Versuchsgruppen hindeutet (**Abbildung 21 C**). „Unter physiologischen Bedingungen liegen 98% des GSH in reduzierter Form vor [297]. Während des oxidativen Stresses oxidiert GSH zu GSSH, welches durch die Gluthation-Reduktase, unter Verbrauch von NADPH, wieder zu zwei reduzierten GSH zurückgewonnen wird [298]“<sup>1</sup> [206]. Die Menge an NADP/NADPH ist abhängig von der Bioverfügbarkeit von NAD<sup>+</sup> und dessen Präkursor [299]. Die NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase (CD38) ist neben Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) eines der wichtigsten NAD<sup>+</sup>-konsumierenden Enzyme. PARP-1 repariert die DNA-Doppelstrangbrüche, die z.B. durch oxidativen Stress entstehen und wird deshalb während der

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

Entzündungsreaktion sehr stark in einer Vielzahl von Zellen exprimiert [300, 301]. „Dies könnte die verringerten NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen in den entzündeten Ohren während der chronischen Kontaktallergie erklären. Des Weiteren, könnten die niedrigen NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen zu erhöhten GSSH-Spiegeln beitragen und somit den oxidativen Stress verstärken. Darüber hinaus deutet die Depletion von Arginin und Prolin [302], die als Präkursor für die Biosynthese von Stickstoffmonoxid dienen [303], auf eine starke Aktivität von NOS-Enzymen während der chronischen Kontaktallergie hin“<sup>1</sup> [206]. Allerdings konnten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit keine erhöhte *iNOS* und *eNOS* Expression während der akuten und chronischen Kontaktallergie festgestellt werden (negativer Nachweis: Signaldetektion über 32 Zyklen). Interessanterweise war die Taurinkonzentration ausschließlich in gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen erhöht. Studien haben gezeigt das Gewebe mit erhöhtem oxidativem Stress mit einer höheren Konzentration von Taurin einhergehen. Taurin spielt neben zahlreichen physiologischen Prozessen auch eine antioxidative Rolle, indem es z.B. die Hypochlorsäure neutralisiert und so die Zellen vor dem oxidativen Stress schützt [304]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zudem beobachten das die Konzentration an Taurin negativ mit der ROS-Produktion korreliert (**Abbildung 21 C**). So könnte die geringere ROS-Produktion in den entzündlichen Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mäusen zum verringerten Verbrauch von Taurin führen und somit zu einer erhöhten Konzentration von Taurin beitragen. Des Weiteren zeigten entzündete Ohren von Mäusen mit chronischer Kontaktallergie im Vergleich zu gesunden Ohren von naiven Mäusen stark erhöhte Konzentration von Ascorbat (das Salz der Ascorbinsäure besser bekannt als Vitamin C). Vitamin C ist ein wichtiges Antioxidans und ein Radikalfänger. Harrison *et al.* konnte zeigen, dass Mäuse die kein Vitamin C synthetisieren können (dies gilt auch für den Menschen) einen erhöhten oxidativen Stress entwickeln [305]. Jedoch wird bei der Synthese von Ascorbat vermehrt GSH konsumiert [306]. Dies könnte ebenfalls die erhöhte Konzentration an GSSH erklären. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Hochregulation der Ascorbat-Synthese im Zusammenhang mit der entzündungsabhängigen Erhöhung des oxidativen Stresses. Der genaue Einfluss der Entzündung auf die Ascorbat-Synthese bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen.

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

#### 4.1.5 NET-Bildung während der Kontaktallergie

Die NET-Bildung wurde als ein grundlegender Mechanismus der angeborenen Immunabwehr gegen verschiedene Krankheitserreger identifiziert. Darüber hinaus zeigen immer mehr Studien die Relevanz von NETs in zahlreichen Autoimmunerkrankungen [3]. „Derzeit werden zwei Hauptmechanismen der NET-Bildung beschrieben: Die NADPH Oxidase-abhängige und die NADPH Oxidase-unabhängige NET-Bildung [108]. Die Fluoreszenzmikroskopie Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigten eine ähnlich stark ausgeprägte NET-Bildung in den entzündeten Ohren von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen wie in den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 23**). Dies deutet auf eine NADPH Oxidase-unabhängige NETosis während der akuten Kontaktallergie hin. Bestimmte Stimulanzen wie Immunkomplexe, Ionomycin und Nikotin können NETs unabhängig von der NADPH Oxidase bilden, diese sind jedoch auf die mitochondriale ROS-Produktion angewiesen [112]. Interessanterweise, zeigten die entzündeten Ohren von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen mit akuter Kontaktallergie ähnlich hohe 8-OHdG Levels wie die Wildtyp-Mäuse (**Abbildung 22**). Ob die DNA Oxidation und die NET-Bildung auf die mitochondriale ROS-Produktion oder andere ROS Quellen zurückzuführen ist, ist noch unklar und bedarf weiterführende Untersuchungen. Allerdings scheint die DNA Oxidation eine essentielle Rolle bei NET-Bildung zu spielen. „Lood *et al.* berichtete, dass die mitochondriale und chromosomale DNA in NETs hohe Mengen an 8-OHdG aufweist [107]. Oxidierte DNA ist stabiler gegenüber Nukleasen wie DNase I und hat eine höhere Immunogenität [107, 128, 307]. Dies könnte auch der Grund für die ausgeprägte Akkumulation von OGG1 in den NETs sein. Somit scheint OGG1 ein exzellenter Marker zur Darstellung von NETs in Geweben zu sein“<sup>1</sup> [206].

„Darüber hinaus waren die NETs in den Wildtyp-Mäusen stark positiv für die H3-Citrullinierung, jedoch nicht die NETs in dem Ohrgewebe von gp91<sup>phox-/-</sup> Mäusen (**Abbildung 24**), was darauf hinweist, dass NADPH Oxidase ein vorangeschalteter Regulator der H3-Citrullinierung ist“<sup>1</sup> [206]. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von anderen Forschungsgruppen gemacht, die gezeigt haben, dass die Inhibition der NADPH-Oxidase zu einer verringerten Citrullinierung führt [3]. Des Weiteren, kann Wasserstoffperoxid sowie die Proteinkinase C $\zeta$ , welche beide am oxidativen Burst beteiligt sind, PAD4 aktivieren. Dies lässt die Vermutung zu, dass PAD4 Downstream von ROS liegt [3]. Zudem haben Studien gezeigt, dass eine PAD4-vermittelte Citrullinierung für die

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

NADPH Oxidase-unabhängige NET-Bildung erforderlich ist [108]. Es wird angenommen, dass der dabei entstehende Calciuminflux PAD4 aktiviert, welches wiederum die Citrullinierung von Histonen mediiert und dadurch die Dekondensation von Chromatin auslöst [112]. Allerdings wird die Annahme, dass eine PAD4-vermittelte Histon-Citrullinierung für die NET-Bildung erforderlich ist, kontrovers diskutiert und eine Vielzahl von Studien konnte bereits eine PAD4-unabhängige NET-Bildung nachweisen [113, 308]. „Die Citrullinierung von Histon H3 kann auch durch PAD2 erfolgen, welche ebenfalls in Neutrophilen stark exprimiert wird [309, 310]“<sup>1</sup> [206]. So konnte Bawadekar M. *et al.* zeigen, dass PAD2 und nicht PAD4 bei der TNF induzierten rheumatoiden Arthritis für die Proteincitrullinierung hauptverantwortlich ist und PAD2 für die NET-Bildung nicht erforderlich ist [311]. TNF ist eines der bedeutendsten Zytokine der Kontaktallergie. Somit könnte TNF über PAD2 die H3-Citrullinierung in den PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen induzieren. „Eine aktuelle Studie mit humanen Neutrophilen von Zhou *et al.* zeigte, dass die PAD4-vermittelte Citrullinierung direkt mit dem oxidativen Burst zusammenhängt [312]. PAD4 ist in seiner inaktiven Form physisch mit den zytosolischen Untereinheiten p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> der NOX2 verbunden. Die Aktivierung von PAD4 bewirkt die Citrullinierung von p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup>, die sich darauf von PAD4 ablösen. Hierdurch wird die Aktivierung und Assemblierung der NOX2 und folglich die ROS-Produktion inhibiert [312]. Die *in vivo* OI-Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigten jedoch keinen Unterschied in der ROS/RNS-Produktion bei PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 26 A**). Diese Diskrepanz könnte eventuell auf die speziesbedingten Unterschiede zwischen den murinen und humanen Neutrophilen zurückgeführt werden [313, 314]. So ist die Bindung von Phosphatidylinositol-3-phosphat an p40<sup>phox</sup>, einem selektiven Regulator der NADPH Oxidase, für die NADPH-Oxidase-Aktivierung und den oxidativen Burst in humanen Neutrophilen jedoch nicht in murinen Neutrophilen erforderlich [315]“<sup>1</sup> [206]. Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen erstmals, die Bildung von NETs während der TNFB-induzierten Kontaktallergie [206]. Denn bis dato gab es keine murine oder humane Studien über die Rolle von NETs in der allergischen Kontaktdermatitis. Lediglich eine Studie von Simon D. *et al.* untersuchte die Bildung von eosinophilen extrazellulären „Traps“ in Hautproben von Patienten mit atopischer Dermatitis und allergischer Kontaktdermatitis [206, 316]. Eine neulich veröffentlichte Studie von Hasegawa Y. *et al.* (2022) zeigte, dass Mäuse mit einem Knockout im

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al.* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

Interleukin 36-Rezeptor-Antagonist (IL-36Ra<sup>-/-</sup>) eine stärkere akute Kontaktallergie entwickelten als die Wildtyp-Mäuse, aufgrund einer verstärkten NET-Bildung. Dabei führte die Therapie mit dem PAD-Inhibitor Cl-Amidin zu einer signifikant reduzierten Ohrschwellungsreaktion in IL-36Ra<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen, indem es die NET-Bildung inhibierte [317]. Dagegen zeigten die entzündlichen Ohren von PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit keine signifikanten Unterschiede in der Ohrschwellungsreaktion, trotz der reduzierten NET-Bildung (**Abbildung 26**). Cl-Amidin inhibiert nicht nur PAD4 sondern auch PAD1 und PAD3 [318]. PAD1 und PAD3 werden stark in der Epidermis exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation und Differenzierung von Keratinozyten [319-321]. Somit könnte die Therapie mit Cl-Amidin in der Studie von Hasegawa Y. *et al.* [318] die PAD1- und PAD3-abhängige Differenzierung von Keratinozyten beeinflussen was zu einem milderem Verlauf der Kontaktallergie führte.

Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Promotionsarbeit in Mäusen mit MPO-Defizienz ebenfalls NETs nachgewiesen werden (**Abbildung 25**) [206]. MPO spielt eine zentrale Rolle bei der NADPH Oxidase-abhängigen NET-Bildung indem es die NE aktiviert worauf diese in den Nukleus transloziert und dort die Histone proteolytisch spaltet, was deren Dekondensation begünstigt. Die anschließende Bindung der synergistisch wirkenden NE und MPO an das Chromatin treiben die Dekondensation weiter voran [111]. Die Rolle von MPO bei der NET-Bildung ist jedoch von der Art des Stimulus abhängig. So sind MPO-defizienten Neutrophile welche mit *P. aeruginosa*, *S. aureus* oder *E. coli* stimuliert wurden in der Lage NETs freizusetzen. Die Stimulation von MPO-defizienten Neutrophilen mit PMA ist hingegen nicht in der Lage NETs zu induzieren [322]. Rocheal NC. *et al.* konnte experimentell zeigen, dass die Stimulation von humanen Neutrophilen mit Leishmanien sowohl die klassischen NADPH Oxidase-abhängige als auch eine frühe ROS- und MPO-unabhängige NET-Bildung auslösen kann [323]. Somit ist es denkbar, dass während der TNCB-induzierten Kontaktallergie die NET-Bildung ebenfalls auf mehreren Wegen ausgelöst wird, womit die Defizienz in NOX2, MPO oder PAD4 gänzlich oder zum Teil kompensiert werden könnte.

