

**Transkutane Immunisierung:
Mechanismen der interzellulären Kommunikation in der
Haut und gezielte Aktivierung von Mastzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ann-Kathrin Hartmann (geb. Weber)
geboren am 16.2.1987
in Siegen

Mainz, April 2018

Aus dem Institut für Immunologie
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2018

„Der ganze Reiz und die ganze Schönheit des Lebens
setzen sich aus Licht und Schatten zusammen.“

Lew Nikolajewitsch Tolstoi

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die angeborene und adaptive Immunantwort gegen Bakterien und Viren	1
1.1.1 Die unspezifische Immunabwehr	1
1.1.2 Die spezifischen Abwehrmechanismen des Immunsystems.....	2
1.1.3 Die Rolle der Mastzelle in der angeborenen und adaptiven Immunität.....	4
1.2 Vakzinierungen	7
1.2.1 Adjuvantien, Hilfsstoffe der Immunisierung	8
1.2.2 Die Methode der transkutanen Immunisierung	8
1.2.3 Die transkutane Immunisierung mit Aldara	11
1.2.4 Mastzellen im Prozess der transkutanen Immunisierung.....	12
1.3 Die Familie der TRP-Rezeptoren	14
1.3.1 Der TRPM4 Rezeptor	14
1.4 Die Familie der Calcium-aktivierten Kalium-Kanäle (K_{Ca})	17
1.4.1 Der K _{Ca} 3.1 Rezeptor.....	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Plastikwaren	20
2.2 Allgemeine Chemikalien und Puffer	20
2.2.1 Zytokine.....	20
2.2.2 Medien zur Kultivierung von Zellen	20
2.2.3 Puffer und Lösungen	21
2.2.4 Reagenzien	23
2.2.5 Salbengrundlage	24
2.3 verwendete Antikörper	24
2.4 Verwendete Mausstämme	24
2.5 In vitro-Experimente	27
2.5.1 Bestimmung der Lebendzellzahl	27
2.5.2 Entnahme von Milzen und Herstellung einer Splenozyten-Einzelzellsuspension .	27
2.5.3 Isolation von Knochenmarkszellen.....	28
2.5.4 Differenzierung von bone marrow-derived mast cells (BMMC) aus Knochenmarkszellen	28
2.5.5 Aktivierung von <i>in vitro</i> -generierten Zellen	28
2.5.6 Bestimmung der Degranulation von Mastzellen mittels β -Hexosaminidase	29
2.5.7 Durchflusszytometrische Analyse	30
2.5.8 Viabilitätsbestimmung von Mastzellen durch Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid.....	30

2.5.9 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration (Calcium-Flux)	31
2.6 Histologische Methoden	32
2.6.1 Toluidinblau-Färbung	32
2.7 In vivo-Experimente	33
2.7.1 Transkutane Immunisierung (TCI).....	33
2.7.2 Betäubung von Versuchstieren mit Ketamin / Rompun.....	33
2.7.3 Migrationsanalyse dermalen dendritischer Zellen (FITC Paint)	33
2.7.4 Entnahme von Blutproben / Nachweis von peptidspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	34
2.7.5 In vivo-Zytotoxizitätstest	34
2.7.6 Analyse der IFN- γ Produktion von peptidspezifischen T-Zellen (ELISpot-Assay).....	35
2.7.7 in vivo Proliferationsanalyse	36
2.7.8 B16-OVA Tumor	36
2.8 Statistische Auswertung	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Die Rolle von dendritischen Zellen in der Haut und migrationsabhängige Mechanismen der transkutanen Immunisierung	38
3.1.1 Die T-Zell-Proliferation wird größtenteils durch passiven Peptid-Transport in die drainierenden Lymphknoten ausgelöst	39
3.1.2 CD103 ⁺ migratorische DCs haben keinen Einfluss auf die Effizienz der TCI mit Aldara	40
3.2 Die Rolle von IL-1 in der TCI	41
3.3 Produzenten von IL-10 im Prozess der transkutanen Immunisierung	46
3.4 Optimierung der transkutanen Immunisierung durch selektive Aktivierung von Mastzellen in der Haut	53
3.4.1 9-Phenanthrol induziert Mastzell-Degranulation in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium	54
3.4.2 Relevante Konzentrationen von 9-Phenanthrol haben keinen toxischen Effekt auf Mastzellen	55
3.4.3 Das Endoplasmatische Retikulum als intrazelluläre Calciumquelle	56
3.4.4 Die durch 9-Phenanthrol induzierte Mastzell-Degranulation ist unabhängig von TRPM4 und kann durch Blockade von <i>K_{Ca}3.1</i> vermindert werden.....	58
3.5 Effekt von 9-Phenanthrol auf die TCI	61
3.5.1 Die Verwendung von 9-Phenanthrol in einer transkutanen Immunisierung aktiviert verstärkt Mastzellen in der Haut.....	61
3.5.2 9-Phenanthrol erhöht die Frequenz peptidspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	64
3.5.3 9-Phenanthrol fördert die Entstehung von peptidspezifischen IFN- γ -produzierenden CD8 ⁺ T-Zellen.....	64

3.5.4 Die Auswanderung von dendritischen Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten wird durch 9-Phenanthrol gefördert	66
3.5.5 9-Phenanthrol vermindert das Tumorwachstum und verlängert das Überleben der Tiere in einem prophylaktischen Tumormodell.....	68
4. Diskussion	70
4.1 Antigen-transport und Zytokin-vermittelte Mechanismen der TCI	70
4.1.1 Der Antigen-transport ist vermittelt durch dendritische Zellen und passiven Transport.....	70
4.1.2 Die Immunisierung mit Aldara ist abhängig von IL-1.....	73
4.1.3 Die Produzenten von IL-10 im Prozess der transkutanen Immunisierung	75
4.2 9-Phenanthrol aktiviert Mastzellen und erhöht die Effizienz der TCI mit Aldara .	78
4.2.1 9-Phenanthrol induziert unabhängig von TRPM4 eine Degranulation der BMMC <i>in vitro</i> durch Freisetzung von endoplasmatischem Calcium	78
4.2.2 9-Phenanthrol fördert in dem Model der TCI die Degranulation der dermalen Mastzellen, die Migration dermalen dendritischer Zellen und die Expansion zytotoxischer T-Zellen	83
5. Zusammenfassung	87
6. Abstract.....	88
7. Anhang	89
7.1 Abbildungsverzeichnis	89
7.2 Tabellenverzeichnis	91
7.3 Abkürzungsverzeichnis	91
7.3 Literaturverzeichnis	95
8. Lebenslauf	110
9. Danksagung.....	111

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in folgender Publikation:

Hartmann, A.-K. *et al.* 2017. "9-Phenanthrol Enhances the Generation of an CD8⁺ T Cell Response Following Transcutaneous Immunization with Imiquimod in Mice." *Journal of Dermatological Science* 87(3):260–67.

1. Einleitung

1.1 Die angeborene und adaptive Immunantwort gegen Bakterien und Viren

Unser Körper ist zu jeder Zeit durch die Außenwelt mit einer Vielzahl von Viren und Bakterien konfrontiert. Zum Schutz gegen diese Pathogene verfügt die körpereigene Abwehr mit dem Immunsystem über komplexe Schutzmechanismen. Diese Mechanismen können zum einen dem angeborenen Immunsystem, zum anderen dem sogenannten adaptiven Immunsystem zugeordnet werden (Murphy *et al.*, 2009).

1.1.1 Die unspezifische Immunabwehr

Die erste Verteidigungsbarriere bei Kontakt mit einem Pathogen stellen die Haut und die Schleimhäute dar (Janeway und Medzhitov, 2002). Im intakten Zustand kann diese Barriere nicht von einem Pathogen überwunden werden. Sekrete, welche von Drüsen der Haut ausgesendet werden, ermöglichen zudem die Bildung eines stark sauren Milieus, welches das Überleben vieler Pathogene verhindert. Ein Hautbestandteil der Sekrete stellen antimikrobielle Peptide dar (Janeway und Medzhitov, 2002; Turvey und Broide, 2010).

Gelingt es dem Erreger z.B. durch winzige Verletzungen der Haut dennoch die erste Verteidigungsbarriere zu überwinden, besitzt das angeborene Immunsystem weitere Mechanismen, körperfremde Stoffe und Pathogene zu beseitigen.

Dabei spielen unterschiedliche Immunzellen eine Rolle. So gelingt es oft den Gewebsmakrophagen, konservierte molekulare Strukturen auf der Oberfläche von Erregern als Fremdstoffe zu erkennen und diese unbemerkt vom infizierten Wirt abzutöten (Turvey und Broide, 2010).

Reicht diese erste Immunabwehr nicht aus um den Erreger zu beseitigen, senden weitere Immunzellen in der Haut z.B. Makrophagen und Mastzellen, Zytokine und Chemokine (TNF, IL-1, Histamin) aus und eine **Entzündungsreaktion** wird in Gang gesetzt (Schütt und Bröcker, 2011).

Eine Entzündungsreaktion ist im Allgemeinen durch vier Symptome charakterisiert: Rötung (*rubor*), Wärme (*calor*), Schwellung (*tumor*) und Schmerz (*dolor*). Durch die chemischen Botenstoffe erweitern sich die Kapillaren und werden durchlässiger. Es kommt lokal zu einem verstärkten Blutfluss (*rubor, calor*). Zusätzlich werden die Endothelzellen aktiviert und die Expression von Adhäsionsmolekülen gesteigert. Leukozyten können so über Diapedese die Endothelschicht überwinden. Phagozytose betreibende Immunzellen - neutrophile Granulozyten und Monozyten, welche zu Makrophagen ausdifferenzieren, - wandern, angelockt durch die sezernierten Zytokine und Chemokine, in die entzündeten Bereiche ein und eliminieren die Erreger (Schütt und Bröcker, 2011).

Neben den o.g. Zellen stellen natürliche Killerzellen (NK) einen weiteren Baustein der unspezifischen Abwehr von Pathogenen dar. Durch ihre direkten Zell-Zell-Interaktionen mit unreifen dendritischen Zellen in den entzündeten Bereichen (Buentke *et al.*, 2002) sowie mit reifen dendritischen Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten (Ferlazzo *et al.*, 2004 und Fehniger *et al.*, 2003) können NK-Zellen als Vermittler zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem bezeichnet werden. Interaktionen von dendritischen Zellen und NK-Zellen wurden erstmals 1999 von Fernandez und Kollegen beschrieben, indem dendritische Zellen die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen fördern (Fernandez *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2002). Im Gegenzug fördern mit IL-2 voraktivierte NK-Zellen zusätzlich die Reifung dendritischer Zellen durch Sekretion von TNF- α (Tumor Nekrose Faktor Alpha), (Piccioli *et al.*, 2002).

Parallel zu den Mechanismen der angeborenen Immunität wird durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) und hierbei vor allem durch dendritische Zellen, die adaptive Immunantwort induziert. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität wird hier ein immunologisches Gedächtnis gebildet (Murphy *et al.*, 2009)

1.1.2 Die spezifischen Abwehrmechanismen des Immunsystems

Die spezifische Immunantwort ist im Gegensatz zu der unspezifischen Antwort speziell auf ein Antigen gerichtet. Sie wird im Laufe des Lebens erworben und wird daher als adaptive Immunität bezeichnet.

Das Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität stellen dendritische Zellen (DC) dar, welche erstmals 1973 von Steinman und Cohn beschrieben wurden (Steinman und Cohn, 1973; 1974 a, b).

Dendritische Zellen nehmen exogene Proteine auf, wandern in die hautdrainierenden Lymphknoten ein und präsentieren als APC die durch Abbau entstandenen die Peptide auf sogenannten Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexen (MHC, *major histocompatibility complex*) naiven T Lymphozyten (Lipscomb und Masten, 2002). Die T-Zellen besitzen im Gegensatz zu den an den Mechanismen des angeborenen Immunsystems beteiligten Immunzellen individuell verschiedene und hoch spezifische Rezeptoren. Durch Erkennung der jeweiligen spezifischen Antigen-Sequenz werden die Lymphozyten aktiviert und es kommt zur Differenzierung der T-Zellen in Effektorzellen sowie Gedächtniszellen. Dieser Prozess wird als klonale Selektion bezeichnet und bildet die **primäre Immunantwort**.

Der Zeitraum zwischen der Exposition des Körpers mit dem Erreger und der Produktion von Effektorzellen kann 4-7 Tage betragen. In diesem Zeitraum kann der Körper erkranken. Sind ausreichend Effektorzellen gebildet, eliminieren diese die Pathogene und die Krankheitssymptome gehen zurück. Bei einem erneuten späteren Kontakt mit dem Erreger

kann der Körper aufgrund der gebildeten Gedächtniszellen nun bedeutend schneller auf die Antigene der Krankheitserreger reagieren und diese bekämpfen, was als **sekundäre Immunantwort** bezeichnet wird (Schütt und Bröcker, 2011).

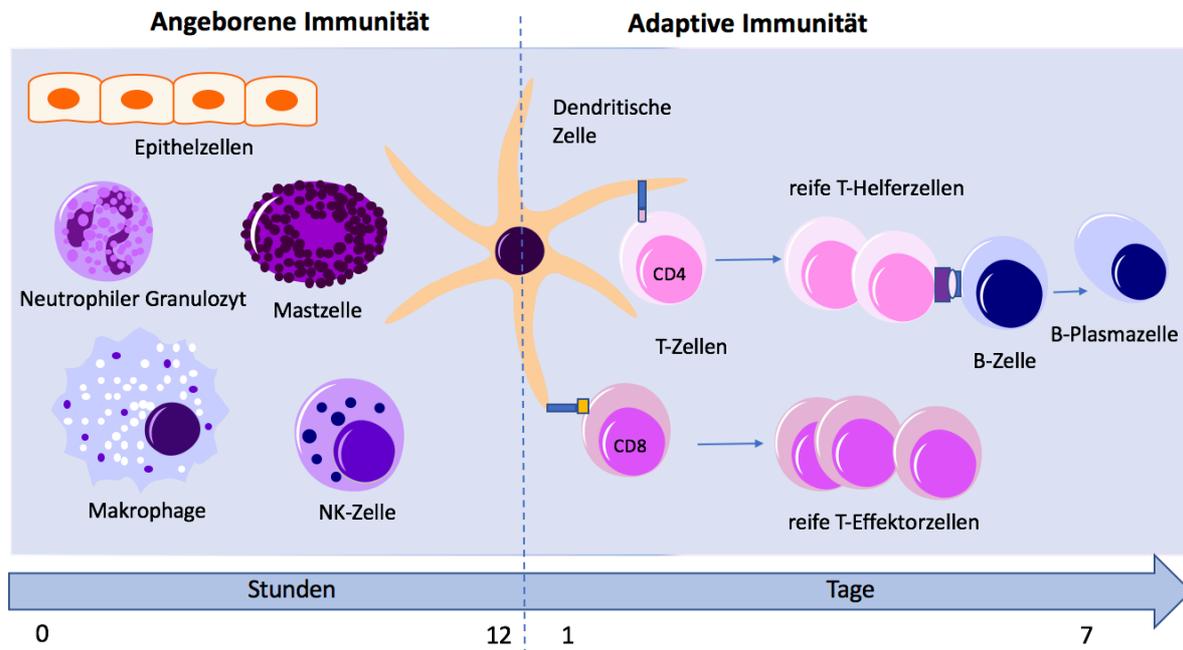


Abbildung 1: Zelluläre Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunität.

Die angeborene Immunität besitzt eine niedrige Spezifität und Affinität, kann jedoch innerhalb von Minuten bis Stunden nach einer Infektion reagieren. Phagozytose betreibende Zellen, vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Mastzellen, können konservierte bakterielle und virale Muster erkennen und diese bekämpfen. Die Angeborene Immunität stellt demnach die erste Abwehr gegen Pathogene dar. Die Adaptive Immunität ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen. Dieser Prozess erfolgt innerhalb weniger Tage nach Infektion. Dendritische Zellen stellen somit ein Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität dar.

Zusammenfassend basiert die Entstehung einer adaptiven Immunantwort auf einem effizienten Zusammenspiel von verschiedenen Immunzellen. Dabei ist die Migration der Zellen zwischen den einzelnen Organen des Immunsystems von essentieller Bedeutung. Die Migration dendritischer Zellen und T-Zellen wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren und Chemokine gesteuert.

1.1.2.1 Die Rolle und Funktion des CC-Chemokin Rezeptors 7 (CCR7)

Schlüsselregulatoren für die Migration der Leukozyten in den einzelnen Organen des Immunsystems stellen Chemokine dar. Die Mehrheit der Chemokine wird im Rahmen einer Entzündungsreaktion exprimiert, es gibt jedoch auch eine kleine Gruppe an Chemokinen, die konstitutiv exprimiert werden. Der CC-Chemokin Ligand 19 (CCL19) bzw. der CC-Chemokin Ligand 21 (CCL21) gehören zu dieser Gruppe und kontrollieren die Zell-Migration in der Homöostase. CCL19 und CCL21 stellen die Liganden für den CC-Chemokin Rezeptor 7 (CCR7) dar (Rot und von Andrian, 2004).

CCR7 wird auf einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert und ist für das Einwandern von T-Zellen bzw. dendritischen Zellen in die Lymphknoten verantwortlich (Rot und von Andrian, 2004).

In vivo Studien mit CCR7-defizienten Tieren zeigten eine veränderte Architektur der lymphoiden Organe. Die Migration dermalen dendritischer Zellen in die Lymphknoten sowie die Einwanderung von T-Lymphozyten in die Lymphknoten ist unterbunden (Förster *et al.*, 1999). *Ccr7*^{-/-} Tiere zeigen in diesem Zusammenhang eine stark verminderte und zeitlich sehr verzögerte adaptive Immunantwort (Davalos-Miszlitz *et al.*, 2007).

1.1.2.2 Der Transkriptionsfaktor BATF3 reguliert die Entwicklung von CD8⁺ dendritischen Zellen

Konventionelle dendritische Zellen können in zwei Haupt-Linien, die CD8⁺ und die CD11b⁺ dendritischen Zellen, eingeteilt werden (Seillet und Belz, 2013). Die Entwicklung der CD8⁺ dendritischen Zellen aus DC Vorläufern aus dem Knochenmark wird u.a. durch den Transkriptionsfaktor BATF3 (*basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3*) reguliert. Mitglieder dieser Linie sind zum einen CD8⁺ dendritische Zellen, welche resident im Lymphknoten vorliegen, sowie CD103⁺/CD11b⁻ dermale dendritische Zellen (Ginhoux *et al.*, 2009). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen auf MHC-I Molekülen und die damit verbundene Aktivierung zytotoxischer T-Zellen sind diese dendritischen Zellen für den Prozess der transkutanen Immunisierung von großem Interesse (Belz *et al.*, 2004; Bedoui *et al.*, 2009).

BATF3-defiziente Tiere auf 129S6/SvEv-Hintergrund, welche als erstes durch Hildner *et al.* beschrieben wurden, zeigten im Vergleich zu BATF3-kompetenten Tieren eine vergleichbare Anzahl CD8⁻ dendritischer Zellen in Milz, Thymus und Lymphknoten, jedoch keine CD8⁺ dendritischen Zellen in den analysierten Geweben. Die Migration von dendritischen Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten wird durch BATF3 nicht beeinflusst (Hildner *et al.*, 2008).

1.1.3 Die Rolle der Mastzelle in der angeborenen und adaptiven Immunität

Mastzellen können als Vermittler von Entzündungsreaktionen und Dirigenten der Pathogenabwehr des Körpers angesehen werden. Neben dieser entscheidenden Rolle interagieren sie zusätzlich mit Zellen des adaptiven Immunsystems (Heib *et al.*, 2008).

Mastzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) des Knochenmarks ab (Kitamura *et al.*, 1989). Als undifferenzierte Promastozyten (*mast cell-committed progenitors* (MCPs), Rodewald *et al.*, 1996) wandern sie mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen aus dem Knochenmark über das Blut in die peripheren Gewebe ein, wo die vollständige Differenzierung erfolgt. Die Mastzellentwicklung wird durch den SCF (*stem*

cell factor) reguliert. Dieser stellt einen Liganden für den Oberflächenrezeptor c-Kit dar, welcher in allen Differenzierungsstufen der Mastzellen exprimiert wird (Li und Krilis, 1999). Zusätzlich wird dem Interleukin-4 (IL-4) eine entwicklungsfördernde Wirkung *in vivo* zugeschrieben (Stassen *et al.*, 2002).

Ausdifferenzierte Mastzellen sind vor allem in Geweben mit direktem Kontakt zur Umwelt zu finden. Dazu gehören die Haut und die Schleimhäute. Bevorzugt lokalisieren Mastzellen in der Nähe von Nervenendigungen, Blutgefäßen und Haarfollikeln (Ehrlich, 1877). Aufgrund ihrer Lokalisation können murine Mastzellen in zwei Subtypen, die Bindegewebsmastzellen und die Schleimhautmastzellen, untergliedert werden (Kitamura und Fujita, 1989). Diese beiden Subtypen unterscheiden sich im Weiteren in der Zusammensetzung ihrer Granula, welche Effektormoleküle enthalten, die bei einer Aktivierung der Mastzelle sezerniert werden (Heib *et al.*, 2007).

Der bekannteste Aktivierungsmechanismus der Mastzelle ist eine IgE-vermittelte Aktivierung des Fc ϵ RI-Rezeptors im Rahmen einer allergischen Reaktion (Metcalfe *et al.*, 1997).

Ein weiterer Aktivierungsmechanismus ausdifferenzierter Mastzellen stellt die Aktivierung über Rezeptoren wie z.B. die TLR (toll-like Rezeptoren), dar.

TLR sind Transmembran-Proteine, welche spezifische Strukturen, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), erkennen und binden können (Janeway, 1989; Akira *et al.*, 2001). Ein Transmembranprotein dieser Familie, der TLR-7, ist auf endosomalen Membranen zu finden (Heil *et al.*, 2003). Nach Aktivierung durch virale ssRNA (*single-stranded RNA*; u. a. durch Influenza Virus), (Lund *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2003) oder den synthetischen Liganden Imiquimod wird ein MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) -abhängiger Signalweg induziert, welcher die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen und Typ1-Interferonen fördert (Hemmi *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2004). Diese Mediatoren besitzen zahlreiche entzündungsfördernde bzw. immunregulatorische Effekte (vgl. Abbildung 2).

Zusätzlich zu den *de novo* synthetisierten Zytokinen sind einige Effektormoleküle bereits im ruhenden Zustand in der Mastzelle in so genannten Granula gespeichert und können innerhalb von wenigen Sekunden bis Minuten freigesetzt werden. Der Tumornekrosefaktor (TNF) gehört zu diesen gespeicherten Mastzellprodukten (vgl. Abbildung 2) TNF vermittelt u. a. die Aktivierung des Gefäßendothels und somit die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die lokalen entzündlichen Bereiche. Durch phagozytierende Granulozyten werden so Pathogene beseitigt (Henz *et al.*, 2001; Maurer *et al.*, 2003).

Die Freisetzung von Proteasen, welche als Hauptproteinkomponenten der Mastzellgranula angesehen werden können, führt zudem zu einer verbesserten Abwehr der Zelle gegen exogene und endogene Toxine und Parasiten (Metz *et al.*, 2006; Maurer *et al.*, 2004).

Zusätzlich zu der Rekrutierung von phagozytotischen Zellen in die von Pathogenen betroffenen Regionen können Mastzellen selbst Phagozytose betreiben (Sher *et al.*, 1979; Malaviya *et al.*, 1994). Dies ist beispielsweise für *E. coli* (*Escherichia coli*) durch die Erkennung spezifischer Oberflächenmoleküle wie FimH beschrieben (Malaviya *et al.*, 1994).

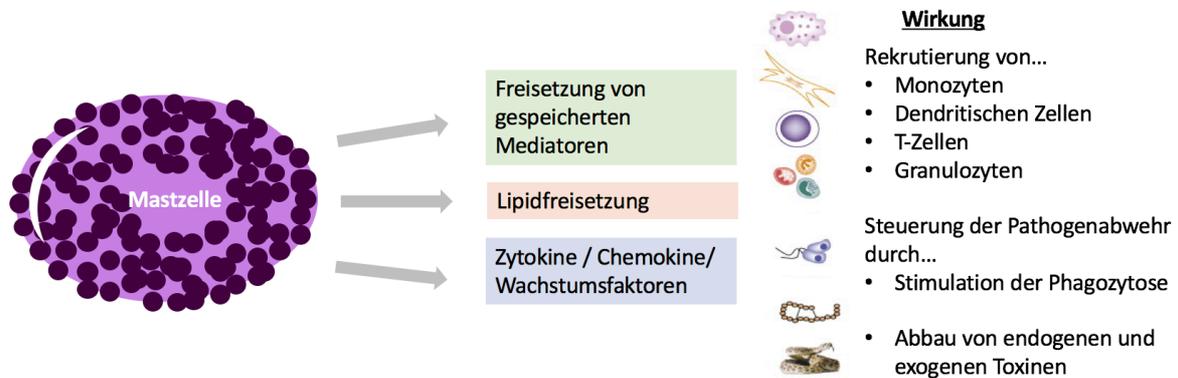


Abbildung 2: Mastzell-Produkte und ihre Wirkungen auf andere Zellen der adaptiven und angeborenen Immunität.

Nach Aktivierung sezernieren Mastzellen in Granula gespeicherte Effektormoleküle in das sie umgebende Gewebe. Zusätzlich werden fettlösliche Mediatoren und Zytokine produziert und freigesetzt. Die Mastzellprodukte haben zahlreiche Effekte auf Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität sowie auf Pathogene und endogene bzw. exogene Toxine. In diesem Zusammenhang wird bspw. die Pathogenabwehr durch die Rekrutierung von phagozytotischen Zellen bzw. die adaptive Immunantwort durch die Aktivierung und Rekrutierung von dendritischen Zellen gefördert (Teile der Abbildung sind entnommen aus Metz und Maurer, 2006).

Neben ihrer Rolle in der angeborenen Verteidigung des Organismus gegen Pathogene und ihrer Beteiligung an der Rekrutierung von Leukozyten in die entzündeten Bereiche wird Mastzellen zudem eine Rolle bei der Induktion der adaptiven Immunantwort zugesprochen. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Mastzellen MHC exprimieren, mit T-Zellen interagieren und somit eine klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen induzieren können (Mekori und Metcalfe 1999; Henz *et al.*, 2001).

Zusätzlich zu der o.g Funktion fördern Mastzellen bzw. die von Ihnen sekretierten Effektormoleküle, die Reifung und Migration dendritischer Zellen. Hierbei sind vor allem das Zytokin IL-1 und der Tumor Nekrose Faktor (TNF) zu nennen (Steinman und Inaba, 1999; Cumberbatch *et al.*, 2000).

Aufgrund ihrer bedeutenden Rolle im angeborenen und adaptiven Immunsystem stellen Mastzellen auch wichtige Immunzellen im Rahmen einer Immunisierung dar.

1.2 Vakzinierungen

Der Begriff Vakzinierung leitet sich vom lateinischen Wort *vacca* (Kuh) ab und geht auf den Mediziner Edward Jenner zurück, welcher im Jahre 1796 erstmals beobachtete, dass Personen, die sich zuvor mit Kuhpocken infiziert wurden, nicht an Pocken erkrankten (Jenner, 1809; Willis, 1997). Vakzinierungen (Impfungen) gehören zu den wichtigsten präventiven Maßnahmen, um einen Organismus vor einer ansteckenden Krankheit zu schützen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, world health organisation) erfasst jährlich die Impfquoten einzelner Länder. Das allgemeine Ziel dabei ist es, durch hohe Impfquoten einzelne Krankheitserreger national und international zu eliminieren. Die WHO nimmt an, dass jährlich 2-3 Millionen Menschen durch Impfungen vor tödlichen Infektionen geschützt werden (Goodchild, 2015).

Bei einer klassischen Impfung wird im Allgemeinen eine aktive Immunisierung durchgeführt. Hier wird die adaptive Immunabwehr ausgenutzt, um den Körper vor einer Infektion mit einem Krankheitserreger zu schützen (Steinman *et al.*, 2008). Hierbei werden inaktive bzw. abgeschwächte Krankheitserreger in den Organismus eingebracht, welche nicht in der Lage sind, die Krankheit auszulösen. Die Erreger werden aber durch das Immunsystem erkannt, so dass APC spezifische Lymphozyten aktivieren und es zur Expansion spezifischer B- und T-Lymphozyten kommt. Bei einem späteren Kontakt mit den echten Krankheitserregern verfügt der Körper über Gedächtniszellen, welche eine schnelle Bekämpfung der Pathogene ermöglichen.

Die bislang am Häufigsten verwendeten Immunisierungsmethoden sind zum einen die intramuskuläre Injektion (IM) und zum anderen die subkutane (SC) Injektion des Impfstoffes. Bei der IM wird der Impfstoff als Depotimpfstoff (> 1ml) (Nicolas und Guy, 2014), in den *muskulus deltoideus* am Oberarm appliziert. Die subkutane Anwendung benutzt eine Nadel, die die Hypodermis, die Fettschicht unter der Dermis, erreicht. Diese Anwendungen erfordern neben einer Verwendung von Spritzen und Kanülen speziell ausgebildetes Personal. Eine Injektion kann schmerzhaft sein und bei den Patienten, vor allem bei Kindern, Stress induzieren. Durch die intramuskuläre sowie die subkutane Applikation werden die in der Haut befindlichen APCs übergangen, jedoch eine lokale Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle ausgelöst. Die Immunantwort wird in diesem Fall von lokal eingewanderten Leukozyten vermittelt, welche aufgrund der freigesetzten Entzündungsmediatoren chemotaktisch in die entzündeten Bereiche einwandern (Combadiere und Liard, 2014).

Ein weiterer Nachteil der IM Injektion liegt in dem mit den Kanülen verbundenen Verletzungsrisiko. So können Stichverletzungen und damit verbunden eine Ansteckung mit Infektionskrankheiten nicht ausgeschlossen werden und kommen vor allem in den ärmeren

Regionen der Welt vor (Mitrugotri *et al.*, 2005; Kermode *et al.*, 2004). Aus diesen Gründen steigt in den letzten Jahrzehnten die Nachfrage nach nadelfreien Immunisierungsmethoden, die den Impfprozess vereinfachen und durch das gezielte Ansprechen von APCs sogar die Impfwirkung verbessern können.

1.2.1 Adjuvantien, Hilfsstoffe der Immunisierung

Die Administration eines Antigens alleine ist meist nicht in der Lage, eine adaptive Immunantwort auszulösen. Aus diesem Grund werden chemische Hilfsstoffe, sogenannte Adjuvantien (*adjuvare* (lat.)), verwendet. Adjuvantien werden, geprägt durch Charles Alderson Janeway Jr. (1943 – 2003), auch als „the immunologist’s dirty little secret“ bezeichnet (Janeway, 1989). Janeway entschlüsselte dieses Geheimnis, indem er den Wirkmechanismus dieser Hilfsstoffe untersuchte. Zur Generierung einer adaptiven Immunantwort ist neben dem Antigen ein zweites Signal (Ko-Signal) notwendig, welches sich in Janeways Arbeiten nach Behandlung mit mikrobiellen Produkten, z.B. LPS oder Zymosan, einstellte (Gayed, 2011). LPS stellt demnach ein Adjuvans dar. Heutzutage ist die Gruppe der verwendeten Adjuvantien lang. Adjuvantien können nach ihrer Beschaffenheit in zwei Untergruppen – partikuläre und nicht-partikuläre Adjuvantien - eingeteilt werden. Zu den partikulären Adjuvantien zählen u.a. Aluminiumsalze, welche bereits seit 1930 verwendet werden (Cox und Coulter, 1997). Als nicht-partikuläre Adjuvantien werden solche bezeichnet, deren Wirkung nicht auf einer partikulären Eigenschaft beruht. In diese Gruppe fällt u.a. ein Bestandteil des LPS (Lipid A) (Alving und Rao, 2008). Durch die Verwendung von Adjuvantien kann die Antigenpersistenz und damit verbunden die Antigen-Aufnahme durch APCs verbessert werden. Zusätzlich ist eine direkte Aktivierung des angeborenen Immunsystems möglich, über welches Einfluss auf die adaptive Immunantwort ausgeübt wird.

1.2.2 Die Methode der transkutanen Immunisierung

Die Methode der transkutanen Immunisierung (TCI) stellt eine Vakzinierungsstrategie dar, bei der das Antigen direkt auf die Haut appliziert wird (Glenn *et al.*, 2000). Diese Methode besitzt bedeutende Vorteile gegenüber der herkömmlich verwendeten intramuskulären bzw. der subkutanen Immunisierung. Die TCI zeichnet sich durch ihre einfache Handhabung aus, bei der auf eine Applikation mit Kanülen verzichtet werden kann. Somit wird die Anwendung der Impfung erleichtert. Es ist keine medizinische Schulung der Anwender notwendig und durch Kanülen verursachte Verletzungen werden ausgeschlossen. Die gezielte Aktivierung von APCs leitet die Generierung einer antigenspezifischen T-Zellantwort ein, welche durch das SALT (*skin associated lymphoid tissue*) vermittelt wird (Streilein, 1983). Durch die epidermale Anwendung wird zudem der direkte Kontakt von starken, potentiell toxischen Adjuvantien mit dem Blutkreislauf vermieden (Ponvert und Scheinmann, 2003).

Einleitung

Im Rahmen einer transkutanen Immunisierung stellt die Haut zunächst eine Barriere für die Agenzien der Immunisierung dar, weshalb die Beschaffenheit der Haut für die Applikation der Wirkstoffe bzw. Antigene berücksichtigt werden muss.

Die Haut kann in Epidermis, Dermis und Subkutis gegliedert werden. Die Epidermis wiederum besteht (von außen nach innen) aus 4 Schichten: dem *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und dem *Stratum basale* (Combadiere und Liard, 2014; vgl. Abbildung 3). Die äußeren Schichten sind aus toten, die inneren zwei Schichten aus lebenden Zellen aufgebaut. Da in der vorliegenden Arbeit mit murinen (Maus) Modellen gearbeitet wurde, soll hier auch auf die Unterschiede der menschlichen Haut im Vergleich zur murinen Haut eingegangen werden. Im Vergleich zur menschlichen Haut ist die murine Epidermis wesentlich dünner, da die einzelnen Schichten aus weniger Zellen bestehen. Zudem ist zu beachten, dass die murine Haut eine hohe Dichte an Haarfollikeln aufweist, wohingegen die menschliche Haut eine geringere Haardichte besitzt (vgl. Abbildung 3; Pasparakis *et al.*, 2014).

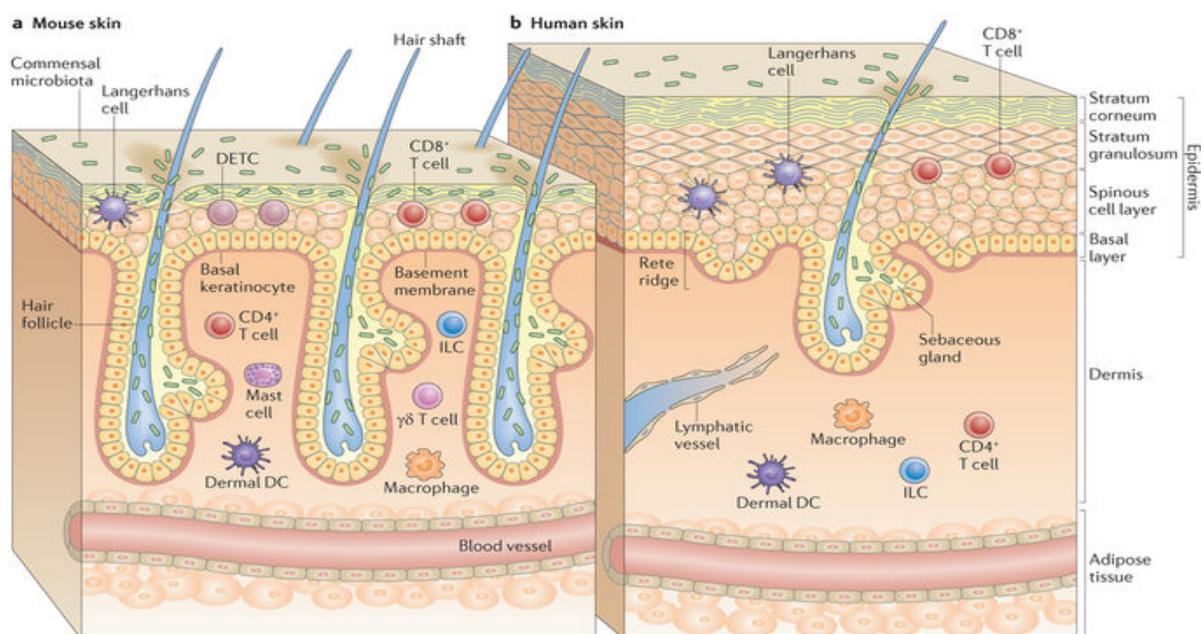


Abbildung 3: Aufbau der Haut.

Murine Haut (**A**) besitzt eine hohe Dichte an Haarfollikeln, wohingegen menschliche Haut (**B**) eine geringe Dichte an Haarfollikeln aufweist. Humane Haut zeichnet sich durch eine dickere Epidermis aus. Die vorherrschenden Zellpopulationen in der Epidermis stellen die Langerhans-Zellen und die residenten $CD8^+$ T-Zellen dar. Die Dermis ist in beiden Spezies bevölkert durch Makrophagen, Mastzellen, T-Zellen und eine kleinen Population von angeborenen lymphoiden Zellen (*innate lymphoide cells*, ILCs), (Abbildung entnommen aus Pasparakis *et al.*, 2014).

Ein Hindernis für die Methode der transkutanen Immunisierung stellt die oberste Hautschicht, das *Stratum corneum*, dar. Dieses ist aus abgestorbenen Keratinozyten aufgebaut und dient

als Schutzbarriere gegen Austrocknung (Attenborough, 1980). Aufgrund seiner Struktur begrenzt es die Molekülgröße der Peptide, welche diese Schicht auf natürliche Weise passieren können, auf 500 Da (Bos und Meinardi, 2000). Der passive Transport der Antigene erfolgt hauptsächlich durch zwei unterschiedliche Methoden: zum einen als interzelluläre Penetration zwischen den Zellen der Epidermis und der Matrix, zum anderen durch freiliegende Haarschächte (Combadiere und Liard, 2014). Größere Moleküle können nur nach einer vorangegangenen Behandlung der Haut, wie bspw. mit Schmirgelpapier (Belyakov *et al.*, 2004) oder Klebestreifen (Yagi *et al.*, 2006) das Stratum corneum passieren. Bei der Entwicklung von effizienten transkutanen Immunisierungsmethoden gilt es, dieses Hindernis zu überwinden.

Die zellulären Prozesse der transkutanen Immunisierung sind schematisch in Abbildung 4 dargestellt:

Gelangt das Antigen (Peptid) in das *Stratum spinosum*, welches aus Keratinozyten und Langerhans Zellen besteht, bzw. in die darunterliegende Dermis, kommt es in Kontakt mit dendritischen Zellen, welche das Antigen endozytotisch aufnehmen, reifen und in die hautdrainierenden Lymphknoten einwandern. Im Lymphknoten präsentieren die dendritischen Zellen das Antigen T-Lymphozyten. Damit kommt es zur u.a. zur Aktivierung naiver T-Zellen und zur Generierung von B- und T-Effektorzellen (Banchereau und Steinman, 1998). In diesem Prozess sind sowohl Langerhans-Zellen als auch dermale dendritische Zellen in der Lage, exogene Peptide auf MHC-I Molekülen CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Dieser Mechanismus wird als Kreuz-Präsentation bezeichnet (Albert *et al.*, 1998).

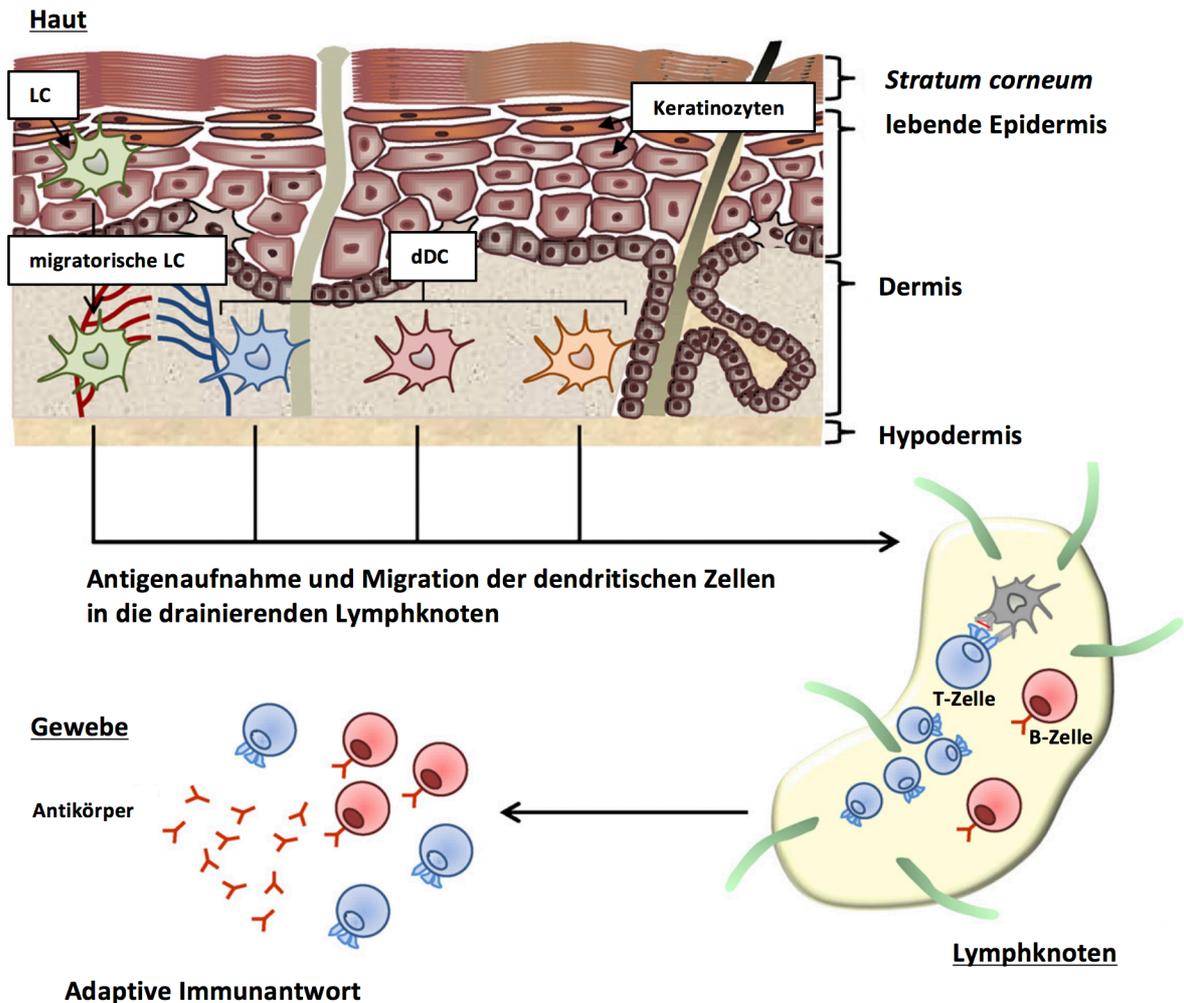


Abbildung 4: Das Immunsystem der Haut.

In der Haut sind zahlreiche immunkompetente Zellen angesiedelt. Zu ihnen gehören Langerhans-Zellen (LC), Keratinozyten und dermale dendritische Zellen (dDC). Langerhans-Zellen und dermale dendritische Zellen nehmen exogene Antigene auf und migrieren in die Haut-residenten Lymphknoten. Dort präsentieren sie das Antigen auf MHC-Komplexen naiven T-Zellen. Es werden so antigenspezifische T und B-Zellen gebildet, welche in die Gewebe auswandern können und eine antigenspezifische Immunantwort auslösen (Abbildung entnommen und übersetzt aus Matsuo *et al.*, 2013).

1.2.3 Die transkutane Immunisierung mit Aldara

In den vergangenen Jahren konnte in unserem Institut eine transkutane Immunisierungsmethode mit dem TLR-7-Agonisten Imiquimod als Adjuvans etabliert werden. Bei der Verwendung dieser Methode kann auf eine vorbereitende Schädigung des *Stratum corneum* verzichtet werden (Rechtsteiner *et al.*, 2005). Bei dieser Methode wird das Antigen SIINFEKL, welches ein Teil des Ovalbumin-Peptids ist (Ova₂₅₇₋₂₆₄), zusammen mit der Creme-Formulierung Aldara auf die rasierte Haut aufgetragen. Aldara wird in der Dermatologie zur Behandlung von Feigwarzen (Beutner *et al.*, 1998a und 1998b; Tyring *et al.*, 1998) und Basaliomen (Beutner *et al.*, 1999) eingesetzt und enthält den Wirkstoff Imiquimod.

Imiquimod besitzt anti-virale und Tumor-hemmende Eigenschaften (Sauder, 2000; Tying *et al.*, 2002) und stellt einen synthetischen Agonisten für den TLR-7 (*toll-like receptor 7*) dar, welcher intrazellulär in Endosomen lokalisiert ist (Hemmi *et al.*, 2002; Heil *et al.*, 2003).

Im Rahmen der transkutanen Immunisierung mit Aldara ereignen sich jedoch zusätzlich einige unerwünschte TLR7-unabhängige Vorgänge. Zum einen werden auf diese Weise keine T-Gedächtniszellen generiert (Rechtsteiner *et al.*, 2005), zum anderen wird neben der Generierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zusätzlich die Expansion von MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*) und regulatorischen T-Zellen (Tregs) gefördert (Dang *et al.*, 2012), welche die zytolytische Aktivität der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen unterdrücken können. Weiter ist eine hemmende Wirkung von Interleukin-10 (IL-10) auf die Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen bekannt. Die Quelle des IL-10 ist jedoch bislang noch unklar (Stein *et al.*, 2011b).

Die ausbleibende Gedächtnis-Antwort kann auf eine suboptimale kostimulierende Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und APCs im Lymphknoten zurückgeführt werden (Warger *et al.*, 2007). Durch zusätzliche Verwendung eines anti-CD40 Liganden, welcher mit CD40 auf der Oberfläche der APCs interagiert (Toes *et al.*, 1998), kann sowohl die Generierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen gesteigert als auch eine T-Zell-Gedächtnisantwort nach der TCI mit Imiquimod induziert werden (Warger *et al.*, 2007). Die Anzahl der mittels Imiquimod induzierten Tregs (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) kann durch eine zusätzliche Verwendung von anti-CD25 bei der TCI reduziert werden, was zu einer Effizienzsteigerung der TCI führt (Stein *et al.*, 2011b).

1.2.4 Mastzellen im Prozess der transkutanen Immunisierung

Mastzellen stellen Vermittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort dar. Sie sind essentiell für die Bekämpfung von bakteriellen Infektionen durch die Rekrutierung von Neutrophilen (Echtenacher *et al.*, 1996; Malaviya *et al.*, 1996). Zusätzlich spielen Mastzellen eine Rolle bei der Rekrutierung von Lymphozyten (McLachlan *et al.*, 2003) und der Migration von Langerhans-Zellen sowie dermalen dendritischen Zellen (Martin-Fontecha *et al.*, 2003; McLachlan *et al.*, 2003; Jawdat *et al.*, 2004; Jawdat *et al.*, 2006) in die drainierenden Lymphknoten. Auf Basis dieser Forschungsergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mastzell-aktivierende Substanzen eine starke protektive antigenspezifische Immunantwort auslösen können (McLachlan *et al.*, 2008).

Im Prozess der transkutanen Immunisierung mit Aldara wird zunächst eine Entzündungsreaktion in der Haut gefördert, was u.a. an einer geröteten, schuppigen Haut, bzw. bei Applikation auf die Ohren anhand einer gesteigerten Ohrschwellung, erkennbar ist. Studien zeigten einen Einfluss von Aldara auf die Wanderung der Langerhans-Zellen (LC)

aus der Epidermis in die drainierenden Lymphknoten (Suzuki *et al.*, 2000), obgleich diese Zellen kein TLR7 exprimieren (Mitsui *et al.*, 2004).

Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe stellten einen Zusammenhang zwischen der Langerhanszellwanderung und der Aktivierung von dermalen Mastzellen in Abhängigkeit von TLR7 heraus (Heib *et al.*, 2007). Im Detail konnte eine gesteigerte IL-1 β - und TNF- α -mRNA-Expression in dermalen Mastzellen aus Imiquimod-behandelten Tieren gezeigt werden. Die Auswanderung epidermaler LC in die drainierenden Lymphknoten ist abhängig von IL-1 β , wohingegen die primäre Entzündungsreaktion – gemessen an einer gesteigerten Ohrschwellung – von beiden genannten Zytokinen beeinflusst wird. Zusätzlich konnte in der Arbeit von Heib und Kollegen ein positiver Effekt von Mastzellen auf den Prozess der transkutanen Immunisierung mit Aldara gezeigt werden. Mastzell-defiziente Mäuse (*C57BL/6J-Kit^{W^{sh}}*) zeigten in diesem Zusammenhang nach Immunisierung mit dem Modell-Peptid SIINFEKL gegenüber dem Wildtyp eine verminderte Expansion antigenspezifischer zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen. Anhand dieser Erkenntnisse kann Mastzellen eine wichtige Rolle in der TCI mit Aldara zugeschrieben werden (Heib *et al.*, 2007).

1.3 Die Familie der TRP-Rezeptoren

Die heterogene Gruppe der TRP (*transient receptor potential*) -Kanäle ist in zahlreichen sensorisch-physiologischen Vorgängen, beispielsweise beim Sehen, Schmecken und Riechen sowie der Temperaturwahrnehmung involviert. Aufgrund der Beteiligung der TRP-Kanäle an diesen vielseitigen Prozessen sind Mutationen in TRP-Proteinen mit spezifischen Krankheiten, Kanalopathien genannt, assoziiert. Mittlerweile sind 6 TRP-Kanal abhängige Kanalopathien bekannt. Beispielsweise ist eine Mutation in TRPP2 mitverantwortlich für die Ausbildung von polyzystischen Nieren (Nilius, 2007).

Das erste Mitglied der TRP-Protein Familie wurde 1989 von Montell und Rubin in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Eine Mutation in dem *trp*-Gen führt zu einer gestörten Lichtreiz-Wahrnehmung der Tiere. Heutzutage sind in Säugern 28 TRP-Proteine bekannt, welche in 6 Unterfamilien eingeteilt werden können: TRPC (*canonical*), TRPV (*vanilloid*), TRPM (*melastatin*), TRPA (*ankyrin*), TRPML (*mucoipin*) und TRPP (*polycytin*) (Montell *et al.*, 2002; Clapham *et al.*, 2005). TRPM-Moleküle bilden in der Zellmembran Kanäle aus 4 Untereinheiten (Kedei *et al.*, 2001; Gaudet *et al.*, 2009), welche jeweils aus 6 Transmembran-Domänen aufgebaut sind (Owsianik *et al.*, 2006). Zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment befindet sich eine Porenregion (Vannier *et al.*, 1998; Clapham *et al.*, 2005). Die Mehrzahl der TRP-Proteine sind nicht-selektive Kationen-Kanäle. Dabei überwiegt jedoch die Affinität zu Calcium im Vergleich zu Natrium. Eine Aktivierung dieser Kanäle bspw. durch eine erhöhte bzw. erniedrigte Temperatur führt in diesem Zusammenhang zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle, was eine Depolarisation der Zelle auslöst (Gees, 2010). Auf diese Weise werden Calcium-abhängige Signalwege gefördert.

1.3.1 Der TRPM4 Rezeptor

Der TRPM4 (*transient receptor potential melastatin 4*) gehört zur Familie der TRP-Kationen-Kanäle und zur Untergruppe der Melastatin-Rezeptoren (TRPM). TRPM4 ist ein calciumabhängiger Kanal, der selektiv permeabel für einwertige Kationen (Na^+/K^+) ist (Launay *et al.*, 2002). Nach der Aufklärung der molekularen Struktur von TRPM4 im Jahre 2001 (Xu *et al.*, 2001) konnte die TRPM4-Expression in einer Vielzahl von Geweben und auf mehreren Zelltypen, bspw. auf dendritischen Zellen, Beta-Zellen und Mastzellen, nachgewiesen werden (Vennekens *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007; Barbet *et al.*, 2008).

TRPM4 wird durch intrazelluläres ATP inhibiert und durch eine erhöhte Calcium-Konzentration im Zytoplasma aktiviert. Nach Aktivierung des TRPM4 kommt es zu einem Einstrom von einwertigen Kationen in die Zelle, was zu einer Erhöhung des Membranpotentials führt. Durch diese Depolarisation der Zelle wird ein weiterer Einstrom von Calciumionen in die Zelle durch CRAC-Kanäle (*calcium release-activated Ca^{2+} channel*) gehemmt (Vennekens *et al.*, 2007; Nilius *et al.*, 2005). Auf diese Weise regulieren die

TRPM4-Kanäle calciumabhängige Signalwege in der Zelle und damit u. a. die Freisetzung von Zytokinen in Mastzellen und die Insulin-Sekretion durch Beta-Zellen (Vennekens *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007). Die Verwendung eines TRPM4-Antagonisten, welcher in der Lage ist, der hemmenden Wirkung des TRPM4 auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration entgegen zu wirken, ist eine interessante Möglichkeit, die Aktivierung von Mastzellen und damit verbunden die Produktion von Mastzell-Mediatoren zu verstärken.

1.3.1.1 Die Mastzelldegranulation wird durch TRPM4 reguliert

Für die Aktivierung von Mastzellen ist die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration essentiell. Nach einer Stimulation der Mastzelle, beispielsweise durch eine Antigen-vermittelte FcεRI-Kreuzvernetzung, kommt es zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration aufgrund der Mobilisierung der im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeicherten Calciumionen (Ca²⁺), gefolgt von einem Calcium-Einstrom aus dem extrazellulären Raum durch CRAC-Kanäle (Hoth und Penner, 1992; Vennekens *et al.*, 2007). Bedingt durch die erhöhte Calcium-Konzentration wird die Exozytose der in den Granula gespeicherten Mastzellmediatoren sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) ausgelöst.

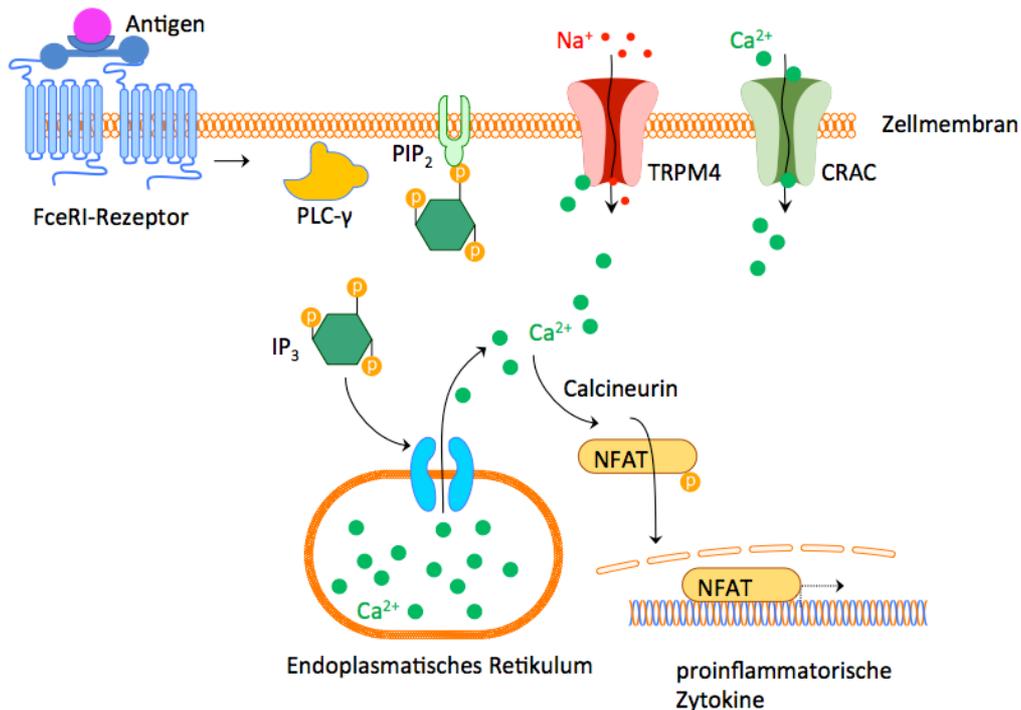


Abbildung 5: Der zytosolische Calcium-Gehalt wird durch den TRPM4-Rezeptor reguliert.

Nach Kreuzvernetzung der Fc ϵ RI-Rezeptoren durch Antigene kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC- γ), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) spaltet. IP $_3$ wiederum aktiviert IP $_3$ -sensitive Kanäle in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), was eine Freisetzung der gespeicherten Calciumionen induziert, gefolgt von einem extrazellulären Calciumionen-Einstrom durch CRAC-Kanäle. Der calciumabhängige, spannungsgesteuerte TRPM4-Kanal wird durch einen erhöhten zytosolischen Calcium-Gehalt aktiviert. Darauf erfolgt ein Natriumionen-Einstrom in die Zelle, welcher die Diffusion von Calciumionen aus dem ER bzw. den Einstrom von extrazellulären Calciumionen unterdrückt. Auf diese Weise werden alle nachgeschalteten calciumabhängigen Signalwege, bspw. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), welcher die Expression von proinflammatorischen Zytokinen reguliert, gehemmt.

Der calciumabhängige TRPM4-Rezeptor auf der Mastzelloberfläche wird durch eine erhöhte zytosolische Calcium-Konzentration aktiviert und reduziert durch den Einstrom von extrazellulären Natriumionen die treibende Kraft für einen weiteren Einstrom von intrazellulären und extrazellulären Calciumionen in das Zytoplasma. Dadurch wird die Sekretion von Effektormolekülen, wie u. a. proinflammatorische Zytokine (siehe Abbildung 5), gehemmt.

Der wohl bedeutendste Antagonist des TRPM4 ist das Phenanthren-Derivat **9-Phenanthrol** (Phenanthren-9-ol). 9-Phenanthrol wurde 1902 von Pschorr und Schröter entdeckt und ist ein höchst selektiver Inhibitor des TRPM4-Kanals (Pschorr und Schröter, 1902; Grand *et al.*, 2008; Guinamard *et al.*, 2014). 9-Phenanthrol besitzt ein Molekulargewicht von 194 g/mol und ist stark hydrophob, was es dem in DMSO-löslichen Stoff ermöglicht, sich in Geweben anzureichern (Escartin und Porte, 1999; Koenig *et al.*, 2013). Durch seine Spezifität ermöglicht 9-Phenanthrol die Erforschung der Funktion von TRPM4 in unterschiedlichen Geweben (Guinamard *et al.*, 2014).

Eine zuvor erschienene Arbeit zeigte, dass sich mit IgE-DNP/DNP-HSA aktivierte Mastzellen aus TRPM4-defizienten Mäusen hyperreaktiv verhalten (Vennekens *et al.*, 2007). Auf dieser Beobachtung fußen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente mit dem TRPM4-Antagonisten 9-Phenanthrol, welcher als zusätzlicher Mastzellaktivator zur Verstärkung der TCI eingesetzt werden sollte.

1.4 Die Familie der Calcium-aktivierten Kalium-Kanäle (K_{Ca})

Calcium stellt einen ubiquitär vorkommenden sekundären Botenstoff in der Zelle dar, welcher an der Regulation zahlreicher Signalwege in der Zelle beteiligt ist. Aus diesem Grund besitzen Zellen diverse Mechanismen den intrazellulären Calcium-Gehalt genauestens zu regulieren (Stocker, 2004). Neben der oben beschriebenen Familie der TRP-Kanäle gibt es in der Zellmembran weitere Calcium-gesteuerte Ionenkanäle. Eine Gruppe stellen die Calcium-aktivierten Kalium-Kanäle (K_{Ca}) dar. Diese wurden erstmals 1958 in Erythrozyten beschrieben (Gárdos, 1958). Ihre Aktivierung führt Hyperpolarisation des Membranpotentials, verbunden mit einem Schrumpfen der Zelle. Aufgrund ihrer Leitfähigkeit für Kalium-Ionen, ihrer Spannungssensitivität und nach pharmakologischen Gesichtspunkten können die K_{Ca} in drei Unterfamilien untergliedert werden. Es gibt Kanäle mit großer Leitfähigkeit (*big*; BK $_{Ca}$), mittlerer Leitfähigkeit (*intermediate*; IK $_{Ca}$) und geringer Leitfähigkeit (*small*; SK $_{Ca}$) (Wei *et al.*, 2005; Guéguinou *et al.*, 2014).

K_{Ca} -Kanäle bestehen, wie auch die TRP (vgl. Kapitel 1.3), aus vier Untereinheiten, welche jeweils aus 6 Transmembran-Domänen (BK $_{Ca}$: 7 Transmembrandomänen) gebildet wird. Zwischen der 5. und der 6. Transmembrandomäne befindet sich eine Porenregion. BK $_{Ca}$ verfügen ergänzend dazu über zusätzliche regulatorische Untereinheiten (Guéguinou *et al.*, 2014).

1.4.1 Der $K_{Ca3.1}$ Rezeptor

Der transmembrane $K_{Ca3.1}$ -Kanal gehört zur Familie der Calcium-sensitiven Kalium-Kanäle (K_{Ca}) und darin zur Unterfamilie der IK $_{Ca}$. Vergangene Studien zeigten eine Expression von $K_{Ca3.1}$ u.a. in Erythrozyten, aktivierten T- und B-Zellen (Ghanshani *et al.*, 2000; Wulff *et al.*, 2004), Makrophagen (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1997; Toyama *et al.*, 2008), Epithel-Zellen (Rufo *et al.*, 1996) und Mastzellen (Duffy *et al.*, 2001, 2004; Shumilina *et al.*, 2008).

$K_{Ca3.1}$ besitzt 4 Untereinheiten, welche jeweils aus 6-Transmembrandomänen mit intrazellulären C- und N-Termini aufgebaut sind (Bradding und Wulff, 2009). Funktionell reguliert $K_{Ca3.1}$ das Membranpotential sowie Calcium-abhängige Signalprozesse in der Zelle.

Steigt der Calciumgehalt in der Zelle, vermittelt Calmodulin die Aktivierung des Kanals (Fanger *et al.*, 1999). Die mittlere effektive Calciumkonzentration (EC_{50}) beträgt hier 300 nM

(Ishii *et al.*, 1997, Logsdon *et al.*, 1997). Die erhöhte Calciumkonzentration ist Folge einer Aktivierung der Zelle. Extrazelluläres Calcium gelangt dabei durch CRAC-Kanäle oder durch die in Kapitel 1.3 beschriebenen TRP-Kanäle in die Zelle. Intrazellulär gespeichertes Calcium wird durch Aktivierung IP₃-sensitiver Kanäle in der Membran des ER vermittelt (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6).

Nach Aktivierung des K_{Ca}3.1 kommt es zum Ausstrom von einfach positiv geladenem Kalium aus der Zelle und damit verbunden zur Hyperpolarisation der Zelle. In diesem Zusammenhang erhöht sich die treibende Kraft für einen weiteren Calcium-Einstrom in die Zelle. Die erhöhte Calciumkonzentration fördert über den NFAT-Signalweg die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen (vgl. Abbildung 5 und Abbildung 6). Zusätzlich ist eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration Grundvoraussetzung für die Migration (Cruse *et al.*, 2006) und Proliferation der Zellen. Studien zeigten, dass z.B. die Proliferation von T-Zellen von einer gesteigerten K_{Ca}3.1-Expression begleitet wird und durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren dieses Kanals gehemmt werden kann (Ghanshani *et al.*, 2000). Ein selektiver Inhibitor von K_{Ca}3.1 ist TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole) (Wulff *et al.*, 2000).

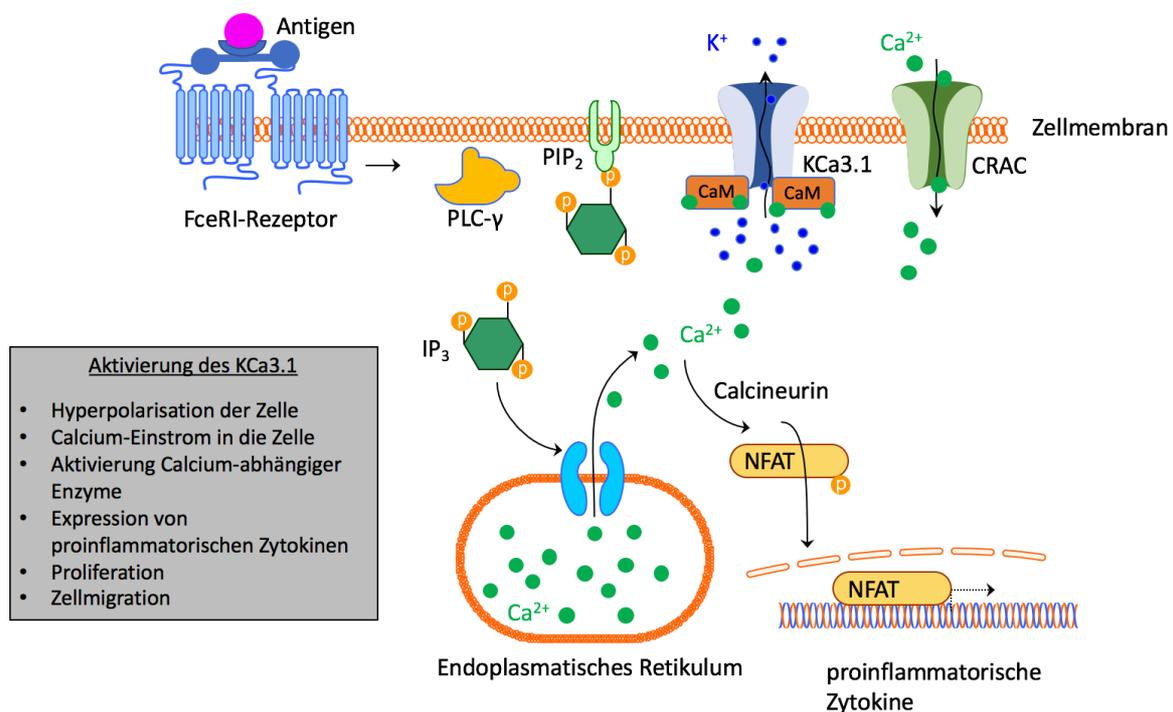


Abbildung 6: Schematische Darstellung der physiologischen Rolle von K_{Ca}3.1.

Der Calcium-abhängige Kalium-Kanal K_{Ca}3.1 wird durch eine ansteigende intrazelluläre Calciumkonzentration, ausgelöst durch eine Calcium-Freisetzung (Ca²⁺) aus dem Endoplasmatischen Retikulum oder durch einen extrazellulären Calcium-Einstrom (CRAC-Kanäle), aktiviert. Dieser Prozess wird durch Calmodulin (CaM) vermittelt und induziert einen Kalium-Efflux (K⁺), welcher einen weiteren Calcium-Influx in die Zelle fördert. Es kommt zur Aktivierung Calcium-abhängiger Signalwege in der Zelle (PLC-γ: Phospholipase C-γ; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; NFAT: *nuclear factor of activated T-cells*).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Für eine erfolgreiche Weiterentwicklung der transkutanen Immunisierung, welche im Jahre 2005 von Rechtsteiner *et al.* etabliert wurde, ist ein detailliertes Verständnis der zellulären Mechanismen und der Rollen einzelner löslicher Komponenten, z.B. sezernierte Zytokine, im Immunsystem Haut unerlässlich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die **migrations-abhängigen Mechanismen** im Prozess der transkutanen Immunisierung mit Aldara beleuchtet werden. Ein Fokus wurde dabei auf die Frage gelegt, welche Rolle migratorische dermale dendritische Zellen im Prozess der primären Immunantwort nach TCI spielen.

Frühere Arbeiten wiesen auf eine Beteiligung von Inflammasom-induziertem IL-1 an dem Prozess der Aldara vermittelten Entzündungsreaktion der Haut hin (Walter *et al.*, 2013). Zusätzlich war aus Vorarbeiten eine inhibitorische Rolle von IL-10 in der TCI bekannt, wobei die zellulären Quellen des IL-10 bislang nicht eindeutig identifiziert sind (Stein *et al.*, 2011b). Weitere Ziele dieser Arbeit lagen daher in der Charakterisierung der Rolle des **Cytokins IL-1** im Prozess der TCI sowie der Analyse der **IL-10 Produzenten** in der transkutan behandelten Haut.

Neben dem Verständnis der zellulären Abläufe in der Haut sollte im Rahmen dieser Arbeit die Aldara-vermittelte **TCI durch zusätzliche Adjuvantien optimiert** werden.

Im Jahre 2007 konnte in unserem Institut ein positiver Effekt von Mastzellen auf die TCI mittels Aldara nachgewiesen werden, weshalb Mastzellen eine bedeutende Initiator-Funktion in der transkutanen Immunisierung zugeschrieben wurde (Heib *et al.*, 2007). Mit dem Ziel einer gesteigerten Mastzellaktivierung sollte in der vorliegenden Arbeit der TRPM4-Antagonist 9-Phenanthrol für die TCI verwendet und der daraus resultierende Effekt auf die Effizienz der transkutanen Immunisierung analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

2.2 Allgemeine Chemikalien und Puffer

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer angegeben. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen der höchsten Reinheitsstufe (*p.a.*).

2.2.1 Zytokine

Folgende Zytokine wurden für die Generierung von Mastzellen aus dem Knochenmark (BMMC - *bone marrow-derived mast cells*) verwendet. Für den Einsatz von Zytokinen gilt, dass eine Einheit (Unit) die Konzentration darstellt, welche die halbmaximale Proliferation einer Indikatorzelllinie bewirkt.

Murines IL-3 (mIL-3)

Das murine IL-3 wurde aus Kulturüberständen der Tumorzelllinie X63/0 gewonnen. Hier wurde die Indikatorzelllinie DA-1 verwendet.

Murines rekombinantes IL-4 (mrIL-4)

Das murine, rekombinante IL-4 wurde aus transformierten 3T3-IL-4-Zellen gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Hier wurde die Indikatorzelllinie C1/9.4 verwendet.

Muriner rekombinanter Kit-Ligand (mrKit-Ligand)

Die cDNA für den Kit-Ligand wurde von Dr. G. W. Bornkamm (GSF München) zur Verfügung gestellt. Der Kit-Ligand wurde in *E. coli* kloniert. Die Expression des mrKit-Liganden wurde mit Hilfe von IPTG induziert. Die Zellpellets wurden anschließend mit Harnstoff-Puffer lysiert und über eine Nickel-Agarose-Säule gereinigt.

2.2.2 Medien zur Kultivierung von Zellen

Fötale Kälberserum (FCS)

Das fötale Kälberserum (FCS) wurde von der Firma Gibco bezogen. Vor Gebrauch wurde das FCS zur Inaktivierung der Komplementkomponenten im Wasserbad 45 min bei 56 °C erhitzt und 20 min bei 600xg zentrifugiert.

Material und Methoden

Kit-Ligand-Mastzellfutter (KL-MZF)

FCS	10 %
Natriumpyruvat	1 %
Glutamin	1 %
IL-3	20 U/ml
IL-4	50 U/ml
Kit-Ligand (Stem Cell Factor, SCF)	200 ng/ml
in IMDM (Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (Sigma) gelöst und 1:1000 mit Penicillin/Streptomycin versetzt	

Minimal Essential Medium (MEM)

MEM-Trockenpulver	10,58 g/l
HEPES-Puffer	4,77 g/l
Penicillin/Streptomycin	1 %
2-Mercaptoethanol	1 %
in VE-Wasser gelöst und steril filtriert (0,2 µm)	

Testmedium (5%/10%; TM5/10)

FCS	5%/10 %
Natriumpyruvat	1 %
Glutamin	1 %
in IMDM (Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (Sigma) gelöst und 1:1000 mit Penicillin/Streptomycin versetzt	

2.2.3 Puffer und Lösungen

ACK-Puffer

Ammoniumchlorid	8,02 g/l
Kaliumhydrogencarbonat	0,1 g/l
EDTA	0,037 g/l

Annexin-V-Bindepuffer (10x)

HEPES (pH 7,4)	0,1 M
Natriumchlorid	1,4 M
Calciumchlorid	25 mM

in VE-Wasser gelöst und steril filtriert

AEC-Lösung

AEC-Tablette	1
Dimethylformamid	2,5 ml

in Natriumacetatpuffer auf 50 ml auffüllen, steril filtrieren

Citratpuffer

Citrat	40 mM
Natriumhydrogenphosphat	60 mM

in VE-Wasser gelöst, pH 4,4 – 4,5

Material und Methoden

EDTA-Puffer

EDTA	30 mM
Natriumazid	0,01 %
in 1x PBS gelöst	

FACS-Puffer

Rinderserumalbumin (BSA, 0,2 µm)	0,5 %
Natriumazid	0,01 %
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	5 mM
in 1x PBS gelöst	

Gey`s Lysepuffer

Ammoniumchlorid	150 mM
Kaliumhydrogencarbonat	1 mM
EDTA	1 mM
in VE-Wasser gelöst, auf pH 7,3 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm)	

Glycin-Lösung

Glycin in VE-Wasser gelöst, pH 10,7	0,2 M
-------------------------------------	-------

Natriumacetat-Puffer

Essigsäure	6 g/l
Natriumacetat-Trihydrat	1,56 g/l
in VE-Wasser gelöst	

Phosphate Buffered Saline (1x PBS)

Natriumchlorid	8,18 g/l
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,56 g/l

in VE-Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm)

Physiologische Trypanblau-Lösung

Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, welcher in tote Zellen diffundiert und diese unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen lässt.

Trypanblau in VE-Wasser	0,2 %
Natriumchlorid in VE-Wasser	4,25 %
Im Verhältnis 1:5 mischen	

Saponin-Puffer

Rinderserumalbumin (BSA, 0,2 µm)	0,5 %
Natriumazid	0,005 %
Saponin	0,5 %
In 1x PBS gelöst	

2.2.4 Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
Aldara	MEDA
3-Amino-9-ethyl-carbazole (AEC)	Sigma
Annexin V-FITC	PD Pharmingen
CFSE	Molekular Probes Europe BV
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences
Deferoxamin	Hospira
DMSO	Sigma-Aldrich
DNase-I	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
EGTA	Sigma-Aldrich
Eisen-III-Sulfat	Sigma-Aldrich
Entellan	Merck
Essigsäure (konz.)	Merck
Ethanol (96 %)	Merck
FCS	Gibco
Flow-Count Fluorospheres	Beckman Coulter
Fluo-3AM	Invitrogen
HBSS (1x; -Ca/Mg)	Sigma-Aldrich
Histofix	Roth
Imiquimod	Invitrogen
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Ketamin	Ratiopharm
Kollagenase-2	Worthington
Olivenöl	ja!
9-Phenanthrol	Sigma-Aldrich
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamin	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Rompun	Bayer
SIINFEKL-Peptid	Peptides and elephants GmbH
Thapsigargin	Sigma-Aldrich
Toluidinblau O	Merck
Tram-34	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Roth
Vectastain ABC-Kit	Vector
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck
Xylol	Roth

2.2.5 Salbengrundlage

Die im Rahmen der transkutanen Immunisierung verwendete Salbengrundlage entspricht einer Basiscreme nach DAG (Deutscher Arzneimittel Codex). Sie stellt eine amphiphile Creme dar, welche unbegrenzt lipophile und hydrophile Substanzen aufnehmen kann.

Bestandteile:

Glycerolmonostearat, Cetylalkohol, MCT (Mittelkettige Triglyceride), Vaseline, Macrogol-20-glycerolmonostearat; Propylenglycol, gereinigtes Wasser.

2.3 verwendete Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten murinen Antikörper.

In Tabelle 2 sind die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper dargestellt. Die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper wurden für die durchflusszytometrische Analyse mittels FACS oder zur Analyse Mittels ELISpot eingesetzt. Zu den einzelnen murinen Antikörpern ist jeweils der Klon aus dem dieser generiert wurde, die eingesetzte Verdünnung und der Hersteller angegeben.

Verwendung	Antigen/Markierung	Klon	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
FACS	CD8-APC	53-6.7	1:200	eBioscience
	CD8-PB	53-6.7	1:400	BioLegend
	CD8-APC-Cy7	53-6.7	1:200	eBioscience
	CD11b-PB	M1/70	1:200	eBioscience
	CD11b-PE-Cy7	M1/70	1:400	BioLegend
	CD11c-APC	N418	1:500	BioLegend
	CD19-biotinyliert	16-10A1	1:100	eBioscience
	CD80-FITC	16-10A1	1:1000	BioLegend
	CD80-PE	16-10A1	1:1000	BioLegend
	CD86-APC	GL-1	1:1500	BioLegend
	CD90.2-biotinyliert	30-H12	1:400	BD
	CD103-BV510	2E7	1:200	BioLegend
	CD107a-APC	eBio1D4B	1:800 – 1:1000	eBioscience
	CD117-APC-Cy7	ACK2	1:400	eBioscience
	CD117-PB	ACK2	1:800	BioLegend
	CD207-PE	eBioL31	1:200	eBioscience
	Annexin-V-FITC		1:20	BD
	Fc-Block	CD16/32	1:50	Eigenherstellung
	FcεRI-FITC	MAR-1	1:400	BioLegend
	FcεRI-PE-Cy7	MAR-1	1:400	BioLegend
ELISpot	MHC-II-PB	M5/114.15.2	1:4000	eBioscience
	Streptavidin-PerCP		1:800	BD
	SIINFEKL-H2K ^b -Tetramer-PE	25.D1.16	1:125	Eigenherstellung
	IFN-γ	AN-18	1:100	Mabtech
	anti-IFN-γ-bio	R4-6A2	1:500	Mabtech

2.4 Verwendete Mausstämme

Alle Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Sie waren einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Raumtemperatur lag konstant bei 22 ± 2 °C.

Die Haltung erfolgte in Tierhaltungseinrichtungen des „Translational Animal Research Center“ (TARC) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz nach aktuellen Tierschutzbedingungen. Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Mausstämme, alle C57BL/6-Hintergrund, verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Mausstämme.

Mausstamm	Herkunft	Beschreibung / Literatur
<i>Batf3</i> ^{-/-}	The Jackson Laboratory	Exon 1 und 2 des <i>Batf3</i> -Gens wurden durch eine Cre-Kassette ersetzt (Hildner <i>et al.</i> , 2008).
C57BL/6	Janvier	
<i>C57BL/6-Kit</i> ^{W^{-sh}}	Institut für Immunologie	Mastzell-defiziente Mäuse mit einer natürlich-vorkommenden Inversionsmutation in den regulatorischen Elementen des W (<i>white spotting</i>)-Locus (Chabot <i>et al.</i> , 1988; Nagle <i>et al.</i> , 1995; Berrozpe <i>et al.</i> , 1999).
C57BL/6-OT1 (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J)	Institut für Virologie, Mainz, Prof. Matthias Reddehase	Die CD8 ⁺ T-Zellen der Tiere tragen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, welcher Teile des Ovalbumin erkennt (OVA ₂₅₇₋₂₆₄) (Hogquist <i>et al.</i> , 1994).
<i>Ccr7</i> ^{-/-}	Hautklinik der Uniklinik Mainz, Prof. Esther von Stebut-Borschitz	Deletion in Exon 3 des <i>Ccr7</i> -Gens in allen Zellen (Förster <i>et al.</i> , 1999).
<i>CD11cCre</i>	Institut für Molekulare Medizin, Mainz, Prof. Ari Waismann	Expression der Rekombinase Cre in Dendritischen Zellen. Stamm kann zusammen mit loxP-flankierten Gensegmenten zur Generierung Zell-spezifischer Gen-Deletionen verwendet werden.
<i>CD11cCre x Il10</i> ^{fl/fl}	Institut für Molekulare Medizin, Mainz, Prof. Ari Waismann	IL-10-defiziente Dendritische Zellen
<i>Il-1r1</i> ^{-/-}	The Jackson Laboratory	Homozygote Deletion des <i>Il-1r1</i> -codierenden Gens in allen Zellen. Die offizielle Stammbezeichnung lautet B6.129S7-Il1r1tm1Imx/J (Glaccum <i>et al.</i> , 1997)
<i>Il-10</i> ^{fl/fl}	Institut für Immunologie, Mainz	Geschwistertiere der IL-10-defizienten Mausstämme

Material und Methoden

<i>Il-10.egfp</i>	Bundesinstitut Risikobewertung, Berlin	für	Die <i>Il-10.egfp</i> Reportermaus, oder auch <i>B-Green</i> -Maus stellt einen knock-in Stamm dar. Hier wurde eine IRES-eGFP Kasette stromabwärts des Translations-Stop-Codons des <i>Il-10</i> Gens eingefügt. Der Ansatz ermöglicht eine eGFP-Fluoreszenz <i>IL-10</i> produzierenden Zellen (Neves et al., 2010).
<i>LysMCre</i>	Centrum für Thrombose und Hämostase, Mainz, Prof. Philip Wenzel		<i>LysMCre</i> Mäuse erlauben eine Deletion von loxP-flankierten Zielgenen in myeloiden Zellen (Clausen et al., 1999)
<i>LysMCre x Il10^{fl/fl}</i>	Institut für Molekulare Medizin, Mainz, Prof. Ari Waismann		<i>IL-10</i> -defiziente myeloide Zellen
<i>Mcpt5Cre</i>	Institut für Immunologie, Dresden Prof. Axel Roers		Das Exon 1 des <i>Mcpt5</i> Gens wurde durch eine Cre-Kasette ersetzt (Scholten et al., 2008). Stamm zur Generierung mastzellspezifischer Gen-Deletionen (loxP)
<i>Mcpt5Cre x Il10^{fl/fl}</i>	Institut für Immunologie, Mainz		<i>IL-10</i> -defiziente Mastzellen
<i>Trmp4^{-/-}</i>	Institut für Pharmakologie, Heidelberg, Prof. Marc Freichel		Homozygote Deletion von Exon 15 und 16 des <i>Trpm4</i> -Gens (Vennekens et al., 2007).

2.5 In vitro-Experimente

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Materialien und Puffern durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre im Brutschrank.

2.5.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die mit Mastzellfütter gezüchteten BMMC wurden geerntet und 5 min bei 500xg in einer Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, 10 ml MEM-Medium zugefügt und resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden zu 90 µl Trypanblaulösung pipettiert und 10 µl dieser Lösung in eine Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Kammertiefe) gegeben. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der für die sogenannte Vitalfärbung der Zellen verwendet wird. Lebende Zellen können den sauren Farbstoff ausschließen, wohingegen tote Zellen den Farbstoff aufnehmen. Diese erscheinen für den Beobachter blau. Ausgezählt wurden lediglich die farblosen, lebenden Zellen in vier Großquadranten mit jeweils einer Grundfläche von 1 mm². Aus den Einzelergebnissen wurde ein Mittelwert (MW) ermittelt. Mit Hilfe der Formel (2.a) wurde die Gesamtzellzahl errechnet. Für die weitere Verwendung wurden die Zellen auf eine Konzentration von 2x10⁶ Zellen/ml mit KL-MZF eingestellt.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{MW} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) \quad (2.a)$$

2.5.2 Entnahme von Milzen und Herstellung einer Splenozyten-Einzelzellsuspension

Zur Entnahme von Milzen wurden die Tiere mit CO₂ abgetötet und mit Hilfe einer Präparier-Schere unterhalb des linken Rippenbogens eingeschnitten. Die Milz kann auf diese Weise mit einer Pinzette herausgezogen und abgetrennt werden. Anschließend wurden die Milzen auf einem mit PBS (1x) angefeuchteten Zellsieb (70 µm) zerrieben und in PBS (1x) resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (500xg/ 5 min/ 4 °C) wurde der Überstand verworfen und zur Lyse der vorhandenen Erythrozyten wurde das Zellpellet für 5 min bei Raumtemperatur in 5 ml ACK-Puffer aufgenommen. Die Lyse wurde durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt beendet. Weiter wurden die Zellen einmal in jeweils 10 ml PBS (1x) gewaschen. Für eine anschließende durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen in 5 ml FACS-Puffer aufgenommen und bei Bedarf erneut über ein Zellsieb filtriert.

Für eine Restimulation der Zellen mit Antigen (vgl. Kapitel 2.7.6) wurden die Milzzellen zunächst mittels elektronischem Blutbild-Analysator (Scil vet ABC Analyzer [Scil animal care company GmbH]) gezählt und auf 5 x 10⁵ Zellen pro 50 µl in IMDM - versetzt mit 5 % FCS - eingestellt.

2.5.3 Isolation von Knochenmarkszellen

Als Modell für die Untersuchung der Funktion von murinen Mastzellen *in vitro* werden sogenannte *bone marrow-derived mast cells* (BMMC) aus Knochenmarkszellen gezüchtet. Die Entwicklung der Mastzellvorläufer aus dem Knochenmark zu Mastzellen erfolgt durch mehrwöchige Kultivierung in IL-3-haltigem Medium (Ihle *et al.*, 1983). Die Isolation von Knochenmarkszellen erfolgte unter einer Sterilbank. Dafür wurden zunächst die Hinterbeine der zuvor mit CO₂ getöteten Mäuse von Fell und Haut befreit und entfernt. Anschließend wurden jeweils das Femur bzw. die Tibia heraus präpariert. Zur Desinfektion wurden die isolierten Knochen zunächst in Isopropanol gewaschen. Ein anschließender Waschschrift in MEM-Medium diente der Entfernung des Isopropanols. Aufbewahrt wurden die Knochen über den Zeitraum der Präparation in einem zweiten, separaten MEM-Medium-Gefäß. Im weiteren Verlauf wurden die Enden der Röhrenknochen aufgeschnitten und das Knochenmark mit jeweils 5 ml MEM-Medium mittels Kanüle (0,55x25 mm) ausgespült. Die erhaltene Suspension wurde über ein 70 µm-Zellsieb gegeben und so von Knochensplittern o. ä. befreit. Nach einer anschließenden Zentrifugation (500xg/ 4 °C/ 5 min) wurde der Überstand verworfen und im Zellpellet vorhandene Erythrozyten mit Hilfe von 2 ml Gey's Lysepuffer 1 min lysiert. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von 8 ml MEM beendet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 2.5.1).

2.5.4 Differenzierung von bone marrow-derived mast cells (BMMC) aus Knochenmarkszellen

BMMC wurden aus Knochenmarkszellen von C57BL/6-Wildtypmäusen generiert. Dazu wurde, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, verfahren. Nach der Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml in KL-MZF eingestellt. Die Zellen wurden zu je 1 ml in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen inkubiert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Dazu wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und mit frischem KL-MZF aufgefüllt. Die Aufreinigung der BMMC-Kultur erfolgte durch mehrmaliges Umsetzen der Zellen auf neue Gewebekulturplatten. Durch diese Methode können die BMMC von adhärennten Zellen, wie z. B. Makrophagen, separiert werden. Nach einer Kultivierungszeit von vier Wochen wurden die BMMC für Versuche verwendet.

2.5.5 Aktivierung von *in vitro*-generierten Zellen

Die analog zu Kapitel 2.5.4 generierten BMMC wurden geerntet, gezählt und in Testmedium (10 % FCS) auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100 µl wurden in eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert und stimuliert. Die Stimulation erfolgte in einem Volumen von 200 µl. Dabei wurde stets eine Probe als Vergleichsprobe nicht stimuliert sowie Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Die verwendeten Konzentrationen der zugesetzten Stimulanzien können Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Verwendete Stimulanzen.

Die Stocklösungen der Reagenzien waren - ausgenommen Ionomycin (in TM5) - in DMSO gelöst.

Substanz	Stock-Konzentration	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ionomycin	50 µM	1 µM	Sigma-Aldrich
9-Phenanthrol	2,58 M	1 µM – 100 µM	Sigma-Aldrich
Tram-34	2 mg/100µl	1 µM	Sigma-Aldrich
Imiquimod	1 mg/ml	10 µg/ml	Invitrogen
DMSO		Volumen entsprechend der verwendeten Lösungsmittelmengen der Stimulanzen	Sigma-Aldrich

2.5.6 Bestimmung der Degranulation von Mastzellen mittels β-Hexosaminidase

Bei einer Stimulation der Mastzellen, kommt es innerhalb kürzester Zeit zur Freisetzung der gespeicherten Granula-Inhalte. Ein Bestandteil der Granula ist das Enzym β-Hexosaminidase. Die Aktivität dieses Enzyms kann mit Hilfe einer Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen werden. Das hierfür verwendete Substrat p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamin (Sigma-Aldrich) wird in dieser Reaktion gespalten, weshalb ein gelber Farbstoff bei 410 nm detektiert werden kann.

Für die Bestimmung der Degranulation von Mastzellen wurden BMDC, wie in Kapitel 2.5.5 dargestellt, für 30 min stimuliert. Die Zellen wurden anschließend in eine Spitzbodenplatte geerntet und bei 500xg für 3 min zentrifugiert. Die Zellüberstände wurden in weitere Vertiefungen der Spitzbodenplatte überführt und das Zellpellet mit 200 µl Triton X-100 durch resuspendieren lysiert. Jeweils 20 µl der Proben wurden in eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen (Flachboden-Platte) pipettiert und mit 50 µl Substratlösung (p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosamin 1,3 mg/ml in Citrat-Puffer) versetzt. Die Substratreaktion erfolgte über 90 min im Brutschrank (37 °C/5 % CO₂) und wurde durch die Zugabe von 150 µl Glycin (0,2 M in VE-Wasser; pH 10,7,) gestoppt. Die Detektion erfolgte bei 410 nm (GENios, TECAN).

Die Degranulation der Zellen kann anhand der nachfolgenden Formeln (2.b /2.c) berechnet werden:

$$\text{Extinktion Überstand (E Ü)} = \text{Extinktion Überstand Probe} - \text{Extinktion Testmedium}$$

$$\text{Extinktion Lysat (E L)} = \text{Extinktion Lysat Probe} - \text{Extinktion Triton X-100} \quad (2.b)$$

$$\text{Degranulation [\%]} = (E Ü / (E Ü + E L)) * 100 \quad (2.c)$$

2.5.7 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse dient dem Nachweis fluoreszenzmarkierter Zellen. Dafür wird die zu analysierende Zellsuspension durch eine Nadel angesaugt und als Einzelzellsuspension an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt. Durch das Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle und die daraus entstehende Abschirmung (Messung im *Forward Scatter*) kann die Größe der Zelle bestimmt werden. Die Streuung des Laserstrahls (Messung im *Side Scatter*) ist ein Maß für die Granularität der Zellen. Wurden die Zellen zuvor mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert, werden die Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt und emittieren Licht bestimmter Wellenlängen.

Die Oberflächenfärbung von Zellen wurde mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper in einer 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte durchgeführt. Für die Färbung wurden die Zellen mit jeweils 50 µl FACS-Puffer bei 4 °C für 20-30 min versetzt, in welchem zuvor die benötigten Antikörper gelöst wurden. Die verwendeten Antikörper können Tabelle 2 entnommen werden. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen zweimal mit jeweils 100 µl FACS-Puffer gewaschen (2 min/ 500xg) und in jeweils 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte am FACS-Canto oder LSR-II (BD Pharmingen) mit Hilfe der Software FACS-Diva (BD Pharmingen).

2.5.8 Viabilitätsbestimmung von Mastzellen durch Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid

In einem frühen Stadium der Apoptose erfolgt eine Translokation des zuvor an der Innenseite der Plasmamembran gebundenen Phosphatidylserins (PS) an die Außenseite der Membran. Dieses Phänomen wird bei dem Annexin V-Viabilitätstest ausgenutzt. Annexin V ist ein calciumabhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS (Vermees *et al.*, 1995). Durch die Markierung der Zellen mit Annexin V-FITC können somit in einer durchflusszytometrischen Analyse apoptotische Zellen detektiert werden. Da jedoch Annexin V auch in nekrotischen Zellen durch die permeabilisierte Membran an PS binden kann, ist die Verwendung von Propidiumiodid notwendig, um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu differenzieren. Propidiumiodid interkaliert in die DNA nekrotischer Zellen, weshalb früh-apoptotische Zellen in der FACS-Analyse durch die Annexin V^{high}/PI^{low}-Population dargestellt werden.

Für die Bestimmung der vitalen Zellen nach einer Stimulation wurden BMDC, wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben, stimuliert und in eine 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte überführt.

Anschließend folgte ein Waschschriff mit PBS (1x) (2 min/500xg) und eine Färbung mit Annexin V-FITC (Annexin V-FITC 1:20 in Annexinbindepuffer (1x)) für 15 min bei RT im Dunkeln. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 200 µl Annexin-Bindepuffer (1x) in

FACS-Röhrchen überführt. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben mit Propidiumiodid (0,25 µg/ml) versetzt.

Die nachfolgende Abbildung zeigt ein exemplarisches Ergebnis einer Annexin V-Bestimmung.

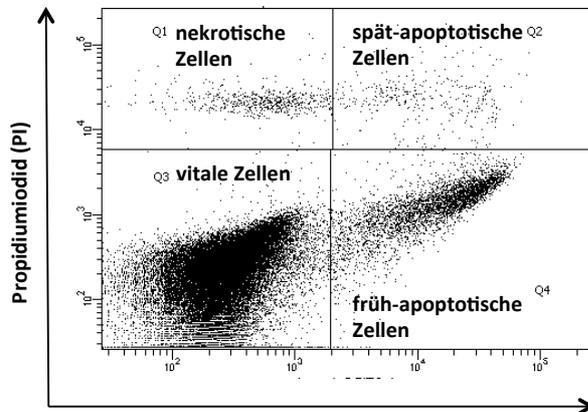


Abbildung 7: Lebende Zellen zeigen einen PI^{low}/Annexin V^{low}-Phänotyp.

Unstimulierte BMMC (0,5x10⁶ Zellen/250 µl) wurden mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Annexin V-Proteins (1:20) gefärbt. Propidiumiodid (PI; 0,25 µg/ml) wurde zur Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse zugegeben. Zur Auswertung des Messergebnisses wurde das Punkte-Diagramm in vier Quadranten eingeteilt. Q1 stellt die PI^{high}/Annexin V^{low}-Population der nekrotischen Zellen dar. Spät-apoptotische BMMC (Q2) unterscheiden sich von früh-apoptotischen (Q4) durch eine PI^{high}-Expression. Lebende Zellen sind PI^{low}/Annexin V^{low} (Q3).

Lebende Zellen besitzen auf ihrer Plasmamembran-Außenseite keine Phosphatidylserine (PS), weshalb Annexin V an diese Zellen nicht binden kann. Propidiumiodid interkaliert in die DNA nekrotischer Zellen, kann jedoch die intakte Zellmembran nicht überwinden. Aus diesen Gründen sind die lebenden Zellen (PI^{low}/Annexin V^{low}) im dritten Quadranten zu finden.

2.5.9 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration (Calcium-Flux)

Mit der Methode des Calcium-Flux kann durchflusszytometrisch die Calciumkonzentration in der Zelle in Echtzeit gemessen werden. Der dafür verwendete Farbstoff Fluo-3 AM erzeugt nach Bindung an Calcium-Ionen eine Fluoreszenz im FITC-Kanal. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu analog Kapitel 2.5.4 generierte BMMC geerntet und auf 1x10⁶ Zellen pro ml in HBSS mit FCS (5 %) eingestellt. Die Zellen wurden mit Fluo-3 AM (2 µM) beladen und zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 15 Minuten im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Überschüssiger Farbstoff und das vorhandene FCS wurden in einem Waschschrift mit Calcium-freien HBSS entfernt. Unmittelbar vor der FACS-Analyse wurde den Zellen EGTA (5 mM) zugesetzt, um extrazelluläres Calcium zu binden. Im FACS wurde zunächst für 30 Sekunden ein Basalwert der FITC-Fluoreszenz bestimmt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit Ionomycin (1 µM), 9-Phenanthrol (50 µM) oder Thapsigargin (1 µM). Die FITC-Fluoreszenz wurde in einem Zeitraum von 5 bis 10 Minuten aufgezeichnet und mittels FlowJo Software (Version 8.8.7) analysiert. Die FACS-

Analyse wurde mit Hilfe des LSR-II Durchflusszytometer der Firma BD Pharmingen durchgeführt.

2.6 Histologische Methoden

Zur Durchführung von histologischen Untersuchungen wurden Gewebeproben zunächst in Histofix (Roth) fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden von der Core Facility Histologie der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz 5 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträger platziert wurden.

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte 10 min in Xylol inkubiert. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95%, 70%, 50%, 0%).

Die verwendeten Färbungen sind in den nachfolgenden Unterkapiteln dargestellt. Im Anschluss an die Färbungen wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckt und getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops der Firma Keyence bei einer 200 - 400-fachen Vergrößerung.

2.6.1 Toluidinblau-Färbung

Toluidinblau gehört zur Gruppe der Thiazinfarbstoffe, welche zur Kernfärbung eingesetzt werden. Die Toluidinblau-Färbung dient zur selektiven Färbung von Mastzellen und wurde erstmals von Blumenkrantz und Asboe-Jansen (1975) beschrieben.

Für die Färbelösung wurden zunächst Eisen-III-Sulfat (Sigma Aldrich, 60 mg/ml in VE-Wasser) und Deferoxamin (Hospira, 100 mg/ml in Leitungswasser) 1:1 gemischt und anschließend mit dem gleichen Volumen Toluidinblau O (Merck, 0,1 % in Leitungswasser) versetzt.

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden für 10 min mit jeweils 350 µl Färbelösung gefärbt.

Die Entfärbung der Präparate erfolgte zunächst für 1 min in Ethanol (100 %) und weiter in 0,1 M Essigsäure. Anschließend wurden die Schnitte in einer ansteigenden Alkoholreihe dehydriert (30 s pro Bad) und in Entellan (Merck) eingedeckt.

2.7 In vivo-Experimente

2.7.1 Transkutane Immunisierung (TCI)

Vorbereitend für die TCI wurden die Mäuse großflächig am Rücken rasiert. An den darauffolgenden zwei Tagen wurde die rasierte Rückenhaut der Mäuse mit einer Mischung aus 50 mg Aldara (3,1 mg Imiquimod), 10 µl SIINFEKL (100 µg) und 5 µl DMSO bzw. 9-Phenanthrol (0,2 %; Stock 50 mg/ml in DMSO) behandelt.

Für Immunisierungsexperimente der Ohren wurde 40 mg Aldara verwendet.

2.7.2 Betäubung von Versuchstieren mit Ketamin / Rompun

Im Rahmen der transkutanen Immunisierung erfolgten das Rasieren und das Cremen der Mäuse unter Betäubung. Als Betäubungsmittel wurde eine Mischung aus 2 ml Ketamin-Lösung (50 mg/ml) und 800 µl Rompun-Lösung (2 %, Bayer) verwendet, welche vor dem Gebrauch 1:5 mit PBS verdünnt wurde. Abhängig von Alter und Gewicht wurde den Mäusen 150 – 250 µl dieser Mischung intraperitoneal (*i. p.*) injiziert.

2.7.3 Migrationsanalyse dermaler dendritischer Zellen (FITC Paint)

Um die Migration dermaler Dendritischer Zellen zu untersuchen, wurde die Ohrhaut der Tiere zunächst mit dem Kontaktallergen FITC (Fluoresceinisothiocyanat; 15 µl, 4 mg/ml in Aceton – Olivenöl (3:1)) und 6 Stunden sowie 32 Stunden später mit Aldara (40 mg) ± 9-Phenanthrol (0,2 %) behandelt. An Tag 3 nach der ersten Behandlung wurden die Tiere getötet und die aurikulären Lymphknoten sowie die nicht drainierenden inguinalen Lymphknoten als Kontrolle entnommen. Das entnommene Gewebe wurde wie in Stroitzer *et al.*, 2005 beschrieben mit Kollagenase und DNase verdaut. Die Reaktion wurde mit 10 mM EDTA abgestoppt. Die Suspension wurde anschließend über ein 70 µm Zellsieb gegeben und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese wurde durchflusszytometrisch analysiert. Für die Oberflächenfärbung wurden folgende murine Antikörper benutzt: CD19-bio, CD90.2-bio, SA-PerCp, CD11c-APC, MHC-II-Pacific Blue, CD8-APC-Cy7, CD11b-PE-Cy7 und CD103-Brilliant Violet 510 (siehe Tabelle 2).

Im Anschluss an die Oberflächenfärbung (vgl Kapitel 2.5.7) wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und vorbereitend für die intrazelluläre Färbung mit 100 µl Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) für 20 Minuten bei 4°C lysiert. Nach der Lyse wurden die Zellen zweimal mit Saponin-Puffer gewaschen und mit einem PE-markierten Antikörper gegen CD207 (eBioscience) in Saponin-Puffer gefärbt (15 min 4°C; 15 min RT). Überschüssiger Antikörper wurde durch zweifaches Waschen mit Saponin-Puffer entfernt. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen in FACS-Puffer 1:1 mit Flow Count Zählbeads (Beckmann Coulter) gemischt. Die Analyse erfolgte an einem LSR-II Durchflusszytometer der Firma BD Pharmingen mittels BD FACS Diva Software.

2.7.4 Entnahme von Blutproben / Nachweis von peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen

Fünf Tage nach der ersten Immunisierung wurden den Mäusen durch Punktieren der Schwanzarterie mit einem Skalpell Blutproben entnommen, welche in EDTA-Puffer aufgefangen wurden. Die Proben wurden bei 500xg für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mittels 5 ml ACK-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Lyse (Zentrifugation, 500xg/ 5 min/ 4 °C) wurden die Proben zweimal in FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Färbung der Zellen erfolgte in einer 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte nach dem Prinzip einer Oberflächenfärbung (2.5.7). Dabei wurden peptidspezifische CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD8-APC und SIINFEKL-H2K^b-Tetramer-PE fluoreszenzgefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.7.5 *In vivo*-Zytotoxizitätstest

Der *in vivo*-Zytotoxizitätstest dient dem Nachweis der zytotoxischen Aktivität peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen (CTL) nach einer transkutanen Immunisierung. Dafür wurden den immunisierten Mäusen an Tag 6 nach der ersten Immunisierung peptidbeladene, CFSE (Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) markierte Zielzellen intravenös (*i. v.*) injiziert (2×10^7 Zellen/300 µl).

Herstellung der Zielzellen

Die Zielzellen stellen Milzzellen dar, welche zuvor im Verhältnis 1:1 mit zwei unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen (0,4 µM und 4 µM, in DMSO) beladen wurden. Hierzu wurden die Mäuse mit CO₂ getötet, die Milzen, wie in 2.5.2 beschrieben, entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese wurden auf 2×10^7 Zellen/ml in PBS eingestellt und hälftig aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit einer hohen Konzentration (4 µM; CFSE^{high}), die andere mit einer niedrigeren Konzentration (0,4 µM; CFSE^{low}) für 4 min bei 37 °C markiert. Die Reaktion wurde mit FCS abgestoppt und bei 500xg für 5 min in der Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert. Weiter folgte ein Waschschriff mit MEM (+2 % FCS). Die Zellen wurden in MEM aufgenommen und die 0,4 µM-CFSE-markierten Zellen (CFSE^{low}) für 60 min bei 37 °C mit SIINFEKL beladen (1 µg/ml). Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Lebendzellzahlen beider Ansätze bestimmt und auf 2×10^7 Zellen/300 µl in PBS (1x) eingestellt. Abschließend wurden beide Ansätze 1:1 vereinigt und intravenös in die immunisierten Tiere injiziert.

In vivo-Zytotoxizitätstest-Analyse

Sechs bis zwanzig Stunden nach der Injektion der Zielzellen wurden die immunisierten Mäuse mit CO₂ abgetötet, wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, die Milzen entnommen und für eine durchflusszytometrische Analyse präpariert. Die Messung und die Auswertung erfolgten

am FACS-Canto oder LSR-II (BD). Nach einer erfolgreichen Immunisierung kommt es zur Generierung SIINFEKL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, welche in der Lage sind, SIINFEKL-beladene, CFSE^{low}-markierte Zielzellen zu erkennen und zu lysieren. Diese Reaktion ist durch eine prozentuale Abnahme der CFSE^{low}-Population zu erkennen.

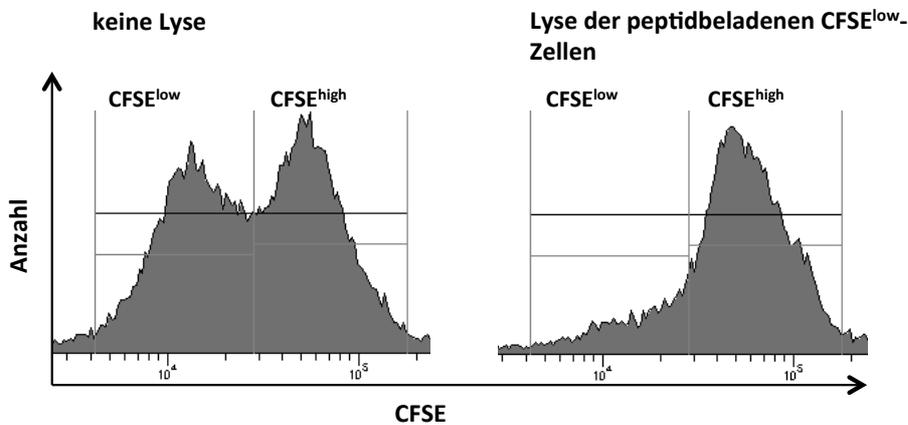


Abbildung 8: Zytotoxisch aktive peptidspezifische CD8⁺ T-Zellen lysieren peptidbeladene Zielzellen.

Der *in vivo*-Zytotoxizitätstest dient dem Nachweis peptidspezifischer CTL nach einer Immunisierung mit dem selbigen Peptid. Dafür wurden Zielzellen mit zwei unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen (0,4 μM; 4 μM) gefärbt. Die CFSE^{low}-Fraktion wurde zusätzlich mit dem Peptid beladen. Bei einer Anwesenheit von CTL ist eine Lyse der peptidbeladenen CFSE^{low}-Zellen zu erkennen. Die CFSE^{high}-Fraktion bleibt erhalten.

Die Lyse der Zielzellen wird mit Hilfe der unten stehenden Formel (2.d) berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = 100 \times (1 - (\text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{neg}} / \text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{immunisiert}})) \quad (2.d)$$

CFSE^{low}_{neg} = Prozentualer Mittelwert der CFSE^{low}-Zellen einer nicht-immunisierten Maus

CFSE^{low}_{immunisiert} = Prozentuale Anzahl der CFSE^{low}-Zellen einer immunisierten Maus

2.7.6 Analyse der IFN-γ Produktion von peptidspezifischen T-Zellen (ELISpot-Assay)

Die Methode des ELISpot (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) dient dem *ex vivo* Nachweis sezernierter Zytokine, die von einzelnen antigenspezifischen T-Lymphozyten nach Restimulation produziert werden (Scheibenbogen *et al.*, 1997).

Verwendet werden hierfür Multiscreen Filter-Platten der Firma Merck Millipore. Diese werden zunächst über Nacht im Kühlschrank mit einem murinen IFN-γ Erstantikörper beschichtet (AN18, Mabtech [5 μg/ml]). Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungsstellen mit ISCOVE's modified DMEM (IMDM, Gibco), welches 10 % FCS enthält für eine Stunde bei 37°C abgesättigt.

Transkutan immunisierte Tiere wurden abgetötet und analog Kapitel 2.5.2 Milz-Einzelzellsuspensionen hergestellt. 5 x 10⁵ Milzzellen, gelöst in 50 μl IMDM mit 5 % FCS

wurden anschließend bei 37°C und 5 % CO₂ für 20 Stunden mit dem Antigen SIINFEKL (1 µg/ml) restimuliert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Platte mit PBS (0,05 % Tween-20, Roth) gewaschen, bevor ein biotinylierter Zweitantikörper (anti-IFN-γ; R4-6A2, Mabtech [2 µg/ml], 2 h 37 °C) verwendet wurde. Nach einem erneuten Waschschrift (6 x PBS + 0,05 % Tween) wurde das Vectastain Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben verwendet, um einen Avidin-Biotin Enzym-Komplex (ABC) aufzubringen (1 h RT, dunkel). Die Platte wurde mit PBS (+ 0,05 % Tween) und anschließend mit PBS gewaschen. Eine abschließende Enzym-Substrat-Reaktion diente zum Nachweis des gebundenen IFN-γ. Hierfür wurde eine AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)-Lösung (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion wurde nach 10-20 Minuten mit Leitungswasser abgestoppt und die Platte bei Raumtemperatur im Dunklen getrocknet. IFN-γ-produzierende Zellen sind als rote Punkte zu erkennen. Die Anzahl der sogenannten Spot-erzeugenden Einheiten (SFU, *spot forming units*) wurde in einem automatisierten Bild-Analyse System bestimmt (CTL-Immuno SPOT S6, CTL).

2.7.7 in vivo Proliferationsanalyse

Einen Tag vor Immunisierung der Versuchstiere wurden Milzzellen aus transgenen OT-I Tieren (siehe 2.5.2 isoliert, mit CFSE gefärbt (Endkonzentration 2,5 µM) und bei 37°C für 4 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml FCS wurde die Reaktion abgestoppt und die Zellen mit jeweils 10 ml TM (5% FCS), IMDM und PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf 1x10⁷/200 µl in PBS eingestellt und in die zu immunisierenden Mäuse *i.v.* injiziert (Tag -1). An den nächsten beiden Tagen erfolgte jeweils eine Immunisierung mit ca. 40 mg der Creme Aldara (5 % Imiquimod) vermischt mit 100 µg SIINFEKL am rechten Ohr der jeweiligen Maus. Auf die Kontrollohren wurde lediglich die Creme (ohne Peptid) aufgetragen. Wiederum einen Tag später (Tag 2) wurden die Mäuse mittels CO₂ getötet, die lokalen aurikularen Lymphknoten isoliert und Zellsuspensionen hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD8 Antikörper gefärbt und im FACS analysiert.

2.7.8 B16-OVA Tumor

C57BL/6 Tiere wurden zunächst transkutan Immunisiert (vgl. 2.7.1). An Tag 3 nach der ersten Behandlung wurden 2 x 10⁵ B16-OVA Zellen subkutan in die Flanke der Tiere injiziert. Das Tumorwachstum wurde dreimal wöchentlich mit Hilfe einer Schieblehre dokumentiert. Dabei wurde die Größe des Tumors in 2 Dimensionen gemessen. Die Mäuse wurden vorzeitig getötet, wenn der Tumor eine Größe von 400 mm² überstieg oder ulzerierte.

2.8 Statistische Auswertung

Zur graphischen Auswertung wurden die ermittelten Einzeldaten in Diagrammen zusammengefasst, welche sowohl die Einzelwerte, als auch die Mittelwerte mit positiver Standardabweichung zeigen.

Der unverbundene t-Test mit Welsch-Korrektur wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz zweier Datenpaare angewandt. Bei Datengruppen mit mehr als zwei Datenpaaren wurde ein einseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur angewandt.

Zur Ermittlung der Signifikanz der Kaplan-Mayer Kurve wurde ein Log-rank-Tests verwendet. Als signifikant wurde ein Unterschied bezeichnet, der eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ besaß. Alle statistischen sowie graphischen Auswertungen von Einzeldaten wurden mit dem Programm Prism 7,0 (Software MacKiev) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Rolle von dendritischen Zellen in der Haut und migrationsabhängige Mechanismen der transkutanen Immunisierung

Im Jahr 2005 konnten bereits Rechtsteiner und Kollegen eine fördernde Wirkung des synthetischen TLR-7-Agonisten Imiquimod auf den Erfolg der transkutanen Immunisierung gegen hautgängige Peptide (bspw. SIINFEKL) zeigen (Rechtsteiner *et al.*, 2005). Hier wurde erstmals die in der Dermatologie verwendete Hautcreme Aldara für die Methode der transkutanen Immunisierung verwendet. Die Aldara-Formulierung enthält 5 % Imiquimod als wirksamen Bestandteil. Imiquimod aktiviert durch Bindung an den *Toll like Rezeptor 7* (TLR-7) das Immunsystem und löst eine Entzündungsreaktion der Haut aus. In der Dermatologie ist die Medikation mit Imiquimod bewährt gegen Feigwarzen (Beutner *et al.*, 1998a; Tyring *et al.*, 1998) und Basaliome.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark gereifte, CD11c⁺ dendritische Zellen essentiell für die Immunantwort nach transkutaner Immunisierung sind (Stein *et al.*, 2011a). In diesem Themengebiet bleibt bislang unbeantwortet, ob es einer direkten TLR7-abhängigen Aktivierung der hautresidenten dendritischen Zellen bedarf, damit das Antigen aufgenommen werden kann und ob die Zellen in die hautdrainierenden Lymphknoten migrieren müssen, um eine Aktivierung von peptidspezifischen T-Zellen einzuleiten. Alternativ könnte es auch möglich sein, dass das Peptid bzw. das Adjuvans Imiquimod mit Hilfe von passivem Transport, z.B. über die Lymphe, direkt in den Lymphknoten gelangt.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde der Einfluss von CCR7 auf den Prozess der transkutanen Immunisierung untersucht. CCR7 (*CC-chemokine receptor 7*) ist ein essentieller *Homing*-Faktor für hautresidente dendritische Zellen und T-Zellen. Dieser fördert die Zellwanderung in die hautdrainierenden Lymphknoten. Die Rekrutierung von Vorläufern dendritischer Zellen in die Haut wird dabei nicht beeinflusst (Worbs *et al.*, 2007; Förster *et al.*, 1999). Diese Phänomene sind zu beachten, wenn mit *Ccr7*^{-/-} Tieren gearbeitet wird. Aufgrund der fehlenden Rekrutierung von dendritischen Zellen und T-Zellen besitzen *Ccr7*^{-/-} Tiere eine massiv veränderte Mikro-Architektur der lymphoiden Organe. Die Lymphknoten sind lymphopenisch und frei von MHC-II⁺/CD11c⁺ dendritischen Zellen (Förster *et al.*, 1999). Transkutane Immunisierungen mit *Ccr7*^{-/-} Tieren, verglichen mit C57BL/6 Tieren, zeigten eine deutlich verminderte Effizienz der Immunisierung (Aranda Lopez *et al.*, 2017).

3.1.1 Die T-Zell-Proliferation wird größtenteils durch passiven Peptid-Transport in die drainierenden Lymphknoten ausgelöst

Um herauszufinden, ob im Rahmen der transkutanen Immunisierung ein aktiver Antigentransport notwendig ist, wurden CFSE gefärbte Milzzellen von transgenen *OT-1-C57BL/6*-Spendertieren in *C57BL/6* bzw. *CCR7*-defiziente Tiere transferiert. Durch diese Methode erhalten *Ccr7*^{-/-} Tiere *Ccr7*-exprimierende T-Zellen, besitzen aber gleichzeitig weiterhin *Ccr7*^{-/-} dendritische Zellen, welche nicht in der Lage sind, aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten zu wandern (Förster *et al.*, 1999).

Nach Transfer der Zellen erfolgte an den darauffolgenden beiden Tagen eine Immunisierung über die Ohrhaut entweder mit oder ohne Peptid (SIINFEKL). An Tag drei wurden die aurikulären Lymphknoten herausgenommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die CD8⁺-T-Zellproliferation wurde anhand der CFSE-Färbung durchflusszytometrisch analysiert.

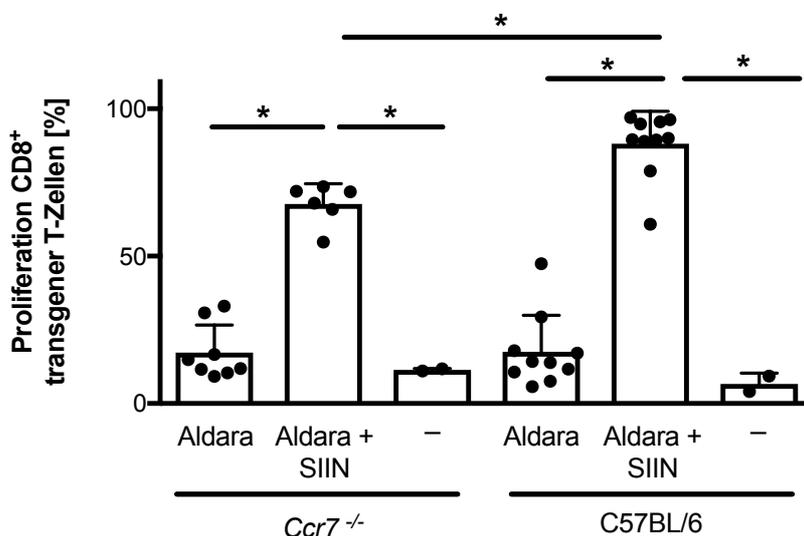


Abbildung 9: Verminderte, jedoch deutlich ausgeprägte, *in vivo* Proliferation von OT-1 T-Zellen in *Ccr7*^{-/-} Tieren.

Ein Tag vor der Immunisierung erfolgte ein adoptiver Transfer von CFSE-markierten (2,5 μ M; $1,5 \times 10^7$ Zellen *i.v.*) OT-1 Milzzellen in *C57BL/6* bzw. *Ccr7*^{-/-} Tiere. Die Tiere wurden an den zwei folgenden Tagen jeweils über die Ohrhaut mit 40 mg Aldara und 100 μ g SIINFEKL immunisiert. An Tag drei wurden die aurikulären Lymphknoten entnommen und die Zellproliferation der transferierten OT-1 Zellen untersucht. Dargestellt sind die Einzelwerte mit zugehörigen Mittelwerten + Standardabweichungen für n= 6-12 bzw. n= 2 für die unbehandelten Kontrollen. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (*p < 0,05).

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis des *in vivo* Proliferationsversuchs. Die Proliferation der CD8-positiven T-Zellen ist nach Immunisierung mit Aldara und SIINFEKL in den Wildtypen stärker ausgeprägt als in den *Ccr7*^{-/-} Tieren. Allerdings zeigen auch die *Ccr7*^{-/-} Tiere nach Behandlung mit Aldara und Peptid eine deutliche Proliferation der OT-1 T-Zellen, welche mehr als zwei Drittel (77 %) der *C57BL/6*-Proliferation ausmacht. Da in *Ccr7*^{-/-} die Migration hautresidenter dendritischer Zellen in die Lymphknoten unterbunden ist, ist die Peptid-

vermittelte T-Zell Proliferation möglicherweise auf einen passiven Peptidtransport zurück zu führen.

3.1.2 CD103⁺ migratorische DCs haben keinen Einfluss auf die Effizienz der TCI mit Aldara

Neben der Rolle des aktiven bzw. passiven Peptid-Transports soll zusätzlich auch die Funktion von CD103⁺ migratorischen DCs untersucht werden.

Die Entwicklung der CD103⁺ / CD11b⁻ DCs ist abhängig von dem Transkriptionsfaktor *Basic leucine zipper transcription factor ATF-like* (BATF3). Um die Beteiligung der CD103⁺ / CD11b⁻ migratorischen DCs an dem Prozess der TCI zu untersuchen, wurden *Batf3*^{-/-} Tiere auf C57BL/6-Hintergrund und C57BL/6 Tiere immunisiert und die primäre T-Zellantwort an Tag 7 nach Immunisierung untersucht.

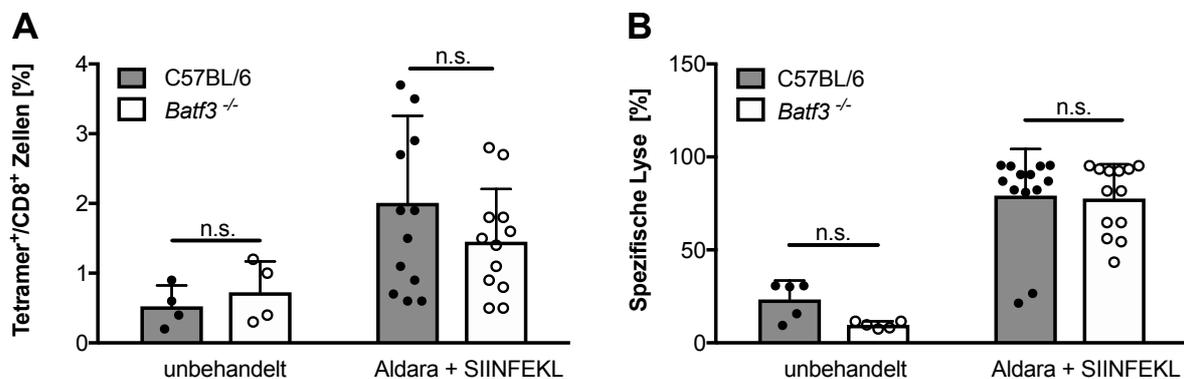


Abbildung 10: CD103⁺ dendritische Zellen haben keinen Einfluss auf die Effizienz der transkutanen Immunisierung.

C57BL/6 sowie *Batf3*^{-/-} Tiere wurden mittels Aldara-Formulierung (50 mg) transkutan gegen SIINFEKL immunisiert. Die Behandlung erfolgte auf zwei aufeinander folgenden Tagen auf die rasierte Rückenhaut. **A** Die Effizienz der Immunisierung wurde im Blut durch die Anzahl an peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen, **B** die Effektorfunktion mittels *in vivo* kill Analyse bestimmt. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4 μ M und 4 μ M) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere eingebracht. Die niedriger konzentrierte Population (0,4 μ M) wurde im Vorhinein mit SIINFEKL beladen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten + Standardabweichungen (n = 4-13). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni Korrektur (*p < 0,05; ns, nicht signifikant).

Die primäre T-Zellantwort nach Immunisierung spiegelt einen vergleichbaren Immunisierungseffekt der behandelten Gruppen wider (Abbildung 10). Sowohl die Anzahl der peptidspezifischen T-Zellen als auch deren Effektorfunktion sind unabhängig von BATF3.

CD103⁺ / CD11b⁻ dendritische Zellen besitzen somit keine essentielle Funktion in der TCI.

Die Rolle von dendritischen Zellen aus der Haut und migrationsabhängige Mechanismen der transkutanen Immunisierung.

- Die T-Zell-Proliferation wird durch passiven Peptid-Transport und aktiven Peptid-Transport in die drainierenden Lymphknoten vermittelt.
- Die *in vivo* Proliferation von CD8⁺ T-Zellen ist in *Ccr7*^{-/-} nach adoptivem Transfer von OT-1-C57BL/6 Milzzellen vermindert.
- Migratorische CD103⁺/CD11b⁻ dendritische Zellen besitzen keinen Einfluss auf die TCI.

3.2 Die Rolle von IL-1 in der TCI

Frühere Ergebnisse von Walter *et al.* 2013 deuteten eine Beteiligung von Inflammasom-induziertem IL-1 an dem Prozess der Aldara vermittelten Entzündungsreaktion der Haut an. Um dies weiter zu untersuchen, wurden *Il-1r1*^{-/-} Tiere für eine transkutane Immunisierung verwendet.

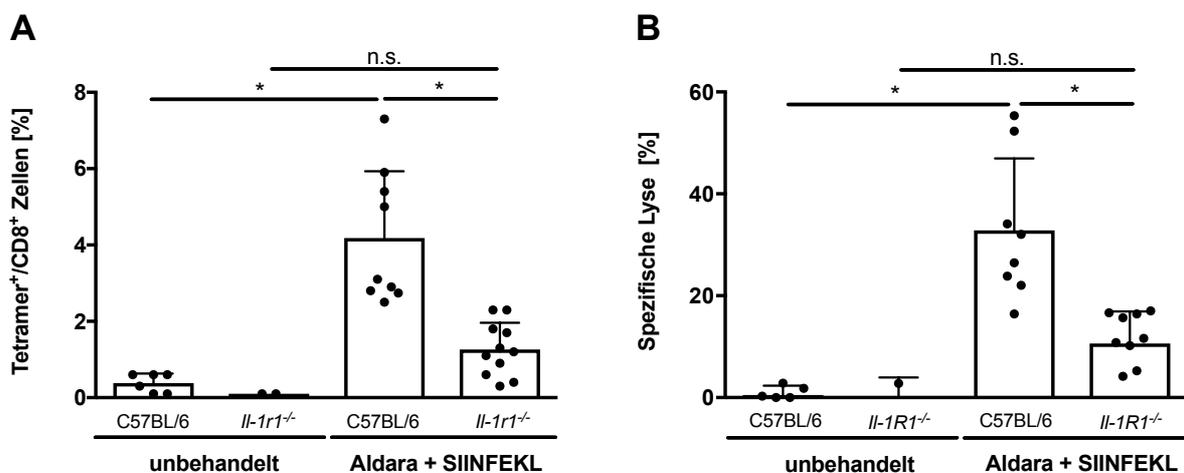


Abbildung 11: IL-1R1-Defizienz reduziert die Bildung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach transkutaner Immunisierung.

C57BL/6 sowie *Il-1r1*^{-/-} Mäuse wurden zweifach mit Aldara und SIINFEKL immunisiert. **A** An Tag 7 wurde die Anzahl SIINFEKL-spezifischer CD8 T-Zellen im Blut und **B** die *in vivo*-Zytotoxizität dieser Zellen überprüft. Dargestellt ist die spezifische Lyse nach 6 Stunden. Die Abbildungsteile zeigen cumulative Ergebnisse (Einzelwerte mit Mittelwerten + Standardabweichungen) von 9-11 behandelten Tieren bzw. 2-6 unbehandelten Tieren. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni Korrektur (**p* < 0,05); n.s., nicht signifikant.

Das Fehlen des IL-1-Rezeptors in den Tieren reduziert die Anzahl antigenspezifischer T-Zellen an Tag 7 nach der ersten Behandlung mit Aldara und Peptid (Abbildung 11 A). Der *in vivo* Zytotoxizitätstest zeigt im Vergleich zu C57BL/6-Tieren eine signifikant verminderte

spezifische Lyse der SIINFEKL-beladenen Target-Zellen durch die spezifischen zytotoxischen T-Zellen (Abbildung 11 B).

Ergänzend zu den Immunisierungsexperimenten wurde zusätzlich die Wanderung der dendritischen Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten mittels des fluoreszenzmarkierten Farbstoffs Fluoresceinisothiocyanat (FITC) untersucht. Aufgetragen auf die Haut nehmen die Hautzellen diesen Farbstoff auf. Somit können in einer durchflusszytometrisch (FACS) - basierten Analyse der drainierenden Lymphknoten die aus der Haut eingewanderten dendritischen Zellen identifiziert werden.

In dem vorliegenden Experiment wurden beide Ohren der Tiere behandelt. 72h nach der ersten Aldara-Behandlung wurden die Ohr-drainierenden aurikulären Lymphknoten entfernt und diese getrennt voneinander im FACS analysiert. Somit konnten pro Tier zwei Datenpunkte generiert werden. Die genaue Anzahl FITC⁺ dendritischer Zellen konnte mit Hilfe von Zählbeads (cell count fluorospheres, Beckman Coulter) errechnet werden.

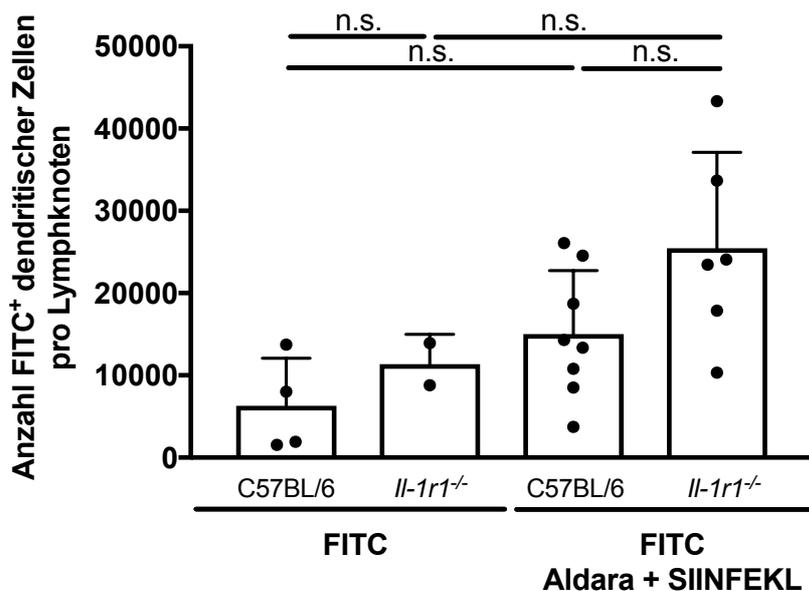


Abbildung 12: Die Migration dendritischer Zellen nach Aldara-Behandlung ist unbeeinflusst von einer IL1R1-Defizienz.

6 Stunden vor der ersten Aldara-Behandlung erfolgte eine Applikation von FITC (4 mg/ml in Aceton/Olivenöl 3:1) auf die Ohren von C57BL/6 sowie *Il1r1^{-/-}* Mäusen. An Tag 3 wurde die Anzahl FITC⁺ dendritischer Zellen in den aurikulären Lymphknoten überprüft. Dargestellt sind die Einzelwerte mit Mittelwerten (+ Standardabweichungen) aus n= 6-8 (FITC + Aldara) bzw. n= 2-4 (FITC). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni Korrektur (n.s., nicht signifikant).

Die Abbildung 12 zeigt eine vergleichbare Anzahl FITC⁺ dendritischer Zellen in *Il-1r1^{-/-}* und C57BL/6 Tieren. Es ist kein signifikanter Anstieg in der Anzahl FITC⁺ dendritischer Zellen im aurikulären Lymphknoten auszumachen. Allerdings ist der Hintergrund der FITC-Färbung in beiden verwendeten Stämmen etwa um den Faktor 2,3 niedriger als mit Aldara-Behandlung

(C57BL/6: FITC: 6304/ FITC+Aldara: 15005; *Il-1r1*^{-/-}: FITC: 11359/ FITC+Aldara: 25451). Das Fehlen des IL-1 Rezeptors hat somit keinen Einfluss auf die Wanderung der dendritischen Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten.

In einem weiteren Experiment wurde die DC-Anzahl im Lymphknoten nach Aldara-Behandlung der Ohrhaut und der Aktivierungsstatus der DCs untersucht. Als Aktivierungsmarker dienten hier CD80 und CD86, welche kostimulatorische Funktionen in der DC-T-Zell-Interaktion besitzen.

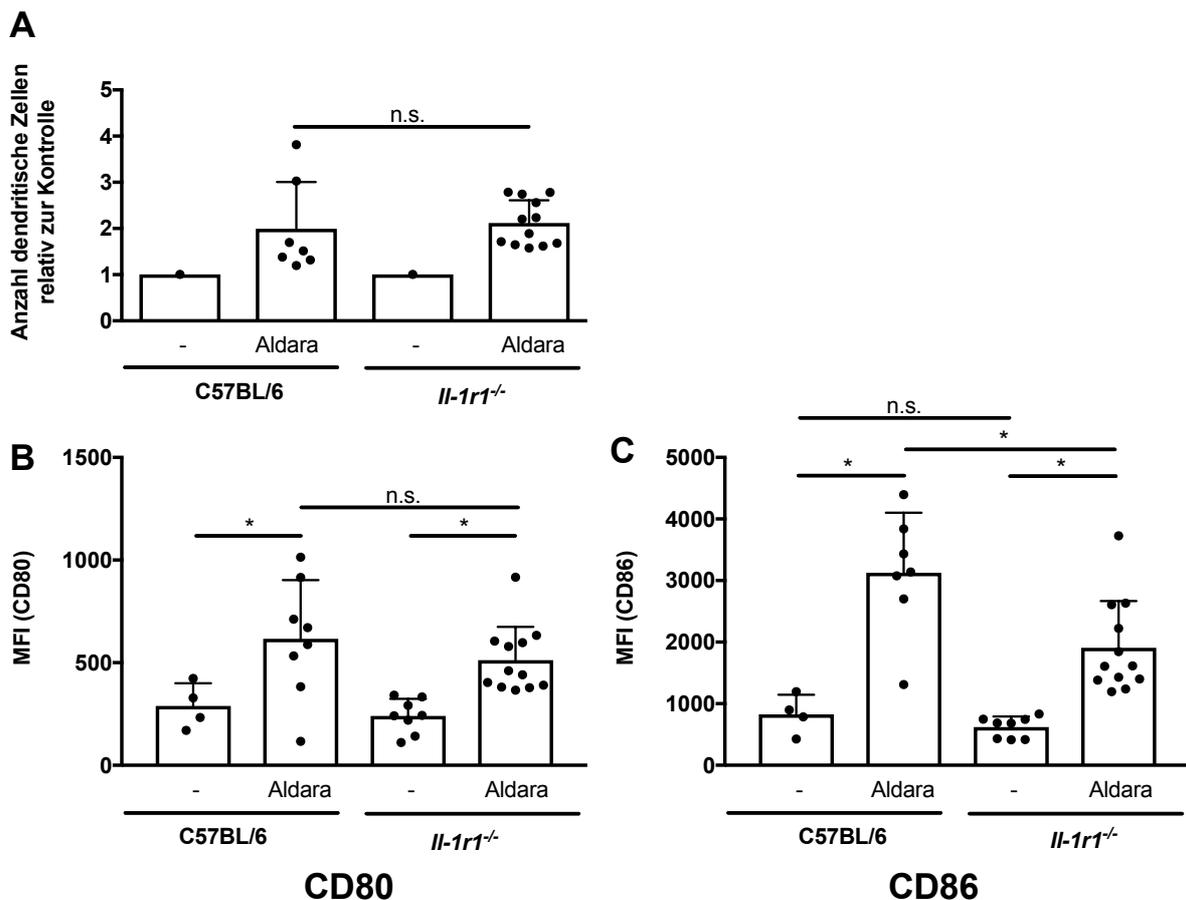


Abbildung 13: *Il-1r1*^{-/-} und C57BL/6 Tiere zeigen vergleichbare Anzahlen dendritischer Zellen in den drainierenden Lymphknoten.

C57BL/6 sowie *Il-1r1*^{-/-} Mäuse wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit Aldara behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Tiere verwendet. Am Tag 3 nach der ersten Immunisierung wurden die Ohr-drainierenden Lymphknoten entfernt und im FACS die Anzahl dendritischer Zellen analysiert. **A** zeigt die relative Anzahl dendritischer Zellen normalisiert auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle. In **B** und **C** wurde der Aktivierungsstatus der Zellen anhand ihrer CD80 bzw. CD86-Expression untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ Standardabweichung) von 4-12 Einzelwerten. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni Korrektur (*p < 0,05; n.s.: nicht signifikant).

Die DC-Anzahlen in den drainierenden Lymphknoten relativ zur Kontrolle sind in Abbildungsteil A dargestellt. Die relative Anzahl dendritischer Zellen ist in beiden

verwendeten Mausstämmen vergleichbar. Der Aktivierungsmarker CD80 zeigt in den *Il-1r1*^{-/-} Tieren keine abweichende Expression im Vergleich zu C57BL/6, wohingegen die Expressionsstärke von CD86 in *Il-1r1*^{-/-} Tieren signifikant vermindert ist.

Neben der Analyse der dendritischen Zellen in den drainierenden Lymphknoten wurde parallel täglich die Ohrdicke der Versuchstiere mit Hilfe eines Mikrometers gemessen. Histologisch wurde zudem die Proliferation epidermaler Zellen nach topischer Aldara-Behandlung in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) analysiert.

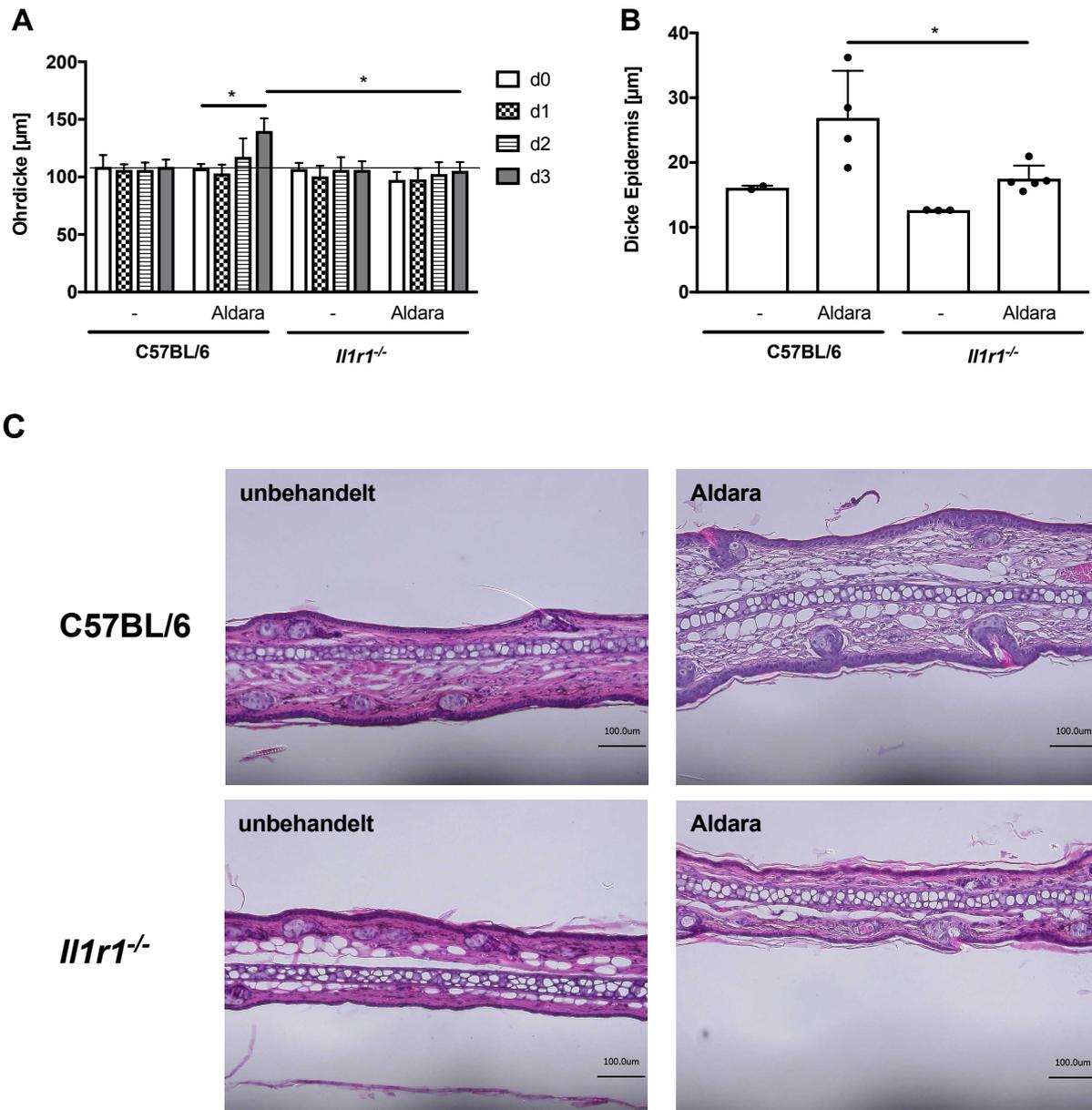


Abbildung 14: Reduzierte lokale Haut-Entzündungsreaktion in *Il-1r1*^{-/-} Tieren.

Die Ohrhaut von C57BL/6 sowie *Il-1r1*^{-/-} Tieren wurde wie bereits in den vorherigen Abbildungen beschrieben, behandelt und **A** die Ohrschwellung mit einem Mikrometer gemessen. **B** und **C** Die Proliferation der epidermalen Zellen wurde mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologisch erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von 2-5 Einzelwerten. Die Datenpunkte in Abbildungsteil **B** stellen die jeweilige mittlere Dicke pro Tier – ermittelt aus 10 mikroskopischen Bildern pro Schnitt – dar. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni Korrektur (*p < 0,05). 200-fache optische Vergrößerung.

In C57BL/6 Mäusen induziert Aldara im Verlauf des Beobachtungszeitraumes eine zunehmende Ohrschwellung. In *Il-1r1^{-/-}* Tieren bleibt diese Reaktion aus. An Tag 3 nach der ersten Aldara-Behandlung ist in C57BL/6 eine im Gegensatz zu den *Il-1r1^{-/-}* Tieren signifikant erhöhte Ohrdicke zu erkennen (vgl. Abbildung 14 A, C). Anhand der HE-Färbung kann die Dicke der epidermalen Zellschicht in der Haut ermittelt werden. Es kommt zu einer Zunahme der Epidermisdicke in den behandelten C57BL/6 Tieren, nicht jedoch in *Il1r1^{-/-}* Mäusen (Abbildung 14 B).

Die Rolle von IL-1 in der transkutanen Immunisierung.

- *Il-1r1^{-/-}* Tiere zeigen gegenüber C57BL/6 eine verminderte Immunisierungseffizienz nach TCI.
- Die Migration sowie die relative Anzahl dendritischer Zellen in den drainierenden Lymphknoten werden durch die IL-1R1-Defizienz nicht beeinflusst.
- Es kommt zu einer verminderten Expression von CD86 auf *Il-1r1^{-/-}* dendritischen Zellen.
- *Il-1r1^{-/-}* Tiere zeigen nach TCI eine verminderte Entzündungsreaktion der Haut. Dies ist anhand einer reduzierten Ohrschwellung verbunden mit einer verminderten Proliferation epidermaler Zellen zu erkennen.

3.3 Produzenten von IL-10 im Prozess der transkutanen Immunisierung

Aus den beobachteten Funktionen von dendritischen Zellen, IL-1 und CCR7 in der transkutanen Immunisierung lässt sich vermuten, dass der Mechanismus der transkutanen Immunisierung ein Ergebnis aus komplexen zellulären Interaktionen ist, die sowohl in der Haut als auch in den hautdrainierenden Lymphknoten stattfinden. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass das Fehlen von IL-10 bei der Verwendung von IL-10-defizienten Tieren die Effizienz der TCI verbessert, indem die zytotoxische Immunantwort gefördert wird. IL-10 ist somit ein negativer Regulator der Immunisierung (Stein *et al.*, 2011b). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die IL-10-Produzenten in der Haut zu identifizieren.

Zunächst wurde eine *Il-10.egfp*-Reportermaus verwendet, um die Beteiligung einzelner Zellpopulationen an der TCI-vermittelten IL-10-Produktion in der Haut zu untersuchen. Dieses Modell wurde bereits schon in Vorarbeiten verwendet (Weber *et al.*, 2014). Grundlage dieses Mausmodells ist das Vorhandensein des *egfp*-Gens unter der Kontrolle des *Il-10* Promotors. Eine *Il-10*-Expression wird somit von einer *egfp*-Expression begleitet (Neves *et al.*, 2010). Die *Il-10.egfp*-Reportertiere wurden zunächst zweimal mit Aldara und SIINFEKL behandelt. Am Tag nach der zweiten Immunisierung wurden die hautdrainierenden inguinalen Lymphknoten entfernt und vereinigt. Zusätzlich wurde eine Probe der Rückenhaut entnommen (1x1 cm). Die Proben wurden mit DNase und Kollagenase behandelt und homogenisiert. Im FACS wurden die lebenden Zellen mittels mastzellspezifischer Marker (CD117/Fc ϵ RI), Marker für dendritische Zellen (MHC-II/CD11c) und Monozyten (GR-1) auf ihre *egfp*-Expression hin analysiert.

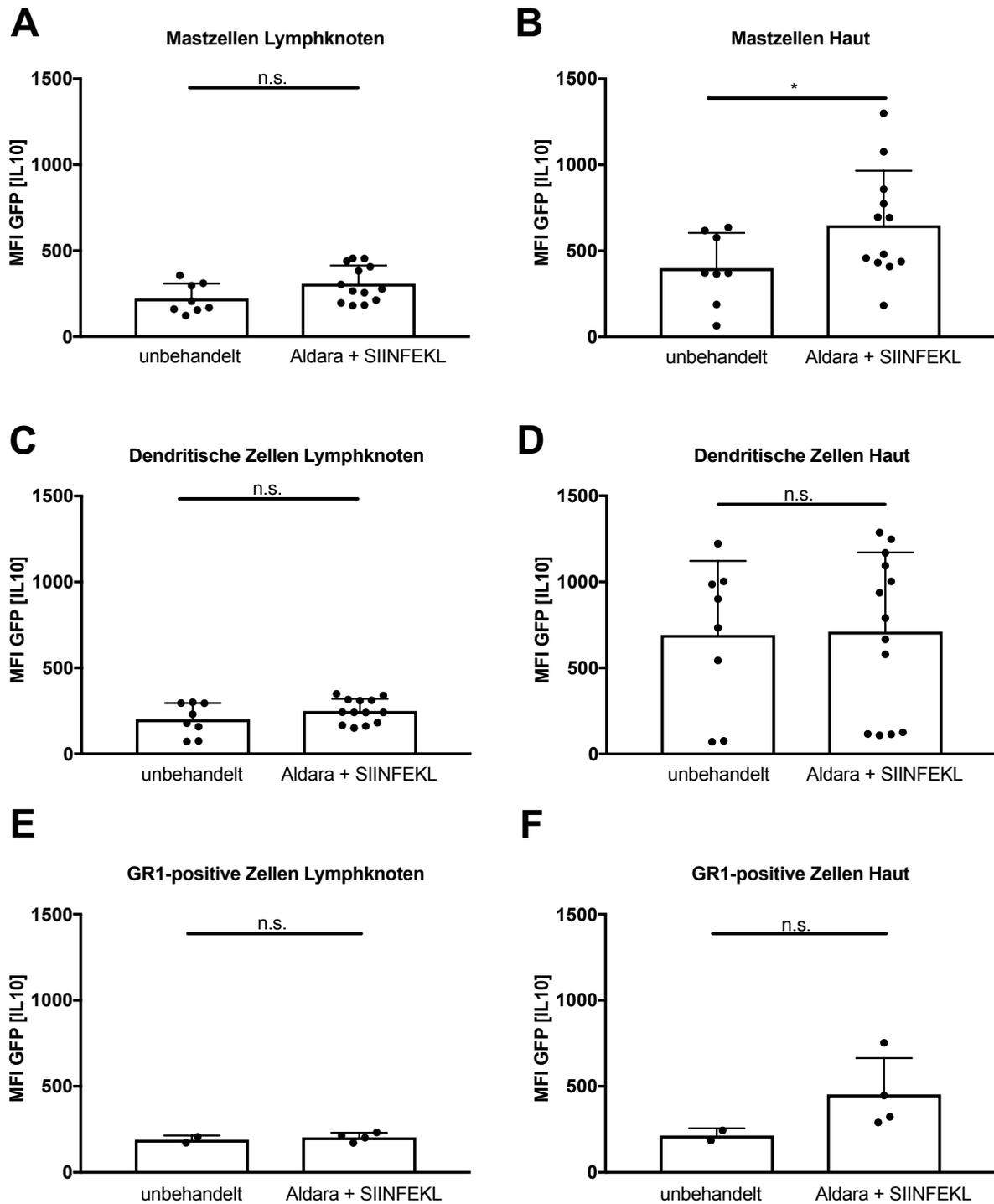


Abbildung 15: Mastzellen stellen mögliche IL-10-Produzenten im Prozess der TCI dar.

Il-10.egfp-Reporterermäuse wurden zunächst auf der Rückenhaut mit Aldara behandelt. An Tag 3 nach der ersten Medikation wurden die hautdrainierenden inguinalen Lymphknoten sowie eine Probe der Haut (1x1 cm) entnommen. Die *Il-10*-Expression von **A – B** Mastzellen sowie **C – D** dendritischer Zellen und **E - F** GR-1-positiver Zellen wurde im FACS untersucht. Die *Il-10*-Expression wird in *Il-10.egfp*-Reporterermäusen anhand einer ansteigenden GFP-Fluoreszenz angezeigt. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der jeweiligen Proben als kumulative Daten mit Mittelwerten + Standardabweichungen (n= 2-13). Statistische Analyse mittels Student t-Test mit Welsch-Korrektur (*p <0,05; n.s.: nicht signifikant).

Ergebnisse

Abbildung 15 zeigt die mittleren GFP- Fluoreszenzintensitäten, welche eine Aktivität des *Il-10* Promotors symbolisieren. Die Aldara-Behandlung erhöht die mittlere eGFP-Fluoreszenzintensität der Mastzellen in der Haut. Die absolute Anzahl an Mastzellen wird dabei nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). In den Lymphknoten ist keine gesteigerte *Il-10*-Expression zu beobachten (Abb. 13 A und B). Betrachtet man dendritische Zellen in der Haut, erzeugt die Immunisierung keinen signifikanten Anstieg der IL-10-Produktion (vgl. 13 D). Es kommt nach Aldara-Behandlung zu keiner Steigerung der IL-10-Produktion von dendritischen Zellen sowie GR-1 positiven Granulozyten in den drainierenden Lymphknoten (vgl. Abb. 13 C und E). Ergänzend dazu wurde nach Aldara-Behandlung eine tendenziell gesteigerte *Il-10*-Expression in GR-1⁺ Zellen in der Haut festgestellt (vgl. Abb. 13 F, MFI Mittelwerte: unbehandelt $214,5 \pm 29,5$; Aldara $453,3 \pm 105,5$).

Um den Einfluss von dendritischen Zellen, Mastzellen sowie Granulozyten auf die IL-10-Produktion im Prozess der TCI weiter zu untersuchen, wurden zellspezifisch IL-10-defiziente Tiere mit Hilfe des Cre/loxP-Systems generiert. Gentechnisch veränderte Tiere, deren IL-10 Locus von zwei sogenannten loxP Sequenzen umfasst wird, wurden bereits in vorhergehenden Arbeiten benutzt, um die Rolle von B-Zell-IL-10 im GVHD Modell zu untersuchen (Weber *et al.*, 2014). Zunächst sollen hier die Ergebnisse der mastzellspezifischen IL-10-Defizienz dargestellt werden, da Mastzellen aufgrund der *Il-10.egfp*-Reportermaus Experimente mögliche IL-10 Produzenten in der TCI darstellen.

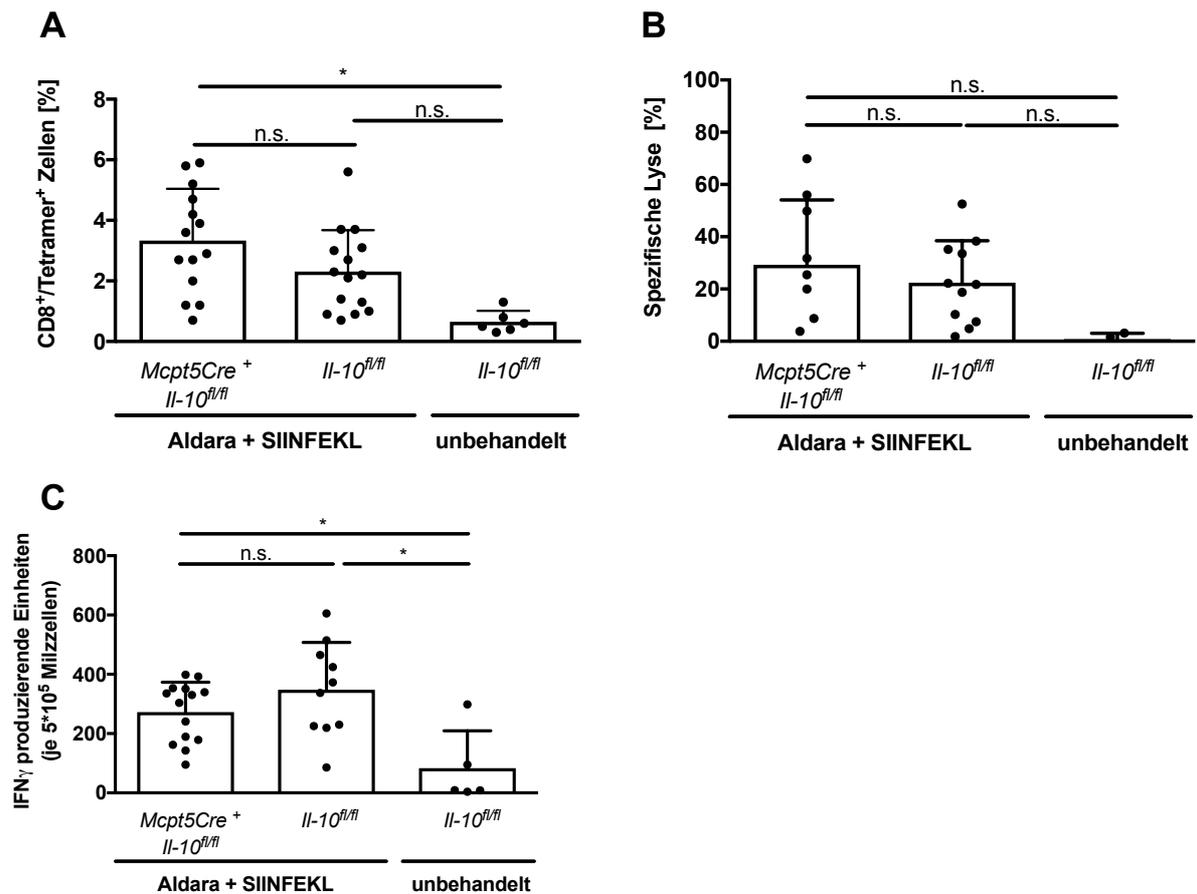


Abbildung 16: Mastzell-IL-10 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der TCI.

Tiere mit einer mastzellspezifischen Deletion von IL-10 und ihre IL-10 produzierenden Geschwistertiere wurden zweifach mittels Aldara gegen SIINFEKL immunisiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte, rasierte, IL-10-produzierende Tiere (*Il-10*^{fl/fl}). An Tag 7 nach der ersten Immunisierung wurden **A** die Frequenz SIINFEKL-spezifischer T-Zellen im Blut und **B** die zytolytische Aktivität der spezifischen Zellen nach 6 h erfasst. Die Effektorfunktion wurde zudem mittels **C** ELISpot-Analyse auf IFN- γ überprüft (n= 4-15; Einzelwerte mit Mittelwerten + Standardabweichungen). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni Korrektur (*p < 0,05; n.s.: nicht signifikant).

Immunisierungen von *Mcpt5Cre*⁺ x *Il-10*^{fl/fl} und entsprechenden Geschwistertieren (*Il-10*^{fl/fl}) zeigen an Tag 7 nach der ersten Behandlung eine tendenziell erhöhte Frequenz antigenspezifischer T-Zellen in Tieren mit mastzellspezifischem IL-10-Defekt, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 16 A). Verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren kommt es hier jedoch zu einem signifikanten Anstieg der CD8⁺/Tetramer⁺ Zellpopulation. Die spezifische Lyse nach 6 Stunden, welche die zytolytische Funktion der peptidspezifischen Zellen anzeigt, ist in beiden immunisierten Gruppen vergleichbar (vgl. Abbildung 16 B). Ergänzend zu der spezifischen Lyse wurde ein IFN- γ ELISpot durchgeführt. Grundlage dieser Methode ist, dass antigenspezifische zytotoxische T-Zellen nach Kontakt mit dem Antigen IFN- γ sezernieren, um die MHC-I-Expression in benachbarten Zielzellen zu steigern. Nach Peptid-Restimulation kommt es somit zu einer IFN- γ -Produktion in den peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen.

Ergebnisse

Mcpt5Cre⁺ x Il-10^{fl/fl} zeigen eine mit ihren Geschwistertieren vergleichbare Anzahl IFN- γ -produzierender Einheiten (Abbildung 16 C). Die Analyse der Effektorfunktionen zeigt demnach keine Unterschiede in Abhängigkeit von Mastzell-IL-10.

CD11cCre Tiere, welche einen konditionellen Gendefekt in dendritischen Zellen erlauben, sowie LysMCre Tiere, in welchen ein konditioneller Defekt u.a. in Monozyten und Makrophagen induzierbar ist, wurden mit $Il-10^{fl/fl}$ Tieren verpaart und für Immunisierungsexperimente verwendet.

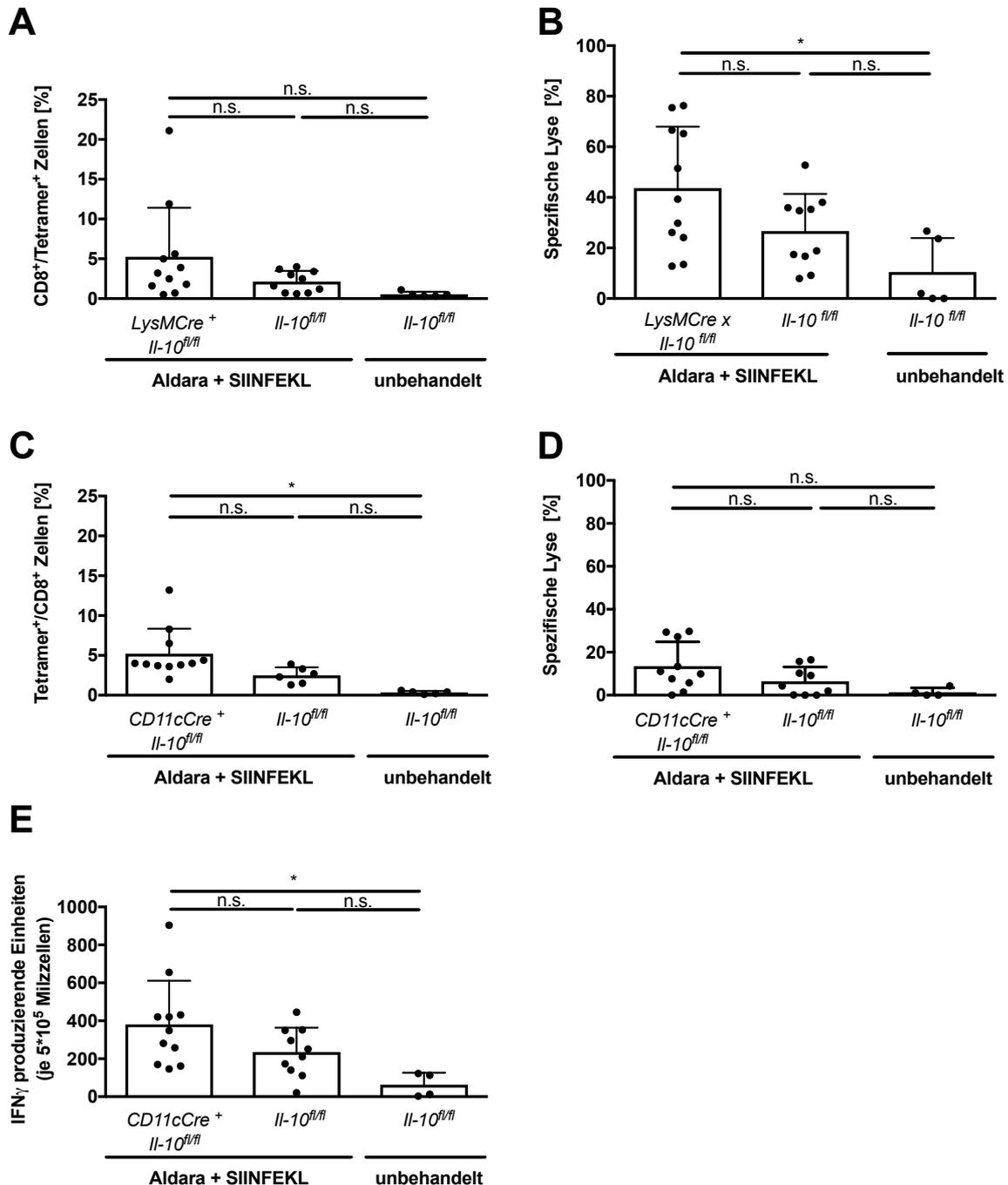


Abbildung 17: Die IL-10-Produktion in der Haut nach TCI ist nicht signifikant beeinflusst von zellspezifischen Knockouts der myeloiden Zellreihe.

LysMCre x Il-10fl/fl sowie CD11cCre x Il-10fl/fl Tiere und ihre entsprechenden Wurfgeschwister wurden mittels Aldara transkutan gegen SIINFEKL immunisiert. Der Immunisierungserfolg wurde an Tag 7 anhand A und C der Frequenz antigenspezifischer T-Zellen im Blut und B und D mittels Zytotoxizitätstest nach 6h überprüft. E Für die CD11cCre x Il-10fl/fl Tiere wurde zusätzlich ein IFN- γ -ELISpot durchgeführt. Abgebildet sind die kumulativen Ergebnisse mit Mittelwerten und Standardabweichungen (n= 4-11). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni Korrektur (*p < 0,05; n.s.: nicht signifikant).

Die Abbildungsteile A und B zeigen die primäre Immunantwort nach Immunisierung in $LysMCre^+ \times Il-10^{fl/fl}$ Mäusen im Vergleich zu Tieren, die kein IL-10 Defizit in der myeloiden Zellreihe aufweisen ($Il-10^{fl/fl}$). Hier ist kein signifikanter Unterschied in der Effizienz der Immunisierung auszumachen. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen zeigen die Aldara behandelten $LysMCre^+ \times Il-10^{fl/fl}$ eine signifikant erhöhte spezifische Lyse. Die Anzahlen peptidspezifischer Zellen und deren Effektorfunktionen – gemessen an der spezifischen Lyse CFSE markierter Milzzellen – sind in beiden Stämmen vergleichbar.

Die Ergebnisse aus Abbildung 17 C zeigen, verglichen mit $Il-10^{fl/fl}$, eine tendenziell gesteigerte Bildung von peptidspezifischen T-Zellen in den Aldara behandelten $CD11cCre^+ \times Il-10^{fl/fl}$. Gegenüber den unbehandelten Kontrollen kommt es hier zu einem signifikanten Anstieg SIINFEKL-spezifischer T-Zellen. Die Analyse der Effektorfunktion zeigt eine vergleichbare zytotoxische-Aktivität der peptidspezifischen Zellen in $CD11cCre^+ \times Il-10^{fl/fl}$ Tieren verglichen mit Ihren Wurfgeschwistern ($Il-10^{fl/fl}$). Dargestellt ist hier die spezifische Lyse nach 6 h (Abbildung 17 D). Zusätzlich zum *in vivo*-Zytotoxizitätstest wurde ein IFN- γ ELISpot durchgeführt. Hier lässt sich nach Aldara-Immunisierung eine tendenziell gesteigerte IFN- γ -Produktion in Tieren mit DC-spezifischem IL-10 Defizit ablesen ($Il-10^{fl/fl}$: Mittelwert $235,1 \pm 128,9$ / $CD11cCre^+ \times Il-10^{fl/fl}$: Mittelwert $381,5 \pm 230$). Gegenüber den unbehandelten Kontrollen ($62,67 \pm 63,37$) ist hier eine signifikant erhöhte Anzahl IFN- γ -produzierender Zellen zu erkennen (Abbildung 17E).

Produzenten von IL-10 im Prozess der transkutanen Immunisierung.

- Die IL-10-Produktion nach transkutaner Immunisierung ist möglicherweise ein Zusammenspiel von mehreren Zellpopulationen.
- Zellspezifische Knockouts zeigen keine eindeutige Beeinflussung der TCI.

3.4 Optimierung der transkutanen Immunisierung durch selektive Aktivierung von Mastzellen in der Haut

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Optimierung der transkutanen Immunisierung gegen das Peptid SIINFEKL mittels Aldara.

Betrachtet man die Wirkungsweise von Imiquimod als Adjuvans, konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Imiquimod murine dermale Mastzellen aktiviert (Heib *et al.*, 2007). Nach Aktivierung sezernieren Mastzellen Zytokine (bspw. TNF und IL-1), welche unmittelbar die Entzündung in der Haut fördern. Es kommt zur Auswanderung von APCs in die drainierenden Lymphknoten. Als Konsequenz konnte demnach eine Beteiligung der Mastzellen an der Generierung antigenspezifischer T-Zellen nach Applikation von Aldara und SIINFEKL auf die intakte Haut nachgewiesen werden (Heib *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2009). Die mit der TLR7-vermittelten Aktivierung in Mastzellen verbundenen Zytokin-Expression ist abgekoppelt von einem Calciumsignal, wodurch die Degranulation der Zelle nicht zu Stande kommen kann (Sandig *et al.*, 2012).

Diese Beobachtung ist Basis für unsere Arbeitshypothese, dass Mastzell-aktivierende Substanzen, welche zusätzlich zu Imiquimod verwendet werden, die Effizienz der transkutanen Immunisierung durch die Generierung eines intrazellulären Calciumsignals verbessern sollten.

Interessante Ziele auf Mastzellen sind in diesem Fall die Familie der TRP (*Transient receptor potential*) - Rezeptoren. TRP-Kanäle stellen Calcium-sensitive Kationenkanäle dar. Ein Mitglied dieser Familie ist der TRPM4 (*Transient receptor melastatin-4*).

Die nachfolgenden Experimente wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Wirkung des TRPM4-Antagonisten 9-Phenanthrol auf Mastzellen und im Zusammenspiel mit der transkutanen Immunisierung (TCI) zu untersuchen. Die Experimente basierten auf der Beobachtung, dass Mastzellen aus TRPM4-defizienten Mäusen nach Aktivierung eine verstärkte Histamin- und TNF-Freisetzung zeigen (Vennekens *et al.*, 2007). Dies führte zu der Annahme, dass die Applikation eines TRPM4-Antagonisten die Degranulation der Mastzellen und den Effekt der TCI verstärken könnte.

Um die Hypothese der 9-Phenanthrol-induzierten Mastzellaktivierung zu überprüfen und Hinweise über die zellulären Mechanismen einer durch 9-Phenanthrol hervorgerufenen Immunreaktion zu bekommen, wurde zunächst in *in vitro* Experimenten der Effekt von 9-Phenanthrol auf murine Mastzellen im Detail untersucht.

3.4.1 9-Phenanthrol induziert Mastzell-Degranulation in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium

Für die nachfolgend dargestellten Experimente wurden aus dem Knochenmark generierte BMMC ($0,5 \times 10^6$ Zellen / 250 μ l) mit 9-Phenanthrol in aufsteigender Konzentration (10 μ M – 100 μ M) und den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen für 30 min bei 37 °C stimuliert.

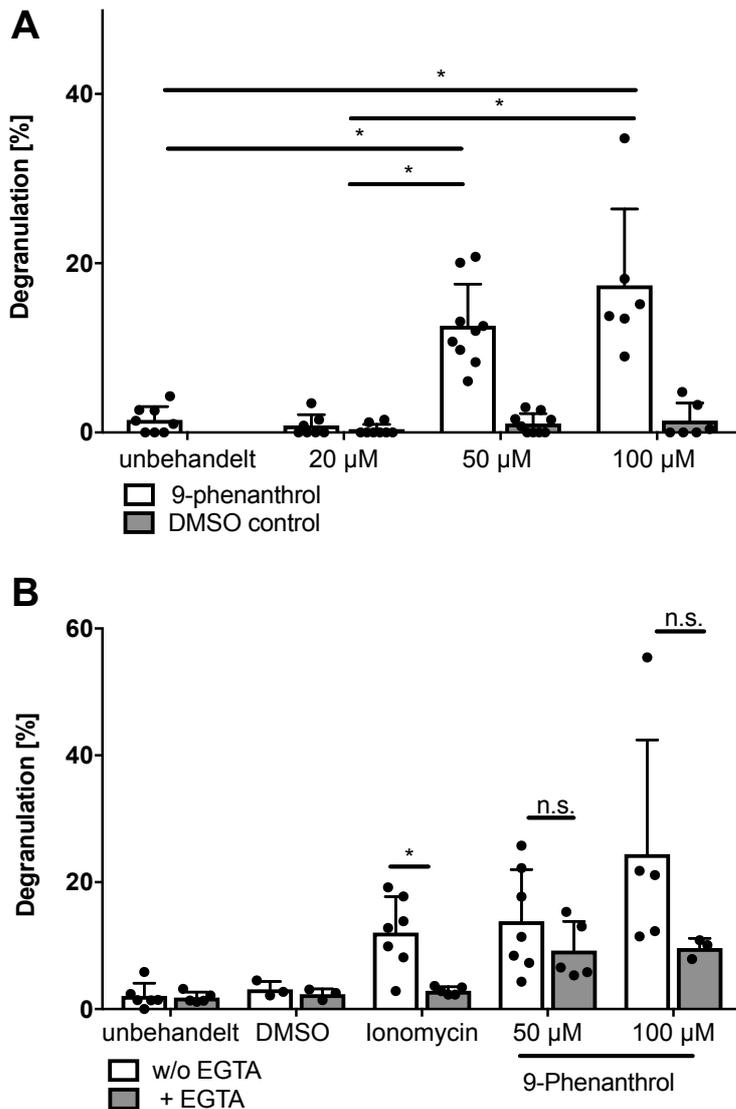


Abbildung 18: 9-Phenanthrol aktiviert Mastzellen unabhängig von extrazellulärem Calcium und fördert so deren Degranulation.

BMMC aus C57BL/6-Wildtypen wurden **A** mit unterschiedlichen 9-Phenanthrol-Konzentration (20 μ M, 50 μ M, 100 μ M) behandelt. **B** Zusätzlich zu einer Stimulation mit 9-Phenanthrol (50 μ M, 100 μ M) erfolgte eine Stimulation mit Ionomycin (1 μ M) in An- bzw. Abwesenheit von EGTA. Die Mastzell-Degranulation wurde in den dargestellten Experimenten nach 30-minütiger Stimulation mittels β -Hexosaminidase-Test überprüft. Unbehandelte Zellen sowie DMSO-behandelte Zellen dienten hier als Kontrollen. Abgebildet ist die Degranulation der Zellen in Prozent in Abhängigkeit von dem jeweiligen Stimulus (Mittelwerte + Standardabweichung, n= 3-7; *p >0,05; Statistische Analyse **A** einseitiger ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, **B** Student t-test mit Welsch-Korrektur).

Im Vergleich zu den verwendeten Lösungsmittelkontrollen induziert die Behandlung der BMMC mit 9-Phenanthrol eine Degranulation der Zellen. Das Ausmaß der Aktivierung ist konzentrationsabhängig. 50 μM bzw. 100 μM 9-Phenanthrol im Reaktionsansatz erzeugen einen signifikanten Anstieg der Degranulation (vgl. Abbildung 18 A). Nach Beobachtung eines direkten Effektes von 9-Phenanthrol auf Mastzellen wurde in einem weiteren Experiment die Degranulation der Mastzellen in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Calcium untersucht. Extrazelluläres Calcium wurde durch die Verwendung von EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure) gebunden. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 B dargestellt. Die durch 9-Phenanthrol induzierte Degranulation ist unabhängig von extrazellulärem Calcium, wird jedoch tendenziell durch dieses gesteigert. Im Gegensatz hierzu ist in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium die Mastzell-Degranulation durch das Calcium-Ionophor Ionomycin unterbunden.

3.4.2 Relevante Konzentrationen von 9-Phenanthrol haben keinen toxischen Effekt auf Mastzellen

Um eine potentiell toxische Wirkung durch 9-Phenanthrol auf die Zellen auszuschließen, wurde ein Annexin V-Viabilitätstest durchgeführt. Annexin V bindet in apoptotischen Zellen das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), welches zuvor an die Außenseite der Membran verlagert wurde. Propidiumiodid (PI) wird zusätzlich verwendet, um zwischen früh-apoptotischen und spät-apoptotischen Zellen zu unterscheiden. In spät-apoptotischen Zellen kann PI die Kernhülle passieren. Es kommt zur Einlagerung in die DNA (Vermes *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 2000).

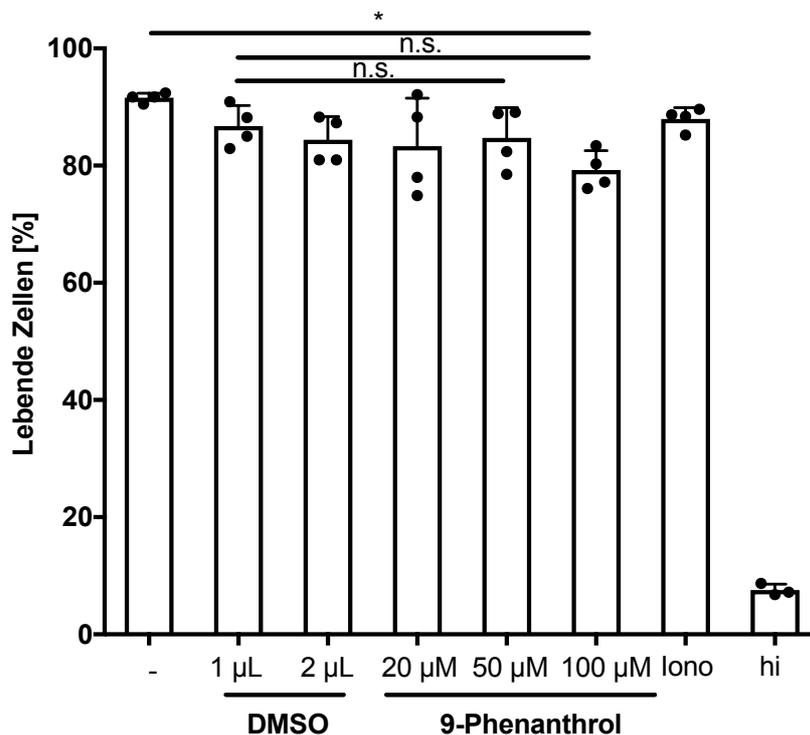


Abbildung 19: Die Viabilität der Zellen wird durch Behandlung mit 9-Phenanthrol und Ionomycin kaum beeinflusst.

2×10^5 BMMC wurden für 30 min mit Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) bzw. 9-Phenanthrol in aufsteigender Konzentration ($20 \mu\text{M}$ – $100 \mu\text{M}$) stimuliert. Zusätzlich wurden DMSO-Lösungsmittelkontrollen für die niedrigste und höchste 9-Phenanthrol-Konzentration mitgeführt. Für die Negativkontrolle wurden hitzeabgetötete BMMC (30 min/ 60°C) verwendet. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen mit Annexin V-FITC gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse. Unmittelbar vor der Messung wurden $1,25 \mu\text{l}$ Propidiumiodid ($50 \mu\text{g/ml}$) zugegeben. Die Frequenz der vitalen Zellen (Annexin V^{neg}/PI^{neg}) ist als prozentuale Angabe in Abhängigkeit von der eingesetzten Stimulation dargestellt ($n=4$; hi: $n=3$). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur; * = $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant; hi, hitzeinaktiviert.

Die Annexin V-Analyse zeigt, dass 9-Phenanthrol selbst in hohen Konzentrationen, im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen, die Viabilität der Zellen nicht signifikant reduziert. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle kommt es jedoch bei der höchsten verwendeten Konzentration ($100 \mu\text{M}$) zu einer Beeinträchtigung der Viabilität der Zellen.

3.4.3 Das Endoplasmatische Retikulum als intrazelluläre Calciumquelle

Anhand der zuvor beschriebenen Experimente konnte eine Unabhängigkeit der 9-Phenanthrol induzierten Degranulation von extrazellulärem Calcium festgestellt werden.

In dem nachfolgenden Experiment wurde zunächst der Einfluss von 9-Phenanthrol auf die intrazelluläre Calciumkonzentration mittels Fluo-3-AM untersucht. Fluo-3-AM bindet freies Calcium und erzeugt so einen Fluoreszenzanstieg der durchflusszytometrisch im FITC-Kanal gemessen werden kann.

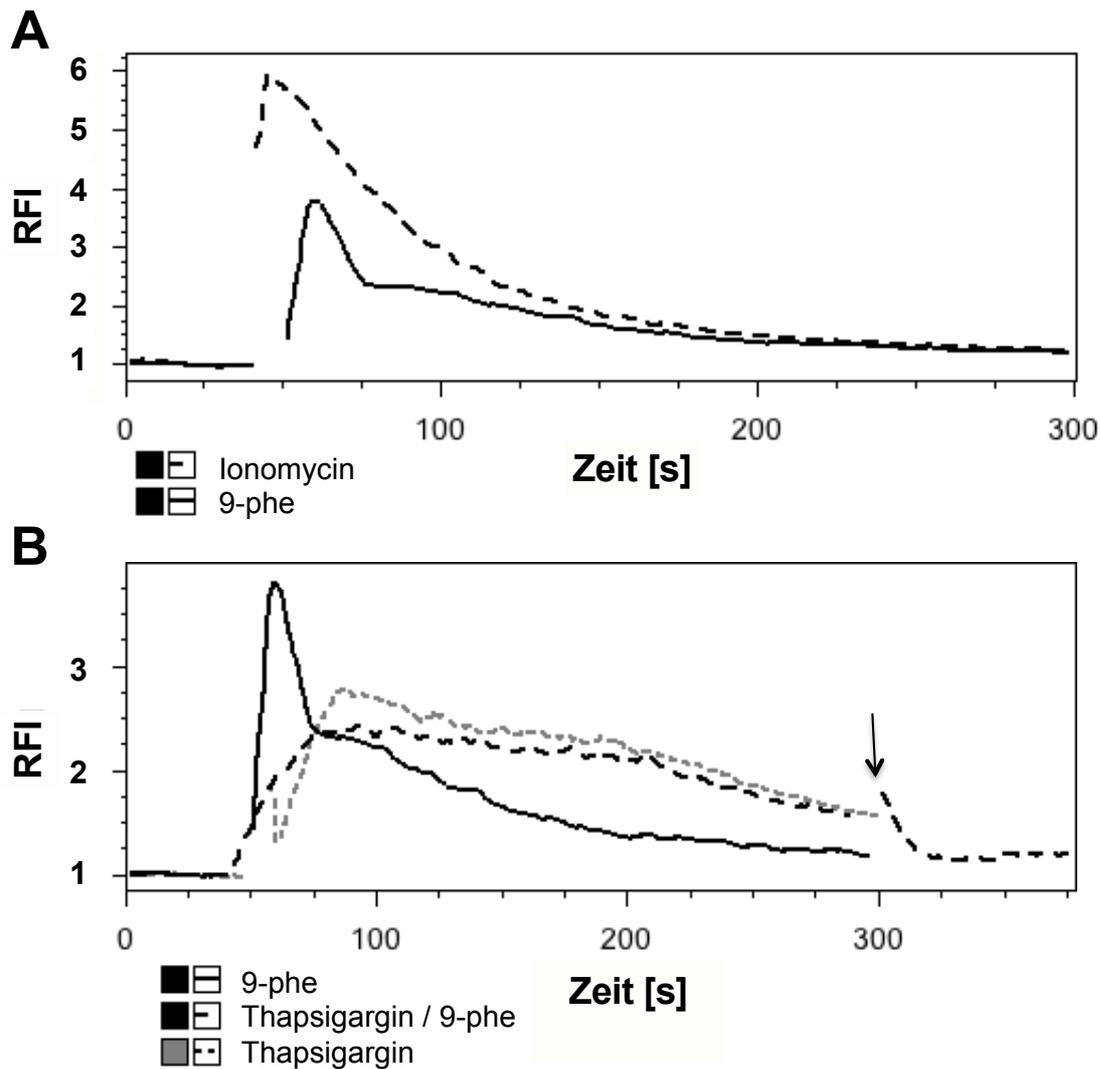


Abbildung 20: 9-Phenanthrol induziert einen transienten Calcium-Efflux aus dem Endoplasmatischen Retikulum.

2×10^5 BMMC wurden zunächst mit dem Calcium-bindenden Farbstoff Fluo-3-AM beladen ($2 \mu\text{M}$) und mit Calcium-freiem HBSS (EGTA 5 mM) gewaschen, um extrazelluläres Calcium zu entfernen.

Im FACS wurde anschließend die relative Fluoreszenzintensität (RFI) von Fluo-3-AM (FITC) gemessen. **A** Nach Messung des Basalwertes erfolgte die Stimulation der Zellen mit Ionomycin ($1 \mu\text{M}$; gestrichelte Linie) oder 9-Phenanthrol ($50 \mu\text{M}$). **B** Vergleichende Analyse mit 9-Phenanthrol und Thapsigargin. Nach Bestimmung des FITC-Grundwerts erfolgte zum einen die Stimulation mit 9-Phenanthrol (schwarze Linie), zum anderen mit Thapsigargin ($1 \mu\text{M}$, gestrichelte Linien). Nach 5-minütiger Stimulation erfolgte eine Zugabe von 9-Phenanthrol (gestrichelte schwarze Linie). Die Abbildungsteile sind repräsentativ für 5 Experimente.

In Abbildung 20 ist das Ergebnis der Fluo-3-AM Analyse dargestellt. In Abbildungsteil A ist ein transienter Anstieg der Fluoreszenz nach Stimulation mit 9-Phenanthrol zu erkennen. Die mittlere Fluoreszenz steigt hier auf das 4-fache des FITC-Grundwertes. Als Positivkontrolle diente das Calcium-Ionophor Ionomycin. Ionomycin erzeugt einen Anstieg der die zytoplasmatischen Calciumkonzentration. Dies ist an einem 6-fachen Fluoreszenzanstieg zu erkennen.

Aus der Beobachtung, dass 9-Phenanthrol alleine in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium einen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration hervorruft, resultierte die Frage, aus welchen intrazellulären Quellen dieses Calcium stammt.

Zunächst stellten Mitochondrien interessante intrazelluläre Calciumspeicher dar, was jedoch nicht bestätigt werden konnte (unveröffentlichte Daten, M.J. Zajac, 2014).

Ein weiterer Calciumspeicher in der Zelle ist das Endoplasmatische Retikulum (ER). Calcium-abhängige ATPasen sorgen hier für die Calciumhomöostase. Um die Rolle des endoplasmatischen Calciumspeichers in der 9-Phenanthrol-vermittelten Degranulation zu untersuchen, wurde zunächst die Calciumhomöostase des ER durch Thapsigargin unterbrochen. Thapsigargin ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der endoplasmatischen Calcium-ATPasen. Es kommt so zu einem Calcium-Ausstrom aus dem ER und damit verbunden zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration (Rogers *et al.*, 1995). Der Effekt von Thapsigargin ist in Abbildung 20 B als graue gestrichelte Linie dargestellt. Es kommt hier zu einem Anstieg der mittleren Fluoreszenz, welche über die Zeit abnimmt. Ohne Thapsigargin induziert 9-Phenanthrol einen transienten Anstieg der Fluo-3-AM Fluoreszenz (schwarze Linie). Nach Vorbehandlung mit Thapsigargin ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Der Fluoreszenzanstieg unterbleibt.

3.4.4 Die durch 9-Phenanthrol induzierte Mastzell-Degranulation ist unabhängig von TRPM4 und kann durch Blockade von $K_{Ca}3.1$ vermindert werden

Ursprünglich wurde 9-Phenanthrol als ein selektiver Inhibitor des TRPM4-Kanals beschrieben, mit Hilfe dessen eine funktionelle Separation des TRPM4 vom nahe verwandten TRPM5 möglich ist (Guinamard, 2014). Aktuelle Studien zeigten eine Aktivierung des Calcium-abhängigen Kaliumkanals $K_{Ca}3.1$ durch 9-Phenanthrol in mesenterialen Ratten-Arterien (Garland *et al.*, 2015). $K_{Ca}3.1$ wird zusätzlich in humanen und murinen Mastzellen exprimiert. Die Aktivierung dieses Kanals erfolgt durch einen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Es kommt zum Ausstrom von Kalium-Ionen aus der Zelle, was zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Diese Hyperpolarisation fördert wiederum den Calcium-Ionen-Einstrom, was eine IgE-vermittelte Degranulation der Mastzelle fördert (Duffy *et al.*, 2001; Shimilina *et al.*, 2008).

Die nachfolgenden Experimente wurden mit der Fragestellung durchgeführt, ob der beobachtete Mastzell-aktivierende Effekt von 9-Phenanthrol über den TRPM4-Kanal oder über den Calcium-abhängigen Kaliumkanal $K_{Ca}3.1$ vermittelt wird.

Um die Rolle von TRPM4 in der Aktivierung durch 9-Phenanthrol zu untersuchen, wurden bone-marrow-derived Mastzellen (BMMC) aus TRPM4-defizienten Tieren und C57BL/6

gewonnen und mittels 9-Phenanthrol stimuliert. Die Degranulation wurde *in vitro* anhand eines β -Hexosaminidase-Test analysiert.

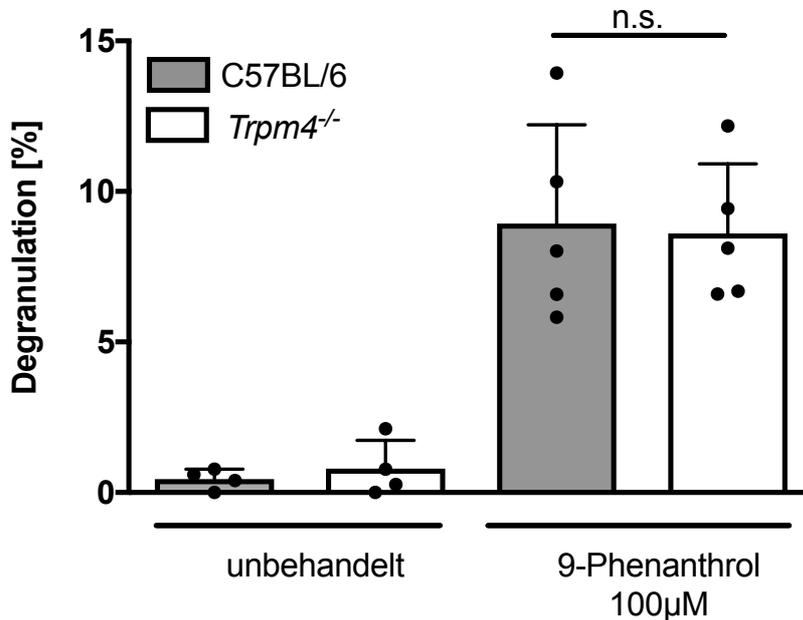


Abbildung 21: Der Effekt von 9-Phenanthrol auf die Mastzell-Degranulation ist unabhängig von TRPM4.

C57BL/6 sowie *Trpm4*^{-/-} BMDC wurden für 30 Minuten mit 9-Phenanthrol stimuliert und die Degranulation mittels β -Hexosaminidase-Test gemessen. Dargestellt sind die kumulativen Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels Student-t-Test und anschließender Welsch-Korrektur (n.s.: nicht signifikant).

Die Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der Degranulationsanalyse. Hier zeigen TRPM4-defiziente Mastzellen eine dem Wildtyp äquivalente Degranulation nach Stimulation mit 9-Phenanthrol.

Ergänzend zu der Rolle von TRPM4 im Prozess der Mastzell-Degranulation durch 9-Phenanthrol wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss des Calcium-abhängigen Kaliumkanals $K_{Ca3.1}$ mit Hilfe von TRAM-34 (1-((2-Chlorophenyl)diphenylmethyl)-1H-pyrazole), einem Inhibitor von $K_{Ca3.1}$, untersucht (Bradding und Wulff, 2009).

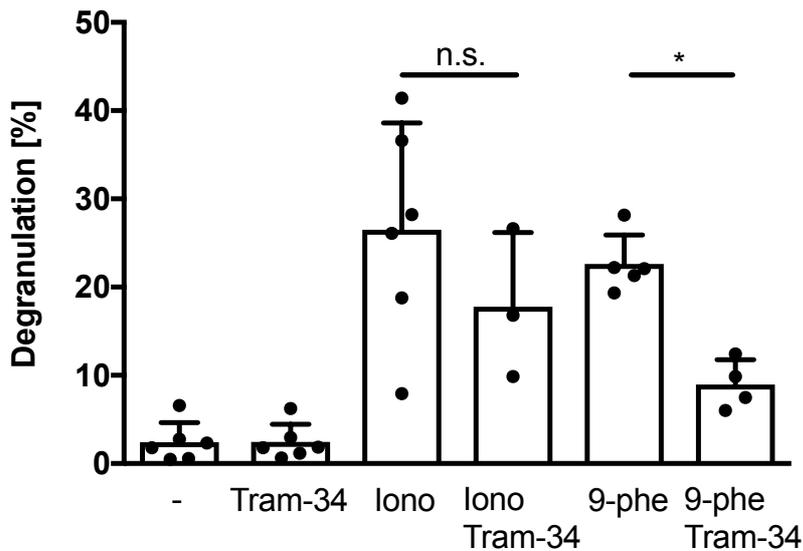


Abbildung 22: Tram-34 reduziert die durch 9-Phenanthrol hervorgerufene Degranulation der BMMC.

C57BL/6 BMMC wurden für 30 Minuten mit 9-Phenanthrol in An- und Abwesenheit von Tram-34 sowie alternativ mit Ionomycin in Kombination mit Tram-34 stimuliert. Die Degranulation wurde mittels β -Hexosaminidase-Test gemessen. Abgebildet ist die jeweilige Degranulation (%) der BMMC als kumulatives Ergebnis aus 3-4 unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse mittels Student-t-Test und anschließender Welsch-Korrektur (* $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant).

Tram-34 alleine induziert keine Degranulation der Mastzellen. Die durch 9-Phenanthrol hervorgerufene Degranulation kann durch Tram-34 reduziert werden. Diese Reduktion ist spezifisch für eine 9-Phenanthrol-vermittelte Mastzell-Aktivierung. Nach Stimulation mit Ionomycin ist kein inhibitorischer Effekt von Tram-34 erkennbar (vgl. Abbildung 22).

Um im weiteren Verlauf zu untersuchen, ob eine Aktivierung von $K_{Ca}3.1$ die Mastzell-Degranulation vermittelt, wurden aus Vorarbeiten bekannte Agonisten dieses Kanals, 1-EBIO (1-Ethyl-2-benzimidazolinone) und SKA-31 (Naphthol[1,2-d]thiazol-2-ylamine) in einem β -Hexosaminidase-Test eingesetzt (Bradding und Wulff, 2009). Keiner der genannten Substanzen erzeugte eine Degranulation der BMMC (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann ein TRPM4-unabhängiger Einfluss von 9-Phenanthrol auf die Mastzell-Degranulation beobachtet werden. Der Calcium-abhängige Kaliumkanal $K_{Ca}3.1$ stellt möglicherweise einen Angriffspunkt der durch 9-Phenanthrol induzierten Degranulation dar.

***In vitro* Untersuchungen über die Wirkung von 9-Phenanthrol auf Mastzellen.**

- 9-Phenanthrol aktiviert Mastzellen und induziert deren Degranulation.
- Die Degranulation ist unabhängig von extrazellulärem Calcium, wird aber durch dieses gefördert.
- Eine mögliche intrazelluläre Calcium-Quelle ist das Endoplasmatische Retikulum.
- Die durch 9-Phenanthrol hervorgerufene Degranulation ist TRPM-4-unabhängig.
- Der Calcium-abhängige Kaliumkanal $K_{Ca}3.1$ stellt ein mögliches Ziel für 9-Phenanthrol dar.

3.5 Effekt von 9-Phenanthrol auf die TCI

Um den Effekt von 9-Phenanthrol auf die TCI zu analysieren, wurden C57/BL6-Tiere wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben immunisiert und zunächst der Effekt auf Hautmastzellen untersucht. Eine wirkstofffreie Salbengrundlage diente hier als Grundlage, um den Effekt von 9-Phenanthrol allein auf die TCI zu untersuchen. Eine Woche nach der ersten Behandlung erfolgte die Auswertung der primären, antigenspezifischen T-Zell-Antwort durch eine Blutuntersuchung. Die Effektorfunktion der T-Zellen wurde durch Peptid-Restimulation in einem IFN- γ -ELISpot untersucht.

3.5.1 Die Verwendung von 9-Phenanthrol in einer transkutanen Immunisierung aktiviert verstärkt Mastzellen in der Haut

Um die *in vitro* beobachtete positive Wirkung von 9-Phenanthrol auf die Mastzellen in der Haut zu untersuchen, wurde die Rückenhaut der transkutan immunisierten Tiere mit Histofix (Roth) fixiert, in Paraffin eingebettet und Längsschnitte angefertigt. Die Paraffin-Schnitte wurden im weiteren Verlauf entparaffiniert und mittels Toluidinblau-Färbung die in der Haut vorhandenen Mastzellen angefärbt. Bei der mikroskopischen Analyse im Hellfeld wurde die Gesamtanzahl der Mastzellen pro Millimeter Haut und der prozentuale Anteil der degranulierten Mastzellen bestimmt.

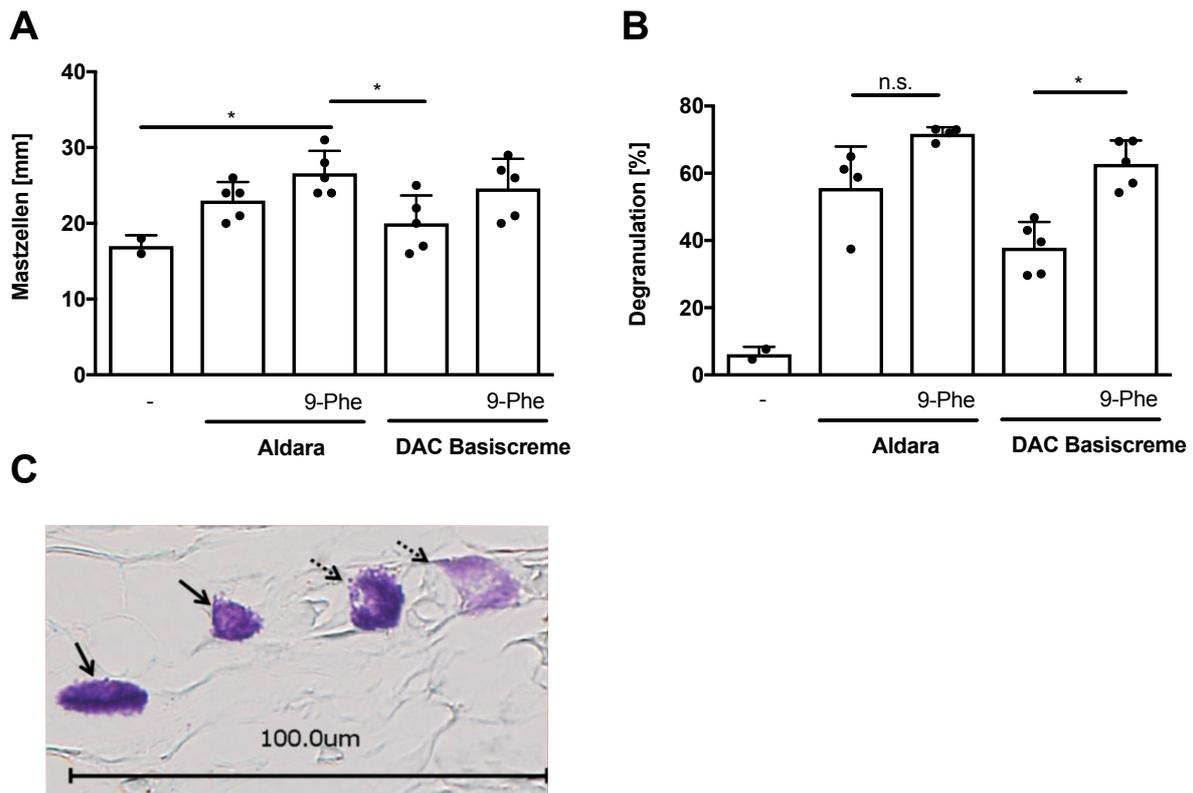


Abbildung 23: Die lokale Anwendung von 9-Phenanthrol verstärkt die Mastzell-Degranulation in der Haut.

C57BL/6-Mäuse wurden transkutan gegen SIINFEKL immunisiert. Dabei wurde zum einen DAC-Basiscreme als wirkstofffreie Grundlage, zum anderen die Creme Aldara (3,1 mg Imiquimod) allein bzw. in Kombination mit 9-Phenanthrol (0,2 %), verwendet. An Tag 7 nach der ersten Immunisierung wurden die Tiere getötet und die behandelte Rückenhaut für histologische Untersuchungen entfernt. Eine Toluidinblau-Färbung diente dem Nachweis von Mastzellen in den Geweben. **A** Die Mastzellen wurden ausgezählt und **B** die Degranulation in Prozent berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte pro Versuchstier mit Standardabweichung dargestellt (n= 2-5, 10 Bilder pro Tier; statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur; *p <0,05). Abbildungsteil **C** zeigt exemplarisch degranulierte Mastzellen (gestrichelte Pfeile) im Vergleich zu ruhenden Mastzellen (schwarze Pfeile). 400-fache optische Vergrößerung.

Die mikroskopische Analyse zeigt im Vergleich zu dem unbehandelten Gewebe eine tendenzielle Zunahme der mittleren absoluten Mastzellzahlen nach Behandlung mit DAC-Basiscreme und 9-Phenanthrol. Die Kombination von Aldara und 9-Phenanthrol erhöht im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe die Mastzellzahlen pro Millimeter Rückenhaut signifikant (Abbildung 23 A).

Zusätzlich zu den absoluten Mastzellzahlen im Gewebe wurde jeweils die Anzahl der degranulierten Mastzellen bestimmt und daraus die prozentuale Degranulation der Mastzellen errechnet (Abbildung 23 B).

Die Bestimmung der degranulierten Mastzellen ist durch eine Abnahme der Farbintensität der zytoplasmatischen Granula möglich (vgl. Abbildungsteil C, gestrichelte Pfeile).

9-Phenanthrol alleine, aufgetragen in einer wirkstofffreien Basiscreme, steigert die Degranulation dermalen Mastzellen (vgl. Abbildungsteil B). Dieses Ergebnis stimmt mit der zuvor *in vitro* beobachteten Aktivierung von Mastzellen durch 9-Phenanthrol überein. Aus vorhergehenden Arbeiten ist eine Degranulation-fördernde Wirkung von Aldara auf

Mastzellen bekannt (Heib *et al.*, 2007). Dieses Phänomen konnte auch in diesem Experiment beobachtet werden. Eine zusätzliche Verwendung von 9-Phenanthrol verstärkt diesen Effekt. Zusätzlich zu der Bestimmung der Degranulation der Mastzellen wurde eine Giemsa-Färbung als Übersichtsfärbung durchgeführt und die Dicke der Epidermis bestimmt.

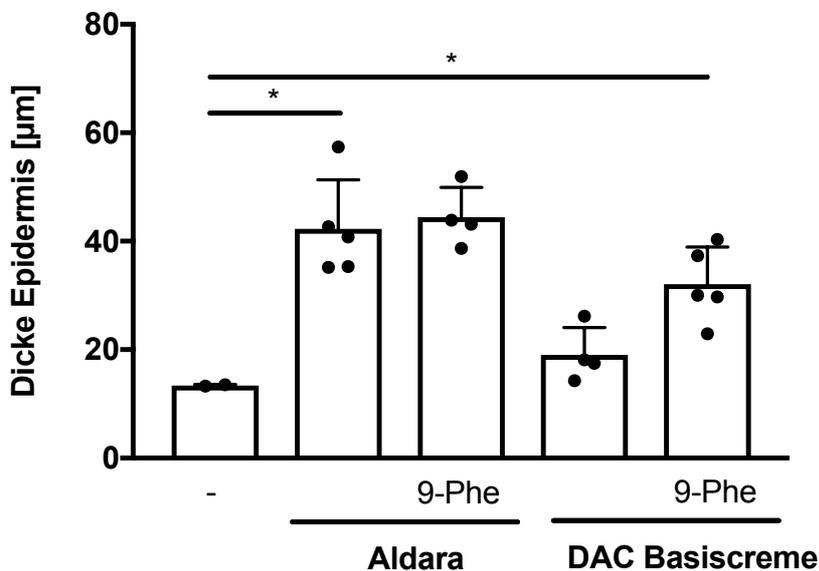


Abbildung 24: Die lokale Anwendung von 9-Phenanthrol verstärkt die Proliferation der epidermalen Zellen.

C57BL/6-Mäuse wurden transkutan gegen SIINFEKL immunisiert. Dabei wurde zum einen DAC-Basiscreme als wirkstofffreie Grundlage, zum anderen die Creme Aldara (3,1 mg Imiquimod) allein bzw. in Kombination mit 9-Phenanthrol (0,2 %) verwendet. An Tag 7 nach der ersten Immunisierung wurde die behandelte Rückenhaut mittels Giemsa-Färbung gefärbt und die Dicke der Epidermis ermittelt. Das Ergebnis stellt die Mittelwerte + Standardabweichung dar (n= 2-5, 10 Bilder pro Tier; 3 Messwerte pro Bild; statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test und anschließender Bonferroni-Korrektur; *p <0,05).

Abbildung 24 zeigt die mittlere epidermale Dicke der histologischen Präparate. Hier ist eine Zunahme der epidermalen Zellschicht nach Behandlung mit Aldara zu erkennen. 9-Phenanthrol steigert diesen Prozess nicht additiv. Verglichen mit den Präparaten unbehandelter Haut steigert 9-Phenanthrol die Dicke der Epidermis allein, ohne die zusätzliche Verwendung von Aldara.

Ergänzend zu der beobachteten Wirkung von 9-Phenanthrol auf BMMC kann eine Mastzell-aktivierende Wirkung von 9-Phenanthrol auf Hautmastzellen festgestellt werden. Zusätzlich vermag es die Proliferation epidermaler Zellen zu fördern.

3.5.2 9-Phenanthrol erhöht die Frequenz peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen

Um den Einfluss von 9-Phenanthrol auf die TCI zu untersuchen, wurde den behandelten Tieren an Tag 7 nach der ersten Aldara-Behandlung Blut entnommen und dieses auf das Vorhandensein SIINFEKL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer-Färbung durchflusszytometrisch untersucht.

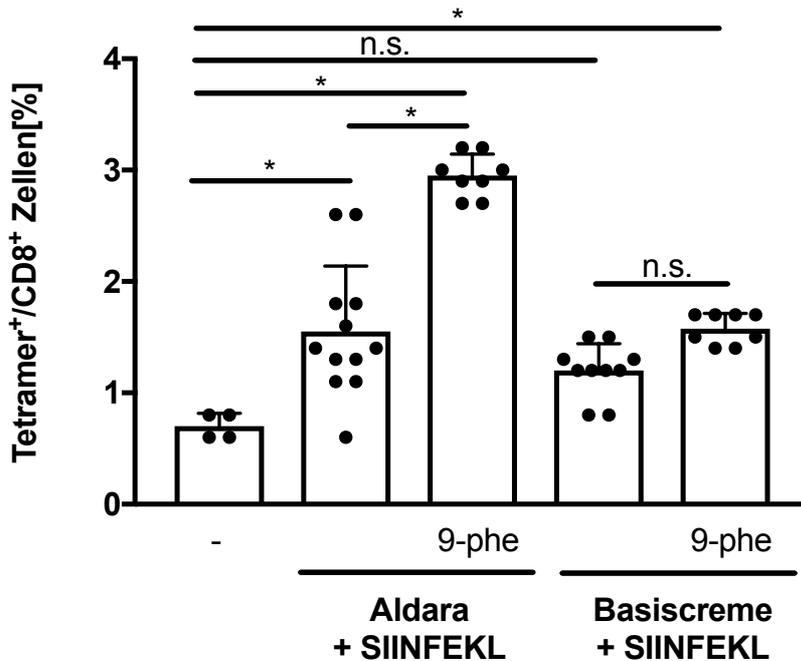


Abbildung 25: 9-Phenanthrol begünstigt bei gleichzeitiger Aldara Behandlung die Entstehung SIINFEKL-spezifischer CD8⁺ Effektorzellen.

C57BL/6 Tiere wurden zweifach gegen SIINFEKL in An- und Abwesenheit von 9-Phenanthrol (9-phe; 0,2 %) immunisiert. Dabei diente neben der Imiquimod-haltigen Creme Aldara eine wirkstofffreie Basiscreme als Grundlage für die Immunisierung. Eine Woche nach der ersten Behandlung wurde die Frequenz peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut mittels FACS untersucht. Die Messpunkte zeigen die Ergebnisse von 4 – 12 Tieren mit Mittelwerten + Standardabweichung (*p < 0,05; n.s.: nicht signifikant; einseitiger ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur).

Durch Kombination von Aldara und 9-Phenanthrol kann die Frequenz SIINFEKL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut im Vergleich zur alleinigen Aldara Behandlung signifikant gesteigert werden. Die Verwendung der wirkstofffreien Basiscreme hat keinen Effekt auf die Immunisierung. Eine additive Verwendung von 9-Phenanthrol in der Basiscreme erhöht jedoch, verglichen mit den unbehandelten Tieren, die CD8⁺/Tetramer⁺ Zellpopulation.

3.5.3 9-Phenanthrol fördert die Entstehung von peptidspezifischen IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen

Um das vermehrte Vorkommen peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach 9-Phenanthrol-Behandlung zu verifizieren, wurde ein IFN- γ -ELISpot durchgeführt. Der ELISpot wurde wie in 2.7.6 beschrieben durchgeführt. Jeweils $2,5 \times 10^5$ Milzzellen von immunisierten Tieren sowie

von Kontrolltieren wurden in Testmedium für 20 Stunden mit SIINFEKL (1 μ M) restimuliert. Dabei wurde auch ein Augenmerk auf den Vergleich zwischen C57BL/6 und dem Mastzell-defizienten Mausstamm *C57BL/6-Kit^{W-Sh}* gelegt, da aus Vorarbeiten bekannt ist, dass Mastzellen essentielle Effektorzellen in dem Prozess der TCI mit Aldara darstellen (Heib *et al.*, 2007).

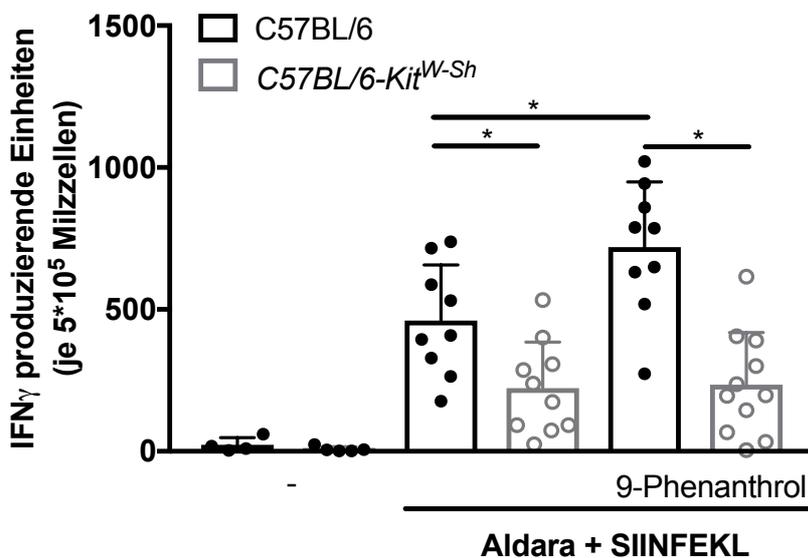


Abbildung 26: 9-Phenanthrol steigert in Verbindung mit Imiquimod die Entstehung von CD8⁺/IFN- γ ⁺-Zellen.

C57BL/6 und *C57BL/6-Kit^{W-Sh}* Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Formulierung aus Imiquimod (3,1 mg) und SIINFEKL (100 μ g) mit und ohne 9-Phenanthrol (0,2 %) transkutan immunisiert. An Tag 8 wurden die Milzellsuspensionen hergestellt und die Anzahl SIINFEKL-spezifischer aktiver CD8⁺ T-Zellen untersucht. Dafür wurden 2,5x10⁵ Milzzellen in An- und Abwesenheit von 1 μ M SIINFEKL für 20 Stunden restimuliert und mittels ELISpot-Antikörper gegen IFN- γ , die Anzahl der SFU (*Spot forming units*) ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des CTL-Immuno SPOT S6 (CTL Europe, Bonn, Germany). Abgebildet sind Spot-Frequenzen + Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 4-10). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (*= $p > 0,05$).

Die zusätzliche Verwendung von 9-Phenanthrol bei der transkutanen Immunisierung gegen SIINFEKL steigert im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Aldara und SIINFEKL die Generierung von peptidspezifischen und IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen.

Abbildung 26 bestätigt zudem die Arbeit von Heib *et al.* aus dem Jahre 2007, welche die TCI mit Aldara als einen mastzell-abhängigen Prozess darstellt. Nach Immunisierung mit Aldara kommt es in dem Mastzell-defizienten Stamm *C57BL/6-Kit^{W-Sh}* zu einer verminderten Frequenz IFN- γ -produzierender T-Zellen.

Dieser Effekt bleibt unbeeinflusst von der 9-Phenanthrol-Anwendung. Mit Aldara und 9-Phenanthrol behandelte *C57BL/6-Kit^{W-Sh}* Tiere zeigen genau wie nach alleiniger Aldara-Behandlung einen reduzierten Immunisierungserfolg, gemessen an einer geringeren Anzahl IFN- γ -produzierender Zellen.

3.5.4 Die Auswanderung von dendritischen Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten wird durch 9-Phenanthrol gefördert

Im Jahre 2007 konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Mastzellen eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der primären Entzündungsreaktion nach Immunisierung mit Imiquimod spielen. Dabei fördern Mastzellen durch die Produktion von IL-1 β die Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis in die hautdrainierenden Lymphknoten. Durch die Verwendung von Mastzell-defizienten *C57BL/6-Kit^{W⁻Sh}* Tieren konnte die Abhängigkeit der Langerhans-Zellwanderung von Mastzellen demonstriert werden (Heib *et al.*, 2007).

Nachdem in den vorhergegangenen Immunisierungsexperimenten ein positiver additiver Einfluss von 9-Phenanthrol auf die TCI festgestellt werden konnte, wurde in einem anschließenden Experiment der Effekt von 9-Phenanthrol auf die Migration dendritischer Zellen in die hautdrainierenden Lymphknoten untersucht.

Dafür wurde, wie bereits in Kapitel 2.7.3 beschrieben, ein Derivat von Fluorescein, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet. Dermale Zellen nehmen diesen Farbstoff auf. In einer anschließenden FACS-Analyse können migratorische Zellen anhand ihrer FITC-Expression in den Lymphknoten identifiziert werden.

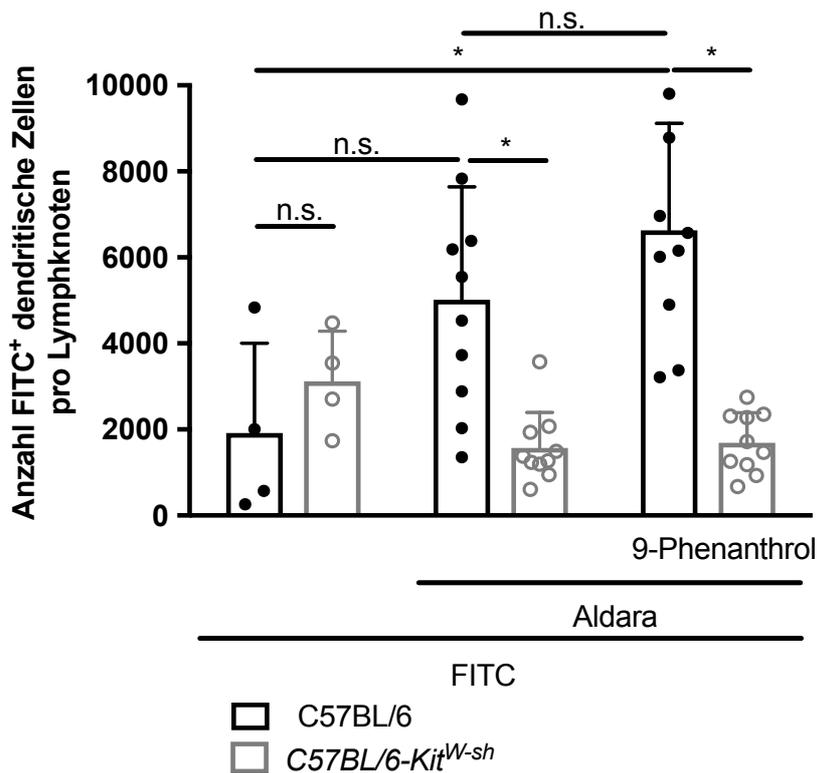


Abbildung 27: 9-Phenanthrol verstärkt die Migration dendritischer Zellen in die drainierenden Lymphknoten.

Die Ohrhaut von C57BL/6 und C57BL/6-Kit^{W-sh} Mäusen wurde zunächst mit FITC (4 mg/ml in Aceton/Olivenöl 3:1) behandelt. 6 h und 30 h nach der FITC-Behandlung erfolgte eine topische Applikation von Aldara alleine bzw. in Kombination mit 9-Phenanthrol. Als Kontrolle dienten FITC-behandelte Tiere ohne Immunisierung. 72 Stunden nach der ersten Immunisierung wurden die drainierenden aurikulären (dr. LN) sowie die inguinalen Lymphknoten (n.dr.LN) auf das Vorhandensein von FITC⁺ dendritischen Zellen (MHCII⁺/CD11c⁺) hin untersucht. Dargestellt ist die Anzahl FITC⁺ dendritischer Zellen pro Organ als Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n= 4-10; 2 Werte pro Tier; einseitiger ANOVA mit Bonferroni-Korrektur; *=p>0,05; n.s.: nicht signifikant).

Abbildung 27 zeigt das Ergebnis des Migrationsexperiments. Nach Behandlung mit Aldara kommt es in den Wildtypen zu einem Anstieg der FITC⁺ dendritischen Zellen in den aurikulären Lymphknoten, welcher jedoch aufgrund der sehr großen Streuung nicht signifikant ist (FITC: 1918 ± 2089; Aldara + FITC: 5016 ± 2622). Durch die additive Verwendung von 9-Phenanthrol kommt es zu einer erneuten Steigerung der Frequenz FITC⁺ dendritischer Zellen. Verglichen mit den FITC-behandelten Kontrolltieren ergibt sich hier ein signifikanter Anstieg der Anzahl FITC positiver dendritischer Zellen. In den Mastzelldefizienten C57BL/6-Kit^{W-sh} ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Hier kommt es nach Behandlung mit Aldara bzw. Aldara und 9-Phenanthrol zu keinem Anstieg der Zellzahl FITC⁺ dendritischer Zellen im aurikulären Lymphknoten. Die Anzahl der FITC⁺ Zielzellen ist in diesen Tieren im Vergleich zu C57BL/6 signifikant verringert. Dieses Ergebnis deckt sich mit der zuvor beschriebenen Beobachtung von Heib *et al.* (2007).

3.5.5 9-Phenanthrol vermindert das Tumorstadium und verlängert das Überleben der Tiere in einem prophylaktischen Tumormodell

Um den Effekt von 9-Phenanthrol auf die SIINFEKL-induzierte Immunantwort abschließend zu untersuchen, wurde ein prophylaktisches B16-Ovalbumin Tumormodell verwendet. Dieses *in vivo* Tumormodell basiert auf der Verwendung von Melanom Zellen, welche die Fähigkeit besitzen, SIINFEKL zu exprimieren. Zunächst wurden die Tiere an zwei aufeinander folgenden Tagen mit Aldara in An- bzw. Abwesenheit von 9-Phenanthrol gegen SIINFEKL immunisiert. An Tag drei nach der ersten Immunisierung wurden 2×10^5 B16-Ova Zellen subkutan in die Flanke der Tiere injiziert. Das Tumorstadium wurde alle 2-3 Tage mit einer Schieblehre gemessen.

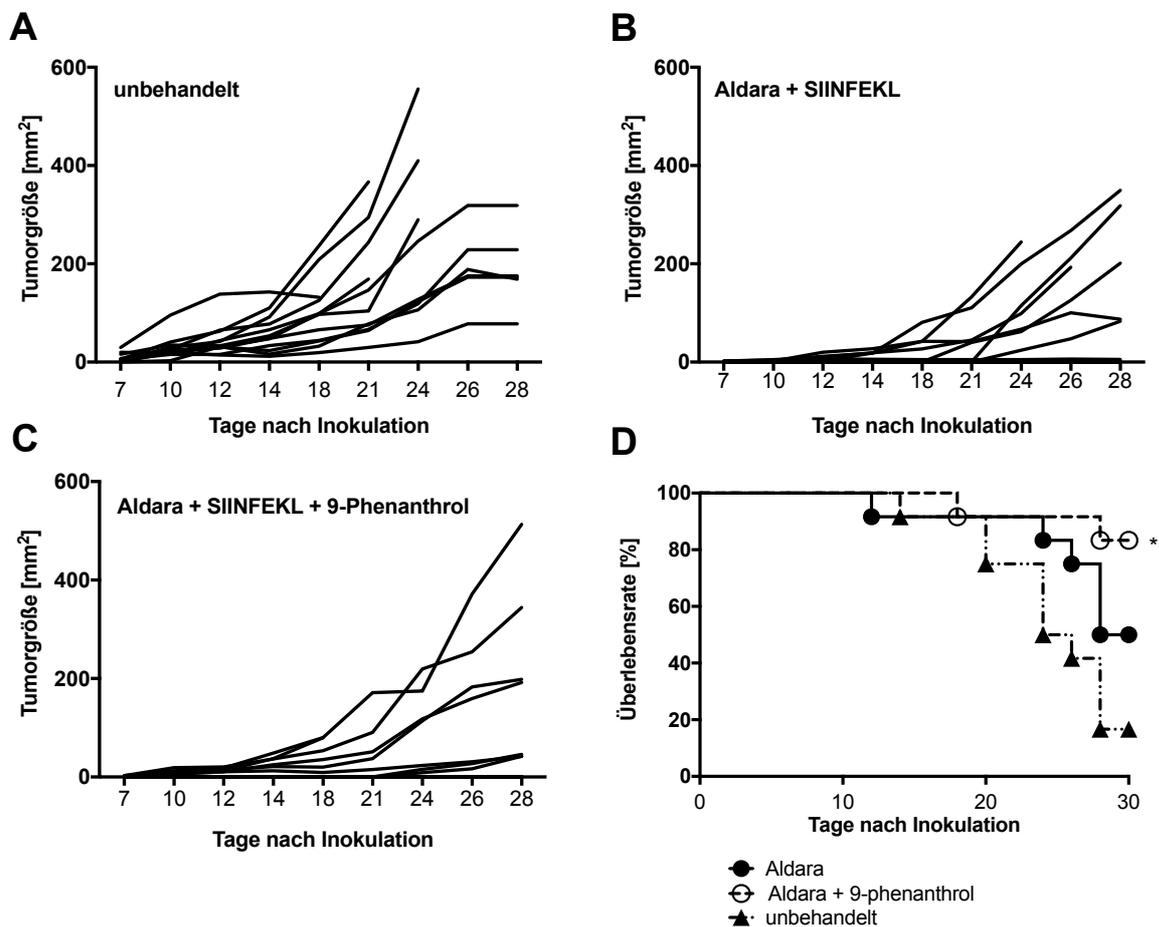


Abbildung 28: Erhöhte Überlebensrate nach kombinierter Applikation von 9-Phenanthrol und Aldara.

Die Immunisierung erfolgte drei Tage vor der Inokulation mit SIINFEKL-exprimierenden B16-OVA Melanom Zellen (2×10^5 Zellen s.c.) in die Flanke der C57BL/6 Tiere. Alle 2-3 Tage wurde **A - C** das Tumorstadium (jede Linie symbolisiert eine einzelne Maus) sowie **D** das Überleben dokumentiert (n= 12; *, signifikanter Unterschied, wenn $p < 0,05$, Log Rank Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe).

In den Abbildungsteilen A bis C ist die Tumorstadium in Abhängigkeit von der Behandlung über die Zeit dargestellt. Jede Linie stellt das individuelle Tumorstadium einer einzelnen Maus dar. Die Kontrollgruppe (Abbildung 28 A) zeigt geschlossen ein messbares Tumorstadium

(mittlere maximale TumorgroÙe 255 mm²). Hier mussten im Rahmen des Beobachtungszeitraumes 83 % der Tiere (10 von 12 Tieren) aufgrund von zu groÙen bzw. ulzerierenden Tumoren abgetötet werden (Abbildung 28 D).

Die vorhergehende Behandlung mit Aldara und SIINFEKL führt zu einem verlangsamten Tumorwachstum. Drei Tiere zeigen keine Tumorentwicklung. Durch eine zusätzliche prophylaktische Behandlung mit 9-Phenanthrol sind ein Drittel (4/12) der Versuchstiere in dem Beobachtungszeitraum tumorfrei. Zwei Versuchstiere mussten in dieser Gruppe aufgrund von schnell wachsenden Tumoren abgetötet werden, zwei weitere zeigten ein zeitlich verzögertes Tumorwachstum. Die übrigen Tiere wiesen minimale bzw. kaum messbare Tumore auf. Betrachtet man die in Abbildungsteil D dargestellten Kaplan-Meier-Kurven, fördert 9-Phenanthrol signifikant das Überleben der Tiere verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. In der Aldara-Gruppe überlebten 50 % (6/12) der Versuchstiere bis Tag 30, nach kombinierter Behandlung mit 9-Phenanthrol überlebten 83 % (10 von 12 Tieren).

Optimierung der transkutanen Immunisierung durch selektive Aktivierung von Mastzellen in der Haut.

- 9-Phenanthrol aktiviert Mastzellen in der Haut und fördert zusätzlich die Proliferation der epidermalen Zellen.
- 9-Phenanthrol erhöht die Effizienz der Primärantwort der transkutanen Immunisierung durch eine erhöhte Frequenz peptidspezifischer, aktiver CD8⁺ T-Zellen.
- 9-Phenanthrol fördert - nach Applikation von Aldara - die Migration dendritischer Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten.
- In einem prophylaktischen Tumormodel fördert 9-Phenanthrol das Überleben der Tiere.

4. Diskussion

Immunisierungen dienen dem Ziel, die Bevölkerung vor gefährlichen Infektionskrankheiten zu schützen. Die dabei am weitesten verbreitete Administrationsmethode ist die nadelbasierte intramuskuläre Impfung, welche einige Nachteile birgt. In 5 % der Injektionen kommt es z.B. statistisch gesehen zu Infektionen (World Health Organization, 2015), was ein beträchtliches Risiko für das ausführende Personal darstellt. Aus diesem Grund stellt die Entwicklung von nadelfreien Immunisierungsmethoden ein bedeutendes Ziel des weltweiten Gesundheitswesens dar (Levine *et al.*, 2003). 2005 gelang es Rechtsteiner und Kollegen, eine neuartige transkutane Immunisierungsmethode zu entwickeln, die auf der Aktivierung des TLR7 durch Imiquimod beruht (Rechtsteiner *et al.*, 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die migrationsabhängigen Mechanismen der TCI und in diesem Zusammenhang die Rolle von CD103⁺ CD11b⁻ dendritischen Zellen zu beleuchten. Zudem sollte die Rolle von IL-1 und der Produzenten des Zytokins IL-10 in der Haut untersucht werden.

Zum Zweiten bestand das Ziel der vorliegenden Dissertation darin, die Effizienz der transkutanen Immunisierung durch gezielte Aktivierung von Mastzellen zu verbessern.

4.1 Antigentransport und Zytokin-vermittelte Mechanismen der TCI

Für die Entwicklung einer effizienten transkutanen Immunisierung ist ein detailliertes Wissen über das zelluläre Zusammenspiel und die Interaktionen der Immunzellen in der Haut essentiell. Bei der transkutanen Immunisierung mit Aldara stellt Imiquimod ein potentes Adjuvans dar, welches TLR7-abhängige Signaltransduktionswege in den Zellen des assoziierten lymphoiden Gewebes (SALT, *skin associated lymphoid tissue*) aktiviert. Das SALT besitzt hier eine Schlüsselrolle in der Organisation einer Immunantwort.

4.1.1 Der Antigentransport ist vermittelt durch dendritische Zellen und passiven Transport

In der Methode der TCI mit Aldara wird ein Peptid aus dem Ovalbumin (SIINFEKL) zusammen mit der Creme auf die rasierte Haut aufgetragen. Antigenpräsentierende Zellen (APC), vor allem dendritische Zellen, können dieses Peptid aufnehmen, werden über TLR7 aktiviert und wandern in die hautdrainierenden Lymphknoten ein. Eine andere Möglichkeit ist der passive Transport der Peptide, z.B. durch die Lymphflüssigkeit. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Analyse der migrationsabhängigen Mechanismen der transkutanen Immunisierung. Aus Vorarbeiten ist eine essentielle Rolle von CD11c⁺ dendritischen Zellen im Prozess der TCI bekannt (Stein *et al.*, 2011a). Unbeantwortet ist bislang in diesem Zusammenhang, ob das Peptid durch APCs aufgenommen werden muss, um später in den hautdrainierenden Lymphknoten die Generierung von peptidspezifischen T-Zellen zu

induzieren, oder ob es zusätzlich durch passiven Transport mit der Lymphe in den Lymphknoten gelangt. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass der CC-Chemokin-Rezeptor CCR7 eine bedeutende Rolle bei der Einwanderung von T- Zellen und dendritischen Zellen in die peripheren Lymphknoten spielt. *Ccr7^{-/-}* Tiere zeigen im Vergleich zu C57BL/6 keinen Immunisierungseffekt nach transkutaner Immunisierung mit Aldara (Aranda Lopez *et al.*, 2017). Um die Rolle der Wanderung der dendritischen Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten zu untersuchen, wurde ein sogenannter *in vivo* Proliferationsversuch durchgeführt (siehe Abbildung 9). Transgene *C57BL/6-OT-1* Milzzellen wurden hierbei intravenös in *Ccr7^{-/-}* oder C57BL/6 Tiere transferiert. Durch den Transfer der CCR7⁺ Milzzellen ist sichergestellt, dass alle Versuchstiere funktionsfähige T-Zellen besitzen, die mittels CCR7 in die lokalen Lymphknoten einwandern können. Nach Behandlung mit Aldara und Peptid wurde die Proliferation der transgenen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten analysiert. *Ccr7^{-/-}* Tiere ohne migrationsfähige DC zeigen nach Immunisierung gegenüber C57BL/6 eine signifikant verminderte jedoch deutlich messbare T-Zell-Proliferation.

Die Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen ist somit sowohl durch die Migration dendritischer Zellen in die Lymphknoten (aktiver Antigentransport) als auch durch passiven Antigentransport bedingt. Die Bedeutung des passiven Antigentransports wurde bereits in anderen Zusammenhängen gezeigt. Hier ist z.B. der passive Transport von auf die Haut aufgetragenen Haptenen (Pior *et al.*, 1999) oder der über die Lymphe vermittelte Transport von exogenen Antigenen zu nennen (Thomas *et al.*, 2012).

Um die Rolle der dendritischen Zellen im Kontext der TCI genauer zu beleuchten, wurden bereits einige Vorarbeiten durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass eine direkte Interaktion von hautresidenten APC mit T-Zellen im Lymphknoten für die Generierung von antigenspezifischen T-Zellen unerlässlich ist (Stroitzer *et al.*, 2008). Bereits 2011 konnte gezeigt werden, dass CD11c⁺ dermale Zellen essentiell für eine T-Zellantwort nach transkutaner Immunisierung sind (Stein *et al.*, 2011a). Ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle erfolgt die Differenzierung der CD11c⁺ konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) durch Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in cDC1 und cDC2. Eine weitere Gruppe stellen die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) dar, welche in der Maus erstmals 2001 beschrieben wurden (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Worbs *et al.*, 2017). Der Transkriptionsfaktor BATF3 reguliert u.a. die Entwicklung der cDC1, welche sowohl CD8⁺ als auch CD103⁺ CD11b⁻ dermale dendritische Zellen darstellen. CD8⁺ dendritische Zellen werden als lymphoid-residente DCs bezeichnet und sind u.a. in den Lymphknoten zu finden (Merad *et al.*, 2013). CD103⁺ CD11b⁻ dendritische Zellen gehören zur Gruppe der migratorischen DCs (Schlitzer und Ginhoux, 2014; Merad *et al.*, 2013). Bei Verwendung von *Batf3^{-/-}* Tieren auf C57BL/6-Hintergrund ist zu beachten, dass im Gegensatz zu 129S6/SvEv

lediglich die Populationen der dermalen CD103⁺ CD11b⁻ cDCs und Population der DEC205⁺CD8⁺ DCs in der Milz reduziert sind. Die Population der DEC205⁺CD8⁺ DCs ist in den hautdrainierenden Lymphknoten unverändert vorhanden (Edelson *et al.*, 2011). Um die Beteiligung der CD103⁺ CD11b⁻ dermalen dendritischen Zellen an der TCI zu untersuchen, wurden *Batf3*^{-/-} Tiere (C57BL/6-Hintergrund) im Vergleich mit C57BL/6 Tieren transkutan immunisiert und die Frequenz der antigenspezifischen T-Zellen analysiert (vgl. Abbildung 10). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von CD103⁺ CD11b⁻ konventionellen DCs keinen Einfluss auf die Effizienz der transkutanen Immunisierung besitzt. Die Rolle der CD8⁺ Lymphknoten-residenten DCs ist in diesem Zusammenhang weiter zu untersuchen. Zusätzlich zeigen *Batf3*^{-/-} Mäuse gegenüber C57BL/6 Mäusen eine signifikant verminderte Anzahl Langerin⁺ dendritischer Zellen (Edelson *et al.*, 2011). Demnach hat eine verminderte Anzahl Langerin⁺ dendritischer Zellen keinen Einfluss auf die Effizienz der Imiquimod-basierten TCI. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Stein und Kollegen aus dem Jahre 2011 untermauert. Hier konnte mit DTR (Diphtherie-Toxin) basierten Modellen gezeigt werden, dass CD11c⁺ dendritische Zellen unerlässlich für die Induktion einer antigenspezifischen T-Zellantwort nach TCI sind, Langerin⁺ Zellen jedoch keine signifikante Rolle spielen (Stein *et al.*, 2011a). Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass sowohl Langerin⁺ dendritische Zellen als auch CD103⁺ CD11b⁻ dermale dendritische Zellen keine essentielle Rolle für die Antigenpräsentation der TCI spielen. Diese Rolle könnte demnach möglicherweise von CD11b⁺ dendritische Zellen (cDC2) übernommen werden. Hier ist bekannt, dass migratorische cDC2, wie auch cDC1, nach Immunisierungsexperimenten im Lymphknoten das Antigen an T-Zellen präsentieren können (Kedl *et al.*, 2017). Um diese Frage zu beantworten, könnten Studien mit IRF4-defizienten dendritischen Zellen hilfreich sein, da die Migration dermalen CD11b⁺ DCs durch IRF-4 reguliert wird (Bajana *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang könnten transkutane Immunisierungen mit *CD11c Cre x IRF4*^{fl/fl} Tieren durchgeführt werden.

Weiterhin ist eine Antigenpräsentation durch pDCs denkbar. Imiquimod fördert die Migration von pDCs in die behandelte Haut und nachfolgend auch deren Einwanderung in die drainierenden Lymphknoten (Palamara *et al.*, 2004; Urosevic *et al.*, 2005). Die Rolle von pDCs an der Antigenpräsentation ist bislang noch kontrovers diskutiert (Villadangos und Young, 2008), jedoch besteht ein Konsens bezüglich ihrer Fähigkeit, nach vorhergegangener Reifung naive T-Zellen bzw. Gedächtnis-T-Zellen zu aktivieren (Colonna *et al.*, 2004; Liu, 2005). Die Entwicklung von pDCs wird mitunter durch IRF8 reguliert (Tsujiura *et al.*, 2003) Studien zeigten, dass in IRF8-defizienten Tieren die Anzahl an pDCs und cDC1-Zellen reduziert, die Anzahl an cDC2-Zellen (CD11b⁺ cDCs) jedoch unbeeinflusst ist (Ginhoux *et al.*, 2009; Merad *et al.*, 2013). *Irf8*^{-/-} Tiere könnten demnach verwendet werden, um die Rolle von cDC2 und pDCs am Prozess der TCI zu untersuchen. Eine weitere Klasse dendritischer

Zellen sind die sog. monozytär-abgeleiteten dendritische Zellen (mDCs), welche durch die Expression von *Ccr2* charakterisiert sind. Dieser Chemokin-Rezeptor vermittelt die Auswanderung der Monozyten aus dem Knochenmark in die entzündeten Bereiche (Serbina und Pamer, 2006; Tsou *et al.*, 2007) Um die Rolle von monozytär-abgeleiteten dendritischen Zellen zu analysieren, könnten Studien mit CCR2-defizienten Tieren hilfreich sein.

4.1.2 Die Immunisierung mit Aldara ist abhängig von IL-1

Aus den Arbeiten von Walter *et al.* im Jahre 2013 war eine TLR7-unabhängige Immunantwort nach Aldara-Behandlung bekannt. In diesen Studien konnte eine Apoptose-induzierende Wirkung von Aldara auf Keratinozyten ausgemacht werden. Bereits 2001 konnte gezeigt werden, dass gestresste oder sterbende Keratinozyten IL-1 α freisetzen. IL-1 α wiederum fördert die Produktion von Mitogenen, welche die Mitose der Keratinozyten beeinflussen und damit verbunden die Proliferation der Zellen steigern (Werner *et al.*, 2001). Diese Hyperpolarisation der Keratinozyten konnten auch Walter und Kollegen nach topischer Aldara-Behandlung feststellen. Messungen der IL-1 α -mRNA Produktion in Aldara-behandelter Haut im Vergleich zu unbehandelter Haut zeigten einen Anstieg der IL-1 α -mRNA unabhängig von TLR7. Außerdem konnte eine gesteigerte IL-1 β Expression gezeigt werden. Dieser Anstieg ist möglicherweise durch die Aldara-vermittelte Aktivierung des NLRP-1 Inflammasoms in humanen Keratinozyten zu erklären (Walter *et al.*, 2013). Ergänzend zu den Ergebnissen von Walter und Kollegen aus dem Jahre 2013 konnte im Rahmen dieser Arbeit eine gesteigerte IL-1 α -Produktion in der transkutan immunisierten Haut initial mittels Zytokin-Array und im Nachfolgenden in Multiplex-FACS-Messungen (CBA; *Cytometric Bead Array*) festgestellt werden (Abbildung 29).

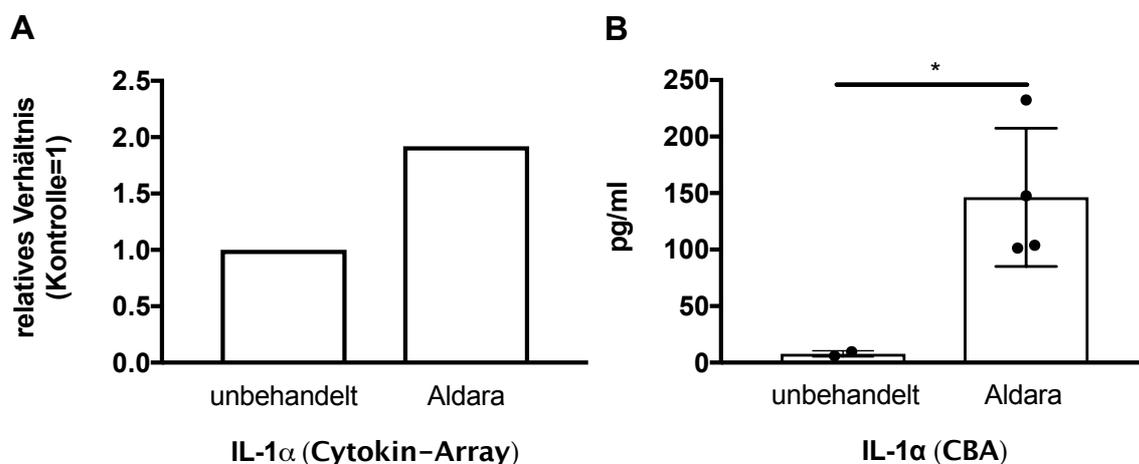


Abbildung 29: Aldara-Behandlung induziert die IL-1 α Produktion in der Haut.

Aldara behandelte sowie unbehandelte Maushaut wurde verdaut, zerkleinert und homogenisiert. Protein-Lysate wurden erstellt und diese mittels A) *Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A* (R&D Systems) bzw. B) *Cytometric Bead Array* (BD), einer multiplen-FACS-Analyse (n=2-5, Mittelwert \pm SD) untersucht.

Um die Rolle von IL-1 im Prozess der TCI mit Aldara genauer zu untersuchen, wurden IL-1R1-defiziente Tiere verwendet. Der IL-1 Rezeptor bindet IL-1 α und IL-1 β und induziert nachgeschaltete MyD88-abhängige Signalwege in der Zelle. Es kommt autokrin zur Produktion von IL-1 β (Dinarello *et al.*, 2009). In *Il-1r1*^{-/-} Tieren ist dieser Wirkmechanismus unterbunden. Diese Tiere zeigten nach Aldara-Behandlung verglichen mit C57BL/6 eine signifikant verminderte Immunisierungseffizienz gegen SIINFEKL. Dies konnte anhand einer verminderten Anzahl peptidspezifischer T-Zellen und einer reduzierten zytotoxischen Lyse ausgemacht werden (vgl. Abbildung 11). Aus Influenza-Infektionsmodellen ist eine verminderte Aktivierung spezifischer CD8⁺ T-Zellen in *Il-1r1*^{-/-} bekannt (Pang *et al.*, 2013).

IL-1 kann demnach eine wichtige Rolle im Prozess der transkutanen Immunisierung zugeordnet werden. Neben dem Effekt auf die TCI wurde zusätzlich die Rolle des IL-1 in der Aldara-induzierten Migration dermalen dendritischer Zellen in die drainierenden Lymphknoten mittels FITC-Färbung untersucht (siehe Abbildung 12). Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den analysierten Mausstämmen in der Anzahl FITC-positiver DCs nach Aldara-Behandlung ausgemacht werden. Die Wanderung dendritischer Zellen in die drainierenden Lymphknoten ist demnach unbeeinflusst von IL1R1. Eine Analyse des Aktivierungsstatus der dendritischen Zellen zeigt nach Aldara-Behandlung in den IL1R1-defizienten Tieren eine signifikant reduzierte Expression von CD86 gegenüber den C57BL/6 Tieren (Abbildung 13 C). Obwohl die relative Anzahl dendritischer Zellen in beiden Stämmen vergleichbar ist (Abbildung 13 A) scheint jedoch in *Il-1r1*^{-/-} die Aktivierung der DCs beeinträchtigt zu werden. Zusätzlich zu der Anzahl der dendritischen Zellen im aurikulären Lymphknoten wurde die Ohrschwellung unter Aldara-Behandlung in *Il-1r1*^{-/-} Tieren und C57BL/6 Tieren untersucht. C57BL/6 Tiere zeigten eine signifikante Steigerung der Ohrschwellung an Tag 3 nach der ersten Behandlung, wohingegen in *Il-1r1*^{-/-} Tieren keine gesteigerte Ohrschwellung zu beobachten ist (vgl. Abbildung 14 A). Diese Beobachtung wird durch HE-Färbungen bestätigt (Abbildung 14 C). Im Jahre 2013 konnte gezeigt werden, dass Aldara die Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten in die Haut in Abhängigkeit von IL-1 reguliert (Walter *et al.*, 2013). Neutrophile Granulozyten sind wichtige Komponenten der Entzündungsreaktion und werden in großen Mengen in die betroffenen Bereiche rekrutiert. Es kommt zu einer Schwellung am Ort der Entzündung, in diesem Fall zu einer Schwellung der Ohrhaut. Durch das Fehlen des IL-1R1 wird die IL-1 Produktion in der Haut gehemmt und die Rekrutierung der Neutrophilen Granulozyten unterbleibt. Eine Schwellung der betroffenen Region (hier Ohrhaut) kommt nicht zu Stande. Histologische Untersuchungen zeigten zudem in *Il-1r1*^{-/-} Tieren eine gegenüber dem Wildtyp verminderte Proliferation der epidermalen Zellen unter Aldara-Behandlung. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Proliferation von Keratinozyten stark von IL-1 abhängig ist (Werner *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2013). Das proinflammatorische Zytokin IL-1 stellt demnach einen wichtigen Baustein im

Prozess der TCI dar, welcher die lokale Entzündungsreaktion und die Effizienz der TCI beeinflusst.

4.1.3 Die Produzenten von IL-10 im Prozess der transkutanen Immunisierung

Die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen, im Speziellen dem Interleukin 10 (IL-10), wurde als ein Mechanismus identifiziert, die Stärke einer Immunantwort zu regulieren. IL-10 stellt in diesem Zusammenhang ein Schlüssel-Zytokin dar, welches die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen hemmt und nachfolgend u.a. die Proliferation von T-Zellen inhibiert (Moore *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2006; Grimaldeston *et al.*, 2007). Die spontane Entwicklung einer chronischen Colitis in IL-10-defizienten Tieren zeigte erstmals die Relevanz von IL-10 in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen *in vivo* (Kühn *et al.*, 1993). Für den Prozess der transkutanen Immunisierung war aus Versuchen mit *Il-10*^{-/-} Tieren eine Beeinträchtigung der Immunisierungseffizienz durch IL-10 bekannt. Hier konnte im Vergleich zu C57BL/6 Tieren in *Il-10*^{-/-} Mäusen eine signifikant erhöhte Produktion von T-Effektorzellen beobachtet werden (Stein *et al.*, 2011b). IL-10 stellt demnach einen negativen Regulator der TCI dar. Die zelluläre Quelle des IL-10 ist aber bislang unbekannt. Stein und Kollegen konnten in ihrer Arbeit regulatorische T-Zellen und B-Zellen als IL-10 Produzenten im Rahmen der TCI jedoch ausschließen. Die Identifizierung der zellulären Quellen des IL-10 würde dazu beitragen, den Prozess der transkutanen Immunisierung besser zu verstehen. Dieses Verständnis ist die Basis, um zukünftige Immunisierungsstrategien zu verbessern (Stein *et al.*, 2011b). Auf dieser Grundlage wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit dem Modell der *Il-10.egfp*-Reportermaus gearbeitet. In diesem Modell wird durch eine IL-10-Produktion zeitgleich eine *egfp*-Expression in den Zellen induziert. Hautproben sowie hautdrainierende Lymphknoten von *Il-10.egfp*-Reportermäusen dienten dem Ziel, mögliche IL-10 Produzenten in der Haut auszumachen. Die Verwendung von *Il10.egfp*-Reportermäusen birgt jedoch auch einige Nachteile. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete *Il10.egfp* Maus, auch *B-Green* Maus genannt, gehört zur Gruppe der 'regulären' IL-10-autofluoreszierenden Protein (AFP) Reportermäusen. Eine homozygote Maus trägt hier lediglich 2 Allele mit dem Reportergen (Neves *et al.*, 2010). Zusammen destabilisierenden Sequenzen aus der *Il-10* mRNA (Brewer *et al.*, 2003; Bouabe, 2012) führt dies zu einer geringen Sensitivität der ATF-Reportermause. Aus diesem Grund ist es möglich, dass die Analyse mittels *Il10.egfp*-Maus keine vollständige Darstellung der IL-10 Produzenten in der Haut ermöglicht. Diese Experimente geben jedoch einen Hinweis auf mögliche Kandidaten.

Die Ergebnisse in Abbildung 15 zeigen eine mögliche Beteiligung von Mastzellen als IL-10 Produzenten in Aldara behandelte Haut. Hier ist in Abbildungsteil B ein signifikanter Anstieg der mittleren *Il-10.egfp*-Expression zu beobachten. Diese Beobachtung passt zu den

bisherigen Erkenntnissen, dass Mastzellen neben einer proinflammatorischen Funktion eine anti-inflammatorische Funktion besitzen. Mastzellen konnten in diesem Zusammenhang als IL-10 produzierende Zellen im Prozess der Kontaktallergie identifiziert werden (Grimbaldeston *et al.*, 2007). Die anti-inflammatorische Funktion, initiiert durch eine IL-10 Sekretion, beeinflusst die Entzündungsreaktion in der Haut und damit die Einwanderung von Leukozyten in die entzündeten Bereiche (Grimbaldeston *et al.*, 2007). Zusätzlich zeigen GR-1-positive Granulozyten in der behandelten Haut eine tendenziell gesteigerte *egfp*-Expression, was mit einer gesteigerten IL-10 Produktion gleichzusetzen ist. Die mittlere eGFP-Fluoreszenz in dermalen dendritischen Zellen scheint unbeeinflusst, jedoch ist eine große Streuung der Werte zu beobachten. Aus vorherigen Arbeiten mit unterschiedlichen Infektionsmodellen sind Makrophagen (Edwards *et al.*, 2006) und dendritische Zellen als IL-10 Produzenten bekannt (Li *et al.*, 1999). Zusätzlich ist eine indirekte Wirkung auf T-Zellen und NK-Zellen bekannt, welche durch die direkte Wirkung von IL-10 auf Makrophagen vermittelt wird (Moore *et al.*, 2001; Couper *et al.*, 2008).

Aufgrund der gezeigten potentiellen Beteiligung von Mastzellen als IL-10 Produzenten wurde die Rolle von mastzellspezifischem IL-10 sowie DC und monozytär-spezifischem IL-10 in nachfolgenden TCI Experimenten mit Hilfe von zellspezifischen Knockouts überprüft.

Aus Abbildung 16 geht eine gesteigerte Immunisierungseffizienz in Tieren mit IL-10-defizienten Mastzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hervor. Im Vergleich zu den IL-10 kompetenten Wurfgeschwistern ist jedoch keine Effizienz-Steigerung zu beobachten. Die mittels der *Il-10.egfp*-Reportermaus beobachtete IL-10 Produktion in Mastzellen hat demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der TCI.

In Anlehnung an die tendenziell gesteigerte *egfp*-Expression in GR-1⁺ monozytären Zellen wurden *LysMCre x Il-10^{fl/fl}* für eine Immunisierung verwendet. Abbildung 17 A und B zeigen keinen signifikanten Einfluss von monozytär-abgeleitetem IL-10. *LysMCre⁺* IL-10 defiziente Tiere zeigen gegenüber ihren Wurfgeschwistern vergleichbare Anzahlen an peptidspezifischen T-Zellen. Die spezifische Lyse ist begleitet von einer großen Streuung der Einzelwerte und zeigt eine leichte tendenziell erhöhte spezifische Lyse in IL-10 defizienten *LysMCre* Tieren.

Um den Einfluss von DC-spezifischem IL-10 zu analysieren, wurden transkutane Immunisierungen mit *CD11cCre x Il-10^{fl/fl}* Tieren, welche eine konditionelle Deletion des *Il10* Gens in dendritischen Zellen aufweisen, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 in den Abbildungsteilen C – E dargestellt. In Tieren mit DC-spezifischem IL-10 Defizit zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine signifikant gesteigerte Expansion von peptidspezifischen T-Zellen. Zwischen *CD11cCre x Il-10^{fl/fl}* Tieren und IL-10 kompetenten Wurfgeschwistern konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildungsteil C). Die Analyse der Effektorfunktion in Abbildungsteil E zeigt ein

vergleichbares Bild. Eine DC spezifische IL-10 Defizienz fördert demnach tendenziell den Erfolg der transkutanen Immunisierung. IL-10 wirkt hier möglicherweise autokrin auf die Zytokin-Produktion von dendritischen Zellen und damit verbunden auf ihre Migration in die drainierenden Lymphknoten, wo es zu einer Aktivierung von naiven T-Zellen durch dendritische Zellen als APCs kommt (Demangel *et al.*, 2002).

Die durchgeführten Immunisierungsexperimente mit IL-10 spezifischen Knockout-Stämmen und die zuvor durchgeführten Experimente mit der IL-10.egfp-Reportermaus erlauben keine eindeutigen Rückschlüsse. Die IL-10-Produktion ist vermutlich die Folge des Zusammenspiels mehrerer Immunzellen in der Haut. Dabei leisten alle untersuchten Zellgruppen, darunter Mastzellen, monozytäre Zellen und dendritische Zellen, einen kleinen Beitrag zur IL-10 Produktion in der Haut. Ist eine Zellpopulation in dem Zusammenhang nicht in der Lage IL-10 zu produzieren, wird dieses Defizit möglicherweise von einer anderen Zellpopulation kompensiert und die Auswirkungen auf die Immunantwort minimiert.

4.2 9-Phenanthrol aktiviert Mastzellen und erhöht die Effizienz der TCI mit Aldara

Neben dem Verständnis der Migrations-abhängigen und Zytokin-bedingten Mechanismen der transkutanen Immunisierung lag ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit in der Modulation der transkutanen Immunisierung durch gezielte Aktivierung von Mastzellen in der Haut.

4.2.1 9-Phenanthrol induziert unabhängig von TRPM4 eine Degranulation der BMMC *in vitro* durch Freisetzung von endoplasmatischem Calcium

Dieser Arbeit vorausgehende Studien zeigten eine Beteiligung von Mastzellen an dem Prozess der TCI. Im Rahmen der TCI kommt es zu einer TLR7 - vermittelten Zytokinproduktion in den Mastzellen (Heib *et al.*, 2007). Typischerweise führen TLR7 – vermittelte Signale jedoch nicht zur Degranulation von Mastzellen (Sandig *et al.*, 2012). Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine gezielte Degranulation der Mastzellen durch zusätzliche Agenzien die Effizienz der TCI mit Aldara verbessern könnte. Mögliche Ziele stellten in diesem Zusammenhang die Familie der TRP-Kanäle dar, zu welcher der Calcium-sensitive Ionenkanal TRPM4 gehört. Neben einer Vielzahl von Zellen wurde die Expression von TRPM4 auch auf Mastzellen gezeigt (Freichel *et al.*, 2012). Das Phenanthren-Derivat 9-Phenanthrol stellt einen Antagonisten des TRPM4 Kanals dar (Grand *et al.*, 2008). Die durchgeführten Experimente basierten zunächst auf der Hypothese, dass eine Blockierung des TRPM4 zu einer gesteigerten Mastzell-Aktivierung führen sollte. TRPM4 gilt als Schlüsselregulator des IgE-vermittelten Calcium-Einstroms in die Zelle (Rixecker *et al.*, 2016). Studien mit *Trpm4*^{-/-} BMMC zeigten, dass die Abwesenheit dieses Rezeptors die Aktivierungsrate der Zellen erhöht (Vennekens *et al.*, 2007). TRPM4 stellt somit einen negativen Regulator der Calcium-induzierten Mastzell-Degranulation dar.

Die Effekte von 9-Phenanthrol auf Mastzellen sind bislang noch nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, 9-Phenanthrol mit einer direkten Mastzellaktivierung in Zusammenhang zu setzen. Degranulationsstudien zeigten eine konzentrationsabhängige Steigerung der Degranulation durch 9-Phenanthrol (Abbildung 18 A), welche jedoch nicht durch eine Neusynthese von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-1 β , TNF) begleitet wird (unveröffentlichte Daten, M. Zajak, 2014). Dieser beobachtete Effekt auf die Degranulation ist unabhängig von extrazellulärem Calcium (vgl. Abbildung 18). Im Gegensatz zu einer Stimulation mit Ionomycin, die eine starke Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium zeigt, ist der Effekt von 9-Phenanthrol in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium nicht signifikant beeinflusst, wird jedoch durch extrazelluläres Calcium gefördert (vgl. Abbildung 18 B). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass 9-Phenanthrol einen Effekt auf intrazelluläre Calciumquellen in BMMC besitzt. Steigt der

Calciumgehalt im Zytoplasma, kommt es zur Degranulation der Zelle (Ozawa *et al.*, 1993). Durchflusszytometrische Analysen mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fluo3-AM zeigten einen transienten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch 9-Phenanthrol (Abbildung 20 A). Frühere Calciumstudien an Herzzellen, welche eine hohe TRPM4-Expression aufweisen, zeigten bereits einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit 9-Phenanthrol, welcher auf einen Calciumausstrom aus den Mitochondrien zurückzuführen war (Burt *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst auch die Mitochondrien als mögliche intrazelluläre Calciumquelle untersucht. Ein indirekter Indikator für den Calcium-Transport über die innere mitochondriale Membran in die Matrix ist das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$). $\Delta\Psi_m$ wird durch einen Ionengradienten über der Membran gebildet. Dabei ist der Protonengehalt im Zwischenmembranraum größer als in der Matrix. Aufgrund der negativen Ladung der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran können kationische lipophile Farbstoffe, wie z.B. Rhodamin 123, in der Matrix akkumulieren. Ihre Fluoreszenzintensität kann als Messwert für ein verändertes Membranpotential angenommen werden. Bei einer Depolarisation, z.B. durch einen zusätzlichen Ausstrom von Calcium aus dem Mitochondrium oder vermittelt durch Protonenentkupper wie CCCP (*Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*), wird das Membranpotential erniedrigt. Messungen mit dem kationischen Farbstoff Rhodamin 123 zeigten keine depolarisierende Wirkung von 9-Phenanthrol auf das mitochondriale Membranpotential in BMMC. 9-Phenanthrol vermittelt in diesem Zusammenhang sogar eine Hyperpolarisation des $\Delta\Psi_m$ (vgl. *Abbildung 30*). Eine Hyperpolarisation geht mit einer Fluoreszenzerniedrigung des Farbstoffes Rhodamin-123 einher (Perry *et al.*, 2001). Rhodamin-123 Messungen mit unterschiedlichen 9-Phenanthrol-Konzentrationen zeigten, dass der hyperpolarisierende Effekt abhängig von der verwendeten Konzentration ist, analog zur Degranulation der Zellen (vgl. *Abbildung 18 A* und *Abbildung 30*). Nach erfolgter Hyperpolarisation ist eine Depolarisation mittels CCCP nur noch eingeschränkt möglich. Die durch 9-Phenanthrol induzierte Hyperpolarisation zeigt demnach eine Calcium-Aufnahme der Mitochondrien an. Aus der Literatur ist eine Calciumaufnahme in die Mitochondrien mittels Calcium Uniporter nach Induktion eines zytosolischen Calciumanstiegs bekannt (Rizzuto *et al.*, 2000). Aus diesem Grund scheiden diese Zellorganelle als Calcium-Quellen für den beobachteten zytosolischen Calciumanstieg aus.

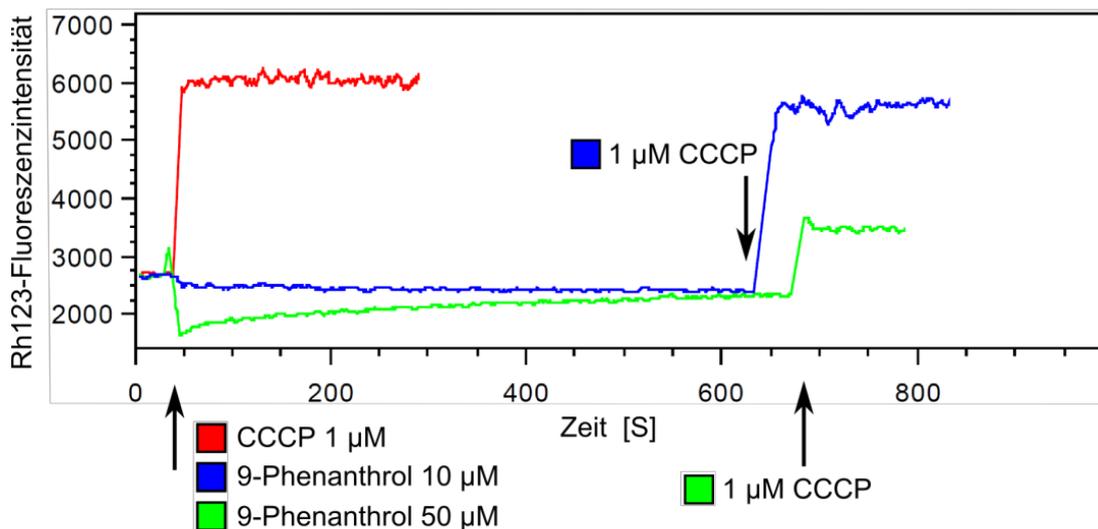


Abbildung 30: 9-Phenanthrol hyperpolarisiert konzentrationsabhängig die mitochondriale Membran.

BMMC wurden mit 10 µM Rhodamin-123 (Rh123) beladen (30 min. /37 °C) und in HBSS (2 mM Ca²⁺, 5 % FCS) gewaschen und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Durchflusszytometer wurde zunächst eine basale Fluoreszenz gemessen und anschließend die angegebenen Stimulanzien zugegeben (Pfeile). Die Fluoreszenzintensität ist gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen. CCCP stellt die Positivkontrolle dar, die zu einer Depolarisation der Membran führt (M. Zajak, unveröffentlichte Daten, 2014).

Neben den Mitochondrien stellt das Endoplasmatische Retikulum einen weiteren möglichen Calciumspeicher dar. Um den Effekt von 9-Phenanthrol auf das Endoplasmatische Retikulum zu untersuchen, wurde Thapsigargin verwendet. Thapsigargin ist ein Inhibitor der endoplasmatischen Calciumpumpen (Lytton *et al.*, 1991) und induziert eine vollständige Entleerung der endoplasmatischen Calciumspeicher. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Arbeiten von Burt und Kollegen (Burt *et al.*, 2013) kann in BMMC das Endoplasmatische Retikulum als Calciumquelle angenommen werden, da nach Entleerung der endoplasmatischen Calciumspeicher durch Thapsigargin der Effekt von 9-Phenanthrol auf den intrazellulären Calciumgehalt aufgehoben werden konnte (vgl. Abbildung 20 B).

9-Phenanthrol gilt als spezifischer Inhibitor des TRPM4-Kanals (Grand *et al.*, 2008). Um herauszufinden, ob die durch 9-Phenanthrol induzierten Effekte allein auf einer Blockade des TRPM4-Kanals beruhen, wurde eine vergleichende Degranulationsanalyse in C57BL/6 und *Trpm4*^{-/-} BMMC durchgeführt. Es konnte ein vergleichbares Aktivierungspotential von 9-Phenanthrol unabhängig von TRPM4 gezeigt werden (siehe Abbildung 21).

Neben der antagonistischen Wirkung von 9-Phenanthrol auf TRPM4 wurde kürzlich ein aktivierender Effekt von 9-Phenanthrol auf den calciumsensitiven Kalium-Kanal K_{Ca}3.1 in Ratten-Darmarterien beschrieben (Garland *et al.*, 2015). K_{Ca}3.1 stellt einen leitfähigkeitsgesteuerten Kaliumkanal dar, dessen Expression auch in humanen und murinen Mastzellen gezeigt werden konnte (Duffy *et al.*, 2001; Shumilina *et al.*, 2008). Nach Aktivierung von K_{Ca}3.1 kommt es zu einem Ausstrom von Kalium-Ionen aus der Zelle, was zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Dieser Mechanismus erhöht wiederum den

Einstrom von Calcium-Ionen ins Zellinnere, bspw. durch CRAC-Kanäle. Studien zeigten in diesem Zusammenhang eine verstärkte Degranulation humaner Mastzellen nach Aktivierung von $K_{Ca}3.1$ (Duffy *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der $K_{Ca}3.1$ -Inhibitor Tram-34 verwendet, um die Wirkung von 9-Phenanthrol auf $K_{Ca}3.1$ zu untersuchen. Durch Blockade des $K_{Ca}3.1$ konnte der durch 9-Phenanthrol induzierte Effekt auf die Degranulation aufgehoben werden. Im Vergleich dazu blieb der Ionomycin induzierte Effekt unbeeinflusst (vgl. Abbildung 22). Diese Beobachtung deutet auf eine mögliche Aktivierung des $K_{Ca}3.1$ durch 9-Phenanthrol hin. Dieses Ergebnis lässt die Hypothese zu, dass eine $K_{Ca}3.1$ vermittelte Aktivierung der BMMC die Degranulation fördert. Um dies weiter zu untersuchen, wurde der Effekt von bekannten Agonisten dieses Kalium-Kanals (1-EBIO (1-Ethyl-2-benzimidazolinone) und SKA-31 (Naphthol[1,2-d]thiazol-2-ylamine)) analysiert. Beide Agonisten induzierten keine Degranulation in BMMC (unveröffentlichte Daten, A. Hartmann). Dies deutet möglicherweise auf eine indirekte Wirkung von 9-Phenanthrol auf $K_{Ca}3.1$ hin. Calciummessungen mit 9-Phenanthrol und Tram-34 zeigten keinen Einfluss von Tram-34 auf den durch 9-Phenanthrol vermittelten Calciumeinstrom. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt von 9-Phenanthrol auf den Calciumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum unbeteiligt von $K_{Ca}3.1$ ist und 9-Phenanthrol möglicherweise eine direkte Wirkung auf das Endoplasmatische Retikulum besitzt.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals der Effekt von 9-Phenanthrol auf BMMC untersucht. Die Wirkungen sind in Abbildung 31 zusammengefasst. 9-Phenanthrol induziert die Degranulation der Mastzellen, entkoppelt von einer Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Die beobachtete Degranulation geht einher mit einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, vermittelt durch Freisetzung der endoplasmatischen Calciumspeicher. Diese Effekte sind unabhängig von TRPM4 und werden durch extrazelluläres Calcium gefördert. 9-Phenanthrol aktiviert möglicherweise den calciumsensitiven Kalium-Kanal $K_{Ca}3.1$, dessen Aktivierung allein jedoch keine Degranulation der BMMC induziert. Der genaue Mechanismus, wie 9-Phenanthrol die Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum vermittelt, bleibt bislang noch ungeklärt. 9-Phenanthrol ist eine lipophile Substanz, welche die Plasmamembran passieren und so intrazelluläre Kompartimente erreichen kann. Aus diesem Grund ist auch eine direkte Aktivierung der endoplasmatischen Membran-Kanäle, z.B. IP_3 -Rezeptoren oder Calciumpumpen (Calcium-ATPasen), denkbar.

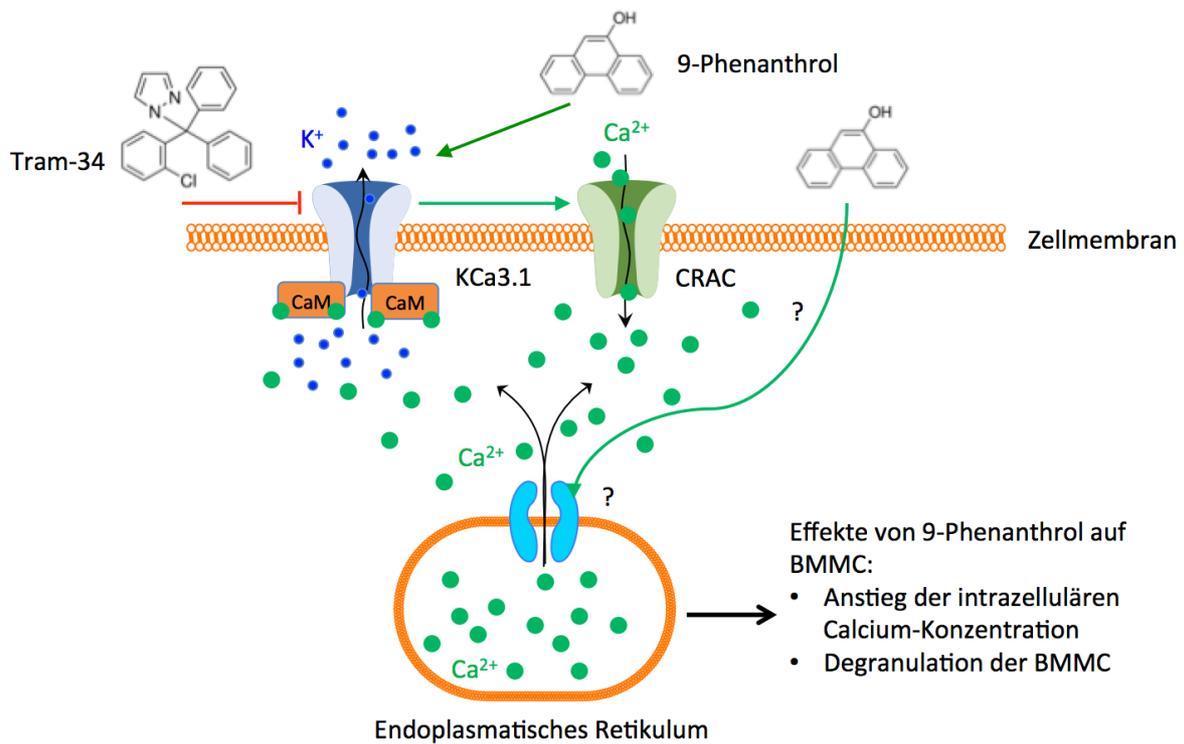


Abbildung 31: Die Wirkung von 9-Phenanthrol auf BMMC *in vitro*.

9-Phenanthrol allein induziert einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und vermittelt die Degranulation der BMMC. Diese Wirkung wird möglicherweise durch Aktivierung des calciumabhängigen Kaliumkanals K_{Ca}3.1 vermittelt. K_{Ca}3.1 besitzt eine positive Wirkung auf CRAC-Kanäle in der Zellmembran, was einen Einstrom von extrazellulären Calcium-Ionen fördert. Die durch 9-Phenanthrol hervorgerufene Degranulation kann durch den K_{Ca}3.1-Antagonisten Tram-34 gehemmt werden. Die erhöhte Calciumkonzentration in der Zelle wird jedoch nur partiell durch extrazelluläres Calcium beeinflusst. 9-Phenanthrol besitzt einen Effekt auf die Calciumspeicher des endoplasmatischen Retikulums (ER), dessen genauer Wirkmechanismus noch aufzuklären ist. Möglicherweise kann 9-Phenanthrol die Zellmembran passieren und einen direkten Effekt auf die Rezeptoren bzw. Calciumpumpen des ER ausüben.

4.2.2 9-Phenanthrol fördert in dem Model der TCI die Degranulation der dermalen Mastzellen, die Migration dermalen dendritischer Zellen und die Expansion zytotoxischer T-Zellen

Die *in vitro* beobachteten Effekte von 9-Phenanthrol auf BMMC (vgl. Kapitel 4.2.1) in Verbindung mit seiner geringen Größe und hohen Hydrophobizität machen 9-Phenanthrol zu einem interessanten Kandidaten, dessen Verwendbarkeit als Adjuvans in der Aldara-vermittelten TCI untersucht werden sollte.

Zunächst wurde der Effekt von 9-Phenanthrol auf dermale Mastzellen untersucht. 72 h nach der Behandlung mit 9-Phenanthrol in An- und Abwesenheit von Aldara wurde die behandelte Haut histologisch untersucht. Mastzellen wurden mittels Toluidinblau angefärbt und deren Degranulation analysiert (vgl. Abbildung 23). Aus Vorarbeiten war ein Mastzell-aktivierender Effekt von Aldara bekannt (Heib *et al.*, 2007). Da die Ligation von TLR7 durch Imiquimod typischerweise keine Mastzell-Degranulation bewirkt (Sandig *et al.*, 2012), muss allerdings davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Degranulation dermalen Mastzellen nach Behandlung mit Aldara ein indirekter Effekt nach Freisetzung von Alarminen im Rahmen einer einsetzenden Entzündungsreaktion ist. (Oppenheim und Yang, 2005; Bianchi, 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten histologischen Untersuchungen (Abbildung 23) zeigen eine Steigerung der dermalen Mastzell-Degranulation nach kombinierter Verwendung von 9-Phenanthrol und Aldara. Zusätzlich induziert die alleinige Behandlung mit 9-Phenanthrol im Vergleich zur unbehandelten Haut die Anzahl der Mastzellen pro mm Haut und fördert deren Degranulation. Dies geht mit den *in vitro* Beobachtungen in BMMC einher (Abbildung 18). Da BMMC nicht sensitiv gegenüber dem TLR7 Agonisten Imiquimod sind (Heib *et al.*, 2007), konnten in diesem Zusammenhang keine *in vitro* Studien durchgeführt werden, die den additiven Effekt von 9-Phenanthrol und Imiquimod auf die Mastzell-Degranulation untermauern könnten.

Ergänzend zu der histologischen Analyse der Haut-Mastzellen wurde der Effekt von 9-Phenanthrol auf die Proliferation epidermaler Zellen untersucht. Hier war eine proliferationsfördernde Wirkung von Aldara bekannt (Heib *et al.*, 2007), welche durch 9-Phenanthrol nicht additiv gesteigert werden konnte. Allerdings erhöht 9-Phenanthrol allein, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, die Dicke der epidermalen Zellschicht und damit die Proliferation dieser Zellen (Abbildung 24).

Zytokin-Studien der mit einer Kombination von 9-Phenanthrol und Aldara behandelten Ohrhaut sowie der dazugehörigen drainierenden Lymphknoten zeigten u.a. eine erhöhte Expression des Chemokins CXCL10 (Abbildung 32).

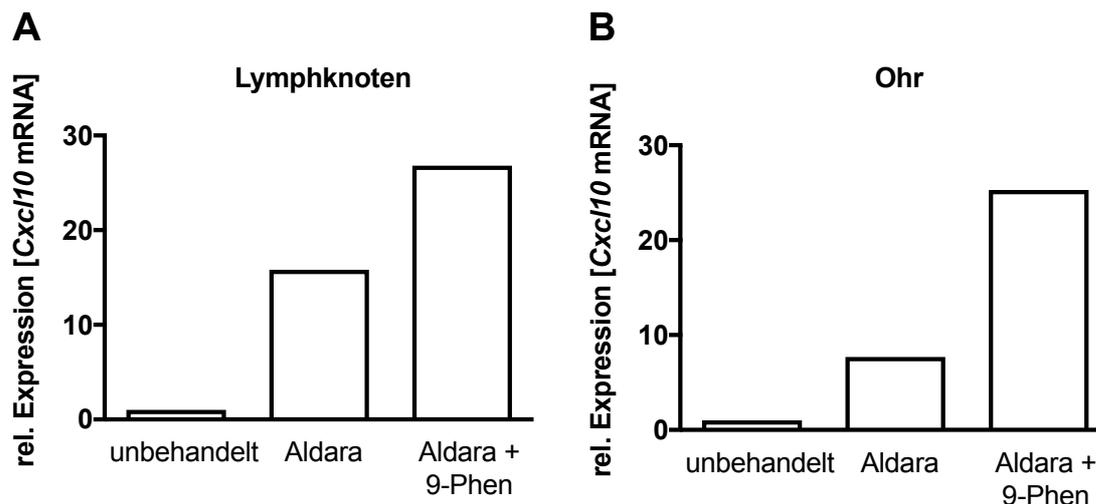


Abbildung 32: Aldara und 9-Phenanthrol erhöhen die *Cxcl10*-Expression in behandelter Haut und den drainierenden Lymphknoten.

Ohrhaut wurde zunächst zweifach mit Aldara allein oder in Kombination mit 9-Phenanthrol (9-Phen) behandelt und 72 Stunden nach der ersten Behandlung wurden **A** die Ohrhaut sowie **B** die aurikulären Lymphknoten auf die Expression von *Cxcl10* hin untersucht. Dazu wurde das jeweilige Gewebe zerkleinert, verdaut und eine RNA-Isolation mit anschließender cDNA-Synthese durchgeführt. Dargestellt sind exemplarische Ergebnisse, welche repräsentativ für 3 Analysen stehen.

CXCL10, auch Interferon- γ -induziertes Protein 10 kDa (IP-10) genannt, gehört zur Familie der CXC-Chemokine. CXCL10 bindet den CXCR3 Rezeptor und beeinflusst neben Chemotaxis (Neville *et al.*, 1997) und Apoptose (Sui *et al.*, 2004) zusätzlich auch das Wachstum der *Cxcr3*-exprimierenden Zellen (Aksoy *et al.*, 2006), zu denen u.a. aktivierte T- und B-Zellen gehören (Sallusto *et al.*, 1998). In einer Entzündungsreaktion wird CXCL10 klassischerweise u.a. von Leukozyten, Neutrophilen (Dyer *et al.*, 2009), Monozyten und Keratinozyten nach IFN- γ -vermittelter Aktivierung produziert (Luster *et al.*, 1987). Eine erhöhte CXCL10 Expression könnte in einem direkten Zusammenhang mit einer erhöhten Entzündungsreaktion stehen, da CXCL10 chemotaktisch die Einwanderung von Immunzellen in die entzündeten Bereiche fördern kann. Diese Beobachtung ergänzt die zuvor dargestellten histologischen Ergebnisse. 9-Phenanthrol scheint die Aldara-vermittelte Entzündungsreaktion zu fördern, indem die Degranulation dermalen Mastzellen gesteigert wird. Zusätzlich wird die Proliferation epidermaler Zellen (Keratinozyten) begünstigt.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurde 9-Phenanthrol als Adjuvans in der transkutanen Immunisierung gegen SIINFEKL eingesetzt. Die Primärantwort der Immunisierung an Tag 7 nach der ersten Behandlung zeigte einen signifikanten Anstieg der Frequenz peptidspezifischer T-Zellen nach zusätzlicher 9-Phenanthrol-Gabe. Verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren konnte sogar 9-Phenanthrol alleine eine signifikant erhöhte Anzahl SIINFEKL-spezifischer T-Zellen generieren, wenn auch diese Population sehr klein ist (Abbildung 25). Eine IFN- γ ELISPOT-Analyse zeigte in den 9-Phenanthrol und Aldara behandelten Tieren eine erhöhte Anzahl IFN- γ -produzierender Milzzellen nach Restimulation

mit SIINFEKL. Dies deutet auf eine erhöhte Effektorfunktion der SIINFEKL-spezifischen zytotoxischen T-Zellen hin (siehe Abbildung 26). Allgemein konnte zusätzlich ein leicht erhöhtes Milzgewicht in den 9-Phenanthrol-behandelten Tieren, verglichen mit einer alleinigen Aldara-Behandlung, festgestellt werden (unveröffentlichte Daten, A. Hartmann), was die oben dargestellten Daten und die These der gesteigerten Entzündungsreaktion unterstreicht.

In Kapitel 4.1.1 wurde die Rolle der dendritischen Zellen im Prozess der transkutanen Immunisierung diskutiert. Neben dem passiven Transport spielt der Peptid-Transport durch dendritische Zellen eine wichtige Rolle in dem Prozess der transkutanen Immunisierung. Migrationsexperimente mit dem fluoreszierenden Agens FITC zeigten nach zusätzlicher 9-Phenanthrol-Behandlung eine tendenziell gesteigerte Migration dendritischer Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten (Abbildung 27). 9-Phenanthrol besitzt jedoch keinen direkten aktivierenden Effekt auf dendritische Zellen, worauf *in vitro* Versuche in isolierten Milz-DCs hindeuteten (unveröffentlichte Daten, A. Hartmann). Die Reifung dendritischer Zellen - u.a. gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle (CD 80/86) - und die Migration dendritischer Zellen stellen jedoch zwei voneinander getrennte Prozesse dar (Barbet *et al.*, 2008).

Im Kontext der gesteigerten Migration konnte auch eine Vergrößerung der Lymphknoten, verbunden mit einem höheren Proteingehalt ausgemacht werden (unveröffentlichte Daten, A. Hartmann).

Um die Relevanz der o.g. Beobachtungen zu untersuchen, wurde 9-Phenanthrol als Adjuvans in einem prophylaktischen Tumorexperiment eingesetzt. Dafür wurden C57BL/6 Tiere transkutan gegen SIINFEKL immunisiert und anschließend mit B16-Ova Melanom-Zellen inokuliert. Abbildung 28 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. 9-Phenanthrol führt zu einem verlangsamten Tumorwachstum und verlängert das Überleben der Tiere. Aufgrund der gesteigerten Anzahl tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen kommt es zu einer gesteigerten Tumorprotektion. Ein weiterer interessanter Baustein dieses Puzzles stellt die durch 9-Phenanthrol induzierte Entzündungsreaktion verbunden mit einer erhöhten *Cxcl10* Expression dar. CXCL10 wurde in anderen Studien bereits mit einer anti-Tumor Wirkung in Verbindung gebracht (Persano *et al.*, 2007; Belperio *et al.*, 2000). Die oben beschriebenen Effekte von 9-Phenanthrol auf den Prozess der TCI sind in Abbildung 33 zusammengefasst. Durch die Vermittlung einer Entzündungsreaktion, verbunden mit einer Aktivierung der Mastzellen, besitzt 9-Phenanthrol einen Adjuvans-Effekt, welcher die Effizienz der transkutanen Immunisierung mit Aldara verbessern und eine gesteigerte Tumorprotektion in einem B16-OVA-Tumormodell vermitteln kann.

5. Zusammenfassung

Während der letzten Jahrzehnte sind neuartige, nicht invasive Immunisierungsmethoden wegen ihrer sicheren und leichten Handhabung in den Focus der Forschung gerückt. In diesem Zusammenhang sind transkutane Immunisierungsmethoden (TCI) von großem Interesse. Die topische Anwendung von Imiquimod als Adjuvans (in der Cremeformulierung Aldara) in Kombination mit dem Peptid SIINFEKL aktiviert das angeborene Immunsystem und induziert eine CTL-Antwort. Um diese Methode weiter optimieren zu können, ist ein detailliertes Wissen über das zelluläre und humorale Netzwerk in der Haut von essentieller Bedeutung.

In diesem Zusammenhang sollten zunächst die migrationsabhängigen Mechanismen untersucht werden. Die Frage, ob ein aktiver DC-vermittelter Peptidtransport notwendig ist, wurde unter Verwendung von *Ccr7^{-/-}* und *Batf3^{-/-}* Tieren untersucht. Schlussfolgernd aus diesen Analysen stellt der passive Transport über die Lymphe neben dem DC-vermittelten Transport einen zweiten wichtigen Transportweg dar.

Aus Vorarbeiten wurde eine Beteiligung des Inflammasoms am Prozess der TCI vermutet, weshalb der Einfluss von IL-1 auf die TCI analysiert wurde. IL-1 besitzt eine wichtige Rolle in der transkutanen Immunisierung mit Aldara, was in einer verringerten TCI-Effizienz und einer verminderten Hautentzündungsreaktion in IL-1R1-defizienten Mäusen widerspiegelt wird. Im Gegensatz zu der positiven Wirkung von IL-1 besitzt IL-10 eine inhibitorische Wirkung auf die TCI. Mit Hilfe von *Il-10.egfp* Reportertieren und diversen zellspezifischen Knockouts wurde die Beteiligung einzelner Zellpopulationen an der TCI-vermittelten IL-10-Produktion in der Haut untersucht und zeigte, dass die IL-10-Produktion hier möglicherweise aus einem Zusammenspiel unterschiedlicher Immunzellen resultiert.

Ein zweites Ziel dieser Studie lag in der Optimierung der TCI durch selektive Aktivierung von Mastzellen. Hier konnte zum ersten Mal eine aktivierende Wirkung von 9-Phenanthrol auf Mastzellen gezeigt werden. 9-Phenanthrol aktiviert Mastzellen *in vitro* - wahrscheinlich durch Aktivierung von $K_{Ca}3.1$ - und *in vivo*. In unserem TCI-Ansatz verstärkt 9-Phenanthrol die DC-Migration zu den drainierenden Lymphknoten und fördert die Bildung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen.

Diese Beobachtungen liefern eine plausible Erklärung für das Phänomen einer verstärkten Tumormunität nach prophylaktischer Immunisierung von Mäusen gegen ein Tumorantigen unter Verwendung von 9-Phenanthrol. Zusammenfassend stellt 9-Phenanthrol ein potentielles Adjuvans der TCI dar.

6. Abstract

In recent decades, novel, non-invasive immunization methods attained attraction to researches due to their safe and easy handling. In this context, transcutaneous immunization methods (TCI) are of great interest. The topical application of imiquimod as an adjuvant (in the cream formulation Aldara) in combination with the peptide SIINFEKL activates the innate immune system and provokes a CTL response. To further improve this original method a detailed knowledge of the cellular and humoral network in the skin is of essential importance. Unfortunately, despite the major impact on TCI efficiency, little is known about the migratory-dependent mechanisms of this process. Thus, this study aimed to investigate dendritic cell migration to the draining lymph nodes and its impact on TCI.

The question of whether active DC-mediated peptide transport is necessary was investigated using *Ccr7*^{-/-} and *Batf3*^{-/-} mice. Consequently, in addition to the DC-mediated transport, passive transport via the lymph represents a second important transport route.

Preliminary work has suggested that the inflammasome may be involved in the process of TCI, for that the influence of IL-1 on TCI was analysed. In conclusion, IL-1 plays an important role in transcutaneous immunization with Aldara, which is reflected in decreased TCI efficiency and a reduced skin inflammatory response in IL-1RI-deficient mice. In contrast to the beneficial effect of IL-1, IL-10 has a negative effect on the efficiency of TCI. With the help of *Il-10.egfp* reporter animals and diverse cell-specific knockouts, the involvement of individual cell populations in TCI-mediated IL-10 production in the skin was investigated. All analysed strains tend to be involved in the IL-10 production in the skin. So, there might be an interaction of different immune cells.

Besides the analysis of the cellular and humoral crosstalk, a second aim of this study was to improve TCI by selectively activating mast cells. This study demonstrates for the first time a mast cell activating competence of 9-phenanthrol. 9-phenanthrol activates mast cell *in vitro* and *in vivo* – most likely by the activation of K_{Ca}3.1. In our TCI approach, 9-phenthrol enhances DC migration to draining lymph nodes and promotes the generation of antigen-specific CD8⁺ T cells. Consequently (In addition), it prolongs the survival of the mice in a prophylactic tumour experiment. Thus, 9-phenanthrol may serve as an adjuvant in TCI.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunität. _____	3
Abbildung 2: Mastzell-Produkte und ihre Wirkungen auf andere Zellen der adaptiven und angeborenen Immunität. _____	6
Abbildung 3: Aufbau der Haut. _____	9
Abbildung 4: Das Immunsystem der Haut. _____	11
Abbildung 5: Der zytoplasmatische Calcium-Gehalt wird durch den TRPM4-Rezeptor reguliert. _____	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung der physiologischen Rolle von $K_{Ca3.1}$. _____	18
Abbildung 7: Lebende Zellen zeigen einen PI^{low} /Annexin V^{low} -Phänotyp. _____	31
Abbildung 8: Zytotoxisch aktive peptidspezifische $CD8^+$ T-Zellen lysieren peptidbeladene Zielzellen. _____	35
Abbildung 9: Verminderte, jedoch deutlich ausgeprägte, in vivo Proliferation von OT-1 T-Zellen in $Ccr7^{-/-}$ Tieren. _____	39
Abbildung 10: $CD103^+$ dendritische Zellen haben keinen Einfluss auf die Effizienz der transkutanen Immunisierung. _____	40
Abbildung 11: IL-1R1-Defizienz reduziert die Bildung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen nach transkutaner Immunisierung. _____	41
Abbildung 12: Die Migration dendritischer Zellen nach Aldara-Behandlung ist unbeeinflusst von einer IL1R1-Defizienz. _____	42
Abbildung 13: $Il-1r1^{-/-}$ und C57BL/6 Tiere zeigen vergleichbare Anzahlen dendritischer Zellen in den drainierenden Lymphknoten. _____	43
Abbildung 14: Reduzierte lokale Haut-Entzündungsreaktion in $Il-1r1^{-/-}$ Tieren. _____	44
Abbildung 15: Mastzellen stellen mögliche IL-10-Produzenten im Prozess der TCI dar. _____	47
Abbildung 16: Mastzell-IL-10 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der TCI. _____	49
Abbildung 17: Die IL-10-Produktion in der Haut nach TCI ist nicht signifikant beeinflusst von zellspezifischen Knockouts der myeloiden Zellreihe. _____	51
Abbildung 18: 9-Phenanthrol aktiviert Mastzellen unabhängig von extrazellulärem Calcium und fördert so deren Degranulation. _____	54
Abbildung 19: Die Viabilität der Zellen wird durch Behandlung mit 9-Phenanthrol und Ionomycin kaum beeinflusst. _____	56
Abbildung 20: 9-Phenanthrol induziert einen transienten Calcium-Efflux aus dem Endoplasmatischen Retikulum. _____	57
Abbildung 21: Der Effekt von 9-Phenanthrol auf die Mastzell-Degranulation ist unabhängig von TRPM4. _____	59

Abbildung 22: Tram-34 reduziert die durch 9-Phenanthrol hervorgerufene Degranulation der BMMC. _____	60
Abbildung 23: Die lokale Anwendung von 9-Phenanthrol verstärkt die Mastzell-Degranulation in der Haut. _____	62
Abbildung 24: Die lokale Anwendung von 9-Phenanthrol verstärkt die Proliferation der epidermalen Zellen. _____	63
Abbildung 25: 9-Phenanthrol begünstigt bei gleichzeitiger Aldara Behandlung die Entstehung SIINFEKL-spezifischer CD8 ⁺ Effektorzellen. _____	64
Abbildung 26: 9-Phenanthrol steigert in Verbindung mit Imiquimod die Entstehung von CD8 ⁺ /IFN- γ ⁺ -Zellen. _____	65
Abbildung 27: 9-Phenanthrol verstärkt die Migration dendritischer Zellen in die drainierenden Lymphknoten. _____	67
Abbildung 28: Erhöhte Überlebensrate nach kombinierter Applikation von 9-Phenanthrol und Aldara. _____	68
Abbildung 29: Aldara-Behandlung induziert die IL-1 α Produktion in der Haut. _____	73
Abbildung 30: 9-Phenanthrol hyperpolarisiert konzentrationsabhängig die mitochondriale Membran. _____	80
Abbildung 31: Die Wirkung von 9-Phenanthrol auf BMMC in vitro. _____	82
Abbildung 32: Aldara und 9-Phenanthrol erhöhen die Cxcl10-Expression in behandelter Haut und den drainierenden Lymphknoten. _____	84
Abbildung 33: Effekte von 9-Phenanthrol auf die TCI. _____	86

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien.....	23
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten murinen Antikörper.....	24
Tabelle 3: Verwendete Mausstämme.....	25
Tabelle 4: Verwendete Stimulanzen.....	29

7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolinone
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazole
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenz-Farbstoff für die FACS-Analyse)
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin-7
-ase	Endung steht für ein Enzym
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
B16-OVA	Ovalbumin (OVA) positive B16 Melanomzellen
BATF3	<i>basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3</i>
BK _{Ca}	<i>big conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel</i>
BMMC	<i>bone marrow-derived mast cells</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bspw.	Beispielsweise
BV	<i>brilliant violet</i>
bzw.	beziehungsweise
CaM	Calmodulin
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCCP	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone</i>
CCR7	CC-Chemokin Rezeptor 7
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRAC	<i>calcium release-activated Ca²⁺ channel</i>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DAG	Deutscher Arzneimittel Codex
DC	Dendritische Zellen
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)

Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

DNP-HSA	Dinitrophenol-humanes Serum Albumin
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
DTP3	Diphtherie-Tetanus und Keuchhusten
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et. al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetale calf serum</i>
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor (<i>Fc epsilon receptor</i>)
fl/fl	<i>flox/flox</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FimH	fimbriae Protein H
Fluo-3AM	Fluo 3 pentaacetoxymethyl ester
FSC	forward scatter
g	Gramm
Gr-1	<i>granulocyte-differentiation antigen-1</i>
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IFN-γ	Interferon-gamma
IgE	Immunglobulin E
IK _{Ca}	<i>intermediate conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel</i>
IL	Interleukin
ILC	innate lymphoide cells
IM	intramuskulär
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
<i>i. p.</i>	intraperitoneal
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRF-8	<i>interferon regulatory factor-8</i>
<i>i. v.</i>	intravenös
K ⁺	Kalium-Ionen
K _{Ca}	Calcium aktivierte Kalium- Kanäle
KL-MZF	Kit-Ligand-Mastzellfutter
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
loxP	<i>locus of X(cross)-over in P1</i>
Ly6C/G	lymphocyte antigen 6C/G
M	Molar
m	murin
MCP	<i>mast cell-committed progenitors</i>
<i>Mcpt5</i>	<i>mast cell protease 5</i>
MCT	Mittelkettige Triglyceride

Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

MDSC	<i>myeloide suppressor cells</i>
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	<i>major histokompatibilität complex</i>
min	Minuten
mIL-3	murines IL-3
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mr	murin rekombinant
mrIL-4	murines rekombinantes IL-4
mrKit-Ligand	muriner rekombinanter Kit-Ligand
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ionen
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
o.ä.	oder ähnliche(s)
o.g.	oben genannte(n/s)
OVA	Ovalbumin
<i>p. a.</i>	<i>per analysis</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PB	Pazifik Blau
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Ketten (<i>chain</i>) Reaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>real time PCR</i>)
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SALT	<i>skin associated lymphoid tissue</i>
SC	subkutan
SCF	<i>stem cell factor</i>
SFU	<i>spot forming units</i>
SIINFEKL	Ovalbumin-Epitop (Ovalbumin ₂₅₇₋₂₆₄)
SKA-31	Naphthol[1,2-d]thiazol-2-ylamine
SK _{Ca}	<i>small conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel</i>
sog.	sogennante(s)

Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TCI	Transkutane Immunisierung
Th2	T-Helferzelle Typ 2
TLR	<i>Toll-like-Rezeptoren</i>
TM	Testmedium
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TRAM-34	<i>1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole</i>
Treg	regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPA	<i>transient receptor potential ankyrin</i>
TRPC	<i>transient receptor potential canonical</i>
TRPM (4)	<i>transient receptor potential melastatin (4)</i>
TRPML	<i>transient receptor potential mucolipin</i>
TRPP	<i>transient receptor potential polycytin</i>
TRPV	<i>transient receptor potential vanilloid</i>
U	<i>Units</i> (Einheiten)
u. a.	unter anderem
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
W	<i>white spotting</i>
WHO	world health organisation
x g	Vielfaches der Fallbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.3 Literaturverzeichnis

- Akira, S., K. Takeda, und T. Kaisho. 2001. "Toll-Like Receptors: Critical Proteins Linking Innate and Acquired Immunity." *Nature Immunology* 2(8):675–80.
- Aksoy, M. O. *et al.* 2006. "CXCR3 Surface Expression in Human Airway Epithelial Cells: Cell Cycle Dependence and Effect on Cell Proliferation." *American Journal of Physiology. Lung cellular and molecular Physiology* 290(5):L909–18.
- Albert, M. L., B. Sauter & N. Bhardwaj. 1998. "Dendritic Cells Acquire Antigen From Apoptotic Cells and Induce Class I-Restricted CTLs." *Nature* 392(6671):86–89.
- Alberts, B. D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2015. "Essential Cell Biology. Fourth Edition. by New York: Garland Science (Taylor & Francis Group). Xxiii + 726 P. + a:1 - a:58; G:1 - G:26; I:1 - I:28 (Index). ISBN: 978-0-8153-4454-4. 2014.." *The Quarterly Review of Biology* 90(3):343–43.
2018. "2658.Full.Pdf." 1–10.
- Alrefai, H. *et al.* 2016. "NFATc1 Supports Imiquimod-Induced Skin Inflammation by Suppressing IL-10 Synthesis in B Cells." *Nature Communications* 7:11724.
- Alving, C. R. & M. Rao. 2008. "Lipid a and Liposomes Containing Lipid a as Antigens and Adjuvants." *Vaccine* 26(24):3036–45.
- Andrews, D. M., A. A. Scalzo, W. M. Yokoyama, M. J. Smyth & M. A. Degli-Esposti. 2002. "Functional Interactions Between Dendritic Cells and NK Cells During Viral Infection." *Nature Immunology* 4(2):175–81.
- Aranda Lopez, P. *et al.* 2017. "Transcutaneous Immunization with a Novel Imiquimod Nanoemulsion Induces Superior T Cell Responses and Virus Protection." *Journal of Dermatological Science* 87(3):252-259.
- Asselin-Paturel, C. *et al.* 2001. "Mouse Type I IFN-Producing Cells Are Immature APCs with Plasmacytoid Morphology." *Nature Immunology* 2(12):1144–50.
- Bajana, S., K. Roach, S. Turner, J. Paul & S. Kovats. 2012. "IRF4 Promotes Cutaneous Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes During Homeostasis and Inflammation." *The Journal of Immunology* 189(7):3368–77.
- Banchereau, J. & R. M. Steinman. 1998. "Dendritic Cells and the Control of Immunity." *Nature* 392(6673):245–52.
- Barbet, G. *et al.* 2008. "The Calcium-Activated Nonselective Cation Channel TRPM4 Is Essential for the Migration but Not the Maturation of Dendritic Cells." *Nature Immunology* 9(10):1148–56.
- Becker, M. *et al.* 2009. "Impaired Mast Cell-Driven Immune Responses in Mice Lacking the Transcription Factor NFATc2." *The Journal of Immunology* 182(10):6136–42.
- Bedoui, S. *et al.* 2009. "Cross-Presentation of Viral and Self Antigens by Skin-Derived CD103+ Dendritic Cells." *Nature Immunology* 10(5):488–95.

