

**Anthralin als neues Adjuvans  
in der Transkutanen Immunisierung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Julian Sohl**  
**geboren am 14.04.1991**  
**in Alsfeld**

Mainz, Oktober 2020

Aus der III. Medizinischen Klinik der  
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Die Haut als Schutzbarriere und immunologisches Organ .....	1
1.2 Antigenpräsentation .....	5
1.2.1 Subtypen der professionellen APCs .....	7
1.2.2 Aktivierungsmechanismen professioneller APCs .....	10
1.3 T-Zellen .....	15
1.3.1 Entwicklung und Lebenszyklus der T-Zellen .....	16
1.3.2 Aufbau und Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors .....	17
1.3.3 Subtypen der T-Zellen .....	18
1.3.4 Die Interaktion kostimulatorischer Moleküle und das Zytokinmilieu beeinflussen das Priming naiver T-Zellen .....	21
1.4 Impfungen.....	23
1.4.1 Klassische Impfungen .....	23
1.4.2 Transkutane Immunisierungen .....	24
1.5 Das Hydroxyanthron Anthralin .....	28
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	31
2. Material und Methoden.....	32
2.1 Verbrauchsmaterialien .....	32
2.2 Laborgeräte .....	33
2.3 Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen und Reagenzien .....	34
2.3.1 Medien zur Kultivierung von Zellen.....	34
2.3.2 Puffer und Lösungen .....	35
2.3.3 Reagenzien .....	38
2.4 Verwendete Antikörper.....	39

2.5	Verwendete Zelllinien.....	40
2.6	Verwendete Mausstämme .....	40
2.7	Virus .....	41
2.8	Adjuvantien für die transkutane Immunisierung.....	41
2.8.1	Anthralin- und Danthron/Vaseline .....	41
2.8.2	IMI-Sol.....	41
2.8.3	Salbengrundlage (Basiscreme DAC, <i>cremor basalis</i> ) .....	42
2.9	<i>In vivo</i> -Experimente .....	42
2.9.1	Betäubung von Versuchstieren mit Ketamin und Rompun.....	42
2.9.2	Transkutane Immunisierung .....	42
2.9.3	Injektion von monoklonalen Antikörpern und Radikalfängern in der TCI .....	43
2.9.4	Charakterisierung der Entzündungsreaktion nach transkutanen Immunisierungen .....	43
2.9.5	Entnahme von Blutproben und Nachweis von antigenspezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	44
2.9.6	<i>In vivo</i> -Zytotoxizitätstest .....	44
2.9.7	Nachweis der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-17A nach der Restimulation antigenspezifischer T-Zellen mittels ELISpot-Analysen .....	46
2.9.8	Zellaufschluss aus Hautgewebe mittels <i>gentleMACS</i> <sup>TM</sup> <i>Dissociator</i> .....	47
2.9.9	Infektion mit dem Ovalbumin-transfizierten Vaccinia Virus (VV-OVA) und Virustiter-Bestimmung mittels <i>Plaque-Assay</i> .....	47
2.10	<i>In vitro</i> -Experimente .....	48
2.10.1	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer .....	48
2.10.2	Entnahme von Milzen und Herstellung einer Splenozyten-Einzelzellsuspension	49
2.10.3	Isolation von CD11c <sup>+</sup> DCs aus einer Splenozyten-Einzelzellsuspension mittels Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) .....	49