#### **4.1.6 Pharmazeutische Inhibition von ROS/RNS als ein therapeutischer Ansatz**

„Die Klärung ob oxidativer Stress einer der Hauptursachen für Erkrankung oder nur ein Nebenprodukt darstellt ist klinisch insbesondere zum besseren Verständnis von

Neutrophilen-reichen T-Zell-vermittelten fortschreitenden Autoimmunerkrankungen von besonderer Bedeutung. Daher können antioxidative Therapien bei Erkrankungen, bei denen oxidativer Stress nicht der maßgebliche Faktor ist, sich als unwirksam erweisen [324]. Viele Studien konnten zeigen, dass oxidativem Stress eine zentrale Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten spielt, insbesondere bei mit Neutrophilen-reichen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoider Arthritis, Psoriasis vulgaris, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn [325-327]. Leider scheiterten im Rahmen von klinischen Studien die meisten therapeutischen Ansätze mit Antioxidantien, da diese keine oder eine nur stark begrenzte Therapieeffizienz zeigten [324, 328]. Dies löste eine starke Skepsis gegenüber Antioxidantien-Therapien aus. Die Gründe für das Versagen von Antioxidationsbehandlungen sind sehr vielfältig. Hierfür verantwortlich könnten eine zu geringe Bioverfügbarkeit oder Dosierung, ungeeignete Verabreichungszeitpunkte und Frequenzen, die Therapiedauer, eine schlechte Spezifität der Wirkstoffe als auch deren Toxizität sein [324]. Darüber hinaus befinden sich einige der antioxidativ wirksamen Verbindungen im erfolgreichen klinischen Einsatz. Es handelt sich bei diesen Wirkstoffen jedoch nicht per se um Antioxidantien, da diese auch zahlreiche Auswirkungen außerhalb ihrer therapeutischen Zielstrukturen zeigen, sogenannte Off-Target-Effekte. Beispielsweise ist Dimethylfumarat (DMF) zur Behandlung von Multipler Sklerose [329] und der Psoriasis vulgaris [330] zugelassen. Es wird angenommen, dass DMF den Nrf2-Weg aktiviert, der die Expression verschiedener antioxidativer Proteine reguliert und so das Redoxgleichgewicht wiederherstellt [331, 332]. Allerdings zeigten Studien, dass DMF das angeborene und adaptive Immunsystem in NRF2-defizienten Mäusen moduliert [333] und die Expression von entzündlichen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen durch Hemmung der Translokation von NF- $\kappa$ B hemmt [332, 334]. Aufgrund dieser vielfältigen Beobachtungen ist es schwer zu bestimmen, ob der therapeutische Nutzen von DMF auf antioxidativen oder immunmodulierenden Wirkungen beruht<sup>1</sup> [206]. So zeigten die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Studien mit NRF2-defizienten Mäusen nur einen geringen Anstieg der Ohrschwellung während der akuten Kontaktallergie und eine nahezu uneinträchtigte chronische Kontaktallergie. Des Weiteren war die ROS-Produktion in entzündeten Ohren von NRF2<sup>-/-</sup> Mäusen - bis auf zwei Messzeitpunkten mit marginal reduzierter ROS-Produktion - ähnlich hoch wie bei den Wildtyp-Mäusen. Es ist in diesem

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

Zusammenhang wichtig anzumerken, dass die *in vivo* OI-Messungen exakt die zum Messzeitpunkt vorliegende ROS/RNS-Produktion widerspiegeln. Allerdings kann daraus keine genaue Aussage über den tatsächlichen oxidativen Stress im Ohr gewebe gemacht werden. Aufgrund der marginalen klinischen Unterschiede in der Ohrschwellungsreaktion zwischen den NRF2<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen wurde jedoch auf weiterführende detaillierte Analysen der Indikatoren für die Anwesenheit von oxidativem Stress verzichtet.

Insgesamt bestärkt dieser Versuch die vorherigen Ergebnisse mit den differentiell ROS/RNS-defizienten Mäusen die aufzeigten, dass ROS/RNS einen marginalen Einfluss auf die akute und chronische Kontaktallergie haben. In Einklang hiermit, hatten die Antioxidans-Therapien mit Trolox und mitoTEMPO keinen Einfluss auf die *in vivo* ROS-Produktion und den Ohrschwellungsverlauf (**Abbildung 30**). Die Gruppe von SF. Martin (Allergologie, Freiburg) zeigte, dass Lokalthherapie mit Trolox oder *N*-Acetylcystein (NAC) vor einer Sensibilisierung schützen kann was auf einen geringeren oxidativen Stress und die damit einhergehende verringerte Degradation von Hyaluron zurückzuführen ist [335]. Somit scheint ROS eine wichtige Rolle bei der Sensibilisierung zu spielen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz zur oben erwähnten Arbeit auf die Effektorphase der akuten Kontaktallergie und nicht auf die Sensibilisierungsphase fokussiert. Somit wurde Trolox systemisch verabreicht und die Applikation erfolgte erst nach der Sensibilisierung. Das Weiteren erfolgte die Sensibilisierung und die Challenge in der oben aufgeführten Studie am selben Ohr [335], während im Rahmen dieser Dissertation die Sensibilisierung am Abdomen und die Challenge am Ohr durchgeführt wurde, weshalb die Ergebnisse nicht direkt verglichen werden können.

Des Weiteren wurde in im Rahmen einer von unserem Labor publizierten Arbeit gezeigt, dass eine systemische Therapie mit NAC zur verringerten Ohrschwellungsreaktion führt, jedoch ohne Beeinträchtigung der *in vivo* RNS/ROS-Produktion [336]. Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass NAC nicht nur als reiner Radikalfänger fungiert, sondern auch ROS unabhängige immunmodulierende Wirkungen hat, indem es den NF- $\kappa$ B-Signalweg und p38 MAP inhibiert [336].

Unterschiedliche ROS/RNS haben unterschiedlichen Auswirkungen auf die Oxidation von Proteinen und können sowohl aktivierend als auch hemmend auf das Immunsystem wirken. Des Weiteren spielt der Entstehungs- und Wirkungsort von ROS/RNS sowie die Konzentration am Wirkungsort eine entscheidende Rolle. All dies ist für eine angemessene Therapie mit Antioxidantien oder ROS/RNS-Scavengern von

entscheidender Bedeutung, weshalb eine willkürliche systemische Inhibition von ROS/RNS zu unspezifisch und zudem zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann.

„Im Allgemeinen ist das Redoxsignaling ein sehr komplexes System, in dem zahlreiche Signalwege und ROS/RNS-Quellen miteinander interagieren. Demzufolge könnte die spezifische Depletion einer ROS/RNS-Quelle durch eine verstärkte Expression oder Aktivität einer anderer ROS/RNS-Quellen kompensiert werden [242, 267]“<sup>1</sup> [206]. Folglich müssten für effiziente therapeutische Ansätze vermutlich mehrere ROS/RNS zeitgleich spezifisch inhibiert oder deletiert werden.

---

<sup>1</sup> Übersetzt und sinngemäß adaptiert von Mehling R. *et al* (2021). Die Diskussion in der aufgeführten Studie Mehling R. *et al.* (2021), Referenz [206] wurde von mir eigenständig verfasst.

## 4.2 Einfluss des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die akute und chronische Kontaktallergie

### 4.2.1 Klassischer NF- $\kappa$ B-Signalweg

Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen und ist maßgebend an der Regulation und Initiation der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt. In dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass Mäuse mit einem Knockout in NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) eine signifikant geringere Ohrschwellungsreaktion während der akuten und chronischen Kontaktallergie entwickelten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 37**). Nichtsdestotrotz zeigten histopathologische Untersuchungen der entzündeten Ohren eine tendenziell stärker ausgeprägte akute Kontaktallergie, mit etwas stärker ausgeprägten Neutrophilen-Abszessen in der Epidermis (**Abbildung 39 A und B**). Während der chronischen Phase wurde dagegen eine ähnlich starke Entzündungsreaktion wie in den Wildtyp-Mäusen beobachtet, jedoch mit einem stärkeren chronischen Immuninfiltrat bestehend aus T-Zellen und mononuklearen Zellen bei gleichzeitig geringerem Infiltrat von Neutrophilen (**Abbildung 39 A, B und C**).

Zahlreiche Studien mit Mäusen sowie Untersuchungen von Patienten zeigten, dass das Fehlen von NF- $\kappa$ B1 oder eine reduzierte Expression des NFKB1-Gens, beispielsweise verursacht durch Gen-Polymorphismen, mit zahlreichen chronisch-entzündlichen Erkrankung, Autoimmunerkrankungen, und Krebs assoziiert ist [337-342]. Die Untereinheit p50/105 spielt eine zentrale Rolle bei der Initiation und Regulation der NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression. Einerseits, kann p50 die Transkription positiv regulieren indem es als Dimerpartner für die TAD-enthaltenden Untereinheiten RelA, c-Rel und RelB fungiert und die Bindung an die  $\kappa$ B- Bindungsstellen der DNA ermöglichen. Andererseits kann p50 durch Bildung von p50-Homodimeren als Transkriptionsrepressor wirken. Dabei können die p50-Homodimere andere Transkriptions-Corepressoren wie Bcl-3, Histondeacetylase 1 (HDAC1) und N-methyl-transferase (EHMT) binden und die Transkription negativ beeinflussen in dem sie die  $\kappa$ B-Bindungsstellen an der DNA blockieren oder deren Zugang durch Kondensation des Chromatins und Methylierung verhindern [340]. So ist die Bildung des Komplexes aus Bcl-3 und p50-Homodimeren wichtig für die Vermittlung der Selbsttoleranz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, indem sie die Transkription von NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen, unter anderem von IL-2, reduzieren [343], während sie in LPS-stimulierten Makrophagen die Expression des anti-

inflammatorischen Zytokins IL-10 induzieren [344]. Des Weiteren ist die Untereinheit p50 für die Rekrutierung und Bindung des transkriptionellen Repressors HDAC1 an die  $\kappa$ B-Bindungsstellen von zahlreichen pro-inflammatorischen Genen, unter anderem Ccl2, Cxcl10, Gm-csf und Mmp-13-Promotor, erforderlich [345]. Die könnte die erhöhte Expression von Ccl2 in den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen erklären (**Abbildung 44**). Zudem zeigten die Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine tendenziell erhöhte *Il6* Expression während der chronischen Kontaktallergie. IL-6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das vor allem in der akuten Phase der Entzündungsreaktion vorherrschend ist. Allerdings zeigten Studien, dass IL-6 auch maßgeblich an der adaptiven Immunantwort sowie der Pathogenese von zahlreichen Autoimmun- und chronisch-entzündlichen Erkrankungen beteiligt ist [346, 347]. So zeigte Valle *et al.*, dass NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen mit zunehmenden Alter, aufgrund einer unkontrollierten Transkription von IL-6 durch RelA, multisystemische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen entwickeln [348]. Dagegen zeigte eine andere Studie, dass die Untereinheit p50 für die Rekrutierung von Neutrophilen während der LPS-induzierten Lungenentzündung notwendig ist [349]. Hierbei beobachteten die Autoren, dass die NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäuse in den entzündlichen Lungen trotz erhöhter Expression von IL-6, CXCL1 und CXCL2 weniger infiltrierende Neutrophile als Wildtyp-Mäuse aufwiesen. Dies korreliert partiell mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, der verringerten Neutrophilen-Akkumulation in den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen während der chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 39 C**).

Neutrophile gehören zu den ersten Immunzellen, die zum Entzündungsort migrieren und dort pro-entzündliche Zytokine und Mediatoren ausschütten. Dies führt zur Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung von Gefäßen und folglich zur Ödembildung. Die verringerte Einwanderung von Neutrophilen in die entzündlichen Ohren könnte folglich die verminderte Ohrschwellungsreaktion in den NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen erklären (**Abbildung 37**).

Es ist unklar ob die stärkere chronische Entzündung in den NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen alleine aus dem nicht vorhanden sein von p50 Untereinheiten resultiert, da das Vorläuferprotein p105 ebenfalls eine regulatorische Rolle in der Signaltransduktion hat. Knockin-Mäuse bei denen ein Stopcodon in das p105 Gen eingefügt wurde, wodurch nur p50 und keine p105 Untereinheit generiert wird, entwickelten eine spontane Entzündung des Colons ähnlich der Colitis ulcerosa [350]. Für diese Mäuse charakteristisch ist eine Reduktion der Anzahl der naiven T-Zellen während die Anzahl der Effektor- und

Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht war, was zum Teil die Ergebnisse in den NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen in der hier vorgelegten Arbeit widerspiegelt. Hierbei war vor allem die Population von CD8<sup>+</sup> zentralen Memory-T-Zellen in den dLK und Milzen von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen um das Zwei- bis Dreifache höher als in den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 42**). Eine Studie von Gugasyan *et al.* zeigte ebenfalls eine erhöhte Population von CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen von NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäusen [351]. Dabei demonstrierten die Autoren, dass NF- $\kappa$ B1 eine wichtige Rolle bei der negativen Selektion von CD8<sup>+</sup> Memory-T-Zellen im Thymus spielt. Zudem zeigten die Ergebnisse in der hier vorgelegten Arbeit eine erhöhte Aktivierung (CD69 Expression) der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den dLK während der chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 43**), was ebenfalls zu der stärkeren chronischen Entzündungsreaktion passt.