- Belperio, J. A. *et al.* 2000. "CXC Chemokines in Angiogenesis.." *Journal of Leukocyte Biology* 68(1):1–8.
- Belyakov, I. M. *et al.* 2004. "Transcutaneous Immunization Induces Mucosal CTLs and Protective Immunity by Migration of Primed Skin Dendritic Cells." *Journal of Clinical Investigation* 113(7):998–1007.
- Belz, G. T. *et al.* 2004. "Cutting Edge: Conventional CD8 Alpha+ Dendritic Cells Are Generally Involved in Priming CTL Immunity to Viruses." *The Journal of Immunology* 172(4):1996–2000.
- Beutner, K. R. *et al.* 1999. "Therapeutic Response of Basal Cell Carcinoma to the Immune Response Modifier Imiquimod 5% Cream." *Journal of the American Academy of Dermatology* 41(6):1002–7.
- Beutner, K. R., S. L. Spruance, *et al.* 1998a. "Treatment of Genital Warts with an Immune-Response Modifier (Imiquimod)." *Journal of the American Academy of Dermatology* 38(2 Pt 1):230–39.
- Beutner, K., L. Edwards, M. Owens & T. Fox. 1998b. "Comparison of Two Vehicle-Controlled Trials of Imiquimod 5% Cream for the Treatment of External Genital Warts." *Journal of Dermatological Science* 16:S210.
- Bianchi, M. E. 2007. "DAMPs, PAMPs and Alarmins: All We Need to Know About Danger." *Journal of Leukocyte Biology* 81(1):1–5.
- Blumenkrantz, N. & G. Asboe-Hansen. 1975. "A Selective Stain for Mast Cells." *The Histochemical Journal* 7(3):277–82.
- Bomford, R. 1989. "Aluminium Salts: Perspectives in Their Use as Adjuvants." Pp. 35–41 in *Immunological Adjuvants and Vaccines*. Boston, MA: Springer, Boston, MA.
- Bos, J. D. & M. M. Meinardi. 2000. "The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs." *Experimental Dermatology* 9(3):165–69.
- Bouabe, H. 2012. "Cytokine Reporter Mice: the Special Case of IL-10." *Scandinavian Journal of Immunology* 75(6):553–67.
- Bradding, P. & H. Wulff. 2009. "The K⁺ Channels K_{Ca}3.1 and K_v1.3 as Novel Targets for Asthma Therapy." *British Journal of Pharmacology* 157(8):1330–39.
- Brewer, G., S. Sacconi, S. Sarkar, A. Lewis & S. Pestka. 2003. "Increased Interleukin-10 mRNA Stability in Melanoma Cells Is Associated with Decreased Levels of a + U-Rich Element Binding Factor AUF1." *Journal of interferon & cytokine research : the official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 23(10):553–64.
- Buentke, E. *et al.* 2002. "Natural Killer and Dendritic Cell Contact in Lesional Atopic Dermatitis Skin –Malassezia-Influenced Cell Interaction." *Journal of Investigative Dermatology* 119(4):850–57.

- Burt, R. *et al.* 2013. "9-Phenanthrol and Flufenamic Acid Inhibit Calcium Oscillations in HL-1 Mouse Cardiomyocytes." *Cell Calcium* 54(3):193–201.
- Chabot, B., D. A. Stephenson, V. M. Chapman, P. Besmer & A. Bernstein. 1988. "The Proto-Oncogene C-Kit Encoding a Transmembrane Tyrosine Kinase Receptor Maps to the Mouse W Locus." *Nature* 335(6185):88–89.
- Cheng, H. *et al.* 2007. "TRPM4 Controls Insulin Secretion in Pancreatic B-Cells." *Cell Calcium* 41(1):51–61.
- Clapham, D. E., D. Julius, C. Montell & G. Schultz. 2005. "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels." *Pharmacological Reviews* 57(4):427–50.
- Clausen, B. E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz & I. Förster. 1999. "Conditional Gene Targeting in Macrophages and Granulocytes Using LysMcre Mice." *Transgenic Research* 8(4):265–77.
- Colonna, M., G. Trinchieri & Y.-J. Liu. 2004. "Plasmacytoid Dendritic Cells in Immunity." *Nature Immunology* 5(12):1219–26.
- Combadiere, B. & C. Liard. 2014. "Transcutaneous and Intradermal Vaccination." *Human Vaccines* 7(8):811–27.
- Couper, K. N., D. G. Blount & E. M. Riley. 2008. "IL-10: the Master Regulator of Immunity to Infection." *The Journal of Immunology* 180(9):5771–77.
- Cox, J. C. & A. R. Coulter. 1997. "Adjuvants—a Classification and Review of Their Modes of Action." *Vaccine* 15(3):248–56.
- Cruse, G., S. M. Duffy, C. E. Brightling & P. Bradding. 2006. "Functional KCa3.1 K⁺ Channels Are Required for Human Lung Mast Cell Migration." *Thorax* 61(10):880–85.
- Cumberbatch, M., R. J. Dearman, C. E. M. Griffiths & I. Kimber. 2000. "Langerhans Cell Migration. Experimental Dermatology . Review Article." *Clinical and Experimental Dermatology* 25(5):413–18.
- Dang, Y. *et al.* 2012. "Dendritic Cell-Activating Vaccine Adjuvants Differ in the Ability to Elicit Antitumor Immunity Due to an Adjuvant-Specific Induction of Immunosuppressive Cells." *Clinical cancer research : an official Journal of the American Association for Cancer Research* 18(11):3122–31.
- Davalos-Miszlitz, A. C. M. *et al.* 2007. "Generalized Multi-Organ Autoimmunity in CCR7-Deficient Mice." *European Journal of Immunology* 37(3):613–22.
- Demangel, C., P. Bertolino & W. J. Britton. 2002. "Autocrine IL-10 Impairs Dendritic Cell (DC)-Derived Immune Responses to Mycobacterial Infection by Suppressing DC Trafficking to Draining Lymph Nodes and Local IL-12 Production." *European Journal of Immunology* 32(4):994–1002.

- Dinarello, C. A. 2009. "Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family." *Annual Review of Immunology* 27(1):519–50.
- Duffy, S. M., W. J. Lawley, E. C. Conley & P. Bradding. 2001. "Resting and Activation-Dependent Ion Channels in Human Mast Cells." *The Journal of Immunology* 167(8):4261–70.
- Duffy, S. M. *et al.* 2004. "The K⁺ Channel iKCA1 Potentiates Ca²⁺ Influx and Degranulation in Human Lung Mast Cells." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114(1):66–72.
- Dyer, K. D., C. M. Percopo, E. R. Fischer, S. J. Gabryszewski & H. F. Rosenberg. 2009. "Pneumoviruses Infect Eosinophils and Elicit MyD88-Dependent Release of Chemoattractant Cytokines and Interleukin-6." *Blood* 114(13):2649–56.
- Echtenacher, B., D. N. Männel & L. Hultner. 1996. "Critical Protective Role of Mast Cells in a Model of Acute Septic Peritonitis." *Nature* 381(6577):75–77.
- Edelson, B. T. *et al.* 2011. "Batf3-Dependent CD11b^{low}/– Peripheral Dendritic Cells Are GM-CSF-Independent and Are Not Required for Th Cell Priming After Subcutaneous Immunization" edited by C. B. Spilianakis. *PLoS One* 6(10):e25660.
- Edwards, J. P., X. Zhang, K. A. Frauwirth & D. M. Mosser. 2006. "Biochemical and Functional Characterization of Three Activated Macrophage Populations." *Journal of Leukocyte Biology* 80(6):1298–1307.
- Ehrlich, P. 1877. "Beiträge Zur Kenntnis Der Anilinfärbungen Und Ihrer Verwendung in Der Mikroskopischen Technik." *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 13(1):263–77.
- Escartín, E. & C. Porte. 1999. "Assessment of PAH Pollution in Coastal Areas From the NW Mediterranean Through the Analysis of Fish Bile." *Marine Pollution Bulletin* 38(12):1200–1206.
- Fanger, C. M. *et al.* 1999. "Calmodulin Mediates Calcium-Dependent Activation of the Intermediate Conductance K⁺ CaChannel, IKCa1." *The Journal of Biological Chemistry* 274(9):5746–54.
- Fehniger, T. A. *et al.* 2003. "CD56^{bright} Natural Killer Cells Are Present in Human Lymph Nodes and Are Activated by T Cell-Derived IL-2: a Potential New Link Between Adaptive and Innate Immunity." *Blood* 101(8):3052–57.
- Ferlazzo, G. *et al.* 2004. "The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic." *The Journal of Immunology* 172(3):1455–62.
- Fernandez, N. C. *et al.* 1999. "Dendritic Cells Directly Trigger NK Cell Functions: Cross-Talk Relevant in Innate Anti-Tumor Immune Responses in Vivo." *Nature Medicine* 5(4):405–11.
- Förster, R. *et al.* 1999. "CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs." *Cell* 99(1):23–33.

- Freichel, M., J. Almering & V. Tsvilovsky. 2012. "The Role of TRP Proteins in Mast Cells." *Frontiers in Immunology* 3.
- Garland, C. J. *et al.* 2015. "TRPM4 Inhibitor 9-Phenanthrol Activates Endothelial Cell Intermediate Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Rat Isolated Mesenteric Artery." *British Journal of Pharmacology* 172(4):1114–23.
- Gaudet, R. 2009. "Structural Insights Into the Function of TRP Channels." Pp. 349–60 in *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, vol. 20065282, *Frontiers in Neuroscience*, edited by S. Heller and W. Liedtke. CRC Press.
- Gayed, P. M. 2011. "Toward a Modern Synthesis of Immunity: Charles a. Janeway Jr. and the Immunologist's Dirty Little Secret." *Yale Journal of Biology and Medicine*.
- Gárdos, G. 1958. "The Function of Calcium in the Potassium Permeability of Human Erythrocytes." *Biochimica et Biophysica Acta* 30(3):653–54.
- Gees, M., B. Colsoul & B. Nilius. 2010. "The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(10):a003962–62.
- Ghanshani, S. *et al.* 2000. "Up-Regulation of the IKCa1Potassium Channel During T-Cell Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 275(47):37137–49.
- Ginhoux, F. & A. Schlitzer. 2014. "CD11b +DCs Rediscovered: Implications for Vaccination." *Expert Review of Vaccines* 13(4):445–47.
- Ginhoux, F. *et al.* 2009. "The Origin and Development of Nonlymphoid Tissue CD103 +DCs." *The Journal of Experimental Medicine* 206(13):3115–30.
- Glaccum, M. B. *et al.* 1997. "Phenotypic and Functional Characterization of Mice That Lack the Type I Receptor for IL-1." *The Journal of Immunology* 159(7):3364–71.
- Glenn, G. M. *et al.* 2000. "Transcutaneous Immunization: a Human Vaccine Delivery Strategy Using a Patch." *Nature Medicine* 6(12):1403–6.
- Goodchild, L. 2015. "Could Dissolvable Microneedles Replace Injected Vaccines?" *Materials Today* 18(8):419–20.
- Grand, T. *et al.* 2008. "9-Phenanthrol Inhibits Human TRPM4 but Not TRPM5 Cationic Channels." *British Journal of Pharmacology* 153(8):1697–1705.
- Grimbaldeston, M. A., S. Nakae, J. Kalesnikoff, M. Tsai & S. J. Galli. 2007. "Mast Cell-Derived Interleukin 10 Limits Skin Pathology in Contact Dermatitis and Chronic Irradiation with Ultraviolet B." *Nature Immunology* 8(10):1095–1104.
- Guinamard, R., T. Hof & C. A. Del Negro. 2014. "The TRPM4 Channel Inhibitor 9-Phenanthrol." *British Journal of Pharmacology* 171(7):1600–1613.

- Hartmann, A.-K. *et al.* 2017. "9-Phenanthrol Enhances the Generation of an CD8+ T Cell Response Following Transcutaneous Immunization with Imiquimod in Mice." *Journal of Dermatological Science* 87(3):260–67.
- Heib, V. *et al.* 2007. "Mast Cells Are Crucial for Early Inflammation, Migration of Langerhans Cells, and CTL Responses Following Topical Application of TLR7 Ligand in Mice." *Blood* 110(3):946–53.
- Heib, V., M. Becker, C. Taube & M. Stassen. 2008. "Advances in the Understanding of Mast Cell Function." *British Journal of Haematology* 142(5):683–94.
- Heil, F. *et al.* 2003. "The Toll-Like Receptor 7 (TLR7)-Specific Stimulus Loxoribine Uncovers a Strong Relationship Within the TLR7, 8 and 9 Subfamily." *European Journal of Immunology* 33(11):2987–97.
- Heller, S. & W. Liedtke. 2006. "TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades". CRC Press.
- Hemmi, H. *et al.* 2002. "Small Anti-Viral Compounds Activate Immune Cells via the TLR7 MyD88-Dependent Signaling Pathway." *Nature Immunology* 3(2):196–200.
- Henz, B. M., M. Maurer, U. Lippert, M. Worm & M. Babina. 2001. "Mast Cells as Initiators of Immunity and Host Defense." *Experimental Dermatology* 10(1):1–10.
- Hildner, K. *et al.* 2008. "Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity." *Science (New York, N.Y.)* 322(5904):1097–1100.
- Hogquist, K. A. *et al.* 1994. "T Cell Receptor Antagonist Peptides Induce Positive Selection." *Cell* 76(1):17–27.
- Hoth, M. & R. Penner. 1992. "Depletion of Intracellular Calcium Stores Activates a Calcium Current in Mast Cells." *Nature* 355(6358):353–56.
- Ihle, J. N. *et al.* 1983. "Biologic Properties of Homogeneous Interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 Growth Factor Activity, Mast Cell Growth Factor Activity, P Cell-Stimulating Factor Activity, Colony-Stimulating Factor Activity, and Histamine-Producing Cell-Stimulating Factor Activity." *The Journal of Immunology* 131(1):282–87.
- Ishii, T. M. *et al.* 1997. "A Human Intermediate Conductance Calcium-Activated Potassium Channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(21):11651–56.
- Janeway, C. A. 1989. "Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54(0):1–13.
- Janeway, C. A., Jr. & R. Medzhitov. 2002. "Innate immune recognition." *Annual Review of Immunology* 20(1):197–216.
- Jawdat, D. M., E. J. Albert, G. Rowden, I. D. Haidl & J. S. Marshall. 2004. "IgE-Mediated Mast Cell Activation Induces Langerhans Cell Migration in Vivo." *The Journal of Immunology* 173(8):5275–82.

- Jawdat, D. M., G. Rowden & J. S. Marshall. 2006. "Mast Cells Have a Pivotal Role in TNF-Independent Lymph Node Hypertrophy and the Mobilization of Langerhans Cells in Response to Bacterial Peptidoglycan." *The Journal of Immunology* 177(3):1755–62.
- Jenner, E. 1809. "Two Cases of Small-Pox Infection Communicated to the Fœtus in Utero Under Peculiar Circumstances, with Additional Remarks." *Medico-Chirurgical Transactions* 1:271–77.
- Kandel, R. S. 1980. "Life and the Earth." Pp. 168–77 in *Earth and Cosmos*. Elsevier.
- Kedei, N. et al. 2001. "Analysis of the Native Quaternary Structure of Vanilloid Receptor 1." *The Journal of Biological Chemistry* 276(30):28613–19.
- Kedei, N. et al. 2001. "Analysis of the Native Quaternary Structure of Vanilloid Receptor 1." *The Journal of Biological Chemistry* 276(30):28613–19.
- Kedl, R. M. et al. 2017. "Migratory Dendritic Cells Acquire and Present Lymphatic Endothelial Cell-Archived Antigens During Lymph Node Contraction." *Nature Communications* 8(1):2034.
- Kermode, M. 2004. "Healthcare Worker Safety Is a Pre-Requisite for Injection Safety in Developing Countries." *International Journal of Infectious Diseases* 8(6):325–27.
- Kitamura, Y. 1989. "Heterogeneity of Mast Cells and Phenotypic Change Between Subpopulations." *Annual Review of Immunology* 7(1):59–76.
- Kitamura, Y. & J. Fujita. 1989. "Regulation of Mast Cell Differentiation." *BioEssays* 10(6):193–96.
- Kitamura, Y., J. Nagoshi, H. Onoue & A. Kuriu. 1989. "Regulatory Mechanisms of Mast Cell Differentiation." *Human Cell* 2(4):363–68.
- Koenig, S., C. Porte, M. Solé & J. Sturve. 2013. "Biliary PAH and Alkylphenol Metabolites, Biomarker Enzyme Activities, and Gene Expression Levels in the Deep-Sea Fish *Alepocephalus Rostratus*." *Environmental Science & Technology* 47(6):2854–61.
- Kühn, R., J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky & W. Müller. 1993. "Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis." *Cell* 75(2):263–74.
- Launay, P. et al. 2002. "TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization." *Cell* 109(3):397–407.
- Levine, M. M. 2003. "Can Needle-Free Administration of Vaccines Become the Norm in Global Immunization?" *Nature Medicine* 9(1):99–103.
- Li, L. & S. A. Krilis. 1999. "Mast-Cell Growth and Differentiation." *Allergy* 54(4):306–12.
- Li, W. et al. 1999. "Differential Effects of Exogenous Interleukin-10 on Cardiac Allograft Survival: Inhibition of Rejection by Recipient Pretreatment Reflects Impaired Host Accessory Cell Function." *Transplantation* 68(9):1402–9.

- Lipscomb, M. F. & B. J. Masten. 2002. "Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease." *Physiological Reviews* 82(1):97–130.
- Liu, M., S. Guo & J. K. Stiles. 2011. "The Emerging Role of CXCL10 in Cancer (Review)." *Oncology Letters* 2(4):583–89.
- Liu, Y.-J. 2005. "IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors." *Annual Review of Immunology* 23(1):275–306.
- Logsdon, N. J., J. Kang, J. A. Togo, E. P. Christian & J. Aiyar. 1997. "A Novel Gene, hKCa4, Encodes the Calcium-Activated Potassium Channel in Human T Lymphocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 272(52):32723–26.
- Lund, J. M. *et al.* 2004. "Recognition of Single-Stranded RNA Viruses by Toll-Like Receptor 7." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(15):5598–5603.
- Luster, A. D. & J. V. Ravetch. 1987. "Biochemical Characterization of a Gamma Interferon-Inducible Cytokine (IP-10)." *The Journal of Experimental Medicine* 166(4):1084–97.
- Lytton, J., M. Westlin & M. R. Hanley. 1991. "Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps." *The Journal of Biological Chemistry* 266(26):17067–71.
- Malaviya, R., E. Ross, B. A. Jakschik & S. N. Abraham. 1994. "Mast Cell Degranulation Induced by Type 1 Fimbriated Escherichia Coli in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 93(4):1645–53.
- Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross & S. N. Abraham. 1996. "Mast Cell Modulation of Neutrophil Influx and Bacterial Clearance at Sites of Infection Through TNF-A." *Nature* 381(6577):77–80.
- Martín-Fontecha, A. *et al.* 2003. "Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node." *The Journal of Experimental Medicine* 198(4):615–21.
- Matsuo, K., S. Hirobe, N. Okada & S. Nakagawa. 2013. "Frontiers of Transcutaneous Vaccination Systems: Novel Technologies and Devices for Vaccine Delivery." *Vaccine* 31(19):2403–15.
- Maurer, M. *et al.* 2003. "What Is the Physiological Function of Mast Cells?" *Experimental Dermatology* 12(6):886–86.
- Maurer, M. *et al.* 2004. "Mast Cells Promote Homeostasis by Limiting Endothelin-1-Induced Toxicity." *Nature* 432(7016):512–16.
- McLachlan, J. B. *et al.* 2003. "Mast Cell-Derived Tumor Necrosis Factor Induces Hypertrophy of Draining Lymph Nodes During Infection." *Nature Immunology* 4(12):1199–1205.
- McLachlan, J. B. *et al.* 2008. "Mast Cell Activators: a New Class of Highly Effective Vaccine Adjuvants." *Nature Medicine* 14(5):536–41.

- Mekori, Y. A. & D. D. Metcalfe. 1999. "Mast Cell–T Cell Interactions." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104(3):517–23.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller & A. Mortha. 2013. "The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting." *Annual Review of Immunology* 31(1):563–604.
- Metcalfe, D. D., D. Baram & Y. A. Mekori. 1997. "Mast Cells." *Physiological Reviews* 77(4):1033–79.
- Metz, M. *et al.* 2006. "Mast Cells Can Enhance Resistance to Snake and Honeybee Venoms." *Science (New York, N.Y.)* 313(5786):526–30.
- Mitragotri, S. 2005. "Immunization Without Needles." *Nature Reviews. Immunology* 5(12):905–16.
- Mitsui, H. *et al.* 2004. "Differential Expression and Function of Toll-Like Receptors in Langerhans Cells: Comparison with Splenic Dendritic Cells." *Journal of Investigative Dermatology* 122(1):95–102.
- Montell, C. & G. M. Rubin. 1989. "Molecular Characterization of the *Drosophila* Trp Locus: a Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction." *Neuron* 2(4):1313–23.
- Montell, C., L. Birnbaumer & V. Flockerzi. 2002. "The TRP Channels, a Remarkably Functional Family." *Cell* 108(5):595–98.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman & A. O'Garra. 2001. "Interleukin-10 and The interleukin-10 Receptor." *Annual Review of Immunology* 19(1):683–765.
- Murphy, K., P. Travers & M. Walport. 2009. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nagle, D. L., C. A. Kozak, H. Mano, V. M. Chapman & M. Bucan. 1995. "Physical Mapping of the Tec and Gabrb1 Loci Reveals That the Wsh Mutation on Mouse Chromosome 5 Is Associated with an Inversion." *Human Molecular Genetics* 4(11):2073–79.
- Neves, P. *et al.* 2010. "Signaling via the MyD88 Adaptor Protein in B Cells Suppresses Protective Immunity During Salmonella Typhimurium Infection." *Immunity* 33(5):777–90.
- Neville, L. F., G. Mathiak & O. Bagasra. 1997. "The Immunobiology of Interferon-Gamma Inducible Protein 10 kD (IP-10): a Novel, Pleiotropic Member of the C-X-C Chemokine Superfamily." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8(3):207–19.
- Nicolas, J.-F. & B. Guy. 2014. "Intradermal, Epidermal and Transcutaneous Vaccination: From Immunology to Clinical Practice." *Expert Review of Vaccines* 7(8):1201–14.
- Nilius, B. 2007. "TRP Channels in Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772(8):805–12.

- Nilius, B. *et al.* 2005. "The Selectivity Filter of the Cation Channel TRPM4." *The Journal of Biological Chemistry* 280(24):22899–906.
- Oppenheim, J. J. & D. Yang. 2005. "Alarmins: Chemotactic Activators of Immune Responses." *Current Opinion in Immunology* 17(4):359–65.
- Owsianik, G., D. D'hoedt, T. Voets & B. Nilius. 2006. "Structure-Function Relationship of the TRP Channel Superfamily." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 156:61–90.
- Ozawa, K. *et al.* 1993. "Ca(2+)-Dependent and Ca(2+)-Independent Isozymes of Protein Kinase C Mediate Exocytosis in Antigen-Stimulated Rat Basophilic RBL-2H3 Cells. Reconstitution of Secretory Responses with Ca²⁺ and Purified Isozymes in Washed Permeabilized Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 268(3):1749–56.
- Palamara, F. *et al.* 2004. "Identification and Characterization of pDC-Like Cells in Normal Mouse Skin and Melanomas Treated with Imiquimod." *The Journal of Immunology* 173(5):3051–61.
- Pang, I. K., T. Ichinohe & A. Iwasaki. 2013. "IL-1R Signaling in Dendritic Cells Replaces Pattern-Recognition Receptors in Promoting CD8⁺ T Cell Responses to Influenza a Virus." *Nature Immunology* 14(3):246–53.
- Pasparakis, M., I. Haase & F. O. Nestle. 2014. "Mechanisms Regulating Skin Immunity and Inflammation." *Nature Reviews. Immunology* 14(5):289–301.
- Perry, S., J. Norman, J. Barbieri, E. Brown & H. Gelbard. 2011. "Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: a Practical Usage Guide." *BioTechniques* 50(2):98–115.
- Persano, L., M. Crescenzi & S. Indraccolo. 2007. "Anti-Angiogenic Gene Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects." *Molecular Aspects of Medicine* 28(1):87–114.
- Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri & N. M. Valiante. 2002. "Contact-Dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 195(3):335–41.
- Pior, J., T. Vogl, C. Sorg & E. Macher. 1999. "Free Hapten Molecules Are Dispersed by Way of the Bloodstream During Contact Sensitization to Fluorescein Isothiocyanate." *Journal of Investigative Dermatology* 113(6):888–93.
- Ponvert, C. & P. Scheinmann. 2003. "Vaccine Allergy and Pseudo-Allergy." *European Journal of Dermatology : EJD* 13(1):10–15.
- Pschorr, R. & J. Schröter. 2006. "Über 9-Aminophenanthren." *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 35(3):2726–29.
- Rechtsteiner, G., T. Warger, P. Osterloh, H. Schild & M. P. Radsak. 2005. "Cutting Edge: Priming of CTL by Transcutaneous Peptide Immunization with Imiquimod." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174(5):2476–80.

- Rixecker, T. *et al.* 2016. "TRPM4-Mediated Control of FcεRI-Evoked Ca²⁺ Elevation Comprises Enhanced Plasmalemmal Trafficking of TRPM4 Channels in Connective Tissue Type Mast Cells." *Scientific Reports* 6(1):155.
- Rizzuto, R., P. Bernardi & T. Pozzan. 2000. "Mitochondria as All-Round Players of the Calcium Game." *The Journal of Physiology* 529 Pt 1(Pt 1):37–47.
- Rodewald, H. R., M. Dessing, A. M. Dvorak & S. J. Galli. 1996. "Identification of a Committed Precursor for the Mast Cell Lineage." *Science (New York, N.Y.)* 271(5250):818–22.
- Rogers, T. B., G. Inesi, R. Wade & W. J. Lederer. 1995. "Use of Thapsigargin to Study Ca²⁺ Homeostasis in Cardiac Cells." *Bioscience Reports* 15(5):341–49.
- Rot, A. & U. H. von Andrian. 2004. "Chemokines in Neutrophil and Eosinophil Trafficking: Basic Chemokine Grammar for Immune Cells." *Annual Review of Immunology* 22(1):891–928.
- Rufo, P. A. *et al.* 1996. "The Antifungal Antibiotic, Clotrimazole, Inhibits Cl⁻ Secretion by Polarized Monolayers of Human Colonic Epithelial Cells." *Journal of Clinical Investigation* 98(9):2066–75.
- Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay & A. Lanzavecchia. 1998. "Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 187(6):875–83.
- Sandig, H. & S. Bulfone-Paus. 2012. "TLR Signaling in Mast Cells: Common and Unique Features." *Frontiers in Immunology* 3:185.
- Sauder, D. N. 2000. "Immunomodulatory and Pharmacologic Properties of Imiquimod." *Journal of the American Academy of Dermatology* 43(1):S6–S11.
- Scheibenbogen, C. *et al.* 1997. "A Sensitive ELISPOT Assay for Detection of CD8⁺ T Lymphocytes Specific for HLA Class I-Binding Peptide Epitopes Derived From Influenza Proteins in the Blood of Healthy Donors and Melanoma Patients." *Clinical cancer research : an official Journal of the American Association for Cancer Research* 3(2):221–26.
- Schmid-Antomarchi, H. *et al.* 1997. "Extracellular ATP and UTP Control the Generation of Reactive Oxygen Intermediates in Human Macrophages Through the Opening of a Charybdotoxin-Sensitive Ca²⁺-Dependent K⁺ Channel." *The Journal of Immunology* 159(12):6209–15.
- Scholten, J. *et al.* 2008. "Mast Cell-Specific Cre/loxP-Mediated Recombination in Vivo." *Transgenic Research* 17(2):307–15.
- Schütt, C. & B. Bröker. 2011. *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Seillet, C. & G. T. Belz. 2013. "Terminal Differentiation of Dendritic Cells." Pp. 185–210 in *Development and Function of Myeloid Subsets*, vol. 120, *Advances in Immunology*. Elsevier.

- Serbina, N. V. & E. G. Pamer. 2006. "Monocyte Emigration From Bone Marrow During Bacterial Infection Requires Signals Mediated by Chemokine Receptor CCR2." *Nature Immunology* 7(3):311–17.
- Shumilina, E. *et al.* 2008. "Blunted IgE-Mediated Activation of Mast Cells in Mice Lacking the Ca²⁺-Activated K⁺ Channel KCa3.1." *The Journal of Immunology* 180(12):8040–47.
- Stassen, M., L. Hultner & E. Schmitt. 2002. "Classical and Alternative Pathways of Mast Cell Activation." *Critical Reviews™ in Immunology* 22(2):26.
- Stein, P. *et al.* 2014. "Efficacy of Imiquimod-Based Transcutaneous Immunization Using a Nano-Dispersed Emulsion Gel Formulation." edited by H. Shiku. *PloS one* 9(7):e102664.
- Stein, P., G. Rechtsteiner, *et al.* 2011a. "UV Exposure Boosts Transcutaneous Immunization and Improves Tumor Immunity: Cytotoxic T-Cell Priming Through the Skin." *The Journal of Investigative Dermatology* 131(1):211–19.
- Stein, P., M. Weber, *et al.* 2011b. "Regulatory T Cells and IL-10 Independently Counterregulate Cytotoxic T Lymphocyte Responses Induced by Transcutaneous Immunization." edited by J. Kanellopoulos. *PloS one* 6(11):e27911.
- Steinman, R. M. 1973. "Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution." *The Journal of Experimental Medicine* 137(5):1142–62.
- Steinman, R. M. 1974a. "Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: II. Functional Properties in Vitro." *The Journal of Experimental Medicine* 139(2):380–97.
- Steinman, R. M. 1974b. "Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: III. Functional Properties in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 139(6):1431–45.
- Steinman, R. M. 2008. "Dendritic Cells in Vivo: a Key Target for a New Vaccine Science." *Immunity* 29(3):319–24.
- Steinman, R. M. & K. Inaba. 1999. "Myeloid Dendritic Cells." *Journal of Leukocyte Biology* 66(2):205–8.
- Studel, F. A. *et al.* 2017. "SK4 Channels Modulate Ca²⁺ Signalling and Cell Cycle Progression in Murine Breast Cancer.." *Molecular Oncology* 11(9):1172–88.
- Stocker, M. 2004. "Ca²⁺-Activated K⁺ Channels: Molecular Determinants and Function of the SK Family." *Nature Reviews Neuroscience* 5(10):758–70.
- Stoitzner, P. *et al.* 2006. "Langerhans Cells Cross-Present Antigen Derived From Skin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(20):7783–88.
- Streilein, J. W. 1983. "Skin-Associated Lymphoid Tissues (SALT): Origins and Functions." *The Journal of Investigative Dermatology* 80 Suppl:12s–16s.

- Sui, Y. *et al.* 2004. "Neuronal Apoptosis Is Mediated by CXCL10 Overexpression in Simian Human Immunodeficiency Virus Encephalitis." *The American Journal of Pathology* 164(5):1557–66.
- Suzuki, H. *et al.* 2000. "Imiquimod, a Topical Immune Response Modifier, Induces Migration of Langerhans Cells." *The Journal of Investigative Dermatology* 114(1):135–41.
- Taylor, A., J. Verhagen, K. Blaser, M. Akdis & C. A. Akdis. 2006. "Mechanisms of Immune Suppression by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-Beta: the Role of T Regulatory Cells." *Immunology* 117(4):433–42.
- Thomas, S. N. *et al.* 2012. "Impaired Humoral Immunity and Tolerance in K14-VEGFR-3-Ig Mice That Lack Dermal Lymphatic Drainage." *The Journal of Immunology* 189(5):2181–90.
- Toes, R. E. M., S. P. Schoenberger, E. I. H. van der Voort, R. Ofringa & C. J. M. Melief. 1998. "CD40–CD40Ligand Interactions and Their Role in Cytotoxic T Lymphocyte Priming and Anti-Tumor Immunity." *Seminars in Immunology* 10(6):443–48.
- Toyama, K. *et al.* 2008. "The Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 Contributes to Atherogenesis in Mice and Humans.." *Journal of Clinical Investigation* 118(9):3025–37.
- Tsou, C.-L. *et al.* 2007. "Critical Roles for CCR2 and MCP-3 in Monocyte Mobilization From Bone Marrow and Recruitment to Inflammatory Sites." *Journal of Clinical Investigation* 117(4):902–9.
- Tsujimura, H., T. Tamura & K. Ozato. 2003. "Cutting Edge: IFN Consensus Sequence Binding Protein/IFN Regulatory Factor 8 Drives the Development of Type I IFN-Producing Plasmacytoid Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 170(3):1131–35.
- Turvey, S. E. & D. H. Broide. 2010. "Innate Immunity." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2):S24–S32.
- Tyring, S. K. *et al.* 1998. "A Randomized, Controlled, Molecular Study of Condylomata Acuminata Clearance During Treatment with Imiquimod." *The Journal of Infectious Diseases* 178(2):551–55.
- Tyring, S., M. Conant, M. Marini, W. Van Der Meijden & K. Washenik. 2002. "Imiquimod; an International Update on Therapeutic Uses in Dermatology." *International Journal of Dermatology* 41(11):810–16.
- Urošević, M. *et al.* 2005. "Disease-Independent Skin Recruitment and Activation of Plasmacytoid Predendritic Cells Following Imiquimod Treatment." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 97(15):1143–53.
- Vannier, B., X. Zhu, D. Brown & L. Birnbaumer. 1998. "The Membrane Topology of Human Transient Receptor Potential 3 as Inferred From Glycosylation-Scanning Mutagenesis and Epitope Immunocytochemistry." *The Journal of Biological Chemistry* 273(15):8675–79.

- Vennekens, R. *et al.* 2007. "Increased IgE-Dependent Mast Cell Activation and Anaphylactic Responses in Mice Lacking the Calcium-Activated Nonselective Cation Channel TRPM4." *Nature Immunology* 8(3):312–20.
- Vermes, I., C. Haanen & C. Reutelingsperger. 2000. "Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death." *Journal of Immunological Methods* 243(1-2):167–90.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken & C. Reutelingsperger. 1995. "A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin v." *Journal of Immunological Methods* 184(1):39–51.
- Villadangos, J. A. & L. Young. 2008. "Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells." *Immunity* 29(3):352–61.
- Walter, A. *et al.* 2013. "Aldara Activates TLR7-Independent Immune Defence.." *Nature Communications* 4:1560.
- Warger, T., H. Schild & G. Rechtsteiner. 2007. "Initiation of Adaptive Immune Responses by Transcutaneous Immunization." *Immunology Letters* 109(1):13–20.
- Weber, M. *et al.* 2014. "Donor and Host B Cell-Derived IL-10 Contributes to Suppression of Graft-Versus-Host Disease." *European Journal of Immunology* 44(6):1857–65.
- Wei, A. D. 2005. "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels." *Pharmacological Reviews* 57(4):463–72.
- Werner, S. & H. Smola. 2001. "Paracrine Regulation of Keratinocyte Proliferation and Differentiation." *Trends in Cell Biology* 11(4):143–46.
- Willis, N. J. 1997. "*Edward Jenner and the Eradication of Smallpox.*" 2nd ed. SAGE Publications Sage UK: London, England.
- Worbs, T., S. I. Hammerschmidt & R. Förster. 2017. "Dendritic Cell Migration in Health and Disease." *Nature reviews. Immunology* 17(1):30–48.
- Worbs, T., T. R. Mempel, J. Bölter, U. H. von Andrian & R. Förster. 2007. "CCR7 Ligands Stimulate the Intranodal Motility of T Lymphocytes in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 204(3):489–95.
- Wulff, H. *et al.* 2000. "Design of a Potent and Selective Inhibitor of the Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel, IKCa1: a Potential Immunosuppressant." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(14):8151–56.
- Wulff, H., H.-G. Knaus, M. Pennington & K. G. Chandy. 2004. "K⁺ Channel Expression During B Cell Differentiation: Implications for Immunomodulation and Autoimmunity." *The Journal of Immunology* 173(2):776–86.

Literaturverzeichnis

Xu, X. Z. S., F. Moebius, D. L. Gill & C. Montell. 2001. "Regulation of Melastatin, a TRP-Related Protein, Through Interaction with a Cytoplasmic Isoform." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(19):10692–97.

Yagi, H. *et al.* 2006. "Induction of Therapeutically Relevant Cytotoxic T Lymphocytes in Humans by Percutaneous Peptide Immunization." *Cancer Research* 66(20):10136–44.

Internetquellen:

World Health Organization, Geneva (2015) WHO calls for worldwide use of "smart" syringes
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/injection-safety/en/> 28.3.2018

Lebenslauf

8. Lebenslauf

Danksagung

9. Danksagung