

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
der Universität zu Köln
Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. E. R. von Stebut

Der Einfluss des Alters und des Geschlechts auf die Homöostase humaner innater lymphoider Zellen in der Haut

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Valeria Smirnov
aus Slawgorod, Russland

promoviert am 03. März 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G.R. Fink

1. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. E. R. von Stebut
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. R. Stripecke

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Dominika Lukas von mir selbst ausgeführt worden. Die FACS-Einstellungen wurden nach den Vorgaben von Frau Dr. rer. nat. Lukas vorgenommen und mit ihrer Hilfe angepasst. Die statistische Auswertung der dadurch gewonnenen Datensätze erfolgte mittels GraphPad Prism 9.0 durch mich selbst und wurde im Nachgang im Rahmen eines Beratungstermins beim Institut für Medizinische Statistik und Bioinformatik der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln mit Frau Angela Ernst besprochen und von Frau Kerstin Rosenberger vor der Abgabe geprüft.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 19.10.2025

Unterschrift:

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt zunächst meiner Doktormutter, Frau Univ.-Prof. Dr. Esther von Stebut-Borschitz, für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, sowie für ihre wissenschaftliche Unterstützung und fachliche Betreuung.

Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. Dominika Lukas für ihre engagierte Betreuung, wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge und stetige Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. von Stebut-Borschitz spreche ich meinen Dank für die freundliche Aufnahme, die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielfältige Unterstützung aus.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Max Zinser, Department für Plastische und Ästhetische Chirurgie der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, Herrn Dr. med. Hikmet Ulus, Kinderchirurg, sowie dem gesamten Team des dermatologischen OPs der Universitätsklinik Köln für die großzügige Bereitstellung von Hautproben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zudem danke ich der Mainz Research School of Translational Biomedicine (TransMed) für das Gewähren eines Promotionsstipendiums und damit die Möglichkeit, mich intensiv der experimentellen Forschung widmen zu können.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Ermutigung haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diesen Weg gehen konnte.

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern, die mir durch ihre Liebe und Unterstützung stets den Weg geebnet haben. Danke für alle Türen, die ihr mir geöffnet, und die Chancen, die ihr mir ermöglicht habt.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	11
2.1. Alter und Geschlecht	11
2.2. Innate lymphoide Zellen	13
2.2.1. Entwicklung der ILCs	13
2.3. Einteilung und Funktionen der ILCs	14
2.3.1. ILC1	14
2.3.2. ILC2	15
2.3.3. ILC3	16
2.4. Bedeutung der ILCs für den menschlichen Körper	17
2.4.1. ILCs und Pathologien	18
2.4.2. ILCs in der Haut	20
2.5. Plastizität der ILCs	21
2.6. Aktueller Forschungsstand	22
2.7. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. Material	25
3.1.1. Instrumente	25
3.1.2. Labormaterialien	25
3.1.3. Reagenzien	26
3.1.4. Fertig-Sets	27
3.1.5. Lösungen	28
3.1.6. Antikörper	29
3.1.7. Software	30
3.1.8. Hautproben	31
3.2. Methode	31
3.2.1. Probenverarbeitung und Zellisolation	31

3.2.2.	Zellzählung	32
3.2.3.	Zellfärbung	33
3.2.4.	FACS	34
3.2.5.	Statistische Auswertung	37
4.	ERGEBNISSE	38
4.1.	Gesamtzellzahlen der Hautproben	38
4.2.	CD45 ⁺ -Zellen in der Haut	39
4.3.	ILCs in humaner Haut	40
4.3.1.	ILCs abhängig vom Alter und Geschlecht	41
4.3.2.	ILC-Subgruppen anteilig an Gesamt-ILCs	44
4.4.	Ganzkörperkartierung der ILCs	46
5.	DISKUSSION	49
5.1.	Häufigkeit und Verteilung der ILCs	49
5.1.1.	CD45 ⁺ -Zellen abhängig vom Alter und Geschlecht	50
5.1.2.	ILC-Homöostase abhängig vom Alter und Geschlecht	51
5.1.3.	Ganzkörper-Kartierung der ILCs	52
5.1.4.	ILC-Homöostase in der Haut und ihre Implikationen	54
5.2.	Limitationen	55
5.3.	Ausblick	58
6.	LITERATURVERZEICHNIS	60
7.	ANHANG	67
7.1.	Abbildungsverzeichnis	67
7.2.	Tabellenverzeichnis	69

Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptoren
AREG	Amphiregulin
BioMaSOTA	Biologische Material Sammlung zur Optimierung Therapeutischer Ansätze
CD	Cluster of Differentiation, Clustermoleküle common helper innate lymphoid progenitor, innaten lymphoide
CHILPs	Helferzell-Progenitoren common innate lymphoid progenitors, innate lymphoide
CILPs	Progenitorzelle
CLA	cutaneous lymphocyte antigen, kutanes Lymphozytenantigen
CLPs	common lymphoid progenitor, lymphatische Progenitorzelle
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRTH2	chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells; chemoattraktives rezeptor-homologes Molekül, das auf Th2-Zellen exprimiert wird
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E-box	Enhancer Box, verstärkende Sequenz auf der DNA
EGF	epidermal growth factor, epidermale Wachstumsfaktor
EOMES	Eomesodermin
ER	estrogen receptor, Östrogenrezeptor
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FAPs	fibro/adipocyte progenitors, Fibroblasten/Adipozyten Progenitoren
FCS	Fetal calf serum, fetales Kalbserum
FSCA	, vorwärts gestreutes Licht
GATA3	GATA bindendes Protein 3
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
hiFCS	heat inactivated fetal calf serum, Hitze-inaktiviertes fetales Kalbserum
Id2	Inhibitor of DNA binding 2, Inhibitor der DNA-Bindung 2
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
ILCPs	innate lymphoid cell precursors, innate lymphoide Zellvorläufer
ILCs	Innate lymphoide Zellen
Kat.	Katalognummer

Lin.	Lineage, Zelllinien-Marker
LTi	lymphoid tissue inducer cells, Lymphgewebe-Induktorzellen
M	arithmetisches Mittel
m	männlich
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MS	Multiple Sklerose
n	Stichprobengröße
N	Gesamtstichprobengröße
NCRs	Natural cytotoxicity receptors, natürliche zytotoxische Rezetoren
Nfil3	Kernfaktor, IL-3 reguliert
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKp44	NK-Zellprotein mit 44 Kilodalton
NKp46	NK-Zellprotein mit 46 Kilodalton
NKPs	NK cell precursor, NK-Vorläuferzellen
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
RET	rearranged in transfection, Tyrosinkinase-Rezeptor
ROR- α	retinoic acid receptor-related orphan receptor- α , Retinsäurerezeptor-bezogener Orphan-Rezeptor α
ROR γ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t ,Retinsäurerezeptor-bezogener Orphan-Rezeptor γ t
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SLE	systemischer Lupus erythematosus
SSCA	side scatter area, Seitenstreulicht
STAT3	Signalüberträger und Aktivator der Transkription 3
T-bet	T-Box Transkriptionsfaktor TBX21
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TSLP	thymic stromal lymphopoietin, Thymisches stromales Lymphopoietin
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
w	weiblich

1. Zusammenfassung

Innate lymphoide Zellen sind als Bestandteil des angeborenen Immunsystems bekannt und seit ihrer Entdeckung werden sie in immer mehr Geweben untersucht. Sie lassen sich in drei Klassen einteilen mit jeweils eigenem Zytokin-Profil und folglich unterschiedlichen Funktionen. Dadurch variiert auch ihr Gewebevorkommen. Unter anderem wurden ILCs in humaner Haut beschrieben, vor allem im Kontext von autoimmun-bedingten Hautkrankheiten. Ihr Vorkommen in gesunder, humaner Haut wurde allerdings noch nicht umfassend untersucht. Auch bleibt bisher offen ob die ILCs in der Haut Alters- oder Geschlechtseinflüssen unterliegen. Als Teil der Immunreaktion könnte die Homöostase der ILCs eine wichtige Rolle nicht nur bei der Immunabwehr, sondern auch bei der Prädisposition für bestimmte Krankheiten spielen. So könnten sie auch zu Dichotomien zwischen den Geschlechtern oder Alterserscheinungen im Rahmen der Immunität beitragen.

In dieser Arbeit wurden Proben gesunder, humaner Haut aufgearbeitet und die ILC-Untergruppen durch Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie detektiert und ihr Vorkommen allgemein sowie in Abhängigkeit des Alters und/oder des Geschlechts untersucht. Aufgrund der funktionellen Heterogenität innerhalb der ILC-Gruppen wurden die drei Haupttypen unterteilt in Typ-1-ILCs, bestehend aus ILC1s und NK-Zellen, Typ-2-ILCs, die ausschließlich ILC2s umfassen, und Typ-3-ILCs, zu denen die ILC3s gehören, die wiederum in NKp44-positive und -negative Untergruppen differenziert werden können. Zudem fand eine Ganzkörperkartierung der gesamten ILC-Population statt. Die Entnahmeorte der Hautproben wurden nach Rumpf, Kopf, proximaler und distaler Extremität getrennt untersucht, um einen möglichen Einfluss der Lokalisation der Haut auf die Zellzahl zu erfassen.

Die Studie ergab, dass alle ILC-Untergruppen in gesunder, humaner Haut vorkamen. Die dominantesten Populationen stellten die ILC2s und ILC1s dar. NK-Zellen, NKp44⁺-ILC3s und NKp44-ILC3s kamen signifikant seltener vor. Ein konstanter Effekt des Geschlechts oder des Alters auf die Zellzahlen konnte zwar nicht festgestellt werden, aber für einige ILC-Untergruppen war er zu finden. NK-Zellen und ILC3s, sowohl NKp44-positive als auch negative, kamen bei jungen Männern signifikant häufiger vor als bei jungen Frauen. Innerhalb der männlichen Proben war hier auch ein Effekt des Alters auf die Zellzahl festzustellen: junge Männer wiesen in der Haut mehr NK-Zellen und ILC3s auf als Männer mittleren und hohen Alters. Für ILC1s und ILC2s hingegen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Darüber hinaus wurde für die gesamte ILC-Population, sowie alle ILC-Subgruppen- außer der ILC1s- für die Zellanzahl ein Gradient von distal nach proximal festgestellt: distale Extremitäten wiesen signifikant mehr ILCs bzw. Lymphozyten generell auf als proximale Körperbereiche wie der Rumpf.

Alles in allem zeigt diese Arbeit das Vorkommen aller ILC-Subtypen in gesunder, humaner Haut und bietet eine Referenzverteilung für zukünftige Forschung. Sie legt für einige ILC-Populationen eine Abhängigkeit von Alter und Geschlecht nahe und zeigt ebenso, dass die kutane ILC-Gesamtpopulation lokalisationsabhängig ist.

2. Einleitung

Der menschliche Körper ist konstant einer Vielzahl an potenziell schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt. Aber auch körpereigene Vorgänge, wie entartende Zellen, bedrohen die Gesundheit. Um den Körper gegen diese zu verteidigen, stehen dem Immunsystem zahlreiche Mechanismen zur Verfügung. Diese können einer der folgenden Kategorien zugeordnet werden: der angeborenen oder der adaptiven Immunabwehr. Während die adaptive, oder auch erworbene, Immunabwehr sich erst im Laufe des Lebens entwickelt und vor allem B- und T- Lymphozyten, sprich einen humoralen und einen zellvermittelten Bestandteil, umfasst, ist die angeborene Immunabwehr, wie der Name schon sagt, von Geburt an funktionsfähig. Sie umfasst dabei drei Komponenten: humorale und zelluläre Abwehrmechanismen, sowie Barrieren. Zu den Barrieren zählen unter anderem Oberflächenepithelien wie die Haut, die durch die gebildeten Zellverbände das Eindringen von pathogenen Organismen verhindern sollen, aber auch vom Körper produzierte Sekrete wie Tränenflüssigkeit oder die Muzine, die von Schleimhäuten gebildet werden und die darin gelösten antimikrobiellen Peptide. Der humorale Bestandteil umfasst hierbei Proteine des Komplementsystems, die z.B. für die Opsonierung von Keimen zuständig sind und generell antimikrobiell wirkende, lösliche Stoffe. Zuletzt stehen einige zelluläre Elemente zur Verfügung. Hierzu zählen verschiedene Leukozyten, beispielsweise Granulozyten, Makrophagen, aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Ihnen ist gemein, dass die mittels verschiedener Rezeptoren pathogene Zellen identifizieren können, was zu einer Kaskade an Reaktionen führt. Es kommt zur Aktivierung der Zellen, möglicherweise zur Phagozytose der Pathogene oder Migration der Zellen, zur Zytokin-Ausschüttung, wodurch weitere Zellen des angeborenen, aber auch des adaptiven Immunsystems aktiviert werden können, sowie zur Ausschüttung lysierender Stoffe.¹ Eine weitere Untergruppe der Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen auch die NK-Zellen gezählt werden, stellen die innaten lymphoiden Zellen (ILCs) dar, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird.

2.1. Alter und Geschlecht

Insgesamt gibt es verschiedenste Zellen und Mechanismen, die zur Immunabwehr beitragen. Diese sind jedoch nicht konstant. Das Immunsystem entwickelt sich nach der Geburt weiter und unterliegt stetig verschiedenen Einflüssen, sowohl durch die Umwelt als auch körpereigenen Veränderungen. Zwei wichtige Einflussfaktoren stellen dabei das Alter und das Geschlecht dar.

Generell ist nicht von der Hand zu weisen, dass das Immunsystem altersbedingt schwächer wird. Nicht nur steigt die Anfälligkeit für viele Krankheiten im hohen Alter, sondern auch die

immunologische Kontrolle dieser nimmt ab. Grund dafür sind neben sozioökonomischen Einflüssen auch physiologische Veränderungen des Körpers und des Immunsystems.^{2,3}

So sollen beispielsweise Entzündungsprozesse bei Männern im hohen Alter, mit sinkenden Testosteronspiegeln, zunehmen, wohingegen Frauen im Erwachsenenalter eine höhere Inflammationsneigung zeigen. Andersherum sollen NK-Zellen bei Männern im Kinder- und Erwachsenenalter öfter vorkommen und bei Frauen hingegen im hohen Alter ansteigen.⁴ Eine altersbedingte Determinante dieser biologischen Veränderungen sind dabei hormonelle Schwankungen im Körper, welche inhibierende oder aktivierende Wirkungen auf das Immunsystem haben können⁵.

Wenn also Hormone einen Einfluss auf immunologische Prozesse haben, muss dabei auch das Geschlecht von Bedeutung sein. Tatsächlich stellt man bei zahlreichen Krankheiten geschlechtsbezogene Unterschiede in der Prävalenz, aber auch der Krankheitsschwere und teilweise der Pathologie fest. Frauen zeigen generell eine stärkere Immunreaktion auf Infektionen hin⁶, sind aber anfälliger für Autoimmunkrankheiten⁷, wie z.B. die Hashimoto Thyreoiditis. Männer hingegen neigen mehr zu nicht-reproduktiven Krebserkrankungen, wie dem Urothelkarzinom.⁴ Männer scheinen auch anfälliger für Infektionskrankheiten verursacht durch Pilze, Bakterien oder Viren wie z.B. die Infektion mit Hepatitis B. Auch das Risiko, dass sich daraus ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt, ist bei Männern höher. Allerdings variiert dies abhängig von der einzelnen Infektionskrankheit. Die Influenza A Infektion z.B. äußert sich in Frauen mit schwereren Krankheitsverläufen und häufigeren Todesfällen, obwohl die Morbidität bei Männern höher ist.⁸ Andersrum wurden bei Männern beispielsweise schwerere Psoriasis-Verläufe und klinische Symptome als bei Frauen festgestellt⁹. Aber auch Pathomechanismen von Krankheiten können sich geschlechtsspezifisch unterscheiden, wie im Falle des Morbus Parkinson, wo unterschiedliche krankheitstreibende Faktoren für Frauen und Männer im Vordergrund stehen¹⁰. Auch die Impfreaktion und Effektivität variieren zwischen den Geschlechtern. Je nach Impfung können Männer und Frauen unterschiedlich starke Antikörpertiter aufweisen.¹¹ So ist die Immunantwort auf die Influenza-Impfung im Schnitt deutlich stärker bei Frauen als bei Männern⁴. Die genauen Mechanismen sind auch hier noch nicht völlig klar. Darüber hinaus, dass die Morbidität und Krankheitsschwere geschlechtsabhängige Unterschiede aufweisen, gibt es auch Evidenzen für Unterschiede in der konkreten Immunantwort, die ursächlich für die oben beschriebenen Phänomene sein können. Beispielsweise erkranken Frauen viel häufiger an systemischem Lupus erythematosus (SLE). In dem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine bestimmte Gruppe dendritischer Zellen in Frauen auf Ligandenbindung an den Toll-like-Rezeptor 7 hin, höhere Konzentrationen an IFN- α ausschütten als dies bei Männern der Fall ist. Dies könnte die Ursache für die unterschiedlichen Prädisposition für den SLE sein bzw. dazu beitragen.¹² Ein

weiteres Beispiel stellen die NK-Zellen dar, die in Männern eine höhere Aktivität aufzuweisen scheinen als in Frauen, trotz gleicher Zellkonzentration im Blut¹³.

Insgesamt gibt es viele Faktoren, die zu geschlechtsspezifischen Unterschieden im Immunsystem beitragen. Dazu zählen, neben unterschiedlichen Verhaltensweisen aufgrund von Geschlechterrollen, sowohl genetische, X-chromosomal-bedingte, als auch hormonelle Faktoren, sowie anatomische Unterschiede.^{6,14,15} Wie genau sich dies in den einzelnen Gruppen von Immunzellen widerspiegelt und inwiefern Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie innate lymphoide Zellen, zu den genannten Phänomenen beitragen, ist noch nicht abschließend geklärt.

2.2. Innate lymphoide Zellen

Wie erwähnt gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems auch die ILCs, mit denen sich diese Arbeit befasst. In diesem Abschnitt wird erläutert, was für Zellen sie eigentlich sind und was sie ausmacht. Innate lymphoide Zellen wurden als solche vor ca. 15 Jahren erstmals beschrieben und sind den Lymphozyten zuzuordnen. Sie unterscheiden sich aber von B- und T-Lymphozyten in ihrer Rezeptorexpression insoweit, als dass sie keine adaptiven Antigen-Rezeptoren exprimieren¹⁶ und keiner somatischen Rekombination oder klonalen Selektion unterliegen, was sie zu Instrumenten der angeborenen Immunantwort macht¹⁷. Durch ihre Expression des MHC-II Moleküls¹⁸ und die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, können sie T-Zell-Antworten regulieren. Darüber hinaus spielen sie als größtenteils gewebsresidente Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Gewebshomöostase sowie der Kommunikation zum zentralen Nervensystem.¹⁶ Diese innaten Zellen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen in drei Untergruppen eingeteilt: Typ-1-ILCs, zu denen ILC1s und die NK-Zellen gehören, Typ-2- und Typ-3-ILCs¹⁹.

2.2.1. Entwicklung der ILCs

Die Entwicklung aller Blutzellen geht von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen aus, welche sich zu multipotenten Progenitorzellen differenzieren, die sowohl die lymphatischen als auch die myeloischen Zelllinien hervorbringen. Für erstere können sie sich zu lymphatischen Progenitorzellen (CLPs: common lymphoid progenitor) differenzieren. Diese sind der Ursprung aller Lymphozyten und so auch der ILCs. Aus diesen CLPs leiten sich, abhängig von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie Nfil3 (Kernfaktor, IL-3 reguliert), innate lymphoide Progenitorzellen, sogenannte CILPs (common innate lymphoid progenitors), ab. Auch Transkriptionsrepressoren wie Id2 (Inhibitor of DNA binding 2) spielen eine wichtige Rolle. Dieses supprimiert die Aktivität von sogenannten E-box-Transkriptionsfaktoren, die wiederum essenziell für die Entwicklung von B- und T-Lymphozyten sind. Die CILPs können alle ILC-

Subtypen generieren. Dabei reifen die CILPs entweder zu NK-Zellvorläufern, den NKPs (NK cell precursors), oder den sogenannten CHILPs (common helper innate lymphoid progenitor), also den innaten lymphoiden Helferzell-Progenitoren, heran. Aus letzteren gehen alle übrigen innaten lymphoiden Zellen hervor. Zunächst geht der Weg über die gemeinsamen innaten lymphoiden Zellvorläufer, die ILCPs (innate lymphoid cell precursors). Abhängig von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Zytokinen differenzieren diese sich zu Subtyp eins, zwei oder drei ILCs. Die Entwicklung der NK-Zellen zweigt also vorher ab, sie werden aber dennoch aufgrund ihrer funktionellen Ähnlichkeit zu Typ-1-ILCs gezählt.^{16,20}

Tabelle 1 zeigt einige ausgewählte, wichtige Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung der einzelnen ILC-Subgruppen.²⁰ Je nach Nomenklatur werden LTi-Zellen (lymphoid tissue inducer cells) entweder zu den Typ-3-ILCs gezählt oder als selbstständige ILC-Untergruppe angesehen. Sie brauchen ebenfalls ROR γ t für ihre Differenzierung, aber auch teilweise andere Transkriptionsfaktoren als die ILC3s.²¹ Da sie im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, stehen sie nicht in der Tabelle und werden im Weiteren nicht weiter erläutert.

ILC-Subgruppe	Transkriptionsfaktor
NK-Zellen	EOMES
ILC1	T-bet
ILC2s	GATA3, ROR- α
ILC3	ROR γ t

Tabelle 1: ILC-Subgruppen und für ihre Differenzierung wichtige Transkriptionsfaktoren. EOMES, Eomesodermin; T-bet, ein T-box Transkriptionsfaktor; GATA3, GATA bindendes Protein 3; ROR- α , retinoic acid receptor-related orphan receptor- α .

2.3. Einteilung und Funktionen der ILCs

Da die ILC-Subtypen in ihrer Zytokinausschüttung und damit der Immunantwort bestimmten T-Helferzellen ähneln, werden sie auch als angeborene Gegenstücke dieser angesehen.

Die ILC1s, ILC2s und ILC3s entsprechen jeweils den TH1, TH2 und TH17 T-Helferzellen. Die NK-Zellen hingegen werden als innates Korrelat der zytotoxischen CD-8⁺-T-Zellen beschrieben.

2.3.1. ILC1

Die Immunantwort der Typ 1 ILCs richtet sich gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren oder Tumore, aber auch z. B. gegen das *Toxoplasma gondii* Bakterium.²² ILC1s produzieren dabei auf Stimulation durch IL-12, IL-15 und auch IL-18 hin IFN- γ als ihr hauptsächlich

Effektorzytokin^{22,23}, aber auch TNF- α , analog zu den TH1-Zellen des adaptiven Immunsystems. Durch die immunmodulatorische Wirkung von IFN- γ über Rezeptoren auf ihren Zielzellen, wie Makrophagen, Lymphozyten und dendritischen Zellen²⁴, werden Abwehrantworten auf Infektionen und Tumorerkrankungen erhöht. Dabei werden z. B. antimikrobielle Funktionen wie die Produktion von Sauerstoffradikalen durch myeloische Zellen und die Phagozytose durch mononukleäre Zellen erhöht²⁵, die Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch MHC-Moleküle gefördert, aber auch die Zellproliferation und Apoptose beeinflusst, indem z. B. Tumorzellen in ihrer Proliferation gestoppt werden^{24,26}. Insgesamt haben IFN- γ und damit die ILC1s eine proinflammatorische Wirkung. Ebenso wie das von ihnen sezernierte TNF- α (Tumornekrosefaktor α)²⁷, welches über verschiedene Signalwege in den Zielzellen die Nekrose bzw. Apoptose einleiten kann²⁸. Zudem können ILC1s auch GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) produzieren¹⁶.

Die NK-Zellen produzieren ebenfalls IFN- γ , TNF- α und GM-CSF, aber im Gegensatz zu ILC1s sind sie darüber hinaus zytotoxisch, weswegen sie auch als angeborenes Gegenstück der CD8⁺-T-Zellen beschrieben werden. Sie können nämlich, wie die CD8⁺-T-Zellen, Granula sekretieren, die Perforine und Granzyme enthalten und den Zelltod herbeiführen.^{29,30} Im Gegensatz zu den anderen ILCs, welche größtenteils geweberesident sind, zirkulieren NK-Zellen vor allem im Blut³¹.

Sowohl ILC1s als auch NK-Zellen können durch die Abtötung von Pathogenen oder geschädigten Zellen und deren konsekutiven Abbau zum Gewebsumbau beitragen, da erst im Anschluss dessen die Reparatur der extrazellulären Matrix erfolgen kann.¹⁶

2.3.2. ILC2

ILCs der zweiten Gruppe bekämpfen vor allem große extrazelluläre Parasiten, wie Helminthen, und Allergene. Sie reagieren auf IL-25, IL-33 und TSLP (Thymisches stromales Lymphopietin) und produzieren IL-5, IL-4, IL-13, aber auch AREG (Amphiregulin)²⁰ und IL-9³². ILC2s spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Erhaltung alternativ aktivierter Makrophagen, ebenso wie eosinophiler Granulozyten, beispielsweise in viszeralem Fettgewebe durch die Produktion von IL-5 und IL-13³³. Sie fördern die Mucusproduktion, können zu Becherzellhyperplasie in der Lunge führen durch die Produktion von IL-5, IL-13 und IL-9 und zur Migration dendritischer Zellen über IL-9³². Generell sind ILC2s wichtig für die Homöostase von Fettgewebe³⁴, aber auch für die Gewebshomöostase und den Gewebeumbau insgesamt durch die Produktion von Amphiregulin (AREG), eines Mitglieds der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF). Amphiregulin wird beispielsweise nach infektionsbedingten Gewebsschädigungen freigesetzt und trägt zur Reparatur des geschädigten Gewebes bei. Somit spielen ILC2s durch den Umbau extrazellulärer Matrix auch

bei der Wundheilung eine Rolle.³⁵ Aber auch bei der Muskelregeneration kommen ILC2s ins Spiel. Die Stimulation mit IL-4, produziert von eosinophilen Granulozyten, führt im Muskelgewebe zur Differenzierung von FAPs (fibro/adipocyte progenitors) zu Fibroblasten statt zu Adipozyten. Diese unterstützen die Myogenese und damit die Reparatur der Skelettmuskulatur nach Verletzung. Da ILC2s zur Rekrutierung und Aufrechterhaltung eosinophiler Granulozyten beitragen, stellen sie also einen Mediator der Muskelregeneration dar.³⁶ Des Weiteren beeinflussen sie auch die Thermoregulation, da sie zur Induktion der Bildung beigen Fettgewebes beitragen können³⁷.

2.3.3. ILC3

Die letzte Untergruppe, die Typ-3-ILCs, ist vor allem in Schleimhäuten angesiedelt und an der Immunabwehr gegen extrazelluläre Mikroben wie Bakterien und Pilze beteiligt²⁰. Im Gastrointestinaltrakt spielen sie eine wichtige Rolle beim Erhalt der Darmflora³⁸⁻⁴⁰. ILC3s reagieren auf IL-23 und IL-1 β und produzieren IL-17 und IL-22. Demnach ähneln sie in ihrer Immunantwort den TH17 T-Helferzellen. Darüber hinaus produzieren ILC3s auf Stimulation mit IL-1 β hin GM-CSF, einen hämatopoetischen Wachstumsfaktor, der unter anderem für das epitheliale Überleben von Bedeutung ist, aber auch für die Differenzierung myeloider Zellen.²² Da IL-1 β z. B. von intestinalen Makrophagen bei der Erkennung kommensaler Bakterien produziert wird, besteht ein wechselseitiger Einfluss zwischen ILC3s und der Darmflora. GM-CSF wirkt je nach Kontext sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch, interagiert mit dendritischen Zellen und Makrophagen und beeinflusst die Bildung regulatorischer T-Zellen.^{39,41-43}

Die proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-22 und IL-17 induzieren in Epithelzellen die Produktion antimikrobieller Peptide wie das β -Defensin-2, beeinflussen die Zytokinausschüttung von Epithelzellen und Fibroblasten⁴⁴ und bewirken durch Chemokine die Migration neutrophiler Granulozyten⁴⁵. Insgesamt führen sie also auch zur Phagozytose von Pathogenen³⁹. Auch führt die IL-22-Produktion zur erhöhten Proliferation intestinaler Stammzellen¹⁶. Dadurch wird die Epithelregeneration gefördert, beispielsweise im Falle der Graft-versus-host Krankheit oder im Zuge von Epithelschäden durch Chemotherapien⁴⁶⁻⁴⁸.

Durch die Stärkung der Epithelzellen unterstützen die ILC3s die Barriere gegen eindringende Mikroben und durch die synergistische Wirkung von IL-22 und Interferon- γ auch die virale Abwehr. Sie können dadurch also auch vor Gewebsschäden schützen, z.B. bei einer Rotavirusinfektion.⁴⁹ Darüber hinaus trägt IL-22 zur Mucusproduktion im Darm bei und wirkt dadurch protektiv auf die Darmschleimhaut bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen⁵⁰. Insgesamt spielen ILC3s demnach eine wichtige Rolle bei der Homöostase der Darmschleimhaut- und Flora. Nicht alle ILC3s tun dies jedoch in gleichem Maße. Ihre Funktion hängt auch vom Subtyp ab. So können humane ILC3s danach unterteilt werden, ob sie z.B.

den Rezeptor für NKp44 exprimieren oder nicht. Dies ist ein Rezeptorprotein aus der Gruppe der natürlichen cytotoxischen Rezeptoren (NCRs). Im Mausmodell wird analog dazu nach der Expression von NKp46 unterteilt. NCR-negative ILC3s exprimieren MHC-II stärker als NCR⁺-ILC3s, tragen also stärker zur Prozessierung und Präsentation von Antigenen bei und beeinflussen dadurch CD4⁺-T-Zellen, wodurch eine überschüssige Immunantwort auf Antigene im Darm reduziert wird. Damit beeinflussen ILC3s das adaptive Immunsystem und das auch unabhängig von ihrer Zytokinausschüttung.³⁸ Die wichtigsten Funktionen der drei ILC-Typen samt Gewebssignalen und Effektor-Zytokinen sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

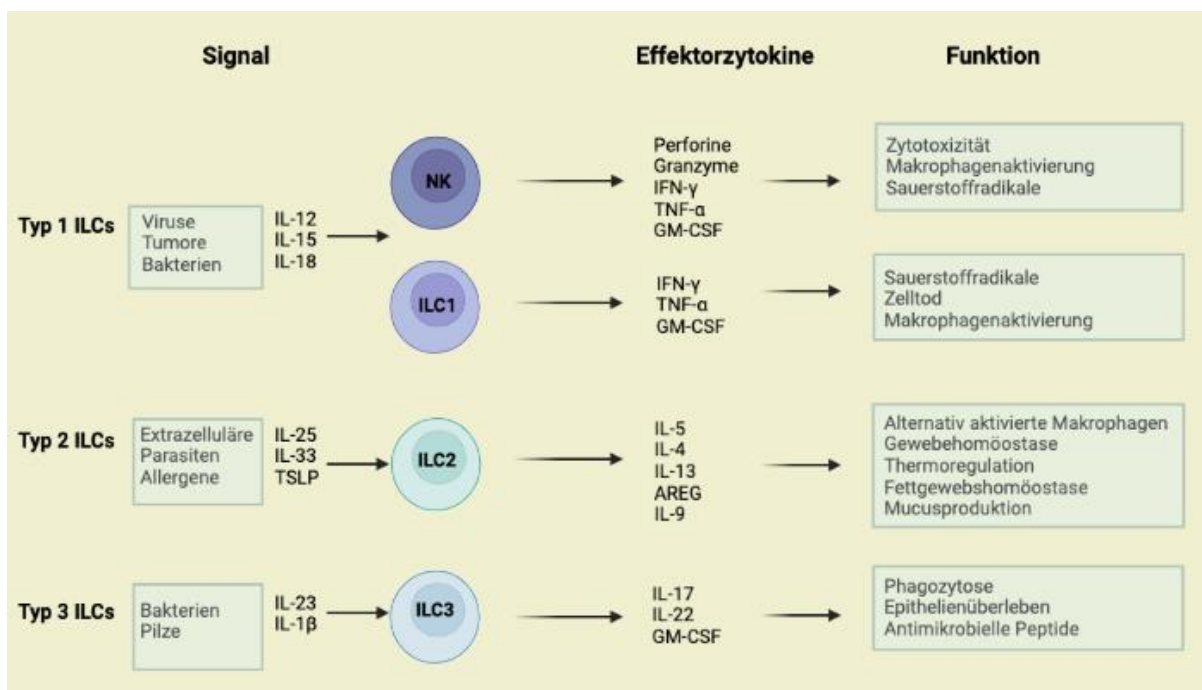


Abbildung 1: Aktivierende Gewebssimpulse und Funktionen der ILCs. (Abbildung verändert nach Eberl, 2015; erstellt mit BioRender.com) Die Abbildung zeigt die Pathogene und konkreten Zytokine, auf die die ILC-Typen reagieren, sowie ihre Effektor-Zytokine und welchen Funktionen diese dienen.

2.4. Bedeutung der ILCs für den menschlichen Körper

Wie man sieht, erfüllen ILCs vielfältige Funktionen. So sind sie in unterschiedlichen Vorgängen im Körper integriert. Auch sind sie nicht losgelöst von endogenen oder exogenen Einflüssen wie dem Mikromilieu oder dem Nährstoffangebot. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind ILCs nicht nur an der Immunabwehr beteiligt, sondern können auch, z. B. durch überschießende Zytokin-Produktion, zur Pathogenese oder Exazerbation von Krankheiten beitragen. Im nächsten Teil wird die Bedeutung der ILCs in verschiedenen Kontexten

beleuchtet: sowohl ihre Beteiligung an homöostatischen Vorgängen, wie sie mit anderen Zellen in Wechselwirkung stehen, als auch wie sie mit verschiedenen Pathologien zusammenhängen. Im Zuge dessen wird auch ihr Potenzial als mögliches therapeutisches Ziel dargelegt.

2.4.1. ILCs und Pathologien

Wie in den vorherigen Punkten schon angeschnitten wurde, können ILC-Funktionen Einfluss auf Krankheitsverläufe nehmen. Nun werden einige, konkrete Beispiele für den Zusammenhang zwischen ILCs und bestimmten Krankheitsbildern angeführt.

Wo das Immunsystem wirkt, können auch Autoimmunkrankheiten entstehen. NK-Zellen unter anderem können zur Entstehung bzw. zu Schüben dieser beitragen, wie im Falle des systemischen Lupus erythematosus oder der autoimmunen Hepatitis. Aber ihr Einfluss ist nicht nur zwangsläufig krankheitstreibend. Je nach Subtyp und Mikromilieu können NK-Zellen auch protektive Eigenschaften im Rahmen von Autoimmunkrankheiten aufweisen, indem sie z. B. inhibierend auf autoreaktive T-Zellen wirken können.²⁹

Die andere Typ 1 ILC-Subgruppe, die ILC1s, ist mit der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung assoziiert. Ein erhöhtes Vorkommen an ILC1s geht bei COPD-Patienten mit einer erhöhten Krankheitsstärke und Wahrscheinlichkeit für Exazerbationen einher.⁵¹ Die erhöhte Produktion von Typ-1-Zytokinen durch ILC1s, aber auch durch NK-Zellen, führt zu einer verstärkten Entzündungsreaktion auf Virusinfektionen bei COPD. Dies wird durch Nikotinabusus weiterhin verstärkt.⁵² Dies ist nicht nur ein Beispiel für die Beteiligung der ILC1s an der Pathogenese der COPD, sondern auch für den Einfluss von Umweltfaktoren wie Noxen auf ILCs und ihre Funktionen. Weiterhin konnte am Mausmodell die Bedeutung der ILC1s für die Immunantwort im Rahmen der kutanen Leishmaniose gezeigt werden: dabei stand die IFN- γ -Produktion der ILC1s insbesondere im frühen Infektionsstadium der murinen Haut mit *Leishmania major* im Zusammenhang mit einer besseren Pathogenkontrolle und umgekehrt war ein geringeres ILC1-Vorkommen in der Haut mit einer höheren Pathogenlast und mit größeren Hautläsionen vergesellschaftet.⁵³

ILC2s spielen, wie schon erwähnt, eine entscheidende Rolle bei der Abwehr parasitärer Wurminfektionen. Im Rahmen von Helminthen-Infektionen wird eine Typ 2 Immunantwort ausgelöst, die unter anderem von ILC2s getrieben wird. Dabei produzieren bestimmte Epithelzellen der Darmschleimhaut IL-25, welches ILC2s aktiviert und die Produktion von IL-13 induziert. Dies führt zu einem Gewebeumbau der Schleimhaut, da IL-13 die Progenitorzellen des Epithels zugunsten der Differenzierung zu Becherzellen und IL-25 produzierenden Zellen beeinflusst. Wenn ein solcher Gewebeumbau in der Darmschleimhaut möglich ist, so wirft das die Frage auf, ob das auch an anderen epithelialen Barrieren der Fall

sein könnte.⁵⁴ Neben IL-13 sind auch IL-9 und IL-5 in der Lage, die Genexpression von Genen in Epithelzellen zu induzieren, die an der Ausschleusung von Parasiten beteiligt sind⁵⁵.

Des Weiteren sind ILC2s durch ihre IL-5- und IL-13-Produktion für den Metabolismus von Bedeutung. Die genannten Zytokine stimulieren Eosinophile in viszeralem Fettgewebe und tragen zum Erhalt alternativ aktivierter Makrophagen bei. Eine Beeinträchtigung der ILC2s und damit der IL-5 Produktion führt im Tiermodell zu erhöhter Insulinresistenz und Adipositas.³³ Unter Adipositas kommt es zusätzlich zur Akkumulation von NK-Zellen in viszeralem Fettgewebe, die zur Ansammlung proinflammatorischer Makrophagen und zur Produktion von Interferon- γ beitragen. Die folgende, chronische Entzündung führt zur Entwicklung einer Insulinresistenz.⁵⁶ Darüber hinaus konnte im Mausmodell der multiplen Sklerose eine ILC2-Defizienz mit einer höheren Krankheitsanfälligkeit in Verbindung gebracht werden. So könnte die TH2-Antwort, die durch ILC2s unterstützt wird und wichtige T-Zell-Antworten regulieren kann, eine Rolle bei der Entwicklung der MS spielen.⁵⁷

ILC2s stehen überdies mit allergischen Erkrankungen im Zusammenhang. Sie verstärken nämlich durch Antigenpräsentation über MHC-II die TH-2-T-Zellantwort.¹⁸ Aber auch über die Produktion von IL-13, das in der Lunge dazu führen kann, dass dendritische Zellen in Lymphknoten migrieren und dort die Differenzierung von TH-2-Zellen induzieren, tragen ILC2s zu einer insgesamt höheren Typ-2-Immunantwort bei. Dadurch scheinen ILC2s auch an der Entwicklung allergischer Reaktionen beteiligt zu sein, etwa bei der Entwicklung einer allergischen Lungenentzündung durch Papain oder auch bei der Entstehung von allergischem Asthma.⁵⁸⁻⁶⁰ Weiterhin sind ILC2s in nasalen Polypen von Patienten mit Rhinosinusitis angereichert, was für eine Mitwirkung dieser Zellen als Produzenten von IL-13 und IL-5 an der Erkrankung spricht.^{61,62}

Zuletzt gibt es auch Anhaltspunkte für die Mitwirkung von ILC3s an bestimmten Krankheitsbildern. ILC3s sind, wie beschrieben, für die Homöostase der Darmflora von Bedeutung. Ein Ungleichgewicht dieser ist wiederum mit zahlreichen anderen Krankheiten wie z. B. Diabetes assoziiert, wodurch ILC3s indirekt, über die Wechselwirkungen mit dem Mikrobiom, Einfluss auf die Krankheitsverläufe haben können.¹⁷ Da GM-CSF als Therapie bei Morbus Crohn die Symptome von Patienten lindert⁶³, könnten ILC3s als GM-CSF Produzenten eine Rolle beim Verlauf dieser Krankheit spielen. Aber auch die Produktion von TNF durch Subtyp-1-ILCs⁴² könnte hier von Bedeutung sein.

Im Rahmen von Krebserkrankungen kann IL-22, das unter anderem von ILC3s produziert wird, sowohl positive als auch negative Effekte haben. So kann es intestinale Entzündungen eindämmen, die sonst zur Entwicklung kolorektaler Tumore führen könnten, gleichzeitig aber auch zum Voranschreiten solcher Tumore beitragen durch seine proliferationsfördernden, aber auch teilweise proinflammatorischen Eigenschaften.^{50,64} Aber auch in anderen Organen kann IL-22 mit der Entwicklung von Tumoren vergesellschaftet sein, wie z. B. im Pankreas, wo hohe

Spiegel an IL-22 und seinem Rezeptor bei duktalem Adenokarzinomen des Pankreas mit einer schlechten Prognose korrelieren⁶⁵. So verschwimmt die Grenze zwischen der Bedeutung der ILCs für die Gewebemöostase und ihrem potenziellen Beitrag zur Tumorphogenese.

Man sieht also, dass ILCs mit einer Reihe von Pathologien assoziiert sind.

2.4.2. ILCs in der Haut

Neben systemischen Erkrankungen unterliegen auch Erkrankungen mit Hautbeteiligung dem Einfluss der ILCs. Als größtenteils gewebsresidente Zellen kommen ILCs nämlich auch in der Haut vor. Die meisten ILCs exprimieren dabei den Skin-homing-Rezeptor CLA (cutaneous lymphocyte antigen)⁶⁶. So wurde für die ILC2s z.B. die Expression des CLA festgestellt.

Bei atopischer Dermatitis kommen ILC2s vermehrt in den betroffenen Hautarealen vor und schüren durch ihre Zytokinproduktion die entzündliche Reaktion.^{67,68} Dies könnte durch eine erhöhte IL-33-Produktion durch Keratinozyten in der Haut erklärt werden, durch welche ILC2s vermehrt aktiviert werden und dann Typ-2-Zytokine wie IL-5 produzieren, das Eosinophile rekrutiert.⁶⁹ Im Mausmodell wurden dadurch allein atopische-Dermatitis-ähnliche Symptome hervorgerufen.⁷⁰

ILC3s exprimieren ebenfalls CLA und scheinen an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt zu sein. So sind insbesondere NKp44⁺-ILC3s im Blut, aber auch in der nicht von Läsionen betroffenen Haut von Psoriasis-Patienten erhöht im Vergleich zu gesunden Personen. Sie könnten durch die Aktivierung von T-Zellen zur Bildung eines Psoriasis-Plaques beitragen.⁷¹ Gleichzeitig sind ILC3s Produzenten des IL-17A und IL-22, die für die inflammatorische Reaktion und Pathogenese der Schuppenflechte wichtig sind. So könnten ILC3s auch durch ihre Zytokinproduktion direkt am Krankheitsverlauf mitwirken.⁷² Während die TH17-Immunabwehr nämlich zur Krankheitsentwicklung beiträgt, sollen ILC3s (zumindest laut Mausmodell) die Hauptproduzenten der charakteristischen Zytokine sein, nicht unbedingt die TH-17-Zellen.^{73,74}

Aber auch NK-Zellen und ILC1s können bei der Psoriasis von Bedeutung sein. Manche Autoren stellen ebenfalls eine Anreicherung dieser Zellen fest. Ein möglicher Grund für den Zusammenhang könnte die TNF- α -Produktion der Typ-1-ILCs sein. Dieses Zytokin scheint nämlich ebenfalls an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt zu sein, da dessen Blockade therapeutische Wirkung zeigt.⁷⁵⁻⁷⁷ Darüber erfüllen ILCs in der Haut auch andere Funktionen. Wie schon erwähnt sind ILC2s beispielsweise für die Wundheilung wichtig. Aber auch ILC3s scheinen an der Wundheilung der Haut beteiligt zu sein, da sie bei Verletzungen der Dermis rekrutiert werden und die epidermale Proliferation beeinflussen können.⁷⁸ Zudem zeigen die aufgeführten Beispiele, dass alle ILC-Klassen in der Haut vertreten sind und ihren eigenen Anteilen zur Homöostase beitragen.

2.5. Plastizität der ILCs

Wenn man von Subtypen der ILCs und ihren Funktionen spricht, darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Einteilung dieser Grenzen aufweist. Denn obwohl die ILC-Subtypen durch bestimmte Charakteristika voneinander abgetrennt werden, können ILCs derselben Untergruppe wohl unterschiedliche Phänotypen haben, beispielsweise je nach anatomischer Lage. Das heißt, dass Oberflächenmarker teilweise unterschiedlich oft zu finden sind oder auch die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren und Zytokine unterschiedlich stark ausfallen kann. So fand man in Haut-ILC2s beispielsweise höhere Level von ROR α und GATA3 und eine höhere Amphiregulinproduktion als in ILC2s aus dem Blut. Auch der Oberflächenmarker CRTH2 wurde vermehrt in den ILC2s der Haut exprimiert.⁶⁷ Des Weiteren kann es nach einer Helmintheninfektion beispielsweise zu einer Differenzierung von intestinalen ILC2s zu IL-25-produzierenden ILC2s kommen. Diese zirkulieren dann im Blut und können zu entzündeten Bereichen migrieren, anders als residente ILC2s, die auf IL-33 reagieren.^{79,80} ILCs derselben Klasse können auch Gene, die charakteristisch für unterschiedliche Subgruppen sind, gleichzeitig exprimieren und Zytokine, die für andere Subgruppen typisch sind, produzieren. So wurden ILC2s gefunden, die Typ-3-ILC-typische Gene exprimierten und fähig waren IL-17 auszuschütten.⁶⁶ Dies ist ein Hinweis dafür, dass ILCs derselben Subgruppe sich abhängig vom Gewebe, in dem sie resident sind und den Einflüssen, denen sie unterliegen, in ihren Funktionen bzw. ihrer Aktivität unterscheiden können. Auch die Dichte an ILCs und ihre Zusammensetzung kann sich abhängig von der Körperregion unterscheiden.⁶⁷ So fanden einige Autoren eine höhere ILC-Gesamtzahl in der Haut als im Blut⁷¹. Je nach Autor variiert auch der Anteil der einzelnen Gruppen an den Gesamt-ILCs^{71,81}.

Zusätzlich wurde auch eine gewisse Plastizität der Zellen beschrieben. Sie scheinen die Fähigkeit zu besitzen, unter bestimmten Bedingungen ihren Phänotyp bzw. ihre Zytokinproduktion zu verändern.⁶⁶ Dies gestaltet die Trennung der einzelnen Gruppen und ihre Implikationen für bestimmte Krankheitsbilder weniger eindeutig.

NK-Zellen beispielsweise können ILC1-ähnlich werden unter Exposition gegenüber TGF- β ⁸². In vitro konnten sich auch ILC3s, die in IL-2 und IL-12 kultiviert wurden, zu ILC1s differenzieren⁸³. Dies wurde an ILC3s aus dem Intestinaltrakt gezeigt. Aber auch umgekehrt zeigt sich die Umwandlungsfähigkeit, da sich ILC1s auch wieder in ILC3s zurück transformieren können unter Einfluss von IL-2, IL-23, IL-1 β und ROR γ t.⁸⁴ NKp44-negative ILC3s explizit können sich in NKp44⁺-ILC3s umwandeln oder auch in IFN- γ -produzierende ILC1s⁸³. Letztere Fähigkeit wurde auch den ILC2s zugeschrieben. Die Umwandlung kann hierbei durch einen Nikotinabusus induziert werden, wodurch IL-12 vermittelt die GATA-3-Expression in ILC2s herunter reguliert und ein ILC1-ähnlicher Phänotyp angenommen wird,

was die ILC2s in IFN- γ -produzierende Zellen umwandelt.⁵¹ Neben IL-12 ist hier auch der Transkriptionsfaktor T-bet entscheidend⁸⁵.

Dies sind nur einzelne Beispiele für die Plastizität der innatens lymphoiden Zellen. Sie ist noch nicht komplett verstanden, zeigt aber, dass die Einteilung der ILCs in Gruppen nicht endgültig ist und diese Zellen verschiedenen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Je nach Mikromilieu sind Anpassungsmechanismen möglich. Die gezielte Beeinflussung solcher Umweltfaktoren, um die Immunabwehr zugunsten einer bestimmten ILC-Gruppe zu verschieben, stellt die Forschung noch vor Herausforderungen, könnte aber als möglicher Therapieansatz dienen.

2.6. Aktueller Forschungsstand

Das Vorkommen und die Verteilung der ILC-Gruppen in humaner Haut wurden bisher primär im Kontext verschiedener Krankheiten, wie der atopischen Dermatitis, untersucht. Die gesunden Vergleichsproben ergaben dabei unterschiedliche Verteilungen. Insgesamt scheinen ILCs nur einen kleinen Teil der gesamten Lymphozytenpopulation auszumachen. Bei einer Untersuchung zur atopischen Dermatitis ergaben die gesunden Hautproben eine deutliche Dominanz der ILC2s, die ca. zwei Drittel der ILCs in der Haut darstellten, gefolgt von den ILC1s und ILC3s, die ähnlich oft vorkamen. Diese Verteilung war unter atopischen Bedingungen anders, was dafürspricht, dass die ILC-Populationen abhängig vom Mikromilieu bzw. anpassungsfähig an äußere Bedingungen sind.⁶⁶

Eine Untersuchung zu ILCs im Kontext von Akne inversa hingegen fand ein anderes Muster. Dabei zeigten sich die ILC1s mit ca. 63 % als größte ILC-Subgruppe, wohingegen die ILC2s und ILC3s mit jeweils ca. 18 % gleichauf waren.⁸⁶

Die Anteile der ILC-Subgruppen in Prozent an den gesamt-ILCs ausgewählter, bisheriger Untersuchungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Dabei wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht nach NKp-44-Positivität der ILC3s differenziert und die NK-Zellen nicht explizit aufgeführt. Daran sieht man deutlich, wie heterogen die bisherigen Ergebnisse zu kutanen ILCs sind.

Der Einfluss des Geschlechts und des Alters auf ILCs konnte im Mausmodell an pulmonalen ILC2s schon gezeigt werden: Die neugeborenen Mäuse wiesen eine deutlich größere pulmonale ILC-Population auf als erwachsene Mäuse. Zudem fand man in beiden Altersgruppen mehr ILC2s bei den weiblichen Mäusen als bei den männlichen.⁸⁷

Dazu, ob das Geschlecht oder das Alter diese ILC-Populationen in gesunder, humaner Haut beeinflusst, gibt es bisher keine Daten. In peripherem Blut hingegen wurde zumindest ein Alterseffekt festgestellt. Im Blut nahm die ILC2-Population, hier die häufigste ILC-Klasse, von der Kindheit bis zu einem Alter von ca. 30 Jahren ab. Die ILC3s, die zweitgrößte Population, nahmen konstant über die Lebensspanne ab. Die ILC1s waren in allen Altersgruppen die

seltenste ILC-Population und waren in ihrem Anteil an Gesamtlmphozyten über das Alter hinweg stabil.⁸⁸

Ob sich die ILCs in der Haut ähnlich verhalten, bleibt offen. Direkt übertragbar sind die Ergebnisse nicht in Anbetracht dessen, dass schon allein die Distribution der ILC-Subgruppen sich zwischen Blut und Haut unterscheiden kann.^{66,86}

ILC-Subgruppe	Alkon et al.	Petrasca et el.	Villanova et al.
ILC1	ca. 15 %	63,26 %	27 %
ILC2s	ca. 70%	18,27 %	28 %
ILC3	ca. 15%	18,46 %	45 %

Tabelle 2: ILC-Subgruppen-Verteilung in normaler Haut in Prozent von der Gesamt-ILC-Population ausgewählter, bisheriger Untersuchungen. Anteil der ILC1s, ILC2s und ILC3s in Prozent an der Gesamt-ILC-Population in normaler Haut für Alkon et al.⁶⁶, Petrasca et al.⁸⁶ und Villanova et al.⁷¹.

2.7. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Das Vorkommen und die generelle Verteilung der ILC-Klassen in gesunder, humaner Haut sowie der mögliche Einfluss des biologischen Geschlechts und des Alters auf die ILC-Populationen zu erfassen, ist die Zielsetzung dieser Dissertation. Wie schon erwähnt, kommen ILCs unter anderem in der Haut vor und wurden vor allem im Kontext einiger Hautkrankheiten erforscht, weniger bei gesunden Patienten. Somit ist ein Ziel und gleichzeitig eine zentrale Hypothese dieser Arbeit der Nachweis aller ILC-Subtypen in humaner Haut, da nicht in allen vorher erwähnten Untersuchungen konsistent alle Subtypen in der Haut nachgewiesen wurden. Ein weiteres Ziel dabei ist die Verteilung der ILC-Subtypen in menschlicher Haut zu erforschen, da sich die Ergebnisse hierzu bei bisherigen Studien teilweise deutlich unterscheiden (siehe Tabelle 2).

Da sich generell sowohl geschlechts- als auch altersabhängige Unterschiede in der Immunantwort feststellen lassen, liegt es nahe, dass sich diese Unterschiede auch in den ILCs widerspiegeln könnten. So wäre eine mögliche Hypothese, dass die zuvor erwähnte höhere Prävalenz von Autoimmunerkrankungen bei Frauen sich in einer höheren ILC-Zellzahl bei Frauen gegenüber Männern widerspiegeln könnte. Eine weitere Annahme wäre, dass die Gesamtzahl der ILCs mit dem Alter abnehmen sollte, da die Immunantwort im Alter insgesamt abnimmt. Damit ist ein Ziel, zu erforschen, ob Haut-ILCs abhängig vom Geschlecht bzw. Alter unterschiedlich oft vorkommen und ob eine Interaktion zwischen den beiden Variablen besteht. Darüber hinaus wird unabhängig davon auch die Bedeutung der Körperregion miterfasst. Da beispielsweise für Mastzellen Unterschiede in der Zellzahl zwischen peripheren und

proximalen Körperregionen festgestellt wurden⁸⁹, soll kontrolliert werden, ob ein ähnlicher Effekt für ILCs vorliegt.

Weiterhin ist die grundlegende Erforschung der ILCs in humaner Haut allgemein ein wichtiger Schritt, um die Pathogenese verschiedener Hautkrankheiten besser zu verstehen und damit mögliche Therapieansätze dieser aufdecken zu können. So konnte unsere Forschungsgruppe in bisherigen Untersuchungen zeigen, dass ILC1s und NK-Zellen eine wichtige Rolle für die Pathogenlast und Läsionsgröße im Rahmen der kutanen Leishmaniose spielen. ILC1-defiziente Mäuse zeigten dabei durch die geringere IFN- γ -Produktion, insbesondere im frühen Infektionsstadium, eine geringere Krankheitskontrolle und damit ausgeprägtere, kutane Läsionen.⁵³ Diese Ergebnisse in humaner Haut zu verifizieren und damit konsekutiv die Bedeutung der ILC1s für die Immunantwort und ihr Potenzial in der Behandlung der *Leishmania major* Infektion aufzuzeigen stellt ein langfristiges Ziel unserer Forschungsgruppe dar.

Insgesamt soll diese Dissertation also zu einem besseren Verständnis der Homöostase der Haut-ILCs und ihrer Einflussfaktoren beitragen. Dies würde für die weitere Forschung erleichtern, Aussagen über krankheitsbedingte Veränderungen dieser Zellen machen zu können, und stellt somit einen Baustein der Grundlagenforschung dar.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Instrumente

Instrumente	Hersteller
FACS Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gefrierschrank -20°C, economic-froster	Bosch, Gerlingen, Deutschland
gentleMACS™ Octo Dissociator, Kat.: 130-096-427	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, MediLine, Ochsenhausen, Deutschland
Mikroskop Primo Star/ Nikon	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetgirl	INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	PolyScience, Niles, IN, USA
Zentrifuge Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.1.2. Labormaterialien

Einmal-Biopsiestanze 4 mm, Kat.: 48401	pfm medical, Köln, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen (0.2-12.,5; 125; 300; 1250 µl)	INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz

Finnpipette Pipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Finnpipette Pipettenspitzen	VWR International, Darmstadt, Deutschland
gentleMACS™ C Tubes, Kat.: 130096334	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Laborpipettenständer (für 12.5; 125; 300; 1250 µl)	INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (VWR International), Darmstadt, Deutschland
Pipette (5; 10; 25 ml)	CELLSTAR Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Petrischale, Kat. 633180	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen Cellstar® 50ml, Kat.: 227261	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Skalpell	pfm medical, Köln, Deutschland
Zellsieb 70µm	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen 15ml, Kat.: 7696714	THGeyer, Renningen, Deutschland

3.1.3. Reagenzien

Aqua dest.	arium SterilePlus (Sartopore 2 150), Sartorius, Göttingen, Deutschland
Attune Bleach	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Attune Performance Tracking Beads	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Attune Wash solution	Life technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Attune 1X Focusing Fluid	Life technologies by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Attune 1X Shutdown Solution	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
DMEM High Glucose w/ L-Glutamine, w/Sodium Pyruvate	Biowest, Nuaille, Frankreich
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fixable Viability Dye eF780, Kat.: 423105	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution), Kat.:422301	BioLegend, San Diego, CA, USA
PBS Tabletten	Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brilliant Violet 510™ Streptavidin, Kat.: 405234	BioLegend, San Diego, CA, USA
Trypan Blau	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.1.4. Fertig-Sets

AbC Total Antibody Compensation Kit, Kat.: A10497	<ul style="list-style-type: none"> • AbCTM Compensation capture beads • Negative beads 	Total	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Whole Skin Dissociation Kit, human, Kat.: 130-101-540	<ul style="list-style-type: none"> •Enzyme A (lyophilized powder) •Enzyme D (lyophilized powder) •Buffer L 	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland

3.1.5. Lösungen

Lösung	Komposition
1xPBS	1 PBS-Tablette 500ml Aqua dest.
2% FCS-PBS	500ml 1xPBS-Lösung 10ml hiFCS
Antikörper-Mastermix 1	100 µl 1xPBS 1 µl Anti-Fc-Blocker 0,1 µl Fixable Viability Dye
Antikörper-Mastermix 2	100 µl 1xPBS 1 µl Anti-Human CD11b BV711, Konzentration: 100 µg / ml 1 µl Anti-Human CD11c Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml 1 µl Anti-Human CD117 APC, Konzentration: 100 µg / ml 1 µl Anti-Human CD127 (IL-7Rα) PE/Dazzle 594, Konzentration: 100 µg / ml 1 µl Anti-Human CD161 BV421, Konzentration: 100 µg / ml 1 µl Anti-Human CD19 Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml 2 µl Anti-Human CD294(CRTH2) PE, Konzentration: 200 µg / ml 1 µl Anti-Human CD3 Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml 1 µl Anti-Human CD336 (NKp44) PerCP/Cyanine5.5, Konzentration: 50 µg / ml

	1 μ l Anti-Human CD4 Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml
	1 μ l Anti-Human CD45 FITC, Konzentration: 200 μ g / ml
	1 μ l Anti-Human CD56 (NCAM) PE/Cyanine7, Konzentration: 100 μ g / ml
	1 μ l Anti-Human CD8a Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml
	1 μ l Anti-Human Fc ϵ R1 α Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml
	1 μ l Anti-Human TCR α/β Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml
	1 μ l Anti-Human TCR γ/δ Biotin, Konzentration: 0.5 mg / ml
Antikörper-Mastermix 3	100 μ l 1x PBS
	1 μ l Streptavidin BV510, Konzentration: 0.2 mg / mL

3.1.6. Antikörper

Anti-Human CD11b BV711, Klon ICRF44, Isotyp Maus IgG1, κ , Kat.: 301343	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD11c Biotin, Klon Bu15, Isotyp Maus IgG1, κ , Kat.: 337232	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD117 APC, Klon 104D2, Isotyp Maus IgG1, κ , Kat.: 313205	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD127 (IL-7R α) PE/Dazzle 594, Klon A019D5, Isotyp Maus IgG1, κ , Kat.: 351335	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD161 BV421, Klon HP-3G10, Isotyp Maus IgG1, κ , Kat.: 339913	BioLegend, San Diego, CA, USA

Anti-Human CD19 Biotin, Klon HIB19, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 302204	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD294(CRTH2) PE, Klon BM16, Isotyp Rat IgG2b, κ, Kat.: 350105	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD3 Biotin, Klon SK7, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 344820	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD336 (NKp44) PerCP/Cyanine5.5, Klon P44-8, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 325113	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD4 Biotin, Klon SK3, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 344610	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD45 FITC, Klon HI30, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 304005	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD56 (NCAM) PE/Cyanine7, Klon HCD56, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 318317	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD8a Biotin, Klon RPA-T8, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 301003	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human FcεR1α Biotin, Klon AER-37 (CRA-1), Isotyp Maus IgG2b, κ, Kat.:	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human TCR α/β Biotin, Klon IP26, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 306703	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human TCR γ/ δ Biotin, Klon B1, Isotyp Maus IgG1, κ, Kat.: 331206	BioLegend, San Diego, CA, USA

3.1.7. Software

Microsoft Excel 16.66.1 für Mac	Microsoft, Redmond, WA, USA
FACS Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FlowJo Version 9.9.5	FlowJo™ Software, Ashland, USA
GraphPad Prism Version 9.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA

3.1.8. Hautproben

Die humanen Hautproben wurden bei Operationen der Dermatologie und plastischen Chirurgie der Universitätsklinik Köln, sowie bei Zirkumzisionen in einer Kinderchirurgie-Praxis gewonnen. Dabei handelte es sich um Gewebereste, die ansonsten verworfen worden wären. Daher wurden keine Hautproben spezifisch für die Studie entnommen. Die Verwendung der Hautproben wurde durch die Ethikkommission genehmigt (Aktenzeichen: 19-1484_2). Es wurden nur gesunde Hautreste verwertet; eine Probe besteht immer aus Epidermis und Dermis. Zur Ausstanzung wurden 4-mm-Einmalbiopsiestanzen verwendet. Insgesamt umfasst die Stichprobe 44 Hautspenden von 23 Frauen und 21 Männern zwischen zwei und 85 Jahren, die zwischen 2020 und 2022 gesammelt wurden. Mit allen Teilnehmenden oder ihren gesetzlichen Vormündern wurde ein Aufklärungsgespräch geführt und die schriftliche Einwilligungserklärung zu BioMaSOTA (Biologische Material Sammlung zur Optimierung Therapeutischer Ansätze), also zur Spende biologischen Materials, eingeholt. Die Proben wurden getrennt nach Geschlecht und Alter untersucht (*siehe Tabelle 2*). Auch wurde die Körperregion, aus der die einzelnen Hautproben stammen, dokumentiert und angelehnt an Weber et al. (2003) nach vier Regionen aufgeteilt: Rumpf (n = 15), proximale Extremitäten (n = 8), distale Extremitäten (n = 14) und Kopf (n = 7).

Alter	Frauen	Männer	Σ
<40	3	10	13
40-70	12	6	18
>70	8	5	13
Σ	23	21	44

Tabelle 3: Probenverteilung. Darstellung der Stichprobenverteilung getrennt nach Alter und Geschlecht, sowie summiert (Σ). Zu sehen ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Gruppen.

3.2. Methode

3.2.1. Probenverarbeitung und Zellisolation

Zur Aufbewahrung bzw. für den Transport der Hautproben wurden den OP-Sälen 15-ml-Röhrchen mit jeweils 10 ml steriler 1xPBS-Lösung bereitgestellt. Die Hautproben wurden gekühlt gelagert und möglichst zeitnah nach Erhalt verarbeitet.

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank, daher wurde diese vor Beginn der Versuche mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Alle Materialien, die in die Sterilbank eingebracht wurden, wurden ebenfalls desinfiziert. Zur Extraktion der ILCs aus der Haut und zur Gewinnung einer

Einzelzellsuspension wurde das Enzymset „Skin dissociation Kit, human“ von Miltenyi Biotec verwendet. Vorbereitend wurden die zwei Enzyme A und D aus dem fertigen Enzymset nach Herstellerangaben mittels Puffer-L aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Demnach setzte sich die Verdau-Lösung für die Hautproben aus jeweils 435 µl Puffer L, 100 µl Enzym D und 2,5 µl Enzym A pro 4-mm-Hautstanze zusammen und wurde kurz vor Gebrauch angefertigt. Die genannten Komponenten wurden aufgetaut und in einem Miltenyi gentleMACS™ C-Röhrchen vermischt. Nach Fertigstellung der Verdau-Lösung wurde die Haut aus dem Aufbewahrungsröhrchen in eine Petrischale mit frischer 1xPBS-Lösung überführt und mithilfe eines Skalpell von Fettgewebe befreit. Die bearbeitete Haut wurde mithilfe einer 4-mm-Biopsiestanze in eine oder mehrere Proben geschnitten, nochmals mit dem Skalpell zerkleinert, um den Verdau zu erleichtern, und in eine entsprechende Menge Verdau-Lösung ins gentleMACS™-Röhrchen gegeben. Die Probe wurde im verschlossenen Röhrchen für mindestens drei Stunden oder über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Verdau-Reaktion durch Zugabe eines Milliliters 10%iger FCS-DMEM-Lösung abgestoppt. Anschließend wurde die Hautprobe im gentleMACS™ Dissociator mittels des Programms „h_skin“ homogenisiert. Die entstandene Zellsuspension wurde durch einen 70-µm-Filter in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Das zuvor benutzte gentleMACS™-Röhrchen wurde mit weiteren 4 ml 10%iger FCS-DMEM-Lösung ausgewaschen und diese ebenso durch das Zellsieb in das 50-ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Die 5 ml Zelllösung wurde dann bei 300 g, 4 °C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer 1-ml-Pipette abgesaugt und gesondert verworfen. Der Bodensatz wurde in einem Milliliter 1xPBS resuspendiert und in ein 1,5-ml-Eppendorfer-Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde bis zum nächsten Schritt auf Eis gestellt.

3.2.2. Zellzählung

Vor der Weiterverarbeitung wurden 10 µl dieser Zelllösung entnommen und mit 10 µl Trypanblau in einem Verhältnis von 1:2 vermischt. Zur Zellzählung wurde die Neubauer-Kammer verwendet. Dazu wurde das Deckgläschen fachgerecht auf die Kammer gelegt, sodass die Newtonschen Ringe zu sehen waren und jeweils 10 µl der Zell-/Trypanblau-Lösung in eine Kammer pipettiert wurde. Danach wurden die Trypanblau-negativen, also noch lebenden Zellen unterm Mikroskop mittels der Neubauer-Kammer gezählt (*siehe Abbildung 2*) und die gesamte Zellzahl für die Hautprobe daraufhin errechnet. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde dabei zunächst für einen Quadranten (*rot umkreist, links oben in Abbildung 2*) ausgezählt. Für Zellen, die sich auf den Grenzlinien der kleineren Quadranten befinden, muss man sich jeweils für eine Linie rechts oder links und oben oder unten entscheiden. In diesem Fall wurden die Zellen auf der linken und oberen Begrenzung dem kleinen Quadranten zugeordnet, wie rechts oben in rot (*Abb. 2*) dargestellt. Um die Zellzahl pro ml zu errechnen,

wird die Anzahl der Zellen in den vier großen Quadranten durch die Anzahl der Quadranten geteilt, mit der Verdünnung durch Trypanblau multipliziert, was in diesem Fall zwei war, dann mit dem Kammerfaktor 10^4 und mit dem Gesamtvolumen (1) multipliziert.

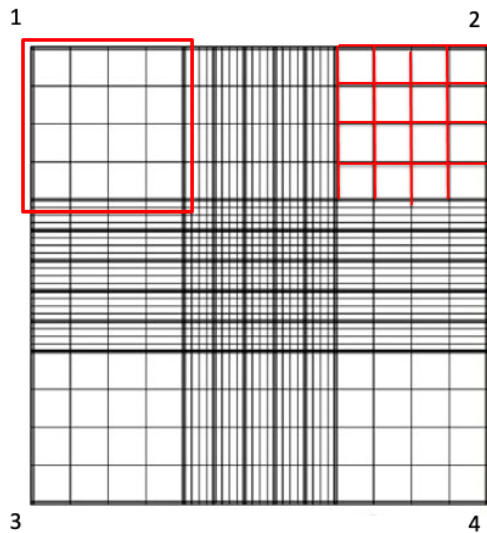


Abbildung 2: Neubauer-Zählkammer. Verändert nach <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>. Die vier Quadranten sind nummeriert, Quadrant 1 rot umkreist. Rechts in rot sind die Grenzen gezeigt, die bei den kleinen Quadranten jeweils mitgezählt werden.

3.2.3. Zellfärbung

Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden drei Antikörper-Mastermixe für die spätere Färbung angemischt. Beim Erstellen wurde jeder Antikörperbehälter vor der Benutzung vortexed und kurz abzentrifugiert. Für den ersten Antikörper-Mastermix wurden $1 \mu\text{l}$ eines Fc-Rezeptor-Blockers in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 und $0,1 \mu\text{l}$ Fixable Viability Dye, einem Lebend-/Tot-Marker, in einem Verhältnis von 1:1000 in $100 \mu\text{l}$ 1xPBS gelöst. Der zweite Mastermix enthielt alle Biotin- und Fluorophor-konjugierten Antikörper. Das Verdünnungsverhältnis war für alle 1:100, außer für den CRTH2-Antikörper, der im Verhältnis 1:50 gemischt wurde. Also kamen $2 \mu\text{l}$ anti-CRTH2 und jeweils $1 \mu\text{l}$ der anderen Antikörper zu $100 \mu\text{l}$ 2%igem FCS-PBS. Der dritte Mastermix bestand aus $1 \mu\text{l}$ Streptavidin BV510 in $100 \mu\text{l}$ 2%igem FCS-PBS (1:100 Verdünnung). Dieses bindet an Biotin und damit an die Biotin-konjugierten Antikörper. Alle Antikörpermischungen wurden bis zum Gebrauch lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die auf Eis gestellte Zellsuspension wurde während des Zählvorgangs bei 4000 g , 8°C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand der zentrifugierten Zellen wurde verworfen und dann mit dem ersten Mastermix resuspendiert und unter Lichtschutz für 45 Min. bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach 45 Min. wurde die Färbung durch Zugabe von 1 ml 2%igem FCS-PBS

abgestoppt und erneut bei 4000 g, 8 °C für 10 Min. zentrifugiert. Nach Abwurf des Überstandes wurde der entstandene Bodensatz mit dem zweiten Mastermix in Suspension gebracht und wieder abgedunkelt für 30 Min. in den Kühlschrank gestellt. Die Färbung wurde erneut mit 1 ml 2%igem FCS-PBS gestoppt, das Ganze bei 4000 g, 8 °C für 10 Min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit dem letzten Mastermix resuspendiert. Die Inkubation erfolgte 20 Min. lang abgedunkelt bei 4°C im Kühlschrank. Die Färbung wird mit einem Milliliter 2% FCS PBS abgestoppt und wie vorher zentrifugiert, wobei der Überstand nach der Zentrifugation verworfen wurde.

3.2.4. FACS

Der übrig gebliebene Bodensatz wurde in 200 µl FCS-PBS aufgenommen, mit 250 µl Focusing Fluid verdünnt und in ein FACS-Röhrchen überführt. Schließlich wurde die Probe in das FACS eingelesen und die Messungen des Durchflusszytometers als „Facs-File“ exportiert.

Für alle Proben wurde dieselbe Kompensation verwendet, die mittels Kompensationsperlen des „AbC Total Antibody Compensation Kit“ von Thermo Fisher Scientific ermittelt wurde, sodass eine möglichst geringe Interferenz der Farbstoffe mit anderen Laserkanälen erzielt wurde. Die Kanäle des Durchflusszytometers mit ihren Wellenlängen und den entsprechenden Fluorophoren, die in sie hineinstrahlen, sind in Abbildung 4 dargestellt.

Attune Kanal		Wellenlänge		Fluorophor	ILC-Marker	Verdünnung
BL1	blau	488 nm	530/30	FITC	CD45	100
			590/40			
BL3			695/40	PerCP-Cy5.5	NKp44	100
YL1	gelb-grün	561 nm	585/16	PE	CRTH2	50
YL2			620/15	PE-TR/PE-Dazzle594	CD127	100
			695/40	PE-Cy5.5		
YL4			780/60	PE/Cy7	CD56	100
RL1	rot	637 nm	670/14	APC	CD117	100
RL2			720/30	Alexa700		
RL3			780/60	APC-Cy7	Viability Dye	1000
VL1	violett	405 nm	440/50	BV421	CD161	100
VL2			512/25	Amcyan/BV510	lineage	100
			603/48	BV605		
VL4			710/50	BV711	CD11b	100

Abbildung 3: FACS-Kanäle. Die Abbildung zeigt die Laserkanäle des FACS und die Wellenlängen, die in sie hineinstreuen. Daneben sind die Fluorophore der jeweiligen Wellenlängen aufgeführt, die ILC-Marker, mit denen die Fluorophore konjugiert sind, sowie die eingesetzte Verdünnung.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit FlowJo Version 9.9.5 und die Populationen der entsprechenden Zelllinien wurden anhand ihrer Oberflächenmarker

bestimmt. Das *Gating* in FlowJo, also die Bestimmung der Populationsgrenzen der untersuchten Zellen, erfolgte in Anlehnung an die Strategie von Villanova et al.⁷¹ und war für alle Proben gleich (*siehe Abbildung 6*). Dabei wurde grundsätzlich bei einem Vorkommen in Höhe der dritten Potenz das Vorkommen eines Oberflächenmarkers als positiv gewertet. Je nach Verteilung der Zellen im Punktwolkendiagramm wurden die Grenzen des Gatings angepasst, sodass sie die dichtesten Zellansammlungen als wahrscheinlichste Zellpopulation eingegrenzt wurden, wie dies auch in anderen Untersuchungen zu ILCs der Fall war.^{71,86} Abbildung 5 zeigt die für die Identifizierung verwendeten Oberflächenmarker der einzelnen ILCs.^{16,71}

NK-Zellen	Lebensfähige Lin- CD45+	CD127+/-	CD161+/-	CRTH2-	CD117-	NKp44-	CD56+
ILC1	Lebensfähige Lin- CD45+	CD127+	CD161+	CRTH2-	CD117-	NKp44-	CD56-
ILC2	Lebensfähige Lin- CD45+	CD127+	CD161+	CRTH2+	CD117+/-	NKp44-	CD56-
NKp44+ ILC3	Lebensfähige Lin- CD45+	CD127+	CD161+	CRTH2-	CD117+	NKp44+	CD56+/-
NKp44- ILC3	Lebensfähige Lin- CD45+	CD127+	CD161+	CRTH2-	CD117-	NKp44-	CD56+/-

Abbildung 4: ILC-Oberflächenmarker. Gezeigt sind die Oberflächenmarker, nach denen die Populationen bei der Durchflusszytometrie bestimmt wurden. Ein Plus steht für das Vorhandensein, ein Minus für das Fehlen eines Markers. Lin-, Zellliniennegativ.

In Abbildung 5 ist die *Gating* Strategie beispielhaft an einer jungen, weiblichen Probe dargestellt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1. Zunächst wurden beim *Gating* Dubletten ausgeschlossen, indem die Zellen nach Seitenstreulicht (Side Scatter Area, SSC-A) und vorwärts gestreutem Licht (Forward Scatter Area, FSC-A) und nach der Breite des gestreuten Lichtes (FSC-W, Forward Scatter Width) aufgetragen wurden (*Abbildung 5, die ersten zwei Diagramme*).
2. ILCs werden als lebensfähige, CD45-positive und zellliniennegative Zellen charakterisiert. Die Zelllinienmarker (Lin.) sind charakteristisch für andere Leukozytenpopulationen⁸¹ und werden daher ausgeschlossen (*Abbildung 5, drittes Diagramm*). Sie umfassen die Oberflächenmarker CD3, CD19, CD8, CD4, FcεR1, CD11c, TCRγδ und TCRαβ.^{16,71,81}
3. Alle lebenden, CD45⁺ Zellen, also alle Leukozyten, wurden rausgesucht und danach getrennt, ob sie positiv für Zelllinienmarker und CD127 sind. (*Abbildung 5, viertes Diagramm*)

4. Die zellliniennegativen und CD127-positiven Zellen wurden dann nach ihrer Expression des CD161 unterteilt (*Abbildung 5, fünftes Diagramm*)
5. Die Lin⁻, CD127⁺, CD161⁺-Population wurde aufgeteilt in CRTH2-positive und negative Zellen (*Abbildung 5, sechstes Diagramm*).
6. Die Lin⁻, CD127⁺, CD161⁺, CRTH2⁺, CD117^{+/-}-Population entspricht den ILC2s (*Abbildung 5, siebtes Diagramm*).
7. Die CRTH2-negative Population wurde auf CD117- und NKp44-Vorkommen untersucht. Die Lin⁻, CD127⁺, CD161⁺, CRTH2⁻, CD117⁺-Population wurde nach Fehlen bzw. Vorhandensein des NKp44 aufgeteilt und entsprach damit den NKp44⁻-ILC3s und NKp44⁺-ILC3s (*Abbildung 5, achtes Diagramm*).
8. Die Lin⁻, CD127⁺, CD161⁺, CRTH2⁻, CD117⁻-Population hingegen wurde nach dem Vorkommen des CD56 unterteilt (*Abbildung 5, neuntes Diagramm*). Die CD56-negative Population repräsentiert dabei die ILC1s (Lin⁻, CD127⁺, CD161⁺, CRTH2⁻, CD117⁻, NKp44⁻, CD56⁻). CD56-positive Zellen entsprechen in diesem Schritt den NK-Zellen. Das ist die Lin⁻, CD127⁺, CD161⁺, CRTH2⁻, CD117⁻, NKp44⁻, CD56⁺-NK-Zellpopulation. Da den NK-Zellen aber, wie aus *Abbildung 4* hervor geht, die Marker CD127 und CD161 auch fehlen können, zweigt die Ermittlung der NK-Zellpopulation schon bei den Lin-negativen Zellen (*Abbildung 5, das größere Gate im vierten Diagramm*) ab und wird aus der Lin⁻, CD127^{+/-}-Population bestimmt. NK-Zellen sind damit Lin⁻, CD127^{+/-}, CD161^{+/-}, CRTH2⁻, CD117⁻, NKp44⁻, CD56⁺-Zellen.

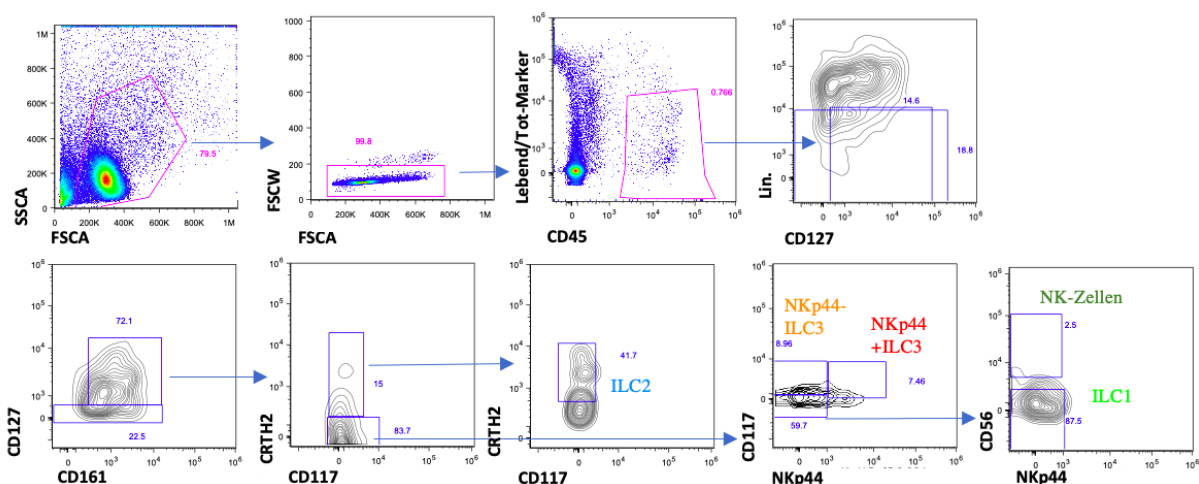


Abbildung 5: Gating-Strategie für ILCs in gesunder, humaner Haut. Repräsentative Gating-Strategie für humane ILCs. ILCs wurden als CD45⁺, Zelllinien-negative (CD3, CD19, CD8, CD4, FcεR1, CD11c, TCR $\gamma\delta$ und TCR $\alpha\beta$) Zellen charakterisiert. (FSCA, Forward Scatter Area; FSCW, Forward Scatter Width; SSCA, Side Scatter Area, Lin.; Zelllinien-Marker)

3.2.5. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Zellzahlen wurde von FlowJo in Excel übertragen. Die totalen Zellzahlen wurden dabei immer pro 8-mm-Stanzbiopsie berechnet. Die deskriptive Statistik umfasste das Minimum und Maximum, das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und den Standardfehler. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mittels Prism 9.0. Um die Ergebnisse auszuwerten, wurden aufgrund der fehlenden Normalverteilung non-parametrische Verfahren gewählt: Für Vergleiche zwischen zwei unabhängigen Gruppen der Mann-Whitney-U-Test und für Vergleiche zwischen mehr als zwei unabhängigen Gruppen der Kruskal-Wallis-Test. Anschließend paarweise Vergleiche der einzelnen Gruppen erfolgten aufgrund der explorativen Natur der Arbeit mittels unkorrigiertem Dunn's-Test für multiple Vergleiche. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse für alle Proben in totalen Zellzahlen, immer bezogen auf eine 8-mm-Stanzbiopsie, dargestellt. In Klammern werden das arithmetische Mittel (M) und der Standardfehler angegeben, berechnet aus den totalen Zellzahlen der jeweiligen Gruppe, ebenfalls pro 8-mm-Stanzbiopsie.

4.1. Gesamtzellzahlen der Hautproben

Zunächst sind in Abbildung 6 die totalen Zellzahlen - pro Stanzbiopsie- aller Proben dargestellt. Dabei wurden die Gesamtzellzahlen getrennt nach Alter (*Abbildung 6a*), Geschlecht (*Abbildung 6b*) und beidem in Kombination (*Abbildung 6c*) verglichen und die Unterschiede mittels Mann-Whitney-U-Test für Vergleiche zweier Gruppen und Kruskal-Wallis-Test für multiple Vergleiche auf statistische Signifikanz geprüft.

Die jüngste Altersgruppe ($96,6 \pm 17,3 \times 10^4$) zeigt im Vergleich zu den 40-70-Jährigen ($37,0 \pm 10,6 \times 10^4$) und den über 70-Jährigen ($31,2 \pm 8,8 \times 10^4$) im Durchschnitt höhere Gesamtzellzahlen in den Hautproben (*Abbildung 6a*, $**p < 0,01$).

Im Geschlechtsvergleich weisen die Männer ($74,0 \pm 13,0 \times 10^4$) höhere Gesamtzellzahlen auf als die Frauen ($33,6 \pm 8,8 \times 10^4$) (*Abbildung 6c*, $**p < 0,01$).

Betrachtet man die Zellpopulationen aufgeteilt nach Alter und Geschlecht (*Abbildung 6c*), so verfügen die jungen, männlichen Proben ($116,1 \pm 17,9 \times 10^4$) über die größte Zellpopulation im Vergleich zu allen anderen Gruppen: sie verfügen über mehr lebende Zellen, als die mittelalten ($37,3 \pm 14,9 \times 10^4$, $*p < 0,05$) und alten ($34,1 \pm 10,5 \times 10^4$, $*p < 0,05$) männlichen Proben, wie auch die mittelalten ($36,9 \pm 14,5 \times 10^4$, $**p < 0,05$) und alten ($29,4 \pm 13,3 \times 10^4$, $***p < 0,001$) weiblichen Proben. Nur verglichen mit den jungen, weiblichen Proben ($31,8 \pm 14,9 \times 10^4$) zeigt sich kein signifikanter Unterschied, auch wenn deskriptiv ein Trend zu erkennen ist.

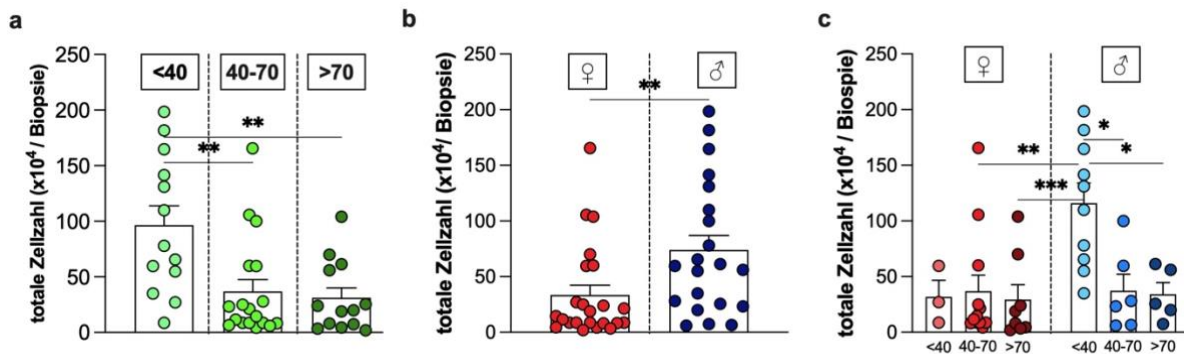


Abbildung 6: Gesamtzellzahlen in den humanen Hautproben. Totale Anzahl an Zellen pro 8-mm-Stanzbiopsie humaner Hautproben (n = 23 Frauen, n = 21 Männer) abhängig vom a) Alter, b) Geschlecht und c) beiden Variablen kombiniert. Die statistische Auswertung erfolgte bei mehr als zwei Gruppen a) c) mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. Der Vergleich der b) Geschlechter erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert \pm SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. (SEM, Standardfehler des Mittelwerts).

4.2. CD45⁺-Zellen in der Haut

Um zu überprüfen, ob die Frequenz der Leukozyten allgemein, sprich der CD45-positiven Zellen, abhängig vom Alter oder Geschlecht variiert und diese potenzielle Schwankungen in den ILCs erklären könnten, wurden die totalen Zellzahlen der CD45⁺ Zellen pro 8-mm-Stanzbiopsie für alle Proben einmal nur nach Alter (*Abbildung 7a*) und einmal nur nach Geschlecht (*Abbildung 7b*) aufgeteilt und mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Tests die Effekte von Alter und Geschlecht auf statistische Signifikanz geprüft. Auch ein kombinierter Effekt von Alter und Geschlecht wurde untersucht (*Abbildung 7c*). Ein alleiniger Effekt des Alters auf CD45-positiv Zellen konnte nicht sicher gezeigt werden. Es scheint, als wäre die Anzahl besagter Zellen in der unter-40-jährigen Gruppe höher ($9,3 \pm 2,1 \times 10^4$) als in den anderen zwei Gruppen ($M(40-70) = 5,5 \pm 1,4 \times 10^4$; $M(>70) = 4,4 \pm 1,0 \times 10^4$). Jedoch erreicht dieser deskriptive Unterschied keine statistische Signifikanz. Das Geschlecht hingegen wies einen signifikanten Einfluss beim zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test auf (*Abbildung 7b*, *p < 0,05); die männlichen Hautproben wiesen mehr CD45⁺-Zellen auf ($6,9 \pm 1,5 \times 10^4$) als die weiblichen ($4,1 \pm 1,5 \times 10^4$). Kombiniert konnte nur innerhalb der jungen Altersgruppe (unter 40) ein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen ($0,6 \pm 0,4 \times 10^4$) und männlichen ($11,9 \pm 2,0 \times 10^4$) Proben festgestellt werden (*Abbildung 7c*, **p < 0,01), mit deutlich mehr CD45⁺-Zellen unter den jungen, männlichen Proben. Innerhalb der weiblichen Proben konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden, deskriptiv scheint die Tendenz mit dem Alter steigend zu sein: die Zellzahlen der jüngsten Gruppe ($M(<40) = 0,6 \pm 0,4 \times 10^4$) waren im Mittel

am geringsten und die der über 70-Jährigen ($M(>70) = 5,6 \pm 3,2 \times 10^4$) am höchsten, während die Gruppe mittleren Alters ($M(40-70) = 4,0 \pm 2,0 \times 10^4$) dazwischen lag.

Die Männer zeigten in ihrer jüngsten Altersgruppe ($6,9 \pm 1,5 \times 10^4$) signifikant mehr CD45⁺-Zellen als in den anderen beiden Altersgruppen (*Abbildung 7c*, $*p < 0,05$), jedoch fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der mittleren ($2,5 \pm 1,4 \times 10^4$) und ältesten ($2,4 \pm 1,2 \times 10^4$) Gruppe.

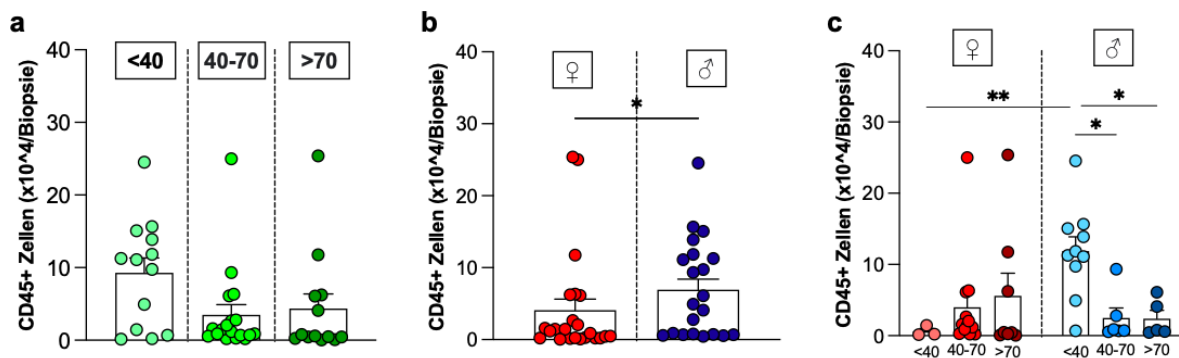


Abbildung 7: CD45⁺-Zellen in humaner Haut. Anzahl an CD45⁺-Zellen pro 8-mm-Stanzbiopsie humaner Hautproben ($n = 23$ Frauen, $n = 21$ Männer) abhängig vom a) Alter, b) Geschlecht und c) beiden Variablen kombiniert. Die statistische Auswertung erfolgte bei mehr als zwei Gruppen a) c) mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. Der Vergleich der b) Geschlechter erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert \pm SEM. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. (SEM, Standardfehler des Mittelwertes).

4.3. ILCs in humaner Haut

Um zu zeigen, dass alle ILC-Klassen in humaner Haut vertreten sind und die Verteilung dieser im gesunden Hautgewebe zu ermitteln, wurden die ILC-Subgruppen für alle Hautproben ($N = 44$) gemeinsam aufgetragen in totaler Zellzahl pro 8-mm-Stanzbiopsie (*Abbildung 8*). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test ($****p < 0,0001$), gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. Dabei waren die ILC2s ($2,0 \pm 1,0 \times 10^3$) und die ILC1s ($0,8 \pm 1,2 \times 10^3$) signifikant häufiger in den Hautproben zu finden als die NK-Zellen ($0,3 \pm 0,1 \times 10^3$; $****p < 0,0001$) und die NKp44⁺-ILC3s ($0,3 \pm 0,1 \times 10^3$; $***p < 0,001$) sowie NKp44⁻-ILC3s ($0,2 \pm 0,1 \times 10^3$; $****p < 0,0001$). Zwischen den ILC2s und ILC1s zeigte sich kein signifikanter Unterschied, auch wenn deskriptiv die ILC2s die größte ILC-Population in der Haut ausmachen. Zwischen den Typ-3-ILCs und den NK-Zellen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Vorkommen ermittelt werden. So kamen also die ILC1s und ILC2s

in den Hautproben signifikant häufiger vor als die NK-Zellen und ILC3s. Alle ILC-Typen waren in der Haut vertreten.

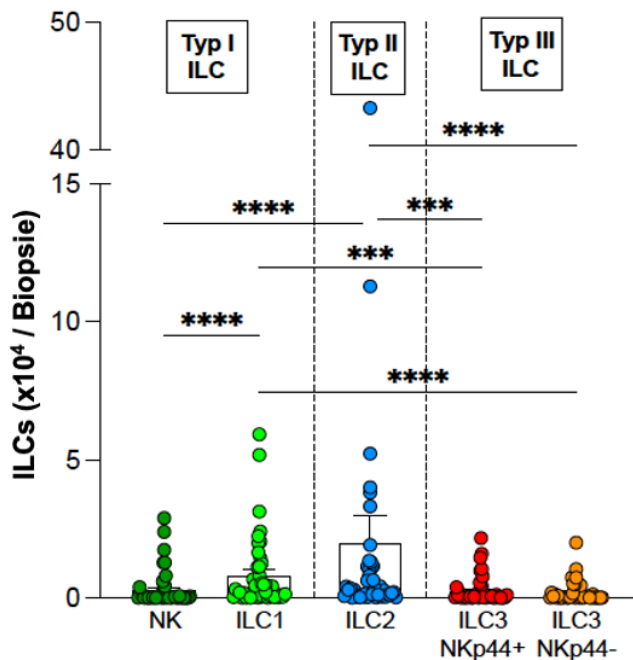


Abbildung 8: ILC Populationen in der Haut. Verteilung der ILC-Typen in allen humanen Hautproben (N = 44) pro 8-mm-Biopsiestanze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test (**p < 0,01), gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert ± SEM. ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

4.3.1. ILCs abhängig vom Alter und Geschlecht

Nachdem alle ILC-Subtypen in der Haut identifiziert werden konnten, wurden die totalen Zellzahlen abhängig vom Alter und Geschlecht mittels Kruskal-Wallis-Test analysiert (*Abbildung 9*). Die Typ-1-ILCs wurden dabei getrennt nach NK-Zellen und ILC1s betrachtet. Bei den NK-Zellen (*Abbildung 9a*) konnte nur bei den männlichen Proben ein Effekt des Alters auf die Zellzahl festgestellt werden; die Haut der unter-40-Jährigen wies signifikant (**p < 0,01) mehr NK-Zellen ($4,9 \pm 1,7 \times 10^2$) auf als die der zwei älteren Gruppen. Zwischen der mittleren ($0,2 \pm 0,1 \times 10^2$) und ältesten ($0,1 \pm 0,1 \times 10^2$) Gruppe konnte kein Unterschied festgestellt werden. Generell waren die Zellzahlen der NK-Zellen in diesen zwei Gruppen sehr gering ausgeprägt. Gleiches gilt für die weiblichen Hautproben; auch hier waren die Populationen sehr klein mit Werten nahe Null bei der jüngsten ($M = 0,1 \pm 0,1 \times 10^2$) und mittleren ($M = 0,2 \pm 0,1 \times 10^2$) Altersgruppe und etwas höheren Werten bei der ältesten Gruppe ($M = 3,8 \pm 3,6 \times 10^2$). Zwischen den Altersstufen konnte bei ihnen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zwischen den weiblichen und männlichen Proben wurde nur bei den unter-

40-Jährigen ein signifikanter Unterschied ermittelt: die jungen, männlichen Proben zeigten eine deutlich größere NK-Zellpopulation als die jungen, weiblichen Proben (**p < 0,01).

Für die ILC1s konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (*Abbildung 9b*), weder zwischen den Geschlechtern noch den verschiedenen Altersstufen. Unter den männlichen Hautproben sieht es so aus, als würden die unter 40-Jährigen eine größere ILC1-Population haben ($15,1 \pm 4,7 \times 10^2$) als die Älteren ($M(40-70) = 3,1 \pm 1,8 \times 10^2$, $M(>70) = 5,4 \pm 3,8 \times 10^2$). Auch ist die totale ILC1-Zellzahl der jungen Männer im Schnitt höher als die der jungen Frauen ($1,9 \pm 1,4 \times 10^2$), aber diese Unterschiede erreichen keine statistische Signifikanz.

Unter den ILC2s konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Effekte des Alters oder Geschlechts ermittelt werden (*Abbildung 9c*). Es sieht so aus, als könne man bei den Frauen mit steigendem Alter auch eine leicht steigende ILC2-Zellzahl beobachten, wobei die unter-40-Jährigen ($M = 0,1 \pm 0,1 \times 10^3$) und 40- bis 70-Jährigen ($M = 0,8 \pm 0,4 \times 10^3$) jeweils eine sehr kleine Zellpopulation aufweisen und die über-70-Jährigen ($M = 1,7 \pm 1,4 \times 10^3$) eine etwas größere; signifikant ist der Anstieg aber nicht. Unter den Männern lässt sich auch deskriptiv kein Trend erkennen.

Die ILC3s wurden getrennt nach NKp44-positiven und -negativen Zellen (*Abbildung 9d-e*). Die NKp44⁺-ILC3-Populationen waren unter den Frauen in allen Altersstufen ähnlich gering ausgeprägt (*Abbildung 9d*): die junge Gruppe ($M = 0,1 \pm 0,1 \times 10^2$), die mittlere ($M = 0,8 \pm 0,4 \times 10^2$) und die älteste ($M = 0,4 \pm 0,2 \times 10^2$) zeigen keine signifikanten Unterschiede untereinander. Anders als bei den Frauen konnte bei den jungen Männern eine statistisch signifikant (**P < 0,01) größere Zellpopulation ($9,1 \pm 2,2 \times 10^2$) festgestellt werden als bei der mittleren ($0,4 \pm 0,2 \times 10^2$) und ältesten ($1,0 \pm 0,9 \times 10^2$) Gruppe. Auch ist die junge, männliche NKp44⁺-ILC3-Population signifikant größer (**p < 0,01) als die der jungen Frauen ($0,1 \pm 0,1 \times 10^2$). Unter den anderen Altersgruppen konnten keine geschlechtsspezifischen Effekte gezeigt werden. Das gleiche Muster wurde auch bei den NKp44-negativen ILC3s beobachtet (*Abbildung 9e*): die jüngsten, männlichen Hautproben wiesen signifikant höhere Zellzahlen auf ($6,0 \pm 1,8 \times 10^2$), als die 40- bis 70-jährigen ($0,7 \pm 0,6 \times 10^2$; ***p < 0,001) und die über-70-jährigen Männer ($1,6 \pm 1,4 \times 10^2$; *p < 0,05), sowie auch als die unter-40-jährigen Frauen ($0,1 \pm 0,1 \times 10^2$; *p < 0,05). Unter den restlichen Gruppen konnten auch hier keine bedeutenden Unterschiede festgestellt werden.

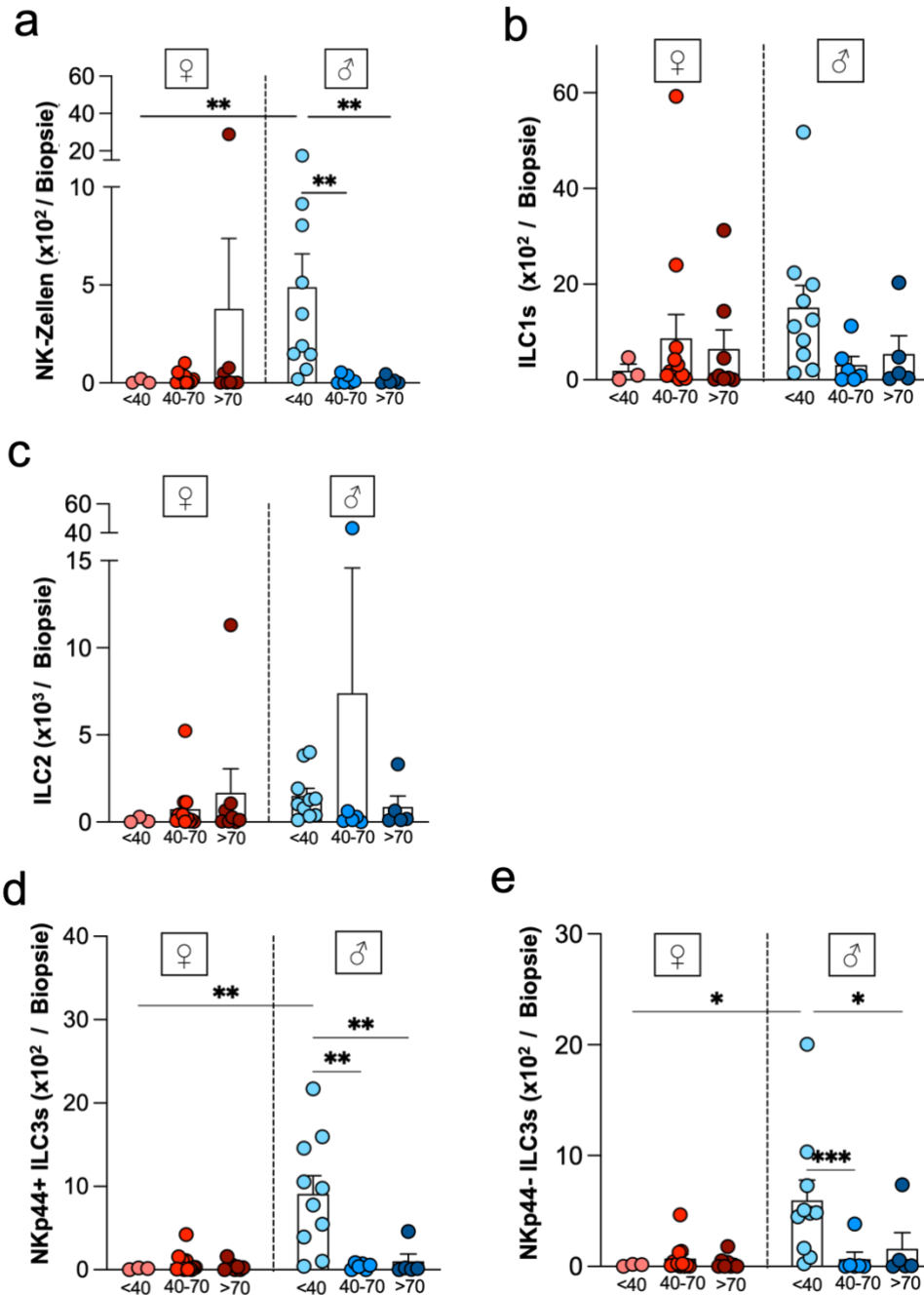


Abbildung 9: Alters- und geschlechtsabhängige Verteilung der ILC-Gruppen. Die Anzahl an a) NK-Zellen, b) ILC1s, c) ILC2s, d) NKp44⁺-ILC3s e) NKp44⁻-ILC3s abhängig des Alters (jünger als 40, zwischen 40 und 70, 70 aufwärts) und Geschlechts (Frauen ♀; Männer ♂) in humanen Hautproben von n = 23 Frauen und n = 21 Männern. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert ± SEM. Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur statistischen Auswertung genutzt, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. (SEM, Standardfehler des Mittelwertes).

4.3.2. ILC-Subgruppen anteilig an Gesamt-ILCs

Um die Proportionen der einzelnen ILC-Subgruppen an der gesamten ILC-Population besser zu visualisieren, sind in Abbildung 10 die durchschnittlichen, prozentualen Anteile der ILC-Gruppen dargestellt. Dazu wurde für jede Probe anhand der totalen Zellzahlen pro 8-mm-Stanzbiopsie der prozentuelle Anteil jeder ILC-Subgruppe an der gesamten ILC-Population dieser Probe berechnet und für jede untersuchte Gruppe das arithmetische Mittel dieser prozentuellen Anteile sowie der Standardfehler bestimmt und als Kreisdiagramm dargestellt (siehe Beschriftung der Diagramme, *Abbildung 10*). Dies wurde über alle Proben hinweg durchgeführt ($n = 44$), getrennt nur nach Alter ($n(\text{jung}) = 13$; $n(\text{mittelalt}) = 18$; $n(\text{alt}) = 13$), nur nach Geschlecht ($n(w) = 23$, $n(m) = 21$) und getrennt nach Alter und Geschlecht in Kombination. Diese Darstellung dient der leichteren Erkennung eventueller, deskriptiv beobachteter Trends in der Distribution der ILC-Klassen.

Zuerst werden die ILC-Populationen aller Proben dargestellt (*Abbildung 10.1*). Dabei fällt auf, dass die ILC2 ($44,3 \pm 26,3$ %) die größte Zellpopulation in der Haut darstellen, gefolgt von den ILC1s ($36,9 \pm 24,0$ %). Die NKp44-positiven ILC3s ($8,7 \pm 9,5$ %) sind an dritter Stelle etwas zahlreicher als die NKp44-negativen ILC3s ($6,4 \pm 8,1$ %). Die kleinste Population stellen die NK-Zellen ($3,8 \pm 4,7$ %) dar.

Wenn man die weiblichen und männlichen Proben einander gegenüberstellt (*Abbildung 10.2*), unabhängig vom Alter, so sieht es aus, als hätten Frauen anteilig mehr ILC1s ($40,0 \pm 24,8$ %) und ILC2s ($45,9 \pm 24,6$ %), wohingegen bei den Männern die NK-Zellen ($4,9 \pm 5,2$ %) und die NKp44-positiven ($11,4 \pm 11,1$ %) sowie die NKp44-negativen ILC3s ($7,7 \pm 8,2$ %) einen größeren Anteil der Gesamt-ILCs ausmachen und die einzelnen Anteile höher als bei den Frauen sind.

Wenn man unabhängig vom Geschlecht nur die verschiedenen Altersgruppen betrachtet (*Abbildung 10.3*), so fallen auf den ersten Blick die höheren Anteile der NKp44⁺-ILC3s ($15,7 \pm 10,9$ %) und NKp44⁻-ILC3s ($10,4 \pm 7,8$ %) sowie der NK-Zellen ($7,1 \pm 5,5$ %) in der jüngsten Gruppe im Vergleich zu der mittleren ($M(\text{NK-Zellen}) = 2,1 \pm 2,2$ %; $M(\text{NKp44}^+\text{-ILC3}) = 6,5 \pm 8,4$ %; $M(\text{NKp44}^-\text{-ILC3s}) = 3,6 \pm 5,1$ %) und ältesten ($M(\text{NK-Zellen}) = 2,9 \pm 5,2$ %; $M(\text{NKp44}^+\text{-ILC3}) = 4,7 \pm 5,6$ %; $M(\text{NKp44}^-\text{-ILC3s}) = 6,1 \pm 10,4$ %) Gruppe auf. Auch macht es den Eindruck, als würde dafür mit steigendem Alter vor allem die ILC2-Population in ihrem Anteil zunehmen - mit ca. einem Drittel bei den Jüngsten ($M = 32,9 \pm 18,2$ %), knapp unter der Hälfte in der mittleren Altersgruppe ($M = 44,4 \pm 25,5$ %) bis hin zu über der Hälfte aller ILCs in der ältesten Gruppe ($M = 55,3 \pm 30,8$ %).

Schaut man sich die Proben getrennt nach Geschlecht und für jede der drei Altersgruppen einzeln an (*Abbildung 10.4*), so fallen die größten Unterschiede zwischen Männern und Frauen in der Gruppe der unter-40-Jährigen auf. Es scheint, dass die NK-Zellen ($8,9 \pm 4,8$ %) und die NKp44⁺-ILC3s ($19,1 \pm 9,7$ %) sowie die NKp44⁻-ILC3s ($12,1 \pm 7,7$ %) bei den Männern einen

sichtbar größeren Anteil an der Gesamtheit der ILCs ausmachen als bei den Frauen (M(NK-Zellen) = $0,9 \pm 1,5$ %; M(NKp44⁺-ILC3) = $4,2 \pm 5,1$ %; M(NKp44⁻-ILC3s) = $4,7 \pm 6,2$ %). Dies ist in den älteren Gruppen nicht mehr ersichtlich. Bei den Männern steigt der ILC2-Anteil prozentual mit dem Alter, mit Anteilen von ca. einem Drittel bei der jungen Kohorte ($30,6 \pm 12,7$ %) und der mittleren Altersstufe ($50,6 \pm 31,3$ %) im Vergleich zur ältesten Gruppe mit über der Hälfte der ILC2s ($56,2 \pm 42,2$ %), während die drei ILC-Subgruppen, die ohnehin seltener in der Haut zu finden sind, die NKp44⁺-, NKp44⁻-ILC3s und die NK-Zellen, in der jüngsten Gruppe häufiger zu finden sind, als in den beiden älteren. Bei den Frauen ist dieser Trend weniger ersichtlich; da sieht es hingegen aus, als würde vor allem die ILC1-Population prozentual schrumpfen mit Anteilen um die Hälfte der ILC1s in der jungen ($49,5 \pm 23,7$ %) und mittleren Altersgruppe ($44,5 \pm 26,3$ %) und unter einem Drittel in der ältesten ($29,7 \pm 22,3$ %). Jedoch sind dies alles keine statistisch signifikanten Trends und können nur Anhaltspunkte für mögliche Entwicklungen geben.

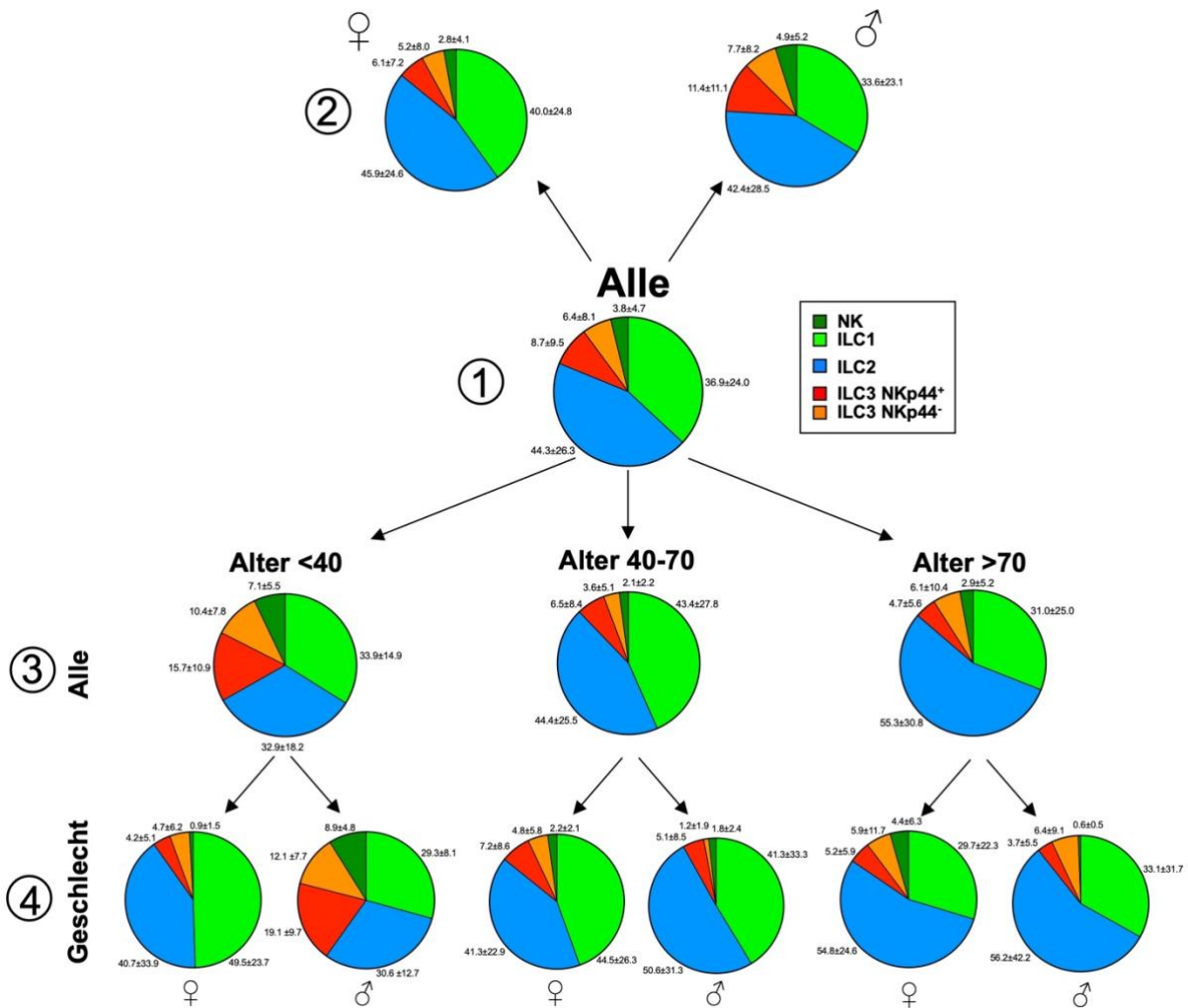


Abbildung 10: Anteile der ILC-Subgruppen am Gesamtpool der ILCs variiert mit dem Alter und Geschlecht. Die Kreisdiagramme zeigen die durchschnittliche ILC-Verteilung in Prozent an der totalen ILC-Zellzahl als Mittelwert \pm SEM für alle Hautproben gesammelt (1) und aufgeteilt jeweils nur nach Geschlecht (2; Frauen ♀, Männer ♂) oder Alter (3; jünger als 40, zwischen 40 und 70, 70 aufwärts) und beides in Kombination (4). (SEM, Standardfehler des Mittelwertes).

4.4. Ganzkörperkartierung der ILCs

Um zu untersuchen, ob auch andere Einflussfaktoren eine Rolle bei der Zellzahl spielen, wurden alle Proben (N = 44) hinsichtlich des Entnahmeortes aufgetrennt. Dabei wurden angelehnt an Weber et al. (2003) nach vier Körperregionen eingeteilt: Rumpf (n = 15), proximale Extremitäten, also Oberarm, Oberschenkel (n = 8), distale Extremitäten, sprich ab Unterarm, Unterschenkel sowie Anhangsgebilde (n = 14) und Kopf (n = 7). Dies wurde sowohl für CD45-positive Zellen (*Abbildung 11a*), also alle Lymphozyten generell, gemacht, als auch

für alle ILCs (*Abbildung 11b*), für die ILC-Subgruppen (*Abbildung 11c-g*), sowie für alle ILCs getrennt nach Geschlecht (*Abbildung 11h*). Auch hier wurden die totalen Zellzahlen pro 8-mm-Stanzbiopsie aufgetragen und mittels Kruskal-Wallis-Test die Körperregionen miteinander verglichen.

Für die CD45⁺-Zellen (*Abbildung 11a*) zeigte sich eine signifikant höhere Zellzahl (**P < 0,01) an distalen Teilen der Extremitäten ($10,4 \pm 2,2 \times 10^4$) als an den proximalen Extremitäten ($1,5 \pm 0,7 \times 10^4$) oder am Rumpf ($3,1 \pm 1,6 \times 10^4$). Zwar waren im Mittel auch mehr CD45⁺-Zellen an distalen Extremitäten zu finden als am Kopf ($5,1 \pm 1,7 \times 10^4$), dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Das gleiche Muster zeigte sich bei den ILCs (*Abbildung 11b*): Die distalen Extremitäten wiesen eine höhere Anzahl an ILCs ($4,8 \pm 1,3 \times 10^3$) auf als die proximalen Extremitäten ($0,8 \pm 0,4 \times 10^3$, **p < 0,01) und der Rumpf ($1,6 \pm 0,8 \times 10^3$, *p < 0,05). Kein Unterschied konnte zwischen den distalen Extremitäten und dem Kopf ($7,7 \pm 6,0 \times 10^3$) festgestellt werden. Im Mittel kommen mehr ILCs im Kopfbereich vor als an den proximalen Extremitäten oder am Rumpf, dieser Unterschied erreicht aber keine statistische Signifikanz.

Schaut man sich die einzelnen ILC-Typen an, zeigt sich dieses Muster so nur bei den NKp44⁻-ILC3s. Auch hier wiesen die distalen Extremitäten höhere Zellzahlen ($4 \pm 1 \times 10^2$ Zellen, *p < 0,05) als die proximalen Extremitäten ($0,3 \pm 0,2 \times 10^2$ Zellen) und der Rumpf ($0,8 \pm 0,4 \times 10^2$ Zellen) auf. Für die NKp44⁺-ILC3s war nur der Unterschied zwischen der Kategorie distale Extremitäten mit $7 \pm 2 \times 10^2$ Zellen (**p < 0,001) und Rumpf mit $0,6 \pm 0,3 \times 10^2$ Zellen signifikant. Dasselbe Muster gilt für die ILC2s mit $2 \pm 0,8 \times 10^3$ Zellen (*p < 0,05) im Bereich der distalen Extremitäten und $0,6 \pm 0,3 \times 10^3$ Zellen am Rumpf. Einzig für die NK-Zellen war die Zellzahl an den distalen Extremitäten ($6 \pm 2 \times 10^2$, **p < 0,01) im Vergleich zum Kopf ($0,2 \pm 0,08 \times 10^2$) signifikant höher. Im Vergleich zum Rumpf ($0,2 \pm 0,08 \times 10^2$) war auch hier die Zellzahl im Bereich der distalen Extremitäten höher (**p < 0,01).

Wenn man neben den Körperregionen zusätzlich nach Geschlecht aufteilt (*Abbildung 11h*) und die ILC-Zellzahlen der einzelnen Regionen bei Frauen (n(Rumpf) = 11, n(proximale Extremitäten) = 6, n(distale Extremitäten) = 3, n(Kopf) = 4) und Männern (n(Rumpf) = 5, n(proximale Extremitäten) = 2, n(distale Extremitäten) = 11, n(Kopf) = 3) gegenüberstellt, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es konnte kein Effekt des Geschlechts oder der Körperregion festgestellt werden.

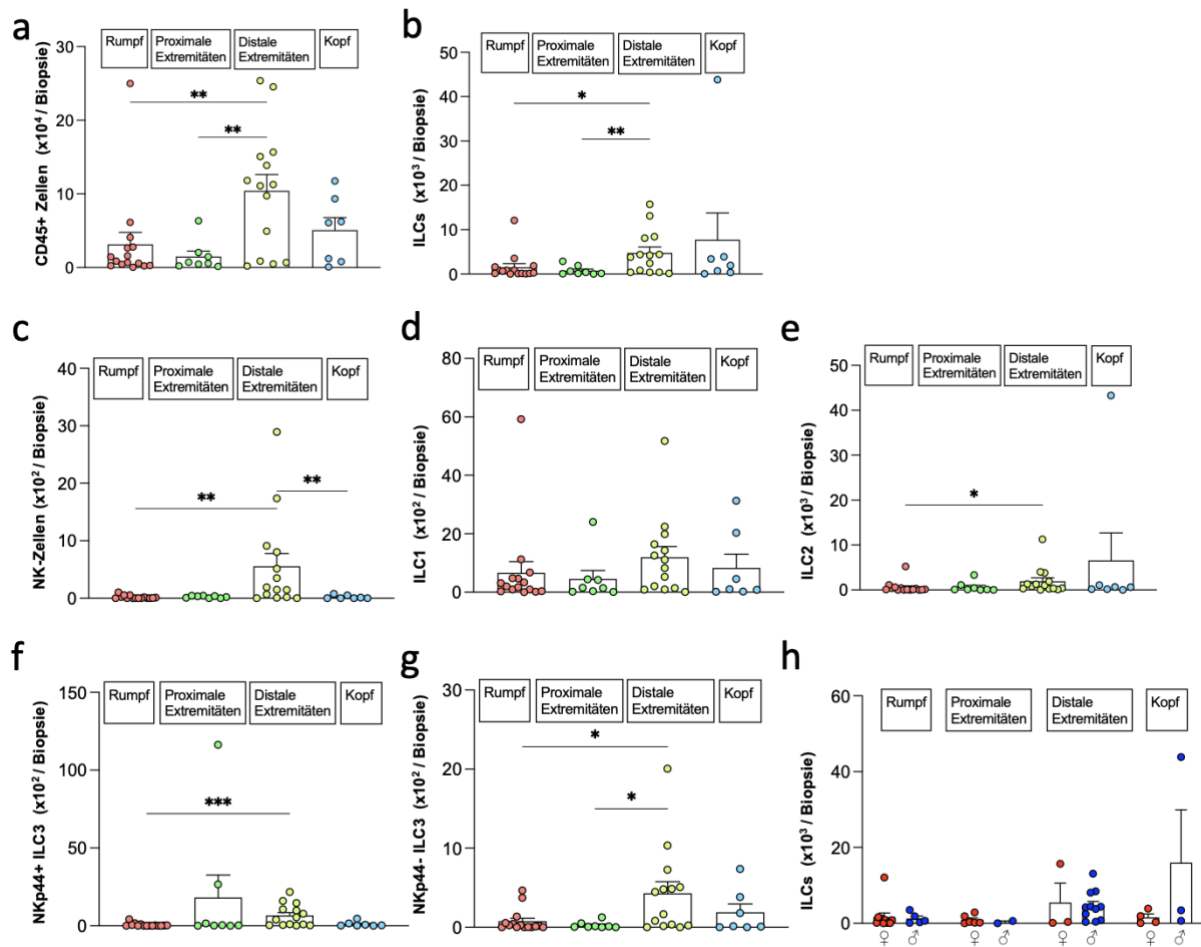


Abbildung 11: Ganzkörper-Oberflächenkartierung der ILCs. Oberflächenkartierung der a) Lymphozyten, charakterisiert als CD45⁺-Zellen, b) aller ILCs, c-g) der ILC-Subgruppen und h) aller ILCs getrennt für n = 23 Frauen und n = 21 Männer. Pro Körperregion (Rumpf, proximale Extremitäten, distale Extremitäten, Kopf) wurden a-g) 7 bis 15 Proben, beziehungsweise h) zwei bis elf Proben analysiert und die Anzahl der Zellen als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte in totalen Zellzahlen. Zur Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test eingesetzt, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (SEM, Standardfehler des Mittelwertes).

5. Diskussion

Um die Rolle der ILCs in der angeborenen Immunabwehr und damit in der Entstehung sowie Bekämpfung verschiedener Hautkrankheiten besser zu verstehen, braucht es ein umfangreiches Wissen über ihre Dynamiken und potenzielle Einflussfaktoren auf diese. Zwei solcher Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit für kutane ILCs untersucht: das Alter und das biologische Geschlecht. Sie sollen die Erschließung von Alters- und Geschlechtserscheinungen bei der Entstehung bzw. Bekämpfung verschiedener Hautkrankheiten ermöglichen und damit einen Ausgangspunkt für die Therapieanpassung darstellen.

5.1. Häufigkeit und Verteilung der ILCs

Insgesamt machte die ILC-Gesamtpopulation nur einen geringen Teil des gesamten CD45⁺-Zellpools aus. Dies war auch bei anderen Autoren der Fall, wie z. B. bei Alkon et al., bei denen die ILCs nur einem Anteil von ca. 0,02 % des Leukozyten-Pools entsprachen. Die Zellzahlen waren dort so gering, dass sie in 6-mm-Stanzbiopsien kaum zu detektieren waren und die Verteilung der ILC-Subpopulationen erst bei größeren Hautlappen von ungefähr 10 x 10 cm² erfasst werden konnten.⁶⁶ In dieser Untersuchung wurde mit 8-mm-Stanzbiopsien gearbeitet, doch trotz des geringen Anteils der ILCs konnten hier alle Subgruppen in der Haut identifiziert werden.

Auch wurde in diesem Fall für die erste ILC-Klasse nach ILC1s und NK-Zellen getrennt geschaut, und so konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen in geringen Mengen auch in der Haut vorkommen, wenngleich sie eigentlich hauptsächlich im Blut zirkulieren und nicht geweberesident sind. In dieser Untersuchung stellten die ILC1s und ILC2s mit Abstand die beiden größten Populationen dar, wohingegen die ILC3s jeweils ungefähr knapp ein Zehntel darstellten und die NK-Zellen keine 5 % erreichten. Dies stimmt teilweise mit bisheriger Forschung überein. Bei einer Untersuchung waren die ILC2s am häufigsten zu finden, aber dafür kamen die ILC1s und ILC3s etwa gleich häufig vor.⁶⁶ In einem anderen Fall waren zu zwei Dritteln der Zellen ILC1s zu finden, während die ILC2s und ILC3s ähnlich häufig vorkamen⁸⁶. Bei Brügggen et al. hingegen machten die ILC1s den Großteil der ILCs aus, gefolgt von den ILC3s und einer kaum vorhandenen ILC2-Population⁸¹. Villanova et al. wiederum verzeichneten einen Anteil von ca. 44 % an NKp44⁺-ILC3s und nur 1 % an NKp44⁺-ILC3s, während ILC1s und ILC2s jeweils 27 bzw. 28% der ILCs bildeten.⁷¹ Diese Studien brachten also für Normalhaut jeweils unterschiedliche Verteilungsmuster. Zudem wurden sie, wie alle vergleichbaren Studien, im Kontext verschiedener Pathologien durchgeführt und die Stichproben der gesunden Haut zum Vergleich waren in den Fällen oft relativ gering: Bei Alkon et al. waren es 12 Normalhaut-Proben⁶⁶, bei Brügggen et al. zehn⁸¹, bei Villanova et al. neun⁷¹

und bei Petresca et al. nur drei⁸⁶. Somit ist zumindest für die allgemeine Distribution unsere Stichprobe mit 44 Probanden repräsentativer. Ähnliche Daten zu muriner Haut sind schwierig zu finden und auch nur bedingt vergleichbar. Bei Untersuchungen an der Maus werden oft nur spezifische ILC-Subtypen in der Haut angeschaut, z.B. ILC2s bei der atopischen Dermatitis⁶⁸. Auch werden nicht zwingend alle Subtypen in Mäusehaut identifiziert: So wurden teilweise nur ILC2s und ILC3s, nicht aber ILC1s in Maushaut beschrieben⁹⁰, weswegen der Fokus hier vor allem auf den Vergleich mit anderen Untersuchungen an humaner Haut gelegt wird.

Wenn man die Verteilung der ILCs in der Haut mit der im peripheren Blut vergleicht, so ergibt sich ebenfalls nicht dasselbe Muster. Zwar stellten bei Darboe et al. auch die ILC2s die größte Population dar, dafür waren ILC1s aber sehr selten zu finden.⁸⁸ Allerdings würde man hier auch keine deckungsgleiche Verteilung erwarten aufgrund der unterschiedlichen Gewebeherkunft sowie Studien, die sowohl Blut als auch Haut untersuchten und zu unterschiedlichen ILC-Verteilungen gelangten.⁸⁶ Auch ist der Anteil von ILCs an CD45-positiven Zellen in der Haut und im Blut unterschiedlich: Bei Alkon et al. beispielsweise war der Anteil der ILCs an der CD45⁺-Zellpopulation in der Haut größer als im Blut, zusätzlich zu der unterschiedlichen Verteilung der Subpopulationen zwischen peripherem Blut und der Haut.⁶⁶

5.1.1. CD45⁺-Zellen abhängig vom Alter und Geschlecht

Wenn man nur die CD45⁺-Zellen betrachtet, so konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Altersgruppen festgestellt werden, aber ein Effekt des Alters war zu ermitteln, mit einer höheren CD45⁺-Häufigkeit unter den Männern. Dies könnte eine Verzerrung durch die jungen, männlichen Hautproben darstellen, da es mehr männliche als weibliche junge Probanden gab und die Frauen in diesem Vergleich dadurch eher durch ältere Proben repräsentiert wurden, die generell weniger Zellen lieferten. Dieser Geschlechtseinfluss könnte also eventuell auf die Schrumpfung des Lymphozyten-Pools mit dem Alter zurückzuführen sein, die allgemein beschrieben wird⁸⁸. Dieser Alterseffekt ist bei dieser Stichprobe, wenn man unabhängig vom Geschlecht schaut, jedoch nicht zu sehen, was wiederum gegen diese Theorie sprechen würde. Es könnte aber auch sein, dass der Alterseffekt hier aufgrund einer nicht ausreichend großen Stichprobe oder zu großer Varianz unter den Proben ausbleibt.

Wenn man sich die CD45⁺-Zellen getrennt nach Alter und Geschlecht anschaut, so bestand nur innerhalb der jüngsten Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern und innerhalb der männlichen Probanden einer zwischen der jüngsten Gruppe und den zwei älteren jeweils.

Dieses Muster war auch bei den NK-Zellen und ILC3s zu beobachten. Da das für ILC1s und ILC2s aber nicht der Fall war, ist es unwahrscheinlich, dass sich die Unterschiede zwischen

den ILC-Klassen auf Unterschiede in der Leukozyten-Zahl zurückführen lassen, sondern eher die Effekte der CD45⁺-Zellen von Unterschieden in den ILC-Populationen herrühren.

5.1.2. ILC-Homöostase abhängig vom Alter und Geschlecht

Wie schon erwähnt wurde bei NK-Zellen, NKp44⁺-und NKp44⁻-ILC3s also ein Geschlechtsunterschied nur für die jüngste Gruppe und ein Alterseffekt nur bei den Männern festgestellt werden. Dieser war nicht kontinuierlich für alle drei Altersgruppen, sondern nur für die jüngste im Vergleich zu den zwei älteren Gruppen feststellbar. Dies könnte zum Beispiel damit erklärbar sein, dass der Einfluss des Alters auf kutane ILCs ab einer gewissen Altersgrenze stagniert, so wie das bei peripheren Blut-ILC2s der Fall ist; geht man jedoch nach den ILC3s im Blut, würde man einen stetigen Abfall in der Zellzahl erwarten⁸⁸.

Die Tatsache, dass ein solcher Einfluss des Alters bei den Frauen nicht feststellbar war, könnte zum einen daran liegen, dass die Stichprobe der jungen Frauen (n = 3) kleiner als die der Männer (n = 10) war und daher keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Zum anderen könnte es sein, dass die Altersgrenze, bis zu der ein Unterschied besteht, geringer als 40 ist. Die jungen weiblichen Proben waren nämlich alle über 20, wohingegen die jungen männlichen Hautspenden aufgrund der Natur der Proben, da es sich um Zirkumzisionsgewebe handelte, von unter 12-Jährigen stammen. Auch könnte dies erklären, warum nur unter der jungen Stichprobe ein Geschlechtseinfluss verzeichnet wurde. Allerdings kann das Ergebnis nicht komplett durch die unterschiedliche Stichprobengröße und das Durchschnittsalter innerhalb der Alterskategorie erklärt werden, da man ansonsten dasselbe Muster auch für die ILC1s und ILC2s hätte verzeichnen müssen. Für diese ILC-Subgruppen wurden allerdings keine signifikanten Alters- oder Geschlechtsunterschiede festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass diese ILC-Gruppen weniger dem Einfluss besagter Faktoren unterliegen. Aber es könnte auch an den teilweise kleinen Stichproben pro Kombinationskategorie beider Faktoren und einer höheren Varianz liegen. Eine höhere Stichprobengröße hätte eventuell zu einer geringeren Varianz und damit eher zu signifikanten Ergebnissen geführt. Eventuell müssten die Probanden in weiteren Untersuchungen nach Alter gepaart werden, um Ungleichheiten entgegenzuwirken und klarere Ergebnisse zu liefern. Dies war aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von Hautspenden hier nicht möglich.

Da ILCs dem Einfluss von Hormonen unterliegen und die Expression dieser wiederum sowohl abhängig vom Alter als auch vom Geschlecht variiert, ist ein Einfluss beider Faktoren auf die ILCs anzunehmen. Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf ILCs wurde beispielsweise für NK-Zellen gut erforscht. Natürliche Killerzellen exprimieren unter anderem ER α , einen Östrogenrezeptor. Östrogene können so die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen erhöhen, ohne die Anzahl der Zellen zu verändern.¹⁵ Damit könnte in diesem Fall die ausbleibende Veränderung der NK-Zellzahl bei den Frauen verschiedener Altersgruppen teilweise erklärbar

sein: zwar haben Östrogene einen Effekt auf NK-Zellen, aber mehr auf ihre Funktion und weniger auf die Zellzahl. Testosteron hingegen inhibiert die Aktivität von NK-Zellen⁹¹ und geht generell mit geringeren Mengen an proinflammatorischen Markern einher, wirkt also entzündungshemmend^{92,93}. Demnach sind erniedrigte Testosteronspiegel in Männern mit höheren NK-Zellzahlen vergesellschaftet⁹⁴. So hätte man erwartet, dass die NK-Zellzahl bei den älteren Männern höher sein müsste als bei jüngeren. Der Einfluss des Testosterons bietet hier keinen Erklärungsansatz für die Ergebnisse.

Der Era-Östrogenrezeptor wurde auch bei uterinen ILC2s entdeckt. Diese waren, anders als beispielsweise pulmonale ILC2s, durch den Östrogenspiegel beeinflussbar.⁹⁵ Auch Androgene spielen für die ILC2-Homöostase eine Rolle. Eine geringere Anzahl an ILC2s in der Lunge männlicher Individuen wurde mit deren Androgenproduktion in Verbindung gebracht. Verantwortlich für den Unterschied soll der inhibierende Einfluss der Androgene auf Progenitorzellen der ILC2s sein, der über Androgenrezeptoren (AR) vermittelt wird. Demnach verhindern Androgene die Differenzierung der ILC2s aus Vorläuferzellen des Knochenmarks.⁹⁶ Somit unterscheiden sich die Geschlechtshormonrezeptoren nicht nur nach ILC-Subtyp, sondern auch nach Gewebeherkunft. So unterliegen ILCs zwar generell hormonellen Einflüssen, aber speziell in der Haut sind sie nicht zwangsläufig vergleichbar mit anderen Geweben. Fehlende geschlechtsspezifische Einflüsse auf die ILC-Populationen könnten durch das eventuelle Fehlen hormonspezifischer Rezeptoren auf kutanen ILCs bzw. einzelner ILC-Subgruppen zurückzuführen sein. Die Hormonrezeptorexpression der ILCs bleibt noch Gegenstand aktueller Forschung.

5.1.3. Ganzkörper-Kartierung der ILCs

Darüber hinaus wurden sowohl CD45⁺-Zellen als auch ILCs signifikant häufiger in der Haut der distalen Extremitäten als der proximalen Extremitäten oder des Rumpfes gefunden. Betrachtet man die Verteilung der einzelnen ILC-Subgruppen separat, zeigt sich bei allen – mit Ausnahme der ILC1s – ein ähnliches Muster. Die ILC1s sind die einzige ILC-Klasse, bei der keine signifikanten Unterschiede in der Zellverteilung in Abhängigkeit von der Entnahmestelle festgestellt wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Entnahmestelle keinen generellen Einfluss auf ILCs oder Leukozyten im Allgemeinen hat und stattdessen eine funktionelle Verteilung vorliegt. Alternativ könnte die hohe Variabilität der ILC1-Zellverteilung bei der gegebenen Probenzahl dazu führen, dass ein möglicher Trend statistisch nicht signifikant wird. Bemerkenswert ist, dass die natürlichen Killerzellen die einzige Subgruppe sind, bei der die Zellzahl in den distalen Extremitäten signifikant höher war als im Kopfbereich. Hier war die Zellanzahl am Kopf so gering, dass dieser Unterschied signifikant wurde. Ob dies eine funktionelle Bedeutung hat und ob NK-Zellen generell seltener im Kopfbereich vorkommen, bleibt unklar. Ein wiederkehrendes Muster zeigt sich bei allen ILC-Subgruppen

mit signifikanten Zellzahlunterschieden in Abhängigkeit vom Entnahmeort: Die höchsten Zellzahlen finden sich stets in den distalen Extremitäten, und zwar stets im Vergleich zum Rumpf und teilweise auch zu anderen Körperregionen. Offen bleibt, inwieweit die Zellzahl graduell von distal nach proximal abnimmt. Dennoch lässt sich – mit Ausnahme der ILC1 – bei allen anderen ILC-Gruppen sowie den Leukozyten zumindest ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Endpunkten des disto-proximalen Spektrums feststellen.

Dieses Muster, dass die Zellhäufigkeit einen Gradienten von distal nach proximal aufweist, entspricht auch dem der Mastzellen in der Haut⁸⁹. Da dies für CD45⁺-Zellen sowie für ILCs der Fall ist, ist es nicht möglich zu sagen, ob es ein reiner Effekt der Körperstelle auf die ILCs ist oder ein Effekt auf Leukozyten allgemein. Diese Beobachtung könnte allerdings ein beitragender Faktor sein, warum die jungen männlichen Hautproben in einzelnen Gruppen mehr ILCs vorwiesen als die jungen weiblichen: während die weiblichen Proben sowohl von proximalen als auch distalen Körperstellen entnommen wurden, waren die jungen männlichen Proben alle den distalen Extremitäten zugeordnet. So könnte die teilweise höhere Zellzahl der ILCs, aber auch der CD45⁺-Zellen in der jüngsten männlichen Gruppe erklärbar sein. Aber auch hier bleibt fraglich, warum dieser Effekt dann nicht für die ILC1s und ILC2s besteht; somit stellt auch dies keine hinreichende Erklärung für die Ergebnismuster dar.

Einen möglichen Faktor für die unterschiedliche Verteilung könnte auch das Hautmikrobiom darstellen. An Mäusen konnte demonstriert werden, dass ILCs in der Haut über epitheliale Signale rekrutiert und aufrechterhalten werden und ihrerseits über ihre Zytokinproduktion die Aktivität von Talgdrüsen an Haarfollikeln regulieren können, was wiederum die Homöostase des Hautmikrobioms beeinflusst.⁹⁰

Insgesamt ist es aufgrund der vielen Einflussfaktoren und Wechselwirkungen zwischen ILCs und anderen Zellen und Botenstoffen plausibel anzunehmen, dass die Verteilung der Haut-ILCs Trends folgen könnte, so wie sie beispielsweise auch innerhalb der Hautschichten eine unterschiedliche Verteilung aufweisen. ILCs scheinen demnach vor allem in der oberen Dermis, nahe der Epidermis, resident zu sein. Darüber hinaus wurde auch eine Nähe zu T-Lymphozyten festgestellt.⁸¹ Dementsprechend läge es nahe, dass die Verteilung der ILCs in der Haut zum Teil ihren Kommunikationspartnern folgt, was erklären würde, warum der hier gefundene Gradient sowohl auf die ILCs als auch auf die Lymphozyten generell zutrifft. Ein solcher Effekt ist auch in anderen Geweben zu beobachten: im Intestinaltrakt z. B. sind ILC2s in direkter Nähe zu cholinergen Neuronen zu finden, die Neuromedin U sezernieren, welches der Kommunikation zwischen ILCs und dem enterischen Nervensystem dient⁹⁷. So muss die Tatsache, dass der Gradient in der Zellzahl sowohl für ILCs als auch für die gesamte Lymphozytenzahl besteht, nicht heißen, dass es keinen isolierten Effekt der Körperregion auf die ILCs gibt. Es könnte auch als Ausdruck der Kommunikation der Immunzellen untereinander zu werten sein, wie z. B. im Lungengewebe von Mäusen, wo die ILC2s im Rahmen einer

allergischen Reaktion wohl essentiell für die Rekrutierung von TH2-Zellen sind⁵⁸. Weiterhin könnte es auch Ausdruck ähnlicher Funktionen der Zellen sein, wie beispielsweise die funktionelle Ähnlichkeit zwischen ILCs und T-Helferzellen, die anfangs beschrieben wurde. Sie entkoppelt voneinander zu betrachten, würde den variablen, komplizierten Kommunikationspfaden der ILCs nicht gerecht werden.

5.1.4. ILC-Homöostase in der Haut und ihre Implikationen

Insgesamt waren alle ILC-Untergruppen in der Haut zu finden. Über alle Proben hinweg machten ILC2s mit ca. 44 % und ILC1s mit ca. 37 % den Hauptteil der kutanen ILCs aus, gefolgt von den NKp44⁺-ILC3s mit ca. 9 %, den NKp44⁻-ILC3s mit ca. 6 % und den NK-Zellen mit ca. 4 %. Signifikante Unterschiede in den Zellzahlen waren nur bei den NK-Zellen und ILC3s zu verzeichnen. Ein Alterseffekt konnte nur unter den männlichen Hautproben zwischen der jüngsten und den jeweils älteren Gruppen festgestellt werden, wobei die junge Gruppe mehr NK-Zellen und ILC3s aufwies. Ein Effekt des Geschlechts wurde jeweils nur zwischen der jüngsten weiblichen und der jüngsten männlichen Gruppe festgestellt. Auch hier verzeichneten die jungen männlichen Proben höhere Zellzahlen. Unabhängig davon kamen ILCs insgesamt häufiger in der Haut distaler Extremitäten vor, als dies für proximale Extremitäten oder den Rumpf der Fall war. Dies legt einen Gradienten der Zellverteilung von distal nach proximal fallend nahe.

Es konnten also für einige Untergruppen signifikante Unterschiede gezeigt werden, auch wenn kein einheitlicher Effekt über alle Gruppen hinweg festgestellt werden konnte. Dies gibt Grund zur Annahme, dass das Alter und das Geschlecht zumindest eine Rolle bei der Homöostase der kutanen, humanen ILCs spielen, wenn auch die Richtung des Effekts noch nicht völlig klar ist. Zudem wurde bei der Zellzahl ein gewisser distal/proximaler Gradient für die ILCs festgestellt, wodurch auch die Hautregion wichtig für die Betrachtung der ILC-Verteilung ist. Weitere Erforschung wäre nötig, um diese Wechselwirkungen besser zu verstehen. Erst dann könnten z. B. sicher Parallelen zu Geschlechtsunterschieden in Krankheitsbildern gezogen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern Hinweise für eine mögliche Erklärung dafür, warum z. B. Männer generell einen ausgeprägteren Krankheitsverlauf der Psoriasis zeigen als Frauen, gemessen unter anderem am Ausmaß der Hautläsionen, dem Grad der Schuppung und des Erythems⁹. Denn zumindest in der jüngsten Altersgruppe konnte hier gezeigt werden, dass bei den Männern eine größere Anzahl an NKp44⁺-ILC3s zu finden war. Da vor allem die NKp44⁺-Zellen IL-17 produzieren, das grundlegend am Krankheitsverlauf der Psoriasis beteiligt ist⁷² und in der Haut von Psoriasis-Patienten eine Anreicherung von NKp44⁺-ILC3s festgestellt wurde⁷¹, könnte also diese Subpopulation der ILCs mitverantwortlich sein für die Dichotomie in der Schwere der Erkrankung zwischen Frauen und Männern. Doch nicht nur die Zellzahl

der ILCs könnte für Unterschiede in Krankheitsverläufen verantwortlich sein. Auch die Aktivität der Zellen spielt eine Rolle. So könnte eine unterschiedliche Zellaktivität und folglich die Zytokinausschüttung der ILCs abhängig vom Alter oder Geschlecht einen Erklärungsansatz für Unterschiede in der Krankheitsaktivität bieten, ohne dass sich dies in der Zellzahl widerspiegeln muss. So wurde beispielsweise gezeigt, dass sich die ILC2s im murinen Lungengewebe neugeborener Mäuse nicht nur in ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Zytokinfreisetzung von denen der adulten Mäuse unterscheiden⁸⁷. Da ILC2s im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale stehen, wäre hier beispielsweise ein möglicher Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Zytokinausschüttung und dem vorwiegenden Auftreten dieser Erkrankung im Kindesalter denkbar⁶⁹. Solche Effekte wären auch im Rahmen des Lupus erythematosus denkbar. Hier trägt die Produktion von IFN-Gamma zur Erkrankung bei, unter anderem produziert von Typ-1-ILCs. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen findet sich dabei auch eine Dichotomie zwischen den Geschlechtern; Frauen sind deutlich anfälliger dafür am Lupus erythematosus zu erkranken.⁷ Ein Unterschied in der Zellzahl der ILC1s konnte bisher nicht festgestellt werden, aber vielleicht könnte auch hier ein Unterschied in der Zellaktivität bestehen.

Bezüglich des Alters wurde hier zwar nur für die NK-Zellen und ILC3s eine Abnahme der Zellzahl verzeichnet, dennoch wäre dies vereinbar mit der generellen Abnahme des Lymphozytenpools im Alter. Dass dies zudem nur bei Männern signifikant war, könnte als Hinweis für einen geschlechtsabhängigen Alterseffekt gewertet werden. Dies wird in Bezug auf die geringere Lebenserwartung von Männern im Vergleich zu Frauen erforscht und es wird vermutet, dass unter anderem Unterschiede in den Immunmechanismen dazu beitragen.^{98,99} Solche potenziellen Zusammenhänge zu untersuchen, soll das Ziel weiterführender Forschung sein.

5.2. Limitationen

Die Implikationen dieser Arbeit werden, wie schon aufgeführt, in gewissem Maße limitiert durch den Umfang der Stichprobe. Während 44 Proben für die Verteilung der ILC-Klassen in der Haut im Allgemeinen eine größere Anzahl an Probanden darstellt als in vielen vergleichbaren Studien zu ILCs in der Haut (wie oben aufgeführt), so sind die Gruppengrößen nach Geschlecht und Alter getrennt teilweise klein; die kleinste Gruppe, die der unter-40-jährigen Frauen, besteht aus nur drei Proben. Aufgrund der Verfügbarkeit der Hautspenden variieren die Gruppengrößen stark: in der kleinsten Gruppe sind es drei und 12 in der umfangreichsten. Die Stichprobengröße wirkt sich auf die statistische Auswertung aus, da höhere Streuungsraten unter den Proben es erschweren, Effekte zu finden. Auch die Auswahl des statistischen Testverfahrens wird dadurch beeinflusst. Daher wurden hier aufgrund der Voraussetzungen nonparametrische Verfahren gewählt, die eine geringere Teststärke

aufweisen. Generell ist von einer gewissen Streuung bei biologischen Merkmalen auszugehen, was eine ausreichende Stichprobengröße notwendig macht. Auch spielt bei der statistischen Signifikanz die Effektgröße eine Rolle. Kleine Effekte sind schwieriger zu ermitteln, benötigen größere Stichproben, um signifikant zu werden. So könnten deskriptive Unterschiede bei dieser Studie, wie z. B., dass über alle Proben hinweg gemittelt die ILC2s am häufigsten vorkamen, durchaus auf reale Trends in der Population hinweisen. Damit diese aber statistisch signifikante Effekte erzielen, wären größere Stichproben nötig. Hinzu kommt der ohnehin geringe Anteil der ILCs an den Gesamtleukozyten und die damit einhergehenden, geringen totalen Zellzahlen, die die Detektion der Zellen selbst sowie potenzieller Effekte erschweren. Je geringer die Anzahl der Proben pro Gruppe ist, desto weniger lassen sich auch mögliche Einflüsse der Krankheitsgeschichte der einzelnen Probanden randomisieren.

Zwar wurde nur gesunde Haut untersucht, dennoch kann ein möglicher Zusammenhang der ILC-Populationen z. B. mit eventuellen systemischen Krankheiten nicht ausgeschlossen werden. So wie beispielsweise bei Psoriasis-Patienten auch in nicht betroffenen Hautregionen Unterschiede in den ILC-Populationen im Vergleich zu Haut von gesunden Vergleichsproben vorlagen, könnten systemische Entzündungen eventuell auch bei Hautproben dieser Studie eine Rolle bei den Haut-ILCs gespielt haben. Dies ist bei den Hautproben aus der Kinderchirurgie und der plastischen Chirurgie weniger wahrscheinlich. Bei den Hautproben aus der Dermatologie handelte es sich jedoch bei einigen um gesundes Tumorrandgewebe. Man kann nicht sicher ausschließen, dass dies nicht eventuell auch Auswirkungen auf die umliegende Haut hatte. Insgesamt könnten mehr Proben solche potenziellen systematischen Fehler noch besser ausschließen.

Darüber hinaus besteht aufgrund der Natur der Proben trotz gleicher, vorher festgelegter Altersstufen in den jungen Gruppen, wie schon erwähnt, eine gewisse Diskrepanz im Alter der jungen männlichen und weiblichen Hautproben. Da innerhalb der zwei Jahre der Probengewinnung keine jungen, männlichen Proben gewonnen werden konnten, musste auf die Kinderchirurgie ausgewichen werden. So sind die jungen männlichen Proben alle jünger als die weiblichen. Wenn das Alter also nicht über die Lebensspanne hinweg, sondern z. B. nur bis zur Pubertät eine Rolle für die Entwicklung der ILCs spielen sollte, wäre eine andere Aufteilung der Altersgruppen notwendig. Noch genauer wäre es, wenn man Proben nach Alter paaren würde; dies war aufgrund mangelnder Hautspenden jedoch leider nicht möglich. Da z. B. für die ILC3s im Blut ein stetiger Abfall in der Zellpopulation vernehmbar war und bei Mäusen z. B. auch nach jungen und adulten Mäusen für ILC2s in der Lunge Unterschiede festgestellt wurden, sollte sich diese Arbeit ebenfalls mit der gesamten Lebensspanne beschäftigen und deswegen wurde eine Unterscheidung zwischen jungem, mittlerem und hohem Alter gewählt.

Da wir auch einen Einfluss des Entnahmeortes auf die totalen ILC-Zahlen feststellen konnten, wäre es eine Überlegung wert, Proben ebenso nach Entnahmeort zu paaren. Aufgrund der teilweise geringen Gruppengrößen könnte der Entnahmeort ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Hinzu kommt, dass die Haut nach der Entnahme schnell verarbeitet werden muss, damit die ILCs nicht absterben. Trotz genauer Instruktionen an die OP-Teams kann nicht ausgeschlossen werden, dass den Umständen geschuldet nicht doch mal mehr, mal weniger Zeit verging, bevor die Hautstücke in PBS-Lösung gelagert wurden und somit das Überleben der Zellen sich zwischen den Proben unterschied. Die Bedingungen der Probengewinnung könnten somit noch weiter optimiert werden. Ein systematischer Fehler war hier nicht erkennbar, es könnte aber im Einzelfall zu einer geringeren Zellausbeute geführt haben. Auch können durch die enzymatische Aufarbeitung des Gewebes Oberflächenmoleküle angegriffen werden, wodurch diese nicht mehr durch Antikörper anfärbbar sind und damit auch nicht mittels FACS erfassbar. So kann es zu einer Verzerrung der tatsächlichen Zellausbeute kommen.

Eine weitere Limitation dieser Studie weniger speziell, sondern allgemein der Interpretierbarkeit der Ergebnisse und der Übertragbarkeit der Anteile der ILC-Subtypen auf ihre möglichen Zusammenhänge mit Krankheitsverläufen stellt die einleitend beschriebene Plastizität dieser Zellgruppe dar. Denn auch wenn eine gewisse Verteilung feststellbar ist, ist diese nicht starr, sondern dynamisch und anpassbar. Es kann nicht allein von der Ausgangsverteilung der ILCs ohne weiteres auf ihren Beitrag zu bestimmten Vorgängen im Körper geschlossen werden. Beispielsweise können ILC2s unter bestimmten Umständen zu IL-17-produzierenden Zellen werden¹⁰⁰. Wenn also auf eine IL-17-getriebene Entzündungsreaktion geschaut wird, können unter den ILCs nicht nur die ILC3s beteiligt sein, sondern auch ILC2s könnten zur Inflammation durch IL-17 beitragen. So könnte der Beitrag der ILCs zum Krankheitsgeschehen größer sein, als es die Größe nur einer Subgruppe vermuten ließe. Die genauen Vorgänge der Plastizität oder wie sehr die Fähigkeit zur Plastizität eventuell mit Faktoren wie Alter und Geschlecht zusammenhängt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Diese Dynamiken müssen aber bei der Interpretation der ILC-Verteilung und ihrer Bedeutung bedacht werden.

Einige Autoren legen eine mögliche Redundanz der ILCs nahe. ILCs seien demnach gegebenenfalls nicht notwendig für das Immunsystem, solange T- und B-Zellen funktionieren. In Patienten mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) nach allogener Stammzelltransplantation wurde gezeigt, dass sich die ILC-Population fast nicht erholt, dennoch keine nennenswert erhöhte Krankheitsanfälligkeit der Patienten im späteren Verlauf festgestellt werden konnte. Das spräche dafür, dass sie nicht notwendig für eine adäquate Immunabwehr sind.¹⁰¹ Dennoch widerspricht dies nicht dem, dass sie bei Vorhandensein

trotzdem eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielen können, sei es auch nur als Modulator, wie einleitend bereits beispielhaft aufgeführt. Da ILCs als angeborene Komponenten des Immunsystems als erstes auf Pathogene und Änderungen der Umwelt reagieren, könnte ein therapeutischer Ansatz potenziell, zumindest teilweise, die Lenkung der Immunantwort erlauben, da die Reaktion der ILCs schnell erfolgt und auch einen Einfluss auf die folgende, adaptive Immunantwort hat.¹⁰²

5.3. Ausblick

Die Einflüsse des Körpers und der Umwelt auf die ILCs und ihre Wechselwirkungen mit anderen Zellen des Immunsystems besser zu verstehen, um eventuelle therapeutische Konsequenzen ziehen zu können, soll Ziel weiterer Forschung sein. Dazu müssten Untersuchungen in größerem Maßstab durchgeführt werden: sprich, die Probensammlung müsste für einen ausreichenden Umfang über einen längeren Zeitraum bzw. über mehrere Kliniken hinweg erfolgen. Dadurch würde auch die vorher beschriebene Paarung der Proben nach Alter und Geschlecht zum Ausschluss möglicher Fehlerquellen und die Nutzung teststärkerer statistischer Verfahren möglich werden. Auch könnten, angelehnt an Alkon et al. größere Hautlappen verwendet werden.⁶⁶

Wie schon erwähnt, ist der Gesamtumfang dieser Studie bezogen auf die generelle Verteilung der ILCs in gesunder, humaner Haut schon größer als in vergleichbaren Studien. So sollte die hier beschriebene Distribution der ILC-Klassen repräsentativer sein als in bisherigen Arbeiten; auch dadurch, dass die Proben über eine breite Altersspanne hinweg erhoben wurden. Diese Ergebnisse könnten damit weiteren Forschungsarbeiten als Referenz dienen, als Basiswert für Normalhaut, der repräsentativer sein sollte als das, was bisher als Vergleich genutzt wurde. Durch das Vorliegen eines solchen Referenzwertes könnte die Notwendigkeit der Gewinnung eigener Normalhaut-Proben wegfallen, damit die Dynamik der kutanen ILCs im Rahmen einzelner Pathologien letztlich besser verstanden werden können. Auch könnte man sich die hohe Zellausbeute der Vorhautproben in zukünftigen Studien zu Nutze machen, wenn eine möglichst hohe ILC-Gesamtzahl, beispielsweise für Manipulationen oder generelle Untersuchungen der Zelleigenschaften der ILCs, wünschenswert ist.

Um eindeutige Aussagen über die Bedeutung der ILCs für verschiedene Erkrankungen treffen zu können, müssten Manipulationen vorgenommen werden. Eine Möglichkeit dafür bestünde in der Xenotransplantation, also der Transplantation humaner Haut beispielsweise auf Mäuse und folglich der spezifischen Blockade einzelner ILC-Typen, um deren Einfluss auf eine bestimmte Hautkrankheit, wie die Psoriasis zu untersuchen. Dies wurde in anderen Zusammenhängen schon durchgeführt¹⁰³ und die Anwendung dieses Verfahrens stellt auch in unserer Forschungsgruppe ein Ziel dar. Auch könnte man vor dem erwähnten Hintergrund der Bedeutung der ILC1s für die Immunabwehr gegen eine Infektion der Haut mit *Leishmania*

major untersuchen, ob Hautregionen mit einem natürlich erhöhten ILC1-Vorkommen geringere Läsionen ausbilden oder ob es hier einen Gradienten von proximal nach distal, entsprechend dem höheren Vorkommen der ILCs allgemein von proximal nach distal, gäbe.

Allgemein wäre es in zukünftigen Studien bezüglich der kutanen ILCs ratsam Faktoren wie Geschlecht, Alter und Körperregion zu kontrollieren, um klare Rückschlüsse der ILC-Subgruppen und ihres Vorkommens auf bestimmte Faktoren wie Krankheitsausprägung machen zu können. Beispielsweise könnte für Xenotransplantationen, je nachdem, welche Zellen untersucht werden sollen, von Bedeutung sein, ob die Hautprobe vom Rumpf oder Unterschenkel entnommen wurde oder ob es sich um eine junge oder alte Hautspende handelt. So wäre z.B. die Bedeutung der ILC3s womöglich leichter an Vorhautproben zu erforschen, da diese Subgruppe in den Vorhautproben deutlich häufiger vorkam als in anderen untersuchten Gruppen.

Alles in allem liefert die Studie schon erste Einblicke in die Abhängigkeit der Homöostase der ILCs gesunder, humaner Haut vom Alter und Geschlecht und zeigt diese zum Teil für einige ILC-Subgruppen, wie die NK-Zellen, sowie die NKp44⁺/NKp44⁻-ILC3s, hauptsächlich in Form eines geschlechtsabhängigen Effekts des Alters auf die Zellzahl. Ebenso wurde ein Gradient in der ILC-Zellzahl von distal nach proximal festgestellt. Die weitere Erforschung der Auswirkungen von Geschlecht und Alter auf Dynamiken der ILCs würde dazu beitragen, die Komplexität ihrer Untergruppen noch besser zu verstehen und den Weg ebnen, neue Interventionsstrategien zu entwickeln, die auf eine verbesserte Vorbeugung und Behandlung von alters- oder geschlechtsspezifischen Krankheiten abzielen.

6. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Lymphatische Organe. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2015: 322-5.
2. Gavazzi G, Krause KH. Ageing and infection. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**(11): 659-66.
3. Pinti M, Appay V, Campisi J, et al. Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur J Immunol* 2016; **46**(10): 2286-301.
4. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**(10): 626-38.
5. Giefing-Kroll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell* 2015; **14**(3): 309-21.
6. Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun* 2012; **38**(2-3): J282-91.
7. Rubtsova K, Marrack P, Rubtsov AV. Sexual dimorphism in autoimmunity. *J Clin Invest* 2015; **125**(6): 2187-93.
8. vom Steeg LG, Klein SL. SeXX Matters in Infectious Disease Pathogenesis. *PLoS Pathog* 2016; **12**(2): e1005374.
9. Hagg D, Sundstrom A, Eriksson M, Schmitt-Egenolf M. Severity of Psoriasis Differs Between Men and Women: A Study of the Clinical Outcome Measure Psoriasis Area and Severity Index (PASI) in 5438 Swedish Register Patients. *Am J Clin Dermatol* 2017; **18**(4): 583-90.
10. Lopez-Cerdan A, Andreu Z, Hidalgo MR, et al. Unveiling sex-based differences in Parkinson's disease: a comprehensive meta-analysis of transcriptomic studies. *Biol Sex Differ* 2022; **13**(1): 68.
11. Cook IF. Sexual dimorphism of humoral immunity with human vaccines. *Vaccine* 2008; **26**(29-30): 3551-5.
12. Berghofer B, Frommer T, Haley G, Fink L, Bein G, Hackstein H. TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J Immunol* 2006; **177**(4): 2088-96.
13. Yovel G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. *Gynecol Oncol* 2001; **81**(2): 254-62.
14. Case LK, Wall EH, Dragon JA, et al. The Y chromosome as a regulatory element shaping immune cell transcriptomes and susceptibility to autoimmune disease. *Genome Res* 2013; **23**(9): 1474-85.
15. Fischer J, Jung N, Robinson N, Lehmann C. Sex differences in immune responses to infectious diseases. *Infection* 2015; **43**(4): 399-403.

16. Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 2018; **174**(5): 1054-66.
17. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. *Immunity* 2012; **37**(4): 601-10.
18. Oliphant CJ, Hwang YY, Walker JA, et al. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* 2014; **41**(2): 283-95.
19. Spits H, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**(2): 145-9.
20. Serafini N, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**(7): 415-28.
21. Bar-Ephraim YE, Mebius RE. Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs. *Immunol Rev* 2016; **271**(1): 185-99.
22. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science* 2015; **348**(6237): aaa6566.
23. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity* 2013; **38**(4): 769-81.
24. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN-gamma): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts* 2018; **9**(1): 64-79.
25. Klose CSN, Flach M, Mohle L, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 2014; **157**(2): 340-56.
26. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 749-95.
27. Kim BS. Innate lymphoid cells in the skin. *J Invest Dermatol* 2015; **135**(3): 673-8.
28. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; **50**(3): 184-95.
29. Liu M, Liang S, Zhang C. NK Cells in Autoimmune Diseases: Protective or Pathogenic? *Front Immunol* 2021; **12**: 624687.
30. Vosshenrich CA, Garcia-Ojeda ME, Samson-Villeger SI, et al. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 2006; **7**(11): 1217-24.
31. Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* 2015; **350**(6263): 981-5.
32. Wilhelm C, Hirota K, Stieglitz B, et al. An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat Immunol* 2011; **12**(11): 1071-7.

33. Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang HE, et al. Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med* 2013; **210**(3): 535-49.
34. Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* 2015; **519**(7542): 242-6.
35. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol* 2011; **12**(11): 1045-54.
36. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 2013; **153**(2): 376-88.
37. Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* 2015; **160**(1-2): 74-87.
38. Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, et al. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 2013; **498**(7452): 113-7.
39. Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 2014; **343**(6178): 1249-288.
40. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 2012; **336**(6086): 1321-5.
41. Zhan Y, Xu Y, Lew AM. The regulation of the development and function of dendritic cell subsets by GM-CSF: more than a hematopoietic growth factor. *Mol Immunol* 2012; **52**(1): 30-7.
42. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(7): 533-44.
43. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, et al. ROR γ mat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol* 2011; **12**(4): 320-6.
44. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; **203**(10): 2271-9.
45. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001; **194**(4): 519-27.
46. Lindemans CA, Calafiore M, Mertelsmann AM, et al. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* 2015; **528**(7583): 560-4.
47. Aparicio-Domingo P, Romera-Hernandez M, Karrich JJ, et al. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J Exp Med* 2015; **212**(11): 1783-91.

48. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 2012; **37**(2): 339-50.
49. Hernandez PP, Mahlakoiv T, Yang I, et al. Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat Immunol* 2015; **16**(7): 698-707.
50. Hernandez P, Gronke K, Diefenbach A. A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *Eur J Immunol* 2018; **48**(1): 15-31.
51. Silver JS, Kearley J, Copenhaver AM, et al. Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol* 2016; **17**(6): 626-35.
52. Kearley J, Silver JS, Sanden C, et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity* 2015; **42**(3): 566-79.
53. Lukas D, Liu X, Reibetanz M, et al. Innate Lymphoid Cell 1- and NK Cell-Derived, Early IFN γ Release Depends on ICER and Promotes Protection against *Leishmania major* Infection. *J Invest Dermatol* 2025.
54. von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 2016; **529**(7585): 221-5.
55. Diefenbach A. Innate lymphoid cells in the defense against infections. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2013; **3**(3): 143-51.
56. Wensveen FM, Jelencic V, Valentic S, et al. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol* 2015; **16**(4): 376-85.
57. Russi AE, Walker-Caulfield ME, Ebel ME, Brown MA. Cutting edge: c-Kit signaling differentially regulates type 2 innate lymphoid cell accumulation and susceptibility to central nervous system demyelination in male and female SJL mice. *J Immunol* 2015; **194**(12): 5609-13.
58. Halim TY, Steer CA, Matha L, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity* 2014; **40**(3): 425-35.
59. Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. IL-33-responsive lineage- CD25⁺ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol* 2012; **188**(3): 1503-13.
60. Wallrapp A, Riesenfeld SJ, Burkett PR, et al. The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation. *Nature* 2017; **549**(7672): 351-6.
61. Mjosberg J, Bernink J, Golebski K, et al. The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 2012; **37**(4): 649-59.

62. Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol* 2011; **12**(11): 1055-62.
63. Korzenik JR, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ, Sargramostim in Crohn's Disease Study G. Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005; **352**(21): 2193-201.
64. Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 2012; **491**(7423): 259-63.
65. Wen Z, Liao Q, Zhao J, et al. High expression of interleukin-22 and its receptor predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014; **21**(1): 125-32.
66. Alkon N, Bauer WM, Krausgruber T, et al. Single-cell analysis reveals innate lymphoid cell lineage infidelity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2022; **149**(2): 624-39.
67. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med* 2013; **210**(13): 2939-50.
68. Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, et al. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med* 2013; **5**(170): 170ra16.
69. Akdis CA, Arkwright PD, Bruggen MC, et al. Type 2 immunity in the skin and lungs. *Allergy* 2020; **75**(7): 1582-605.
70. Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, et al. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(34): 13921-6.
71. Villanova F, Flutter B, Tosi I, et al. Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2014; **134**(4): 984-91.
72. Bugaut H, Aractingi S. Major Role of the IL17/23 Axis in Psoriasis Supports the Development of New Targeted Therapies. *Front Immunol* 2021; **12**: 621956.
73. Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, et al. Rorgammat+ innate lymphocytes and gammadelta T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest* 2012; **122**(6): 2252-6.
74. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; **445**(7128): 648-51.
75. Bos JD, de Rie MA, Teunissen MB, Piskin G. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. *Br J Dermatol* 2005; **152**(6): 1098-107.
76. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009; **361**(5): 496-509.
77. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 2004; **199**(1): 125-30.

78. Li Z, Hodgkinson T, Gothard EJ, et al. Epidermal Notch1 recruits RORgamma(+) group 3 innate lymphoid cells to orchestrate normal skin repair. *Nat Commun* 2016; **7**: 11394.
79. Huang Y, Guo L, Qiu J, et al. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2015; **16**(2): 161-9.
80. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010; **464**(7293): 1367-70.
81. Bruggen MC, Bauer WM, Reininger B, et al. In Situ Mapping of Innate Lymphoid Cells in Human Skin: Evidence for Remarkable Differences between Normal and Inflamed Skin. *J Invest Dermatol* 2016; **136**(12): 2396-405.
82. Gao Y, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Bald T, et al. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2017; **18**(9): 1004-15.
83. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* 2013; **14**(3): 221-9.
84. Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, et al. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* 2015; **43**(1): 146-60.
85. Ohne Y, Silver JS, Thompson-Snipes L, et al. IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. *Nat Immunol* 2016; **17**(6): 646-55.
86. Petrasca A, Hambly R, Molloy O, et al. Innate lymphoid cell (ILC) subsets are enriched in the skin of patients with hidradenitis suppurativa. *PLoS One* 2023; **18**(2): e0281688.
87. Loering S, Cameron GJM, Bhatt NP, et al. Differences in pulmonary group 2 innate lymphoid cells are dependent on mouse age, sex and strain. *Immunol Cell Biol* 2021; **99**(5): 542-51.
88. Darboe A, Nielsen CM, Wolf AS, et al. Age-Related Dynamics of Circulating Innate Lymphoid Cells in an African Population. *Front Immunol* 2020; **11**: 594107.
89. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol* 2003; **148**(2): 224-8.
90. Kobayashi T, Voisin B, Kim DY, et al. Homeostatic Control of Sebaceous Glands by Innate Lymphoid Cells Regulates Commensal Bacteria Equilibrium. *Cell* 2019; **176**(5): 982-97 e16.
91. Hou J, Zheng WF. Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. *Int J Immunopharmacol* 1988; **10**(1): 15-22.
92. Bobjer J, Katrinaki M, Tsatsanis C, Lundberg Giwercman Y, Giwercman A. Negative association between testosterone concentration and inflammatory markers in young men: a nested cross-sectional study. *PLoS One* 2013; **8**(4): e61466.

93. Kalinchenko SY, Tishova YA, Mskhalaya GJ, Gooren LJ, Giltay EJ, Saad F. Effects of testosterone supplementation on markers of the metabolic syndrome and inflammation in hypogonadal men with the metabolic syndrome: the double-blinded placebo-controlled Moscow study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; **73**(5): 602-12.
94. Page ST, Plymate SR, Bremner WJ, et al. Effect of medical castration on CD4+ CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN-gamma expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **290**(5): E856-63.
95. Bartemes K, Chen CC, Iijima K, Drake L, Kita H. IL-33-Responsive Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Regulated by Female Sex Hormones in the Uterus. *J Immunol* 2018; **200**(1): 229-36.
96. Laffont S, Blanquart E, Savignac M, et al. Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *J Exp Med* 2017; **214**(6): 1581-92.
97. Klose CSN, Mahlakoiv T, Moeller JB, et al. The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature* 2017; **549**(7671): 282-6.
98. Yan J, Greer JM, Hull R, et al. The effect of ageing on human lymphocyte subsets: comparison of males and females. *Immun Ageing* 2010; **7**: 4.
99. Tower J, Arbeitman M. The genetics of gender and life span. *J Biol* 2009; **8**(4): 38.
100. Golebski K, Ros XR, Nagasawa M, et al. IL-1beta, IL-23, and TGF-beta drive plasticity of human ILC2s towards IL-17-producing ILCs in nasal inflammation. *Nat Commun* 2019; **10**(1): 2162.
101. Vely F, Barlogis V, Vallentin B, et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat Immunol* 2016; **17**(11): 1291-9.
102. Cording S, Medvedovic J, Aychek T, Eberl G. Innate lymphoid cells in defense, immunopathology and immunotherapy. *Nat Immunol* 2016; **17**(7): 755-7.
103. Cristobal L, Asunsolo A, Sanchez J, et al. Mouse Models for Human Skin Transplantation: A Systematic Review. *Cells Tissues Organs* 2021; **210**(4): 250-9.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aktivierende Gewebsimpulse und Funktionen der ILCs.** (Abbildung verändert nach Eberl, 2015; erstellt mit BioRender.com) Die Abbildung zeigt die Pathogene und konkreten Zytokine, auf die die ILC-Typen reagieren, sowie ihre Effektor-Zytokine und welchen Funktionen diese dienen..... 17
- Abbildung 2: Neubauer-Zählkammer.** Verändert nach <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>. Die vier Quadranten sind nummeriert, Quadrant 1 rot umkreist. Rechts in rot sind die Grenzen gezeigt, die bei den kleinen Quadranten jeweils mitgezählt werden. 33
- Abbildung 3: FACS-Kanäle.** Die Abbildung zeigt die Laserkanäle des FACS und die Wellenlängen, die in sie hineinstreuen. Daneben sind die Fluorophore der jeweiligen Wellenlängen aufgeführt, die ILC-Marker, mit denen die Fluorophore konjugiert sind, sowie die eingesetzte Verdünnung. 34
- Abbildung 4: ILC-Oberflächenmarker.** Gezeigt sind die Oberflächenmarker, nach denen die Populationen bei der Durchflusszytometrie bestimmt wurden. Ein Plus steht für das Vorhandensein, ein Minus für das Fehlen eines Markers. Lin-, Zellliniennegativ..... 35
- Abbildung 5: Gating-Strategie für ILCs in gesunder, humaner Haut.** Repräsentative Gating-Strategie für humane ILCs. ILCs wurden als CD45⁺, Zelllinien-negative (CD3, CD19, CD8, CD4, FcεR1, CD11c, TCRγδ und TCRαβ) Zellen charakterisiert. (FSCA, Forward Scatter Area; FSCW, Forward Scatter Width; SSCA, Side Scatter Area, Lin.; Zelllinien-Marker)..... 36
- Abbildung 6: Gesamtzellzahlen in den humanen Hautproben.** Totale Anzahl an Zellen pro 8-mm-Stanzbiopsie humaner Hautproben (n = 23 Frauen, n = 21 Männer) abhängig vom a) Alter, b) Geschlecht und c) beiden Variablen kombiniert. Die statistische Auswertung erfolgte bei mehr als zwei Gruppen a) c) mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. Der Vergleich der b) Geschlechter erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. (SEM, Standardfehler des Mittelwerts). 39
- Abbildung 7: CD45⁺-Zellen in humaner Haut.** Anzahl an CD45⁺-Zellen pro 8-mm-Stanzbiopsie humaner Hautproben (n = 23 Frauen, n = 21 Männer) abhängig vom a) Alter, b) Geschlecht und c) beiden Variablen kombiniert. Die statistische Auswertung erfolgte bei mehr als zwei Gruppen a) c) mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. Der Vergleich der b) Geschlechter erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert \pm SEM. *p < 0,05, **p < 0,01. (SEM, Standardfehler des Mittelwertes)..... 40

Abbildung 8: ILC Populationen in der Haut. Verteilung der ILC-Typen in allen humanen Hauptproben (N = 44) pro 8-mm-Biopsiestanze. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test (**p < 0,01), gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert \pm SEM. ***p < 0,001, ****p < 0,0001. 41

Abbildung 9: Alters- und geschlechtsabhängige Verteilung der ILC-Gruppen. Die Anzahl an a) NK-Zellen, b) ILC1s, c) ILC2s, d) NKp44⁺-ILC3s e) NKp44⁻-ILC3s abhängig des Alters (jünger als 40, zwischen 40 und 70, 70 aufwärts) und Geschlechts (Frauen ♀; Männer ♂) in humanen Hautproben von n = 23 Frauen und n = 21 Männern. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte und die Balken den Mittelwert \pm SEM. Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur statistischen Auswertung genutzt, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. (SEM, Standardfehler des Mittelwertes)..... 43

Abbildung 10: Anteile der ILC-Subgruppen am Gesamtpool der ILCs variiert mit dem Alter und Geschlecht. Die Kreisdiagramme zeigen die durchschnittliche ILC-Verteilung in Prozent an der totalen ILC-Zellzahl als Mittelwert \pm SEM für alle Hautproben gesammelt (1) und aufgeteilt jeweils nur nach Geschlecht (2; Frauen ♀, Männer ♂) oder Alter (3; jünger als 40, zwischen 40 und 70, 70 aufwärts) und beides in Kombination (4). (SEM, Standardfehler des Mittelwertes). 46

Abbildung 11: Ganzkörper-Oberflächenkartierung der ILCs. Oberflächenkartierung der a) Lymphozyten, charakterisiert als CD45⁺-Zellen, b) aller ILCs, c-g) der ILC-Subgruppen und h) aller ILCs getrennt für n = 23 Frauen und n = 21 Männer. Pro Körperregion (Rumpf, proximale Extremitäten, distale Extremitäten, Kopf) wurden a-g) 7 bis 15 Proben, beziehungsweise h) zwei bis elf Proben analysiert und die Anzahl der Zellen als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Kreise repräsentieren die individuellen Werte in totalen Zellzahlen. Zur Auswertung wurde der Kruskal-Wallis Test eingesetzt, gefolgt vom unkorrigierten Dunn's-Test für multiple Vergleiche. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (SEM, Standardfehler des Mittelwertes). 48

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ILC-Subgruppen und für ihre Differenzierung wichtige Transkriptionsfaktoren. EOMES, Eomesodermin; T-bet, ein T-box Transkriptionsfaktor; GATA3, GATA bindendes Protein 3; ROR- α , retinoic acid receptor-related orphan receptor- α	14
Tabelle 2: ILC-Subgruppen-Verteilung in normaler Haut in Prozent von der Gesamt-ILC-Population ausgewählter, bisheriger Untersuchungen. Anteil der ILC1s, ILC2s und ILC3s in Prozent an der Gesamt-ILC-Population in normaler Haut für Alkon et al. ⁶⁶ , Petrasca et al. ⁸⁶ und Villanova et al. ⁷¹	23
Tabelle 3: Probenverteilung. Darstellung der Stichprobenverteilung getrennt nach Alter und Geschlecht, sowie summiert (Σ). Zu sehen ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Gruppen.....	31