Die Ergebnisse in der hier vorgelegten Promotionsarbeit demonstrieren, dass die Untereinheit p50/p105, trotz einer vermeintlich verringerten Ohrschwellung der NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> Mäuse, eine eher antiinflammatorische Rolle bei der akuten und chronischen Kontaktallergie spielt. Dabei scheint NF- $\kappa$ B1 vor allem bei der Auflösung der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle zu spielen in dem es die Signaltransduktion inhibiert. Während der initialen Entzündungsreaktion befinden sich überwiegend p50/RelA Heterodimere im Nukleus. Dagegen befindet sich während der Rückbildung der Entzündungsreaktion überwiegend p50/50 Homodimere im Nukleus [338]. Die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs induziert die Expression von zahlreichen Mediatoren, wie IL-1 $\beta$  und TNF, welche die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs vorantreiben. Zudem wird die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  und p50/p105 induziert, welche für die Inhibition der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion verantwortlich sind. Die Deletion von p50/p105 könnte somit zum Verlust der Eigenregulation (Feedbackmechanismus) führen. Dies resultiert in einer kontinuierlichen Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, was zum Teil die erhöhte Expression von RelA erklären kann [352].

### 4.2.2 Alternativer NF- $\kappa$ B-Signalweg

Im Vergleich zu dem klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg hat der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg eine spezifischere Funktion im Immunsystem. Dazu zählen primär die Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen sowie die Reifung, Differenzierung und das Überleben von B-Zellen. Eine Dysregulation des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs

wird mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Autoimmunerkrankungen und Krebs (**1.5.2**).

Das Fehlen der p52/p100 Untereinheit in den NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäusen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die akute Kontaktallergie (**Abbildung 37** und **Abbildung 39 A** und **B**). Dies zeigt vor allem, dass die Sensibilisierungsphase in den NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäusen nicht beeinträchtigt ist wodurch eine adäquate Effektorphase ausgelöst werden konnte. Jedoch waren die NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäuse nicht in der Lage eine chronische Kontaktallergie zu entwickeln. Das wiederholte Auftragen der TNCB-Challenge-Lösung führte zu einer stetigen Abnahme der Ohrschwellungsreaktion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 37**). Des Weiteren zeigten die entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäusen eine stark eingeschränkte Immunzellinfiltration, Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Chemokinen sowie eine reduzierte Expression von Blutgefäßen und Angiogenese-fördernden Faktoren, was auf eine beeinträchtigte Funktion der Endothelialen-Zellen hindeutet (**Abbildung 39 C** und **D**, **Abbildung 45 B**, **Abbildung 46**). Wie bereits unter (**1.5.2**) beschrieben, ist die primäre Funktion des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs die Entwicklung und die Organisation von sekundär lymphatischen Organen (SLOs), wie Lymphknoten, Milz und die Peyer-Plaques [141]. SLOs bilden eine dreidimensionale Matrix aus Retikulumzellen in denen Lymphozyten wie T- und B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und DCs miteinander interagieren können um eine angemessene adaptive Immunantwort auszulösen. Die Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg über den Lymphotoxinrezeptor ist essentiell für die Reifung von Mesenchym-, Stroma- und Endothelzellen und die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen die zur Bildung und Funktion der SLOs benötigt werden [137, 167]. Eine Studie von Camano *et al.* zeigte, dass die B-Zell-Population in den Milzen und drainierenden Lymphknoten von NF- $\kappa$ B-defizienten Mäuse deutlich reduziert ist [169], was die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift bestätigt (**Abbildung 41**). Es zeigte sich zudem, dass die Milzen und Lymphknoten der NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäuse eine veränderte Architektur haben [169]. Dies äußerte sich vor allem durch diffuse, unregelmäßige B-Zell-Zonen und das Fehlen von Marginal- und Mantelzonen sowie einer Beeinträchtigung der sekundären Keimzentren in den Milzen [169]. Keimzentren repräsentieren den Ort der Selektion und der klonalen Expansion von aktivierten B-Zellen [171]. Zudem reguliert der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg das Überleben von B-Zellen während der Reifung indem er sie vor Apoptose schützt [175]. Durch die reduzierte B-Zell-Population in den dLK und Milzen von NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäusen kam es im

Rahmen der FACS-Analyse zu einem relativen Anstieg der übrigen Immunzellpopulation wie z.B. T-Zellen, DCs, NK-Zellen und Neutrophilen (**Abbildung 40** und **Abbildung 41**), da alle Immunzellpopulationen in Relation zu den lebenden Zellen gesetzt wurden. Somit können im Rahmen der in dieser Promotionsarbeit präsentierten Ergebnisse keine quantitativen Angaben über die absoluten Zellzahlen gemacht werden.

Neben der Beteiligung an der Formation von SLOs spielen Endothelzellen eine wesentliche Rolle bei der Initiation und Regulation von Entzündungsreaktionen in vielen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis und der Colitis ulcerosa [353, 354]. Aktivierte Endothelzellen exprimieren zahlreiche Chemokine und endotheliale Adhäsionsmoleküle, die zur Rekrutierung unterschiedlicher Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems an den Ort der Entzündungsreaktion führen. Des Weiteren sind die Endothelzellen für die Initiierung der Angiogenese und der TLOs verantwortlich, was eine anhaltende chronische Entzündungsreaktion fördert [353, 355]. So zeigten *in vitro* und *in vivo* Versuche, dass eine Blockade des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zu einer reduzierten Angiogenese führt [356, 357], was im Einklang mit den Ergebnissen in dieser Promotionsarbeit steht (**Abbildung 39 D**).

Die Aktivierung von Endothelzellen und die daraus resultierende Expression von proinflammatorischen Mediatoren erfolgt hauptsächlich über die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Dabei scheint vor allem die Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs über LT $\beta$ R eine wesentliche Rolle zu spielen [358-360]. Lymphotoxin (LT) gehört zu der Gruppe von TNF-Rezeptoren, welche eine wichtige Rolle bei der Lymphoidorganogenese spielen [141, 142, 361]. LT hat zwei Untereinheiten (LT $\alpha$  und LT $\beta$ ) und kommt in zwei verschiedenen Formen vor: das lösliche Homotrimer von LT $\alpha$  (LT $\alpha$ 3), welches an den TNFR1 bindet und das membrangebundene Heterotrimer (LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2), welches an das LT $\beta$ R bindet. Im Gegensatz zu TNFRs, welche ausschließlich den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren, aktiviert der LT $\beta$ R auf Endothelzellen sowohl den klassischen als auch den alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg über das NIK [362, 363]. NIK ist ein zentraler Regulator der Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Stimulation von LT $\beta$ R führt zu einer Akkumulation von NIK welches die Prozessierung und die proteosomalen Degradation von p100 zu p52 initiiert, vorauf RelB:p52 Heterodimere in den Nukleus translozieren können und dort Gene des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren. Dazu zählt vor allem die homöostatische Chemokine CXCL12, CCL19 und CCL21, welche unter anderem von Endothelzellen exprimiert werden und eine essentielle Rolle bei der Organisation von SLOs und TLOs als auch bei der

Rekrutierung von Immunzellen spielen [174, 363, 364]. Auf der anderen Seite aktiviert NIK den IKK-Komplex des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Hierdurch kommt es zur Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B und Bildung von RelA:p50 Heterodimeren, welche die Gene des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, wie beispielsweise von CCL2, ICAM-1 und VCAM-1 aktivieren [137, 142, 358, 363].

T-Zell-medierte Autoimmunerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis und Colitis ulcerosa sind mit einer erhöhten Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs und der Akkumulation von NIK in Endothelzellen assoziiert [357, 365-368]. Unterschiedliche Studien haben demonstriert, dass in Endothelzellen die Aktivierung des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs über NIK eine Schlüsselrolle in der experimentellen Arthritis und Colitis spielt, indem es die Angiogenese, die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Chemokinen mediiert und dadurch die Rekrutierung von Immunzellen an den Entzündungsort reguliert [356, 358, 359, 368, 369], was die Ergebnisse in dieser Dissertation widerspiegelt (**Abbildung 39 C und D, Abbildung 45 B, Abbildung 46**). Im Rahmen der experimentellen Kontaktallergie zeigte die Studie von Piao W. *et al.*, dass die Inhibition der LT $\beta$ R-NIK-Signalachse durch ein LT $\beta$ R-abgeleitetes Decoy-Peptid (nciLT), welches nur den alternativen NF- $\kappa$ B-Signalweg (p100 zu p52 Prozessierung) inhibiert, sowohl die Sensibilisierungs- als auch die Effektorphase der akuten Kontaktallergie hemmt, indem es die Migration von T-Zellen und DCs unterdrückt. Die Therapie mit nciLT führte zu einer Hemmung in der Expression der Chemokine CCL21 und CXCL12 und zur Steigerung der Expression des vom klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg-abhängigen Adhäsionsmoleküls VCAM-1 und des Integrins  $\beta$ 4. Dies führte zu einer verstärkten Bindung der T-Zellen und DCs an das Endothel wodurch die transendotheliale Migration ins Gewebe gehindert wurde [360]. Dies könnte die erhöhte Expression von VCAM-1 in den entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäusen während der akuten und chronischen Kontaktallergie in der hier vorgelegter Arbeit erklären (**Abbildung 45 B**). Allerdings zeigten die Ergebnisse in dieser Promotionsarbeit keine Unterschiede in der Expression von CCL21 zwischen den entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen, sowohl während der akuten wie auch chronischen Kontaktallergie (**Abbildung 46**).

Des Weiteren zeigten die NF- $\kappa$ B<sup>-/-</sup> Mäuse keine Einschränkungen in der Effektorphase der akuten Kontaktallergie (**Abbildung 37** und **Abbildung 39 A und B**). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen könnte eventuell auf die unterschiedliche Manipulation des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zurückgeführt werden. In der oben

aufgeführten Studie von Piao W. *et al.*, wurden Wildtyp-Mäuse verwendet bei denen eine pharmakologische Blockade (Inhibition) des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs Upstream der LT $\beta$ R-NIK-Signalachse erfolgte [360]. Im Gegensatz hierzu besitzen NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäuse keine p100 und p52 Untereinheit, während die LT $\beta$ R-NIK-Signalachse unbeeinflusst ist. In Anbetracht dessen, dass die Untereinheit RelB hauptverantwortlich für die Transkription der Zielgene des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs ist, können in den NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen weiterhin RelB:p50 Heterodimere gebildet werden, wodurch es weiterhin zu einer Expression von Ccl21 kommt [142, 370]. Des Weiteren wirkt die Untereinheit p100 als ein Repressor indem es das RelB bindet und die Translokation in den Nukleus verhindert [370].

Durch die Inhibition der LT $\beta$ R-NIK-Signalachse mittels nciLT findet keine Prozessierung von p100 zu p52 statt [360], wodurch das RelB an das p100 im Zytoplasma gebunden bleibt und die Transkription der Zielgene des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs ausbleibt. Allerdings zeigten die entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen eine stark beeinträchtigte Expression von durch den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg regulierten proinflammatorischen Genen und Proteinen wie *Il-6*, *Tnf*, *Il-1 $\beta$* , *Ccl2* (**Abbildung 44**), E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 (**Abbildung 45**), CXCL2, CXCL5, CXCL9 und CXCL10 (**Abbildung 46**) was auf eine Inhibition des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs hindeutet. Der klassische NF- $\kappa$ B-Signalweg wird hauptsächlich durch die Untereinheit RelA reguliert [358, 359, 371, 372]. Unter normalen physiologischen Bedingungen sorgen I $\kappa$ B $\alpha$  und A20, als negative Regulatoren des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, für eine kontrollierte RelA-Aktivität in den Zellen. Dagegen zeigt sich im Rahmen von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der Colitis ulcerosa eine übermäßige RelA-Aktivität [354, 373-376]. So korreliert der Schweregrad einer chronischen Darmentzündung „*inflammatory bowel disease* (IBD)“ bei Patienten mit dem Ausmaß der RelA-Aktivierung [377].

Wie bereits beschrieben, sind die beiden NF- $\kappa$ B-Signalwege stark miteinander verflochten. So hat die Manipulationen des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs direkte Auswirkungen auf den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg und vice versa [137, 354, 359, 360, 363, 364, 378, 379]. Die Interaktion der beiden Schenkel des NF- $\kappa$ B-Signalwegs erfolgt sowohl auf der Aktivierungsebene durch die Rezeptoren sowie auf der Transkriptionsebene. So erfolgt die Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs selektiv durch eine bestimmte Gruppe von TNF-Rezeptorsuperfamilie wie LT $\beta$ R, BAFFR, CD40 und RANK, welche jedoch alle in der Lage sind den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg zu

aktivieren, wenn auch im unterschiedlichen Ausmaß [142, 380], wie zuvor am Beispiel von  $LT\beta R$  aufgeführt.

Das Zusammenspiel der beiden NF- $\kappa$ B-Signalwege auf der Transkriptionsebene findet vor allem durch die Interaktion der einzelnen Homodimere miteinander statt. So regulieren diese die gegenseitige Expression und die Neusynthese der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten. So zeigte eine Studie von Yilmaz *et al.*, dass für die  $LT\beta R$ -induzierte Prozessierung von p50 aus dem neu-synthetisierten Vorläuferprotein p105 die Prozessierung von p100 zu p52 erforderlich ist [381]. Des Weiteren ist die Transkription des *Nfkb2*-Gens, welches für das Protein p100 codiert, RelA abhängig [363, 364, 382]. Zudem bildet p100 in Verbindung mit p105 hochmolekulare Komplexe, sogenannte „*kappaB-some's*“, die RelA im Zytoplasma sequestrieren. Im Gegensatz zu den klassischen NF- $\kappa$ B-Komplexen, wo RelA als Homodimer von I $\kappa$ Bs sequestriert wird, bildend die *kappaB-some* hochmolekulare Komplexe aus RelA-Monomeren zusammen mit den einzelnen NF- $\kappa$ B-Vorläuferproteinen p105 und p100 [370, 383, 384]. Schließlich kann p52 mit RelA interagieren und das RelA:p52-Heterodimer bilden. Ähnlich wie RelA:p50 wird RelA:p52 von I $\kappa$ Bs sequestriert. Die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt zur Translokation von RelA:p52 in den Nukleus und zur Transkription von proinflammatorischen Genen des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs [378, 385]. Diese komplexen Querverbindungen ermöglichen die Interaktion zwischen dem klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegen.

Im Rahmen einer experimentellen Colitis zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie von Chawla *et al.*, dass eine anhaltende Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs die RelA-Aktivität und somit die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs in Epithelzellen verstärkt. So zeigten die im Rahmen der Studie verwendeten NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen eine geringere RelA-Aktivität und verringerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie *Tnf*, *Il1 $\beta$* , *Ccl2*, *Ccl5*, *Ccl20* und *Cxcl2* in den Endothelzellen. Dies führte zu einer reduzierten Infiltration von Immunzellen im entzündlichen Colon und einer mildereren Colitis als in Wildtyp-Mäusen [354]. Die Ergebnisse der Studie von Chawla *et al.* [354] spiegeln exakt die Ergebnisse in der hier vorgelegten Dissertation wieder. Somit könnte der fehlende synergistische Wirkung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg in den Endothelzellen von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen zur kontinuierlichen Abnahme der Ohrschwellungsreaktion, zur stark reduzierten Immunzellinfiltration und zur fehlenden Ausprägung eine chronische Entzündungsreaktion in den Ohren führen. Die Blockade des

alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Effektorphase der akuten Kontaktallergie (**Abbildung 37** und **Abbildung 39 A** und **B**). Dies könnte an der unterschiedlichen zeitlichen Dynamik der Aktivierung der beiden NF- $\kappa$ B-Signalwege liegen. So erfolgt die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs sehr schnell innerhalb von wenigen Minuten, während die Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs erst nach mehreren Stunden stattfindet [354]. Die Proteomanalysen von den entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sogar eine etwas stärkere Expression von entzündungsfördernden Mediatoren des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs (**Abbildung 46**).

Da wie bereits erläutert die p100 Untereinheit als Repressor wirkt, welche RelA, RelB und p105 Untereinheiten sequestrieren kann [370], könnte das Fehlen von p100 zu einer erhöhten initialen Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs führen. Somit scheint der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg vor allem in der chronischen Phase der Kontaktallergie eine entscheidende Rolle zu spielen indem er die Aktivität des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs verstärkt und aufrechterhält. Des Weiteren Piao W. *et al.* zeigen, dass eine verringerte Aktivität des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zu einer schnelleren Auflösung der Entzündungsreaktion durch die verstärkte Auswanderung von Immunzellen aus dem entzündeten Gewebe führt [360]. Dies ist ein weiterer Faktor, der die verringerte Immunzellinfiltration in den entzündeten Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie erklären könnte (**Abbildung 39 C**).

Passend zu der reduzierten chronischen Entzündung, zeigten die dLK von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant erhöhte Treg-Population (**Abbildung 42**). Tregs spielen eine essenzielle Rolle bei der Regulation des Immunsystems, indem sie die übermäßig aktivierte Immunzellen supprimieren und so die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen verhindern [14, 386]. Tregs weisen eine Heterogenität auf und können wie konventionelle T-Zellen in "naive" und "Effektor-Tregs" unterteilt werden. Die meisten Tregs in sekundären lymphatischen Organen exprimieren wie naive konventionelle T-Zellen vermehrt CD62L12 und CCR713 und werden als zentrale Tregs (cTregs) klassifiziert. Die cTregs werden in der Peripherie aktiviert und differenzieren zu Effektor-Tregs (eTregs) [387]. So zeigte eine Studie von Dhar *et al.*, dass die NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Anzahl von peripheren eTregs aufweisen [388]. Die NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Tregs hatten eine normale suppressive Funktion, überlebten länger, zeigten eine verstärkte Aktivierung und Proliferation und wanderten verstärkt in nicht-lymphatisches Gewebe ein. Zudem wurde im

Rahmen der Publikation von Dhar *et al.* gezeigt, dass in Tregs ein Knockout von NF- $\kappa$ B2 die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs verstärkt, indem zusätzlich zu RelA:p50 und cRel:p50 die Heterodimere RelB:p50 gebildet werden und dieser Effekt Treg-intrinsisch ist [388]. In einer früheren Studie zeigte die selbe Arbeitsgruppe, dass das Fehlen von p100 zu Akkumulation von RelB:p50 Heterodimeren im Nukleus führt und hierdurch die Transkription von klassischen NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen reguliert wird [389]. Die Autoren kamen zur Schlussfolgerung, dass die Funktionen von NF- $\kappa$ B2 in Tregs primär durch die inhibierende Untereinheit p100 bestimmt werden, indem die RelB:p50- und nicht RelB:52-vermittelte Treg-Aktivierung unterdrückt wird. Somit führt die Defizienz von p100 zur Bildung von RelB:p50 Heterodimeren was zu einer verstärkten Ausprägung von aktivierten Tregs führt [388].

Zusammenfassend führt eine Blockade im alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch die Beeinträchtigung der Chemotaxis, die verringerte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und die unterdrückte Angiogenese zur verringerten Rekrutierung von Immunzellen und folglich zur eindrucksvoll verringerten chronischen Kontaktallergie.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Promotionsarbeit zusammen mit den oben aufgeführten Studien anderer Arbeitsgruppen belegen die wichtige Rolle des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs im Rahmen von T-Zell-medierten DTHRs. Demzufolge stellt eine pharmakologische Inhibition des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Behandlung von T-Zell-medierten Autoimmunerkrankungen dar.

## 5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurde der Einfluss von verschiedenen ROS/RNS-Quellen sowie die Rolle des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die akute und chronische Hapten-induzierte Kontaktallergie untersucht.

Die Optical Imaging und DHR-FACS Analysen zeigten, dass NOX2 und MPO die dominierenden ROS-Quellen während der akuten und chronischen Kontaktallergie sind, während die iNOS- und NOX4-abhängige ROS/RNS-Produktion eine eher vernachlässigbare Rolle spielen. Die Defizienz der einzelnen ROS/RNS Quellen hatte jedoch keine richtungsweisende klinische Relevanz auf den Verlauf der akuten und chronischen Kontaktallergie. Sowohl die Ohrschwellungsreaktion, die histopathologischen und immunhistochemischen Analysen des Immunzellinfiltrats als auch die genomische Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren zeigten nur sehr diskrete Unterschiede zwischen den gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen auf. *Ex-vivo* Analysen der entzündlichen Ohren von gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>, MPO<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> Wildtyp-Mäusen zeigten während der chronischen Kontaktallergie einen ähnlichen oxidativen Stress (Lipidperoxidation und DNA-Oxidation) sowie ein annähernd identisches Metaboliten-Profil was auf Kompensationsmechanismen schließen lässt. Weitere Untersuchungen der NOX4<sup>-/-</sup> und NRF2<sup>-/-</sup> Mäuse sowie antioxidative Therapieansätze mit Vitamin E und mitoTEMPO hatten ebenfalls kaum Einfluss auf die akute und chronische Kontaktallergie. Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse in der hier vorliegenden Dissertation, dass ROS/RNS eine eher untergeordnete Rolle im Verlauf der akuten und chronischen Kontaktallergie spielen und die Depletion einer ROS/RNS-Quelle vermutlich durch die verstärkte Expression oder Aktivität anderer ROS/RNS-Quellen kompensiert werden könnte. Dies würde auch das Scheitern von Therapien mit Antioxidantien in klinischen Studien erklären. Demzufolge scheint für effiziente ROS/RNS-basierte Therapieansätze die simultane kombinierte Blockade mehrerer ROS/RNS-Quellen ein vielversprechender innovativer therapeutischer Ansatz zu sein.

Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift eine ausgeprägte NET-Bildung in den entzündlichen kontaktallergischen Ohren unabhängig von der Anwesenheit von ROS/RNS. Weiterführende Untersuchungen von PAD4<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten eine reduzierte NET-Bildung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, dies hatte jedoch kaum Einfluss auf den Verlauf der akuten und chronischen Kontaktallergie.

Zudem wurde in der hier vorliegenden Promotionsarbeit der Einfluss des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf den Verlauf der akuten und chronischen

TNCB-induzierten Kontaktallergie untersucht. *In vivo* und *ex-vivo* Untersuchungen der NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup> und NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten, dass die Blockade des klassischen oder alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs nur einen geringen Einfluss auf den Verlauf der akuten Kontaktallergie hat. Dagegen konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg essentiell für die Entwicklung einer chronischen Kontaktallergie ist. Denn die entzündlichen Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie zeigten im Vergleich zu den Ohren von Wildtyp-Mäusen eine signifikant reduzierte Ohrschwellungsreaktion einhergehend mit einer verringerten Hyperkeratose und Akanthose, einem reduzierten Immunzellinfiltrat und einer verringerten Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren. Zudem zeigten die Ohren von NF- $\kappa$ B2<sup>-/-</sup> Mäusen mit chronischer Kontaktallergie eine signifikant verringerte Expression von Chemokinen, endothelialen Adhäsionsmolekülen, pro-angiogenen Mediatoren und eine deutlich verringerte Anzahl an Blutgefäßen. Zusammenfassend führt eine Inhibition des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs zu einer signifikant reduzierten Entzündungsreaktion, Chemotaxis Expression von endothelialer Adhäsionsmoleküle, Angiogenese und hieraus resultierend zu einer signifikant verringerten Einwanderung von Leukozyten wie T Zellen, Neutrophilen und Makrophagen in die entzündlichen Ohren mit chronischer Kontaktallergiereaktion. Folglich könnte die pharmakologische Inhibition des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs einen vielversprechenden neuen Therapieansatz zur lokalen als auch systemischen Therapie von T-Zell-medierte Autoimmunerkrankungen, wie der Psoriasis vulgaris, der Colitis ulcerosa oder der rheumatoiden Arthritis darstellen.

## 6 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies und NF- $\kappa$ B-abhängiger Signalwege auf die kontaktallergische Reaktion der Haut“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, 2023

### 6.1 Erklärung zum Eigenanteil

Alle *in vivo* Experimente (Induktion der TNCB- und Oxazolon-spezifischen Kontaktallergie, Messung der Ohrschwellungsreaktion, Optical Imaging, Therapie mit Mito-TEMPO und Vitamin E) sowie molekularbiologische Analysen (RNA Isolation, cDNA Synthese, qRT-PCR Analyse, FACS-Analyse, Lipidperoxidation und DNA-Oxidation Assays) wurden von mir durchgeführt. Des Weiteren wurde die Planung, die Analyse und die Aufarbeitung der Daten von mir durchgeführt.

Folgende Arbeiten wurden mit freundlicher Unterstützung durch Dritte durchgeführt:

Das Design der *in vivo* und *ex vivo* Studien als auch deren Interpretation wurde in enger Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Manfred Kneilling durchgeführt.

Alle Paraffinschnitte, H&E-Färbungen und immunhistochemischen Färbungen, die Analysen am Mikroskop wurden von Dr. Irene Gonzalez Menendez unter Leitung von Prof. Dr. Leticia Quintanilla de Fend am Institut für Allgemeine Molekulare Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen drüberführt.

Die Matablomanalysen wurden von Laimdota Zizmare und Dr. Christoph Trautwein unter der Leitung von Prof. Bernd Pichler am Werner Siemens Imaging Center Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgten in der Zusammenarbeit mit der AG Trautwein.

Alle Kryoschnitte und Immunfluoreszenzfärbungen (NETs und endotheliale Adhäsionsmoleküle) sowie die Aufnahmen und Analysen am Mikroskop wurden von Birgit

Fehrenbacher und Renate Nordin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Martin Röcken an der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt.

Ein Teil der qRT-PCR Analysen sowie die Proteom Analysen (Cytokine Array) wurden von Berenice Fischer, Antonia Kolb und Dr. Daniela Kramer an der Universitäts-Hautklinik Mainz durchgeführt. Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgten in Zusammenarbeit mit der AG Kramer.

## 7 Publikation

1. Zizmare L, **R. Mehling**, I. Gonzalez-Menendez, Lonati C, L. Quintanilla-Martinez, B.J. Pichler, M. Kneilling, C. Trautwein. Acute and chronic inflammation alter immunometabolism in a cutaneous delayed-type hypersensitivity reaction (DTHR) mouse model. *Commun Biol.* 2022 Nov 15;5(1):1250.
2. **Mehling, R.**, J. Schwenck, C. Lemberg, C. Trautwein, L. Zizmare, D. Kramer, A. Muller, B. Fehrenbacher, I. Gonzalez-Menendez, L. Quintanilla-Martinez, K. Schroder, R. P. Brandes, M. Schaller, W. Ruf, M. Eichner, K. Ghoreschi, M. Rocken, B. J. Pichler and M. Kneilling (2021). "Immunomodulatory role of reactive oxygen species and nitrogen species during T cell-driven neutrophil-enriched acute and chronic cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions." *Theranostics* 11(2): 470-490.
3. Schwenck, J., **R. Mehling**, W. M. Thaiss, D. Kramer, I. G. Menendez, H. H. Oz, D. Hartl, K. Schulze-Osthoff, S. Hailfinger, K. Ghoreschi, L. Quintanilla-Martinez, H. Carlsen, M. Rocken, B. J. Pichler and M. Kneilling (2020). "Temporal Dynamics of Reactive Oxygen and Nitrogen Species and NF-kappaB Activation During Acute and Chronic T Cell-Driven Inflammation." *Mol Imaging Biol* 22(3): 504-514.
4. Weber, M., A. Fech, L. Jager, H. Steinle, L. Buhler, R. M. Perl, P. Martirosian, **R. Mehling**, D. Sonanini, W. K. Aicher, K. Nikolaou, C. Schlensak, M. D. Enderle, H. P. Wendel, W. Linzenbold and M. Avci-Adali (2020). "Hydrojet-based delivery of footprint-free iPSC-derived cardiomyocytes into porcine myocardium." *Sci Rep* 10(1): 16787.
5. Schwenck, J., A. Maurer, B. Fehrenbacher, **R. Mehling**, P. Knopf, N. Mucha, D. Haupt, K. Fuchs, C. M. Griessinger, D. Bukala, J. Holstein, M. Schaller, I. G. Menendez, K. Ghoreschi, L. Quintanilla-Martinez, M. Gutschow, S. Laufer, T. Reinheckel, M. Rocken, H. Kalbacher, B. J. Pichler and M. Kneilling (2019). "Cysteine-type cathepsins promote the effector phase of acute cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions." *Theranostics* 9(13): 3903-3917.
6. Stoll, H., M. Ost, A. Singh, **R. Mehling**, D. Neri, I. Schafer, A. Velic, B. Macek, D. Kretschmer, C. Weidenmaier, A. Hector, R. Handgretinger, F. Gotz, A. Peschel, D. Hartl and N. Rieber (2018). "Staphylococcal Enterotoxins Dose-Dependently Modulate the Generation of Myeloid-Derived Suppressor Cells." *Front Cell Infect Microbiol* 8: 321.
7. Ost, M., A. Singh, A. Peschel, **R. Mehling**, N. Rieber and D. Hartl (2016). "Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections." *Front Cell Infect Microbiol* 6: 37.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Siegenthaler, W. and H.E. Blum, *Klinische Pathophysiologie*. Vol. 9. 2006, Stuttgart, Deutschland: Thieme.
2. Murphy, K.W.C., *Janeway's immunobiology*. Vol. 9th edition. 2017, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
3. Papayannopoulos, V., *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 134-147.
4. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
5. Doebel, T., B. Voisin, and K. Nagao, *Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing*. Trends Immunol, 2017. **38**(11): p. 817-828.
6. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
7. McComb, S., et al., *Introduction to the Immune System*. Methods Mol Biol, 2019. **2024**: p. 1-24.
8. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 5-17.
9. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *The basic immunology of asthma*. Cell, 2021. **184**(6): p. 1469-1485.
10. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
11. Quaglino, P., et al., *Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response*. Dermatology, 2011. **223**(1): p. 57-67.
12. Zhong, L., et al., *The immunoregulatory effects of natural products on psoriasis via its action on Th17 cells versus regulatory T cells balance*. Int Immunopharmacol, 2022. **110**: p. 109032.
13. Dominguez-Villar, M. and D.A. Hafler, *Regulatory T cells in autoimmune disease*. Nat Immunol, 2018. **19**(7): p. 665-673.
14. Hatzioannou, A., et al., *Regulatory T Cells in Autoimmunity and Cancer: A Duplicious Lifestyle*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 731947.
15. Gell, P.G.H. and R.R.A.J.C.A.o.I. Coombs, *Clinical aspects of immunology*. 1963.
16. Bajwa SF, M.R., *Type II Hypersensitivity Reaction*, StatPearls, Editor. 2022, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL).
17. Abul K. Abbas, A.H.L., Shiv Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 9th ed. 2017, Philadelphia, PA United States: Saunders/Elsevier.
18. Rajan, T.V., *The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation*. Trends Immunol, 2003. **24**(7): p. 376-9.
19. T. Biedermann, W.H., H. Renz, M. Röcken *Allergologie*. Vol. 2. Auflage. 2016, Berlin DE: Springer. 702.
20. Thyssen, J.P., et al., *The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings*. Contact Dermatitis, 2007. **57**(5): p. 287-99.
21. Erkes, D.A. and S.R. Selvan, *Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: plausibility of mediating antitumor immunity*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 175265.
22. Veale, D.J., C. Ritchlin, and O. FitzGerald, *Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64 Suppl 2**: p. ii26-9.
23. Boismenu, R. and Y. Chen, *Insights from mouse models of colitis*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 267-78.
24. Smolen, J.S., D. Aletaha, and K. Redlich, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?* Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(4): p. 235-43.
25. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of Multiple Sclerosis*. Semin Neurol, 2016. **36**(2): p. 115-27.

26. Zhao, Y., et al., *Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis*. Br J Dermatol, 2009. **161**(6): p. 1301-6.
27. Chipinda, I., J.M. Hettick, and P.D. Siegel, *Haptenation: chemical reactivity and protein binding*. J Allergy (Cairo), 2011. **2011**: p. 839682.
28. Martin, S.F., et al., *Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis*. Allergy, 2011. **66**(9): p. 1152-63.
29. Lambert, J., *Itch in Allergic Contact Dermatitis*. Front Allergy, 2021. **2**: p. 702488.
30. Hayashi, M., et al., *Assessment of preferential Th1 or Th2 induction by low-molecular-weight compounds using a reverse transcription-polymerase chain reaction method: comparison of two mouse strains, C57BL/6 and BALB/c*. Toxicol Appl Pharmacol, 2001. **177**(1): p. 38-45.
31. Honda, T., et al., *Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(2): p. 303-15.
32. Griffin, G.K., et al., *IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation*. J Immunol, 2012. **188**(12): p. 6287-99.
33. Nakae, S., et al., *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 375-87.
34. Engeman, T., et al., *The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(5): p. 941-9.
35. Weber, F.C., et al., *Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity*. J Exp Med, 2015. **212**(1): p. 15-22.
36. Kitagaki, H., et al., *Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(6): p. 749-55.
37. Kitagaki, H., et al., *Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2484-91.
38. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free Radical in Biology & Medicine*. Vol. 5th Edition. 2015, Oxford: Oxford University Press.
39. Sies, H., C. Berndt, and D.P. Jones, *Oxidative Stress*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 715-748.
40. Davies, M.J., *Protein oxidation and peroxidation*. Biochem J, 2016. **473**(7): p. 805-25.
41. Winterbourn, C.C., *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 278-86.
42. Dikalov, S., *Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases*. Free radical biology & medicine, 2011. **51**(7): p. 1289-1301.
43. Kuppusamy, P. and J.L. Zweier, *Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation*. J Biol Chem, 1989. **264**(17): p. 9880-4.
44. Kontos, H.A., et al., *Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats*. Circ Res, 1985. **57**(1): p. 142-51.
45. McIntyre, M., D.F. Bohr, and A.F. Dominiczak, *Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 1): p. 539-45.
46. Winterbourn, C.C., *The biological chemistry of hydrogen peroxide*. Methods Enzymol, 2013. **528**: p. 3-25.
47. Egea, J., et al., *European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS)*. Redox Biol, 2017. **13**: p. 94-162.
48. Reczek, C.R. and N.S. Chandel, *ROS-dependent signal transduction*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **33**: p. 8-13.

49. Hanschmann, E.M., et al., *Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(13): p. 1539-605.
50. Spencer, J.P., et al., *Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(7): p. 1039-50.
51. Fliss, H., M. Menard, and M. Desai, *Hypochlorous acid mobilizes cellular zinc*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1991. **69**(11): p. 1686-91.
52. Maitra, D., et al., *Mechanism of hypochlorous acid-mediated heme destruction and free iron release*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(2): p. 364-73.
53. Rees, M.D., et al., *Myeloperoxidase-derived oxidants selectively disrupt the protein core of the heparan sulfate proteoglycan perlecan*. *Matrix Biol*, 2010. **29**(1): p. 63-73.
54. Ulfing, A. and L.I. Leichert, *The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020.
55. Klebanoff, S.J., et al., *Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms*. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(2): p. 185-98.
56. Odobasic, D., A.R. Kitching, and S.R. Holdsworth, *Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase*. *J Immunol Res*, 2016. **2016**: p. 2349817.
57. Salvemini, D., et al., *Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(16): p. 6328-32.
58. Radi, R., *Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects*. *Acc Chem Res*, 2013. **46**(2): p. 550-9.
59. Ferrer-Sueta, G. and R. Radi, *Chemical biology of peroxyxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals*. *ACS Chem Biol*, 2009. **4**(3): p. 161-77.
60. Mittal, M., et al., *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(7): p. 1126-67.
61. Handy, D.E. and J. Loscalzo, *Redox regulation of mitochondrial function*. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **16**(11): p. 1323-67.
62. Dan Dunn, J., et al., *Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis*. *Redox Biol*, 2015. **6**: p. 472-485.
63. Altenhofer, S., et al., *The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(14): p. 2327-43.
64. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 181-9.
65. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
66. Heyworth, P.G., A.R. Cross, and J.T. Curnutte, *Chronic granulomatous disease*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(5): p. 578-84.
67. Brandes, R.P., N. Weissmann, and K. Schroder, *Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **76**: p. 208-26.
68. Panday, A., et al., *NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies*. *Cell Mol Immunol*, 2015. **12**(1): p. 5-23.
69. Kawahara, T. and J.D. Lambeth, *Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes*. *BMC Evol Biol*, 2007. **7**: p. 178.
70. Kayama, Y., et al., *Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(10): p. 25234-63.
71. Chamulitrat, W., et al., *A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes*. *J Invest Dermatol*, 2004. **122**(4): p. 1000-9.
72. Chen, F., et al., *From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 412.
73. Yang, Q., et al., *Nox4 in renal diseases: An update*. *Free Radic Biol Med*, 2018. **124**: p. 466-472.
74. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. *Circulation*, 2006. **113**(13): p. 1708-14.

75. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
76. Saini, R. and S. Singh, *Inducible nitric oxide synthase: An asset to neutrophils*. J Leukoc Biol, 2019. **105**(1): p. 49-61.
77. Ono, T., et al., *Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion*. Brain Res, 2009. **1305**: p. 158-67.
78. Pacher, P., A. Nivorozhkin, and C. Szabo, *Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(1): p. 87-114.
79. Kinuta, Y., et al., *Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain*. J Neurosurg, 1989. **71**(3): p. 417-20.
80. Mesa-Garcia, M.D., J. Plaza-Diaz, and C. Gomez-Llorente, *Chapter 3 - Molecular Basis of Oxidative Stress and Inflammation*, in *Obesity*, A.M. del Moral and C.M. Aguilera García, Editors. 2018, Academic Press. p. 41-62.
81. Birben, E., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense*. World Allergy Organ J, 2012. **5**(1): p. 9-19.
82. He, L., et al., *Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species*. Cell Physiol Biochem, 2017. **44**(2): p. 532-553.
83. Berndt, C., C.H. Lillig, and L. Flohe, *Redox regulation by glutathione needs enzymes*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 168.
84. Waring, W.S., D.J. Webb, and S.R. Maxwell, *Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(3): p. 365-71.
85. Martin, M., et al., *Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo*. J Pineal Res, 2000. **28**(4): p. 242-8.
86. Sies, H. and E. Cadenas, *Oxidative stress: damage to intact cells and organs*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1985. **311**(1152): p. 617-31.
87. Poetsch, A.R., *The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis*. Comput Struct Biotechnol J, 2020. **18**: p. 207-219.
88. Valavanidis, A., et al., *Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(9): p. 3886-907.
89. Marnett, L.J., *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. Mutat Res, 1999. **424**(1-2): p. 83-95.
90. Jiang, X., B.R. Stockwell, and M. Conrad, *Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(4): p. 266-282.
91. Davies, M.J., *The oxidative environment and protein damage*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1703**(2): p. 93-109.
92. Tonelli, C., I.I.C. Chio, and D.A. Tuveson, *Transcriptional Regulation by Nrf2*. Antioxid Redox Signal, 2018. **29**(17): p. 1727-1745.
93. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 401-26.
94. Lugin, J., et al., *The role of oxidative stress during inflammatory processes*. Biol Chem, 2014. **395**(2): p. 203-30.
95. Chan, J.K., et al., *Alarmins: awaiting a clinical response*. J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2711-9.
96. Powers, K.A., et al., *Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages*. J Exp Med, 2006. **203**(8): p. 1951-61.
97. Wong, S.W., et al., *Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner*. J Biol Chem, 2009. **284**(40): p. 27384-92.

98. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 229-65.
99. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. *Nature*, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
100. Nakahira, K., et al., *Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 222-30.
101. Dal Secco, D., et al., *Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase*. *Nitric Oxide*, 2006. **15**(1): p. 77-86.
102. Lo, S.K., et al., *Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(4 Pt 1): p. L406-12.
103. Patel, K.D., et al., *Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils*. *J Cell Biol*, 1991. **112**(4): p. 749-59.
104. Metzler, K.D., et al., *A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis*. *Cell Rep*, 2014. **8**(3): p. 883-96.
105. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. *J Cell Biol*, 2007. **176**(2): p. 231-41.
106. Pilsczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
107. Lood, C., et al., *Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease*. *Nat Med*, 2016. **22**(2): p. 146-53.
108. Ravindran, M., M.A. Khan, and N. Palaniyar, *Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology*. *Biomolecules*, 2019. **9**(8).
109. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. *J Immunol*, 2012. **189**(6): p. 2689-95.
110. Hakkim, A., et al., *Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation*. *Nat Chem Biol*, 2011. **7**(2): p. 75-7.
111. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(3): p. 677-91.
112. Kenny, E.F., et al., *Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways*. *Elife*, 2017. **6**.
113. Warnatsch, A., et al., *Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis*. *Science*, 2015. **349**(6245): p. 316-20.
114. Schauer, C., et al., *Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines*. *Nat Med*, 2014. **20**(5): p. 511-7.
115. Saffarzadeh, M., et al., *Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e32366.
116. Poon, I., et al., *Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis*. *Elife*, 2014. **3**: p. e01808.
117. Kawabata, K., T. Hagio, and S. Matsuoka, *The role of neutrophil elastase in acute lung injury*. *Eur J Pharmacol*, 2002. **451**(1): p. 1-10.
118. Garcia-Romo, G.S., et al., *Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(73): p. 73ra20.
119. Khandpur, R., et al., *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(178): p. 178ra40.
120. Hu, S.C., et al., *Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human beta-defensin-2 production in epidermal keratinocytes*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 31119.
121. Herster, F., et al., *Neutrophil extracellular trap-associated RNA and LL37 enable self-amplifying inflammation in psoriasis*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 105.

122. Kessenbrock, K., et al., *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 623-5.
123. Sur Chowdhury, C., et al., *Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility*. Arthritis Res Ther, 2014. **16**(3): p. R122.
124. Seri, Y., et al., *Peptidylarginine deiminase type 4 deficiency reduced arthritis severity in a glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis model*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13041.
125. Papadaki, G., et al., *Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation*. Eur J Immunol, 2016. **46**(11): p. 2542-2554.
126. Lande, R., et al., *Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus*. Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra19.
127. Guiducci, C., et al., *Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9*. J Exp Med, 2010. **207**(13): p. 2931-42.
128. Gehrke, N., et al., *Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 482-95.
129. Oeckinghaus, A. and S. Ghosh, *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000034.
130. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 695-708.
131. Sun, S.C., *Non-canonical NF-kappaB signaling pathway*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 71-85.
132. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB in immunobiology*. Cell Res, 2011. **21**(2): p. 223-44.
133. Ruland, J., *Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 709-14.
134. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001651.
135. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
136. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 392-401.
137. Yu, H., et al., *Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 209.
138. Sun, S.C., *The noncanonical NF-kappaB pathway*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 125-40.
139. Akiyama, T., et al., *The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 423-37.
140. Burkly, L., et al., *Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells*. Nature, 1995. **373**(6514): p. 531-6.
141. Weih, F. and J. Caamano, *Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 91-105.
142. Sun, S.C., *The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(9): p. 545-558.
143. Senftleben, U., et al., *IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis*. Immunity, 2001. **14**(3): p. 217-30.
144. Alcamo, E., et al., *Targeted mutation of TNF receptor 1 rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1592-600.

145. Li, Q., et al., *Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene*. Science, 1999. **284**(5412): p. 321-5.
146. Schindler, U. and V.R. Baichwal, *Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5820-31.
147. Bunting, K., et al., *Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-kappa B transcription factor c-Rel*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7097-109.
148. Eck, S.L., et al., *Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF-kappa B in vivo*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6530-6.
149. Ward, C., et al., *NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 4309-18.
150. Manea, S.A., et al., *Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms*. Redox Biol, 2015. **5**: p. 358-366.
151. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 103-15.
152. Dennis, E.A. and P.C. Norris, *Eicosanoid storm in infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(8): p. 511-23.
153. Lai, W.C., et al., *Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6244-9.
154. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, *Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors*. Arthritis Res, 2002. **4**(3): p. 157-64.
155. Tato, C.M., et al., *Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma*. Int Immunol, 2006. **18**(4): p. 505-13.
156. Sacconi, A., et al., *p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11432-40.
157. Ghosh, P., et al., *The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NF kappa B family: c-Rel, p50, and p65*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1696-700.
158. Banerjee, D., H.C. Liou, and R. Sen, *c-Rel-dependent priming of naive T cells by inflammatory cytokines*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 445-58.
159. Jeremias, I., et al., *Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4624-31.
160. Kontgen, F., et al., *Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression*. Genes Dev, 1995. **9**(16): p. 1965-77.
161. Aronica, M.A., et al., *Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 5116-24.
162. Hilliard, B.A., et al., *Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 843-50.
163. Ruan, Q., et al., *The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORgamma-RORgamma T transcriptional axis*. J Exp Med, 2011. **208**(11): p. 2321-33.
164. Das, J., et al., *A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation*. Nat Immunol, 2001. **2**(1): p. 45-50.
165. Long, M., et al., *Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 921-31.
166. Ronin, E., et al., *The NF-kappaB RelA Transcription Factor Is Critical for Regulatory T Cell Activation and Stability*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2487.

167. Banks, T.A., et al., *Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness.* J Immunol, 1995. **155**(4): p. 1685-93.
168. Karrer, U., et al., *Immunodeficiency of alymphoplasia mice (aly/aly) in vivo: structural defect of secondary lymphoid organs and functional B cell defect.* Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2799-807.
169. Caamano, J.H., et al., *Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses.* J Exp Med, 1998. **187**(2): p. 185-96.
170. Weih, D.S., Z.B. Yilmaz, and F. Weih, *Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines.* J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1909-19.
171. Stebegg, M., et al., *Regulation of the Germinal Center Response.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 2469.
172. Mebius, R.E. and G. Kraal, *Structure and function of the spleen.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 606-16.
173. Droebner, K., et al., *The alternative NF-kappaB signalling pathway is a prerequisite for an appropriate immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection.* Viral Immunol, 2010. **23**(3): p. 295-308.
174. Luther, S.A., et al., *Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis.* J Immunol, 2002. **169**(1): p. 424-33.
175. Xie, P., et al., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs.* Immunity, 2007. **27**(2): p. 253-67.
176. Hahn, M., et al., *NF-kappaB-inducing kinase is essential for B-cell maintenance in mice.* Eur J Immunol, 2016. **46**(3): p. 732-41.
177. Brightbill, H.D., et al., *Conditional Deletion of NF-kappaB-Inducing Kinase (NIK) in Adult Mice Disrupts Mature B Cell Survival and Activation.* J Immunol, 2015. **195**(3): p. 953-64.
178. Katakam, A.K., et al., *Dendritic cells require NIK for CD40-dependent cross-priming of CD8+ T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(47): p. 14664-9.
179. Tas, S.W., et al., *Noncanonical NF-kappaB signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation.* Blood, 2007. **110**(5): p. 1540-9.
180. Abramson, J. and G. Anderson, *Thymic Epithelial Cells.* Annu Rev Immunol, 2017. **35**: p. 85-118.
181. Baik, S., et al., *Relb acts downstream of medullary thymic epithelial stem cells and is essential for the emergence of RANK(+) medullary epithelial progenitors.* Eur J Immunol, 2016. **46**(4): p. 857-62.
182. Boehm, T., et al., *Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR.* J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 757-69.
183. Lkhagvasuren, E., et al., *Lymphotoxin beta receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells.* J Immunol, 2013. **190**(10): p. 5110-7.
184. Jin, W., et al., *Regulation of Th17 cell differentiation and EAE induction by MAP3K NIK.* Blood, 2009. **113**(26): p. 6603-10.
185. Li, Y., et al., *Cell intrinsic role of NF-kappaB-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 22115.
186. Rowe, A.M., et al., *A cell-intrinsic requirement for NF-kappaB-inducing kinase in CD4 and CD8 T cell memory.* J Immunol, 2013. **191**(7): p. 3663-72.
187. Zhang, B., et al., *An oncogenic role for alternative NF-kappaB signaling in DLBCL revealed upon deregulated BCL6 expression.* Cell Rep, 2015. **11**(5): p. 715-26.
188. Liu, Y., et al., *Novel NFKB2 mutation in early-onset CVID.* J Clin Immunol, 2014. **34**(6): p. 686-90.

189. Wang, Z., et al., *Constitutive production of NF-kappaB2 p52 is not tumorigenic but predisposes mice to inflammatory autoimmune disease by repressing Bim expression.* J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 10698-706.
190. Yang, L., et al., *Loss of negative feedback control of nuclear factor-kappaB2 activity in lymphocytes leads to fatal lung inflammation.* Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2646-57.
191. Zhang, H., et al., *NOTCH inhibits osteoblast formation in inflammatory arthritis via noncanonical NF-kappaB.* J Clin Invest, 2014. **124**(7): p. 3200-14.
192. Ntziachristos, V., et al., *Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging.* Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 313-20.
193. Remington, S.J., *Green fluorescent protein: a perspective.* Protein Sci, 2011. **20**(9): p. 1509-19.
194. Licha, K. and U. Resch-Genger, *Probes for optical imaging: new developments.* Drug Discov Today Technol, 2011. **8**(2-4): p. e87-94.
195. Kobayashi, H., et al., *New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging.* Chem Rev, 2010. **110**(5): p. 2620-40.
196. Wolfs, E., et al., *Radiolabeling strategies for radionuclide imaging of stem cells.* Stem Cell Rev Rep, 2015. **11**(2): p. 254-74.
197. Kielland, A., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012.* Free Radic Biol Med, 2009. **47**(6): p. 760-6.
198. Nishinaka, Y., et al., *A new sensitive chemiluminescence probe, L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(2): p. 554-9.
199. Conroy, E. and G. Aviello, *Imaging Intestinal ROS in Homeostatic Conditions Using L-012.* Methods Mol Biol, 2019. **1982**: p. 313-327.
200. Zielonka, J., J.D. Lambeth, and B. Kalyanaraman, *On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation.* Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 1310-1314.
201. Paroo, Z., et al., *Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden.* Mol Imaging, 2004. **3**(2): p. 117-24.
202. Luker, G.D. and K.E. Luker, *Optical imaging: current applications and future directions.* J Nucl Med, 2008. **49**(1): p. 1-4.
203. Richardson, M.P., et al., *A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test.* J Immunol Methods, 1998. **219**(1-2): p. 187-93.
204. van den Berg, R.A., et al., *Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data.* BMC Genomics, 2006. **7**: p. 142.
205. Eriksson, I., et al., *Multi- and Megavariate Data Analysis. Principles and Applications.* 2001, Umeå: Umetrics Academy.
206. Mehling, R., et al., *Immunomodulatory role of reactive oxygen species and nitrogen species during T cell-driven neutrophil-enriched acute and chronic cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions.* Theranostics, 2021. **11**(2): p. 470-490.
207. Crow, J.P., *Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species.* Nitric Oxide, 1997. **1**(2): p. 145-57.
208. Nauseef, W.M., et al., *Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components.* J Biol Chem, 1991. **266**(9): p. 5911-7.
209. Schumacher, C., et al., *High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10542-6.
210. Carr, M.W., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3652-6.
211. Xu, L.L., et al., *Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro.* J Leukoc Biol, 1996. **60**(3): p. 365-71.

212. Wolpe, S.D., et al., *Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 612-6.
213. Aguilera-Aguirre, L., et al., *Innate inflammation induced by the 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-KRAS-NF-kappaB pathway*. J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4643-53.
214. Visnes, T., et al., *Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation*. Science, 2018. **362**(6416): p. 834-839.
215. Nakabeppu, Y., *Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(7): p. 12543-57.
216. Grayson, P.C. and M.J. Kaplan, *At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(2): p. 253-64.
217. Albrengues, J., et al., *Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice*. Science, 2018. **361**(6409).
218. Erpenbeck, L. and M.P. Schon, *Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression?* Oncogene, 2017. **36**(18): p. 2483-2490.
219. Liu, S., et al., *Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 37252.
220. Gupta, S. and M.J. Kaplan, *The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(7): p. 402-13.
221. Holmes, C.L., et al., *Insight into Neutrophil Extracellular Traps through Systematic Evaluation of Citrullination and Peptidylarginine Deiminases*. J Immunol Res, 2019. **2019**: p. 2160192.
222. Garcia-Ruiz, C. and J.C. Fernandez-Checa, *Mitochondrial Oxidative Stress and Antioxidants Balance in Fatty Liver Disease*. Hepatol Commun, 2018. **2**(12): p. 1425-1439.
223. Elfawy, H.A. and B. Das, *Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies*. Life Sci, 2019. **218**: p. 165-184.
224. Daenen, K., et al., *Oxidative stress in chronic kidney disease*. Pediatr Nephrol, 2019. **34**(6): p. 975-991.
225. Zhao, Y., et al., *p66Shc Contributes to Liver Fibrosis through the Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species*. Theranostics, 2019. **9**(5): p. 1510-1522.
226. Ni, R., et al., *Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy*. Free Radic Biol Med, 2016. **90**: p. 12-23.
227. Drevet, S., et al., *Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis*. Exp Gerontol, 2018. **111**: p. 107-117.
228. Jin, H., et al., *Animal models of atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 31-40.
229. Kneilling, M., et al., *Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1696-706.
230. Biedermann, T., et al., *Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1441-52.
231. Schwenck, J., et al., *Temporal Dynamics of Reactive Oxygen and Nitrogen Species and NF-kappaB Activation During Acute and Chronic T Cell-Driven Inflammation*. Mol Imaging Biol, 2020. **22**(3): p. 504-514.
232. Glennon-Alty, L., et al., *Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease*. Free Radic Biol Med, 2018. **125**: p. 25-35.
233. Belikov, A.V., B. Schraven, and L. Simeoni, *T cells and reactive oxygen species*. J Biomed Sci, 2015. **22**: p. 85.
234. Wheeler, M.L. and A.L. Defranco, *Prolonged production of reactive oxygen species in response to B cell receptor stimulation promotes B cell activation and proliferation*. J Immunol, 2012. **189**(9): p. 4405-16.

235. Richards, S.M. and E.A. Clark, *BCR-induced superoxide negatively regulates B-cell proliferation and T-cell-independent type 2 Ab responses*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3395-403.
236. Daiber, A., et al., *Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012*. Free Radic Res, 2004. **38**(3): p. 259-69.
237. Imada, I., et al., *Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012*. Anal Biochem, 1999. **271**(1): p. 53-8.
238. Zhou, J., et al., *Noninvasive assessment of localized inflammatory responses*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 218-26.
239. Royall, J.A. and H. Ischiropoulos, *Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells*. Arch Biochem Biophys, 1993. **302**(2): p. 348-55.
240. Dypbukt, J.M., et al., *A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(11): p. 1468-77.
241. Schurmann, N., et al., *Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to Salmonella and prevents collateral tissue damage*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 16268.
242. Abu-Soud, H.M. and S.L. Hazen, *Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5425-30.
243. Rodenas, J., M.T. Mitjavila, and T. Carbonell, *Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes*. Am J Physiol, 1998. **274**(3): p. C827-30.
244. Zimpelmann, J., N. Li, and K.D. Burns, *Nitric oxide inhibits superoxide-stimulated urea permeability in the rat inner medullary collecting duct*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(6): p. F1160-7.
245. Liu, P., et al., *Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(3): p. 1139-46.
246. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
247. Xu, S., et al., *Caveolin-1 scaffolding domain promotes leukocyte adhesion by reduced basal endothelial nitric oxide-mediated ICAM-1 phosphorylation in rat mesenteric venules*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(10): p. H1484-93.
248. Chigaev, A., Y. Smagley, and L.A. Sklar, *Nitric oxide/cGMP pathway signaling actively down-regulates alpha4beta1-integrin affinity: an unexpected mechanism for inducing cell de-adhesion*. BMC Immunol, 2011. **12**: p. 28.
249. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
250. Napimoga, M.H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub>, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 609-17.
251. Sugita, K., et al., *Inducible nitric oxide synthase downmodulates contact hypersensitivity by suppressing dendritic cell migration and survival*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 464-71.
252. Ross, R., et al., *Involvement of NO in contact hypersensitivity*. Int Immunol, 1998. **10**(1): p. 61-9.
253. Benjamim, C.F., et al., *Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3602-10.
254. Crosara-Alberto, D.P., et al., *Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(5): p. 645-58.
255. Winterbourn, C.C., *Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 223-7.
256. van der Veen, B.S., M.P. de Winther, and P. Heeringa, *Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2899-937.

257. Gaut, J.P., et al., *Artifact-free quantification of free 3-chlorotyrosine, 3-bromotyrosine, and 3-nitrotyrosine in human plasma by electron capture-negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2002. **300**(2): p. 252-9.
258. Aratani, Y., *Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function*. *Arch Biochem Biophys*, 2018. **640**: p. 47-52.
259. Odobasic, D., et al., *Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function*. *Blood*, 2013. **121**(20): p. 4195-204.
260. Odobasic, D., et al., *Suppression of Autoimmunity and Renal Disease in Pristane-Induced Lupus by Myeloperoxidase*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(7): p. 1868-80.
261. Endo, D., et al., *Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils*. *Inflamm Res*, 2016. **65**(2): p. 151-9.
262. Takeuchi, K., et al., *Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to zymosan*. *Inflamm Res*, 2012. **61**(3): p. 197-205.
263. Tateno, N., et al., *Myeloperoxidase deficiency induces MIP-2 production via ERK activation in zymosan-stimulated mouse neutrophils*. *Free Radic Res*, 2013. **47**(5): p. 376-85.
264. Pullar, J.M., C.C. Winterbourn, and M.C. Vissers, *The effect of hypochlorous acid on the expression of adhesion molecules and activation of NF-kappaB in cultured human endothelial cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2002. **4**(1): p. 5-15.
265. Vissers, M.C. and C. Thomas, *Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(3): p. 401-11.
266. Rees, M.D., et al., *Targeted subendothelial matrix oxidation by myeloperoxidase triggers myosin II-dependent de-adhesion and alters signaling in endothelial cells*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(12): p. 2344-56.
267. Brovkovich, V., et al., *Augmented inducible nitric oxide synthase expression and increased NO production reduce sepsis-induced lung injury and mortality in myeloperoxidase-null mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **295**(1): p. L96-103.
268. Haegens, A., et al., *Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production*. *J Immunol*, 2009. **182**(12): p. 7990-6.
269. Shen, H.M. and S. Pervaiz, *TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution*. *FASEB J*, 2006. **20**(10): p. 1589-98.
270. Han, D., et al., *Hydrogen peroxide and redox modulation sensitize primary mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(4): p. 627-39.
271. Zahler, S., C. Kupatt, and B.F. Becker, *Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha*. *FASEB J*, 2000. **14**(3): p. 555-64.
272. Wullaert, A., K. Heyninck, and R. Beyaert, *Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(9): p. 1090-101.
273. Korn, S.H., et al., *Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of I kappa B kinase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(38): p. 35693-700.
274. Lou, H. and N. Kaplowitz, *Glutathione depletion down-regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activity via I kappa B kinase-dependent and -independent mechanisms*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(40): p. 29470-81.
275. Han, D., et al., *Redox regulation of tumor necrosis factor signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(9): p. 2245-63.
276. Sundqvist, M., et al., *Elevated Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Redox Imbalance in Human NADPH-Oxidase-Deficient Phagocytes*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1828.

277. Nakai, K., et al., *Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4616-21.
278. Barygina, V., et al., *Fibroblasts to Keratinocytes Redox Signaling: The Possible Role of ROS in Psoriatic Plaque Formation*. Antioxidants (Basel), 2019. **8**(11).
279. Emmert, H., et al., *NADPH oxidase inhibition rescues keratinocytes from elevated oxidative stress in a 2D atopic dermatitis and psoriasis model*. Exp Dermatol, 2020.
280. Wang, H. and M.E. Hartnett, *Roles of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase in Angiogenesis: Isoform-Specific Effects*. Antioxidants (Basel), 2017. **6**(2).
281. Chen, C., et al., *The Role of NOX4 and TRX2 in Angiogenesis and Their Potential Cross-Talk*. Antioxidants (Basel), 2017. **6**(2).
282. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.
283. Cibrian, D. and F. Sanchez-Madrid, *CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper*. Eur J Immunol, 2017. **47**(6): p. 946-953.
284. Yu, L., et al., *CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production*. Cell Death Dis, 2018. **9**(9): p. 905.
285. Radulovic, K., et al., *The early activation marker CD69 regulates the expression of chemokines and CD4 T cell accumulation in intestine*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65413.
286. Gardiner, G.J., et al., *A role for NADPH oxidase in antigen presentation*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 295.
287. Hoffmann, M.H. and H.R. Griffiths, *The dual role of Reactive Oxygen Species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models*. Free Radic Biol Med, 2018. **125**: p. 62-71.
288. Henrickson, S.E., et al., *Noninfectious Manifestations and Complications of Chronic Granulomatous Disease*. J Pediatric Infect Dis Soc, 2018. **7**(suppl\_1): p. S18-S24.
289. Hultqvist, M., et al., *Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12646-51.
290. Gelderman, K.A., et al., *T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(34): p. 12831-6.
291. Cemerski, S., J.P. van Meerwijk, and P. Romagnoli, *Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules*. Eur J Immunol, 2003. **33**(8): p. 2178-85.
292. Samstag, Y., I. John, and G.H. Wabnitz, *Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration*. Immunol Rev, 2013. **256**(1): p. 30-47.
293. Dingjan, I., et al., *Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22064.
294. De Jong, W.H., et al., *Contact and respiratory sensitizers can be identified by cytokine profiles following inhalation exposure*. Toxicology, 2009. **261**(3): p. 103-11.
295. Won, H.Y., et al., *Enhancement of Allergen-induced Airway Inflammation by NOX2 Deficiency*. Immune Netw, 2011. **11**(3): p. 169-74.
296. Kwon, B.I., et al., *Enhanced Th2 cell differentiation and function in the absence of Nox2*. Allergy, 2017. **72**(2): p. 252-265.
297. Ballatori, N., et al., *Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases*. Biol Chem, 2009. **390**(3): p. 191-214.
298. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 1957-97.
299. Xiao, W., et al., *NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(3): p. 251-272.
300. Schneider, M., et al., *CD38 is expressed on inflammatory cells of the intestine and promotes intestinal inflammation*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126007.

301. Amici, S.A., et al., *CD38 Is Robustly Induced in Human Macrophages and Monocytes in Inflammatory Conditions*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1593.
302. Tomlinson, C., et al., *Arginine is synthesized from proline, not glutamate, in enterally fed human preterm neonates*. Pediatr Res, 2011. **69**(1): p. 46-50.
303. Andrew, P.J. and B. Mayer, *Enzymatic function of nitric oxide synthases*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 521-31.
304. Marcinkiewicz, J. and E. Kontny, *Taurine and inflammatory diseases*. Amino Acids, 2014. **46**(1): p. 7-20.
305. Harrison, F.E., et al., *Elevated oxidative stress and sensorimotor deficits but normal cognition in mice that cannot synthesize ascorbic acid*. J Neurochem, 2008. **106**(3): p. 1198-208.
306. Banhegyi, G., et al., *Ascorbate synthesis-dependent glutathione consumption in mouse liver*. FEBS Lett, 1996. **381**(1-2): p. 39-41.
307. Kolaczowska, E., et al., *Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6673.
308. Guiducci, E., et al., *Candida albicans-Induced NETosis Is Independent of Peptidylarginine Deiminase 4*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1573.
309. Zhou, Y., N. Mittereder, and G.P. Sims, *Perspective on Protein Arginine Deiminase Activity-Bicarbonate Is a pH-Independent Regulator of Citrullination*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 34.
310. Damgaard, D., et al., *Relative efficiencies of peptidylarginine deiminase 2 and 4 in generating target sites for anti-citrullinated protein antibodies in fibrinogen, alpha-enolase and histone H3*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0203214.
311. Bawadekar, M., et al., *Peptidylarginine deiminase 2 is required for tumor necrosis factor alpha-induced citrullination and arthritis, but not neutrophil extracellular trap formation*. J Autoimmun, 2017. **80**: p. 39-47.
312. Zhou, Y., et al., *Evidence for a direct link between PAD4-mediated citrullination and the oxidative burst in human neutrophils*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15228.
313. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
314. Eruslanov, E.B., S. Singhal, and S.M. Albelda, *Mouse versus Human Neutrophils in Cancer: A Major Knowledge Gap*. Trends Cancer, 2017. **3**(2): p. 149-160.
315. Bagaitkar, J., et al., *Activation of neutrophil respiratory burst by fungal particles requires phosphatidylinositol 3-phosphate binding to p40(phox) in humans but not in mice*. Blood, 2012. **120**(16): p. 3385-7.
316. Simon, D., et al., *Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(1): p. 194-9.
317. Hasegawa, Y., et al., *Neutrophil extracellular traps are involved in enhanced contact hypersensitivity response in IL-36 receptor antagonist-deficient mice*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 13384.
318. Knuckley, B., et al., *Substrate specificity and kinetic studies of PADs 1, 3, and 4 identify potent and selective inhibitors of protein arginine deiminase 3*. Biochemistry, 2010. **49**(23): p. 4852-63.
319. Nachat, R., et al., *Peptidylarginine deiminase isoforms are differentially expressed in the anagen hair follicles and other human skin appendages*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(1): p. 34-41.
320. Wang, S. and Y. Wang, *Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(10): p. 1126-35.
321. Ciesielski, O., et al., *Citrullination in the pathology of inflammatory and autoimmune disorders: recent advances and future perspectives*. Cell Mol Life Sci, 2022. **79**(2): p. 94.
322. Parker, H., et al., *Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(4): p. 841-9.

323. Rochael, N.C., et al., *Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18302.
324. Firuzi, O., et al., *Antioxidant therapy: current status and future prospects*. Curr Med Chem, 2011. **18**(25): p. 3871-88.
325. Tian, T., Z. Wang, and J. Zhang, *Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 4535194.
326. Lin, X. and T. Huang, *Oxidative stress in psoriasis and potential therapeutic use of antioxidants*. Free Radic Res, 2016. **50**(6): p. 585-95.
327. Quinonez-Flores, C.M., et al., *Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 6097417.
328. Iannitti, T. and B. Palmieri, *Antioxidant therapy effectiveness: an up to date*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2009. **13**(4): p. 245-78.
329. *Tecfidera (dimethyl fumarate)*, FDA, Editor. 2013.
330. *Skilarence (dimethyl fumarate)*, EMEA/H/C/002157, in <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/skilarence>. 2017, European Medicines Agency.
331. Linker, R.A. and R. Gold, *Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: mechanism of action, effectiveness, and side effects*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2013. **13**(11): p. 394.
332. Bruck, J., et al., *A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis*. Exp Dermatol, 2018. **27**(6): p. 611-624.
333. Schulze-Topphoff, U., et al., *Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(17): p. 4777-82.
334. Mrowietz, U. and K. Asadullah, *Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity*. Trends Mol Med, 2005. **11**(1): p. 43-8.
335. Esser, P.R., et al., *Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41340.
336. Schwenck, J., et al., *In vivo optical imaging of matrix metalloproteinase activity detects acute and chronic contact hypersensitivity reactions and enables monitoring of the antiinflammatory effects of N-acetylcysteine*. Mol Imaging, 2014. **13**.
337. Oakley, F., et al., *Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury*. Am J Pathol, 2005. **166**(3): p. 695-708.
338. Panzer, U., et al., *Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(2): p. F429-39.
339. Rolova, T., et al., *Complex regulation of acute and chronic neuroinflammatory responses in mouse models deficient for nuclear factor kappa B p50 subunit*. Neurobiol Dis, 2014. **64**: p. 16-29.
340. Cartwright, T., N.D. Perkins, and L.W. C, *NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer*. FEBS J, 2016. **283**(10): p. 1812-22.
341. Karban, A.S., et al., *Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(1): p. 35-45.
342. O'Reilly, L.A., et al., *Loss of NF-kappaB1 Causes Gastric Cancer with Aberrant Inflammation and Expression of Immune Checkpoint Regulators in a STAT-1-Dependent Manner*. Immunity, 2018. **48**(3): p. 570-583 e8.
343. Grundstrom, S., et al., *Bcl-3 and NFkappaB p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4+ T cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8460-8.
344. Wessells, J., et al., *BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49995-50003.
345. Elsharkawy, A.M., et al., *The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes*. J Hepatol, 2010. **53**(3): p. 519-27.

346. Ishihara, K. and T. Hirano, *IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 357-68.
347. Hunter, C.A. and S.A. Jones, *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 448-57.
348. de Valle, E., et al., *NFkappaB1 is essential to prevent the development of multiorgan autoimmunity by limiting IL-6 production in follicular B cells*. J Exp Med, 2016. **213**(4): p. 621-41.
349. Mizgerd, J.P., M.M. Lupa, and M.S. Spieker, *NF-kappaB p50 facilitates neutrophil accumulation during LPS-induced pulmonary inflammation*. BMC Immunol, 2004. **5**: p. 10.
350. Chang, M., et al., *NF-kappa B1 p105 regulates T cell homeostasis and prevents chronic inflammation*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3131-8.
351. Gugasyan, R., et al., *The NF-kappaB1 transcription factor prevents the intrathymic development of CD8 T cells with memory properties*. EMBO J, 2012. **31**(3): p. 692-706.
352. Best, K.T., et al., *Deletion of NFKB1 enhances canonical NF-kappaB signaling and increases macrophage and myofibroblast content during tendon healing*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 10926.
353. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 803-15.
354. Chawla, M., et al., *An epithelial Nfkb2 pathway exacerbates intestinal inflammation by supplementing latent RelA dimers to the canonical NF-kappaB module*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(25).
355. Al-Soudi, A., M.H. Kaaij, and S.W. Tas, *Endothelial cells: From innocent bystanders to active participants in immune responses*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(9): p. 951-962.
356. Noort, A.R., et al., *NF-kappaB-inducing kinase is a key regulator of inflammation-induced and tumour-associated angiogenesis*. J Pathol, 2014. **234**(3): p. 375-85.
357. Maracle, C.X., et al., *Targeting non-canonical nuclear factor-kappaB signalling attenuates neovascularization in a novel 3D model of rheumatoid arthritis synovial angiogenesis*. Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(2): p. 294-302.
358. Kucharzewska, P., et al., *NIK-IKK complex interaction controls NF-kappaB-dependent inflammatory activation of endothelium in response to LTbetaR ligation*. J Cell Sci, 2019. **132**(7).
359. Jeucken, K.C.M., et al., *Differential Contribution of NF-kappaB Signaling Pathways to CD4(+) Memory T Cell Induced Activation of Endothelial Cells*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 860327.
360. Piao, W., et al., *Regulation of T cell afferent lymphatic migration by targeting LTbetaR-mediated non-classical NFkappaB signaling*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3020.
361. Rennert, P.D., et al., *Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1999-2006.
362. Beinke, S. and S.C. Ley, *Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology*. Biochem J, 2004. **382**(Pt 2): p. 393-409.
363. Madge, L.A., et al., *Lymphotoxin-alpha 1 beta 2 and LIGHT induce classical and noncanonical NF-kappa B-dependent proinflammatory gene expression in vascular endothelial cells*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3467-77.
364. Dejardin, E., et al., *The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 525-35.
365. Noort, A.R., et al., *Tertiary Lymphoid Structures in Rheumatoid Arthritis: NF-kappaB-Inducing Kinase-Positive Endothelial Cells as Central Players*. Am J Pathol, 2015. **185**(7): p. 1935-43.
366. Noort, A.R., P.P. Tak, and S.W. Tas, *Non-canonical NF-kappaB signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde?* Arthritis Res Ther, 2015. **17**(1): p. 15.
367. Liu, J.Z., et al., *Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 979-986.
368. Ramakrishnan, S.K., et al., *Intestinal non-canonical NFkappaB signaling shapes the local and systemic immune response*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 660.

369. Aya, K., et al., *NF-(kappa)B-inducing kinase controls lymphocyte and osteoclast activities in inflammatory arthritis*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1848-54.
370. Ghosh, G. and V.Y. Wang, *Origin of the Functional Distinctiveness of NF-kappaB/p52*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 764164.
371. Li, X., et al., *IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamm are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45129-40.
372. Wu, F. and S. Chakravarti, *Differential expression of inflammatory and fibrogenic genes and their regulation by NF-kappaB inhibition in a mouse model of chronic colitis*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6988-7000.
373. Yang, Q., et al., *RelA/MicroRNA-30a/NLRP3 signal axis is involved in rheumatoid arthritis via regulating NLRP3 inflammasome in macrophages*. Cell Death Dis, 2021. **12**(11): p. 1060.
374. Makarov, S.S., *NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction*. Arthritis Res, 2001. **3**(4): p. 200-6.
375. Handel, M.L., L.B. McMorro, and E.M. Gravalles, *Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(12): p. 1762-70.
376. Zhang, T., et al., *NF-kappaB signaling in inflammation and cancer*. MedComm (2020), 2021. **2**(4): p. 618-653.
377. Han, Y.M., et al., *NF-kappa B activation correlates with disease phenotype in Crohn's disease*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0182071.
378. Banoth, B., et al., *Stimulus-selective crosstalk via the NF-kappaB signaling system reinforces innate immune response to alleviate gut infection*. Elife, 2015. **4**.
379. Derudder, E., et al., *RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23278-84.
380. Napetschnig, J. and H. Wu, *Molecular basis of NF-kappaB signaling*. Annu Rev Biophys, 2013. **42**: p. 443-68.
381. Yilmaz, Z.B., et al., *Quantitative dissection and modeling of the NF-kappaB p100-p105 module reveals interdependent precursor proteolysis*. Cell Rep, 2014. **9**(5): p. 1756-1769.
382. Basak, S., V.F. Shih, and A. Hoffmann, *Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3139-50.
383. Tao, Z., et al., *p100/IkappaBdelta sequesters and inhibits NF-kappaB through kappaBsome formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(45): p. 15946-51.
384. Savinova, O.V., A. Hoffmann, and G. Ghosh, *The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes*. Mol Cell, 2009. **34**(5): p. 591-602.
385. Mukherjee, T., et al., *A TNF-p100 pathway subverts noncanonical NF-kappaB signaling in inflamed secondary lymphoid organs*. EMBO J, 2017. **36**(23): p. 3501-3516.
386. Sharabi, A., et al., *Regulatory T cells in the treatment of disease*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(11): p. 823-844.
387. Liston, A. and D.H. Gray, *Homeostatic control of regulatory T cell diversity*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 154-65.
388. Dhar, A., et al., *Role of NF-kappaB2-p100 in regulatory T cell homeostasis and activation*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 13867.
389. Roy, P., et al., *Non-canonical NFkappaB mutations reinforce pro-survival TNF response in multiple myeloma through an autoregulatory RelB:p50 NFkappaB pathway*. Oncogene, 2017. **36**(10): p. 1417-1429.