2.10.4 Isolation von Knochenmarkszellen und Differenzierung in <i>bone-marrow derived macrophages</i> (BMMs) .....	50
2.10.5 Stimulation und Analyse von APCs <i>in vitro</i> .....	50
2.10.6 Durchflusszytometrische Analysen .....	51
2.10.7 Metabolismus-Analyse von Makrophagen mittels <i>Seahorse extracellular flux (XF) analyzer</i> .....	52
2.10.8 Histologische Analyse des Ohrgewebes nach transkutane Immunisierung.....	53
2.10.9 Statistische Auswertung .....	54
3. Ergebnisse .....	55
3.1 Die Kombination der Agenzien Anthralin und Imiquimod verstärkt die Induktion antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Primärantwort der TCI .....	55
3.1.1 Die Verwendung von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI erfordert die Anpassung des etablierten Immunisierungsprotokolls .....	55
3.1.2 Die topische Verabreichung von Anthralin fördert die Entstehung einer Entzündungsreaktion in gesunder, muriner Haut.....	56
3.1.3 Anthralin erhöht die Frequenz antigenspezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Effektorzellen und verstärkt deren Effektorfunktionen nach der Imiquimod-basierten TCI.....	58
3.1.4 Anthralin induziert T <sub>H</sub> 1-polarisierte, antigenspezifische CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach der Imiquimod-basierten TCI .....	61
3.2 Anthralin ermöglicht die Entstehung antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der Imiquimod-basierten TCI .....	63
3.2.1 Anthralin ermöglicht die Induktion antigenspezifischer CD8 <sup>+</sup> Gedächtniszellen nach der Imiquimod-basierten TCI .....	63
3.2.2 Anthralin fördert die Entstehung IFN $\gamma$ -produzierender CD4 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der TCI .....	65
3.2.3 Die topische Verabreichung von Anthralin fördert die Entstehung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Haut.....	66
3.2.4 Das Auftreten immunologischer Gedächtnisantworten in der Haut und peripheren lymphatischen Organen wird durch CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen beeinflusst .....	69

3.3	Mechanismen der Induktion antigenspezifischer T-Zellen durch die Kombination von Anthralin und Imiquimod in der TCI.....	72
3.3.1	Die Bedeutung oxidativer Ereignisse und der Bildung von ROS für die Entstehung antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der TCI.....	72
3.3.2	Die Blockade von CD70 führt zu einer verringerten Frequenz antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI.....	78
3.4	Die Bedeutung von APCs für die Induktion adaptiver Immunantworten nach der Kombi-TCI.....	80
3.4.1	Die Bedeutung des TLR7-Signalweges in verschiedenen Subtypen der APCs für die Induktion antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI <i>in vivo</i> .....	80
3.4.2	Untersuchung direkter Adjuvanseffekte von Anthralin und Imiquimod auf professionelle APCs <i>in vitro</i> .....	85
3.5	Die prophylaktische Immunisierung durch die Kombi-TCI schützt vor einer Infektion mit dem Vaccinia Virus .....	91
3.6	Die Verwendung von niedrig-konzentriertem Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI minimiert unerwünschte Nebenwirkungen und amplifiziert die antigenspezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Population.....	93
3.6.1	Geringere Anthralin-Konzentrationen verursachen keine makroskopische Entzündung und erzeugen einen vergleichbaren Adjuvanseffekt in der Primärantwort der Imiquimod-basierten TCI .....	93
3.6.2	Die wiederholte topische Verabreichung geringer Anthralin-Konzentrationen und Imiquimod ermöglicht eine Vervielfachung der Anzahl antigenspezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen.....	96
4.	Diskussion.....	99
4.1)	Die Kombi-TCI fördert die Entstehung hochqualitativer und langlebiger CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	100
4.2)	APCs beeinflussen die Quantität und Qualität von T-Zell-Antworten nach der Kombi-TCI.....	103
4.3)	Anthralin verändert die Struktur und das kutane Zytokinmilieu in muriner Haut durch die Beeinflussung von Keratinozyten und die Rekrutierung von Immunzellen.....	106
4.4)	Reaktive Sauerstoffspezies und das ROS-induzierte NLRP3-Inflammasom nehmen Einfluss auf die Entstehung adaptiver Immunantworten nach der Kombi-TCI .....	109

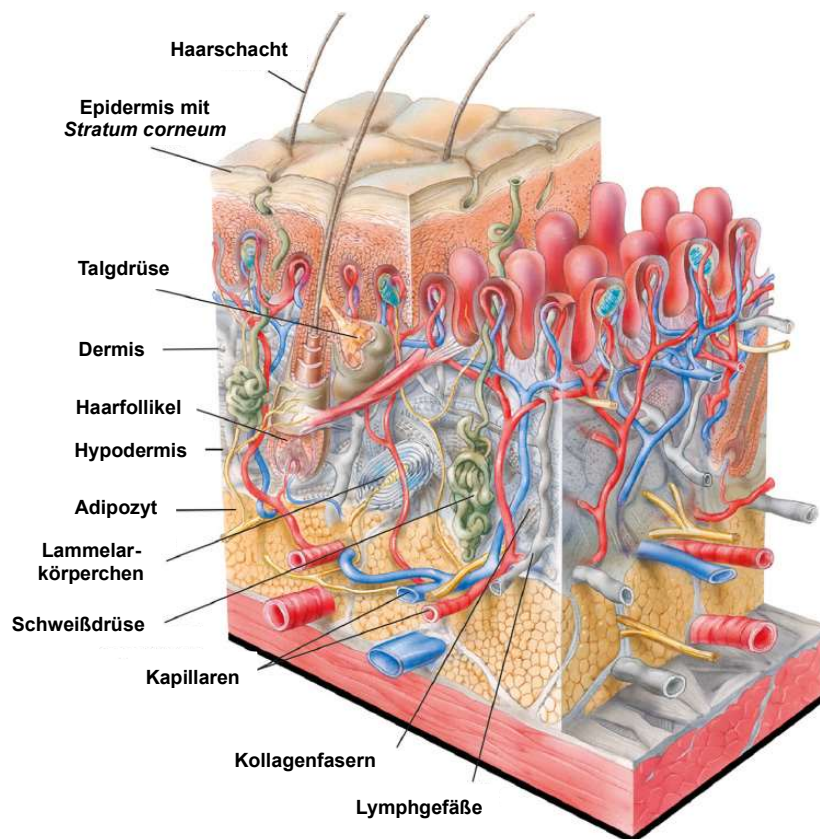
4.5) Bestehende Limitierungen und Möglichkeiten zur Weiterentwicklung für die immuntherapeutische Nutzung der Kombi-TCI im humanen Organismus .....	113
5. Zusammenfassung .....	116
6. Abstract .....	117
7. Anhang .....	118
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	118
7.2 Tabellenverzeichnis .....	120
7.3 Abkürzungsverzeichnis .....	121
7.4 Literaturverzeichnis .....	123
8. Lebenslauf .....	141
9. Danksagung .....	142

# Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Haut als Schutzbarriere und immunologisches Organ

Der Mensch steht als Lebewesen in einem ständigen Austausch mit seiner Umwelt. Um das Eindringen von Pathogenen in den Körper zu verhindern, besitzt der Körper bereits bei der Geburt mechanische und biochemische Abwehrmechanismen. Eine erste mechanische Verteidigungslinie des Körpers gegen körperfremde Substanzen oder Organismen ist die Haut. Mit einer mittleren Größe von eineinhalb bis zwei Quadratmetern und einem Gewicht von drei bis fünf Kilogramm ist die Haut sowohl das größte als auch das schwerste Organ des menschlichen Körpers (Nicholas Dias, Yung Peng, 2017). Als Hüllorgan dient sie vor allem der Abgrenzung des Körperinneren von seiner äußeren Umgebung, dem Schutz vor Umwelteinflüssen und der Wahrung der inneren Homöostase (Gilaberte et al., 2016). Die funktionellen Eigenschaften der Haut resultieren vor allem aus ihrem schichtartigen Aufbau (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Der schematische Aufbau der Haut.**

Die Haut stellt die äußerste Barriere des Körpers dar und setzt sich aus Epidermis, Dermis und Subkutis zusammen. Die äußerste Schicht der Epidermis, das *Stratum corneum*, bietet einen effektiven Schutz vor eindringenden Pathogenen oder schädlichen Umwelteinflüssen. Blutgefäße und verschiedene Drüsen, einschließlich Talg- und Schweißdrüsen, liefern essentielle Substanzen und erhalten die funktionellen Charakteristika der Haut. Lymphgefäße erfüllen durch den Transport von Antigenen und Leukozyten hingegen immunbiologische Aufgaben. Abgewandelt nach (Aldag et al., 2016)

## Einleitung

Von außen nach innen umfassen die einzelnen Hautschichten die Oberhaut (Epidermis), die Lederhaut (Dermis) und das Unterhautfettgewebe (Subkutis, Hypodermis). Die einzelnen Hautschichten sind von Hautanhangsgebilden durchzogen. Bei diesen handelt es sich um spezialisierte Gewebestrukturen, welche sich aus den Epithelzellen der Dermis und Epidermis entwickeln. Zu den Hautanhangsgebilden werden Haare, Hornbildungen und Drüsen gezählt. Saure Sekrete aus Hautdrüsen erzeugen zudem eine lebensfeindliche Umgebung auf der Haut, die das Überleben und die Vermehrung von eindringenden Pathogenen verhindert.

Die äußerste Schicht der Haut, die Epidermis, besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel. Der nach außen gerichtete Bereich der Epidermis wird als *Stratum corneum* (SC) bezeichnet und besteht vor allem aus abgestorbenen, abgeflachten Keratinozyten, welche als Korneozyten bezeichnet werden (Elias, 2012). Die Korneozyten sind in interzellulären Lipiden eingebettet und darüber hinaus durch Transmembranproteine verbunden. Diese Verbindungsstellen zwischen den Korneozyten, die sogenannten Korneodesmosomen, minimieren zusammen mit den interzellulären Lipiden die Durchlässigkeit der Haut und verhindern das Eindringen körperfremder Substanzen oder Organismen (Kitajima, 2015). Im unterhalb des SC gelegenen *Stratum germinativum* (bestehend aus dem *Stratum basale* und dem *Stratum spinosum*) befinden sich Stammzellen, welche sich zu Keratinozyten entwickeln. Die Keratinozyten wandern topikal in das *Stratum spinosum* ein, in dem durch die Bildung von Keratohyalin die Differenzierung in Korneozyten beginnt (Di Meglio & Conrad, 2016). Durch diese Vorgänge erfolgt eine permanente Erneuerung des *Stratum corneum*, welche die Aufrechterhaltung der schützenden Außenbarriere zum Ziel hat.

Während die Epidermis vor allem dem Schutz des Körpers vor äußeren Einflüssen dient, erzeugt die darunter liegende Dermis mit ihrem dichten Bindegewebe die Elastizität der Haut. In der Dermis liegen Nerven- und Muskelfasern, Schweiß- und Talgdrüsen, Blut- und Lymphgefäße, Haarwurzeln, Tastsinneszellen, Wärme- und Kälterezeptoren (Lai-Cheong & McGrath, 2017). Darüber hinaus wird die Dermis von einer Vielzahl verschiedener Immunzellen bevölkert. Zu diesen zählen vor allem Mastzellen, Makrophagen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie verschiedene Subtypen dermalen DCs. Das Netzwerk aller Immunzellen in der Dermis und Epidermis wird als *skin-associated lymphoid tissue* (SALT) bezeichnet (Kabashima et al., 2019). Das SALT dient der unmittelbaren Erkennung und Eliminierung von Pathogenen, welche das SC passieren und in den Körper eindringen. Die Mechanismen des SALT, welche zur Eliminierung eingedrungener Pathogene führen, sind vielfältig. Klassischerweise sind die Mechanismen der Immunabwehr in zwei Untersysteme unterteilt - die angeborene und die adaptive Immunantwort.

## Einleitung

Die angeborene Immunantwort setzt sich aus verschiedenen löslichen und zellulären Bestandteilen zusammen, welche die Verbreitung der Pathogene ohne spezifische Anpassungen an Antigene verhindern. Zu den löslichen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems wird beispielsweise das Komplementsystem gezählt, dessen Komponenten an eingedrungene Pathogene binden und diese dem Immunsystem sichtbar machen. Die Identifikation der Pathogene kann durch gewebsresidente Makrophagen, Mastzellen und sogenannte *innate lymphoid cells* (ILCs) erfolgen. ILCs sind vor allem an den Grenzflächen des Körpers zu seiner Umwelt zu finden und werden von epithelialen, stromalen oder myeloiden Zellen aktiviert. Zu den aktivierenden Signalen der ILCs gehören Alarmine, Zytokine und weitere inflammatorische Mediatoren. Vor allem der Subtyp ILC1 spielt durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenabwehr in der Haut (Kobayashi et al., 2020).

Durch die Freisetzung chemischer Botenstoffe erweitern sich zudem die Kapillaren und es kommt lokal zu einem verstärkten Blutfluss. Durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen der Blutgefäße wird im Blut zirkulierenden Leukozyten die Überwindung der Endothelschicht und die Migration in das Gewebe erleichtert. Man bezeichnet diesen Vorgang als Leukodiapedese. Die Gesamtheit dieser Prozesse wird als Entstehung einer Entzündungsreaktion bezeichnet. Allgemein werden Entzündungen durch die vier Symptome Rötung (*rubor*), Wärme (*calor*), Schwellung (*tumor*) und Schmerz (*dolor*) charakterisiert (Linlin Chen et al., 2018).

Im Blut zirkulierende neutrophile Granulozyten werden durch die freigesetzten Chemokine zu einem frühen Zeitpunkt der Entzündungsreaktion in das betroffene Gewebe gelockt. Im Gewebe können neutrophile Granulozyten durch verschiedene Effektorfunktionen, zum Beispiel NETose oder die Bildung zytotoxischer Sauerstoffradikale, Pathogene unschädlich machen (Rosales, 2018). Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) und neutrophile Granulozyten können darüber hinaus konservierte molekulare Strukturen auf der Oberfläche der Pathogene (sog. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen und mit Hilfe bestimmter Rezeptoren (sog. *pattern-recognition receptors*, PRRs) aufnehmen. Diese sogenannten Phagozyten, werden durch die Aufnahme des Pathogens aktiviert und sezernieren entzündungsfördernde Mediatoren, die zur vollständigen Eliminierung des eingedrungenen Pathogens beitragen (Gordon, 2016).

Parallel zu den Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort wird durch die Präsentation phagozytierter Antigene auf der Zelloberfläche professioneller antigenpräsentierender Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) eine spezifische, erworbene Immunantwort eingeleitet. Professionelle APCs, vor allem DCs, nehmen Antigene in der Körperperipherie auf, prozessieren diese und migrieren in sekundäre lymphatische Organe.

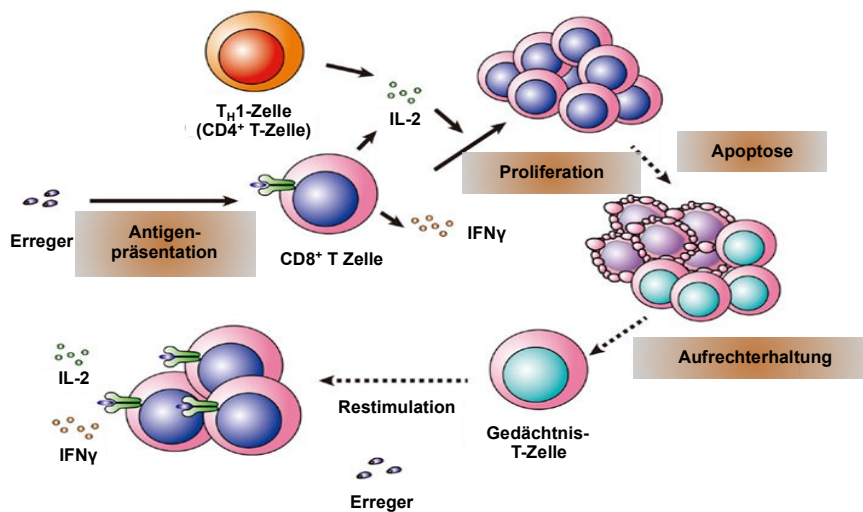
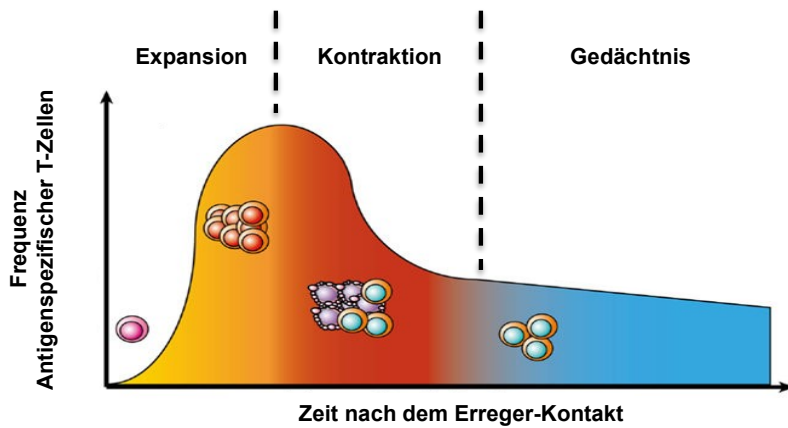
## Einleitung

Bei Antigenen handelt es sich um Stoffe, welche in einem Organismus eine Immunreaktion auslösen. Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und andere komplexe Moleküle können als Antigen wirken. Die APCs sind ein zentraler Bestandteil des Immunsystems, da sie zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort vermitteln (Iwasaki & Medzhitov, 2015). In sekundären lymphatischen Organen werden die prozessierten Antigene auf spezialisierten Proteinkomplexen der APCs naiven T-Zellen präsentiert.

Die Erkennung des präsentierten Antigen-Komplexes auf den APCs erfolgt durch den T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR). Der TCR ist im Gegensatz zu den Rezeptoren der angeborenen Immunantwort hochspezifisch für ein Antigen. Naive T-Zellen werden durch die Interaktion des TCR mit der APC aktiviert und zur Proliferation angeregt. Dieser Prozess wird als klonale Selektion bezeichnet und führt zur Bildung von T-Zell-Klonen, welche die gleiche Spezifität wie die Ursprungszelle besitzen. Die Entstehung antigenspezifischer CTLs erfolgt etwa 4-7 Tage nach der Exposition mit dem Antigen. Die CTLs verlassen nach der Aktivierung die sekundären lymphatischen Organe und wandern entlang der chemischen Botenstoffe zum Ort der Entzündung. Dort angekommen erkennen CTLs das spezifische Antigen des Pathogens auf infizierten Zellen und eliminieren diese durch die Freisetzung pro-apoptotischer und zytotoxischer Substanzen. Die Gesamtheit dieser Abläufe wird als primäre Immunantwort bezeichnet (Chaplin, 2010).

Ein Großteil der CTLs erhält nach Abschluss der primären Immunantwort kein Überlebenssignal und stirbt ab. Durch bestimmte weitere Stimuli können sich aktivierte T-Effektorzellen jedoch in langlebige T-Gedächtniszellen differenzieren und im Körper verbleiben. Bei einem erneuten Kontakt des Organismus mit dem gleichen Pathogen können diese T-Gedächtniszellen reaktiviert werden und diesen effektiver als in der primären Immunantwort eliminieren. Die erworbene Immunantwort ermöglicht somit die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses, welches den Organismus langanhaltend vor einem erneuten Kontakt mit einem spezifischen Pathogen schützt (Chaplin, 2010). Dieser Prozess wird als sekundäre Immunantwort bezeichnet. Die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

## Einleitung



**Abbildung 2: Die Induktion und der Verlauf antigenspezifischer T-Zell-Antworten.**

APCs präsentieren naiven T-Zellen Antigene körperfremder Erreger. Naive T-Zellen werden durch diesen Vorgang aktiviert und durchlaufen innerhalb von 4-7 Tagen nach Antigenkontakt eine klonale Expansion, welche zu einer Vermehrung der antigenspezifischen T-Effektorzellen und zur Eliminierung des Erregers führt („Expansion“). Nach der Erregerabwehr nimmt die Anzahl erregerspezifischer T-Effektorzellen ab („Kontraktion“). Einige dieser erregerspezifischen Zellen verbleiben als T-Gedächtniszellen im Körper und ermöglichen eine effiziente Sekundärantwort bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger. Abgewandelt nach Inoue et al., 2013.

Die Induktion eines immunologischen Gedächtnisses ist von einer effizienten Zusammenarbeit des angeborenen und des adaptiven Immunsystems abhängig. Die hinreichende Aktivierung der zellulären Vertreter des angeborenen Immunsystems und eine effektive Antigenpräsentation durch professionelle APCs sind die Grundlage für die Entstehung wirkungsvoller und langanhaltender, adaptiver Immunantworten.

### 1.2 Antigenpräsentation

Das erworbene, adaptive Immunsystem ermöglicht eine spezifische Reaktion auf definierte Antigene und die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses, welches den Körper

## Einleitung

langanhaltend vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen schützt. Die Vertreter des adaptiven Immunsystems können Antigene jedoch nur dann erkennen, wenn diese auf spezialisierten Proteinkomplexen, den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexen (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden (Wieczorek et al., 2017). Man bezeichnet diesen Umstand als MHC-Restriktion. Grundsätzlich unterscheidet man zwei strukturell und funktionell verschiedene Klassen von MHC-Molekülen:

**MHC-Klasse-I-Moleküle** bestehen aus einer etwa 45kDa großen schweren  $\alpha$ -Kette und einer nicht kovalent gebundenen etwa 12kDa großen leichten  $\beta$ -Kette, dem so genannten beta-2-Mikroglobulin. Die  $\alpha$ -Kette besteht aus drei  $\alpha$ -Domänen, wobei die  $\alpha_3$  Domäne der Transmembrandomäne zugewandt ist und die beiden membranfernen  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domänen die Peptidbindungsfurche bilden. Diese stellt eine hochvariable Region dar, die ähnlich wie Antikörper viele Millionen verschiedener Antigene binden und diese dem Immunsystem präsentieren kann. MHC-Klasse-I-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Körperzellen vor und präsentieren aufgrund der geschlossenen Peptidbindungsfurche endogene Antigene mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren. Dabei kann es sich sowohl um Sequenzen körpereigener Proteine, bei infizierten Zellen aber auch um virale oder bakterielle Antigene handeln. Die Präsentation körpereigener Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen schützt die Körperzellen vor der Degradierung durch zytotoxische Effektormechanismen natürlicher Killer (NK)-Zellen, welche eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche z.B. nach einer Virusinfektion erkennen („*Missing-self*-Hypothese“). Die Präsentation körperfremder Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen zeigt dem Immunsystem die Infektion der betroffenen Zelle an. Der MHC-Klasse-I-Antigen-Komplex wird durch den spezifischen TCR von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt.

**MHC-Klasse-II-Moleküle** bestehen aus zwei nahezu gleich großen Proteinen, einer  $\alpha$ -Untereinheit und einer nicht kovalent gebundenen  $\beta$ -Untereinheit. Jede Proteinuntereinheit besitzt zwei extrazelluläre Domänen, eine Transmembrandomäne und einen kurzen zytosolischen Bereich. Bei den MHC-Klasse-II-Komplexen wird ebenfalls die hochvariable Peptidbindungsfurche von membranfernen Domänen ( $\alpha_1$  und  $\beta_1$ ) gebildet. Im Gegensatz zum MHC-Klasse-I-Komplex sind hier beide Untereinheiten in der Zellmembran verankert. MHC-Klasse-II-Moleküle werden vorrangig auf der Zelloberfläche von professionellen APCs exprimiert. Auf MHC-Klasse-II-Molekülen werden aufgrund der offenen Peptidbindungsfurche exogene Antigene mit einer nahezu unbegrenzten Länge, welche aber zumeist bei 13-17 Aminosäuren liegt, präsentiert. Diese Antigene werden von den APCs durch Pinozytose oder Phagozytose aufgenommen und prozessiert. Dabei kann es sich sowohl um apoptotische, körpereigene Zellen als auch extrazelluläre Pathogene handeln. MHC-Klasse-II-Antigen-Komplexe interagieren mit dem spezifischen TCR von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen.

## Einleitung

Neben diesen beiden klassischen Präsentationswegen gibt es einen Sonderfall der Antigenpräsentation, welcher als **Kreuzpräsentation** bezeichnet wird (Embgenbroich & Burgdorf, 2018). Dieser Mechanismus ist unter anderem bei der Immunabwehr von virusinfizierten Nicht-Immunzellen und Tumorzellen von Bedeutung (Sánchez-Paulete et al., 2017). Die Kreuzpräsentation stellt eine Mischung der beiden klassischen Präsentationswege dar, bei der exogene Antigene vor allem durch bestimmte Subtypen der DCs aus der Umgebung aufgenommen und auf MHC-Klasse-I-Molekülen CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden (Joffre et al., 2012).

### 1.2.1 Subtypen der professionellen APCs

Nahezu alle kernhaltige Zellen und Thrombozyten besitzen die Fähigkeit, endogene Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren. Darüber hinaus gibt es Zelltypen, die T-Zellen Antigene präsentieren, um diese zu aktivieren und eine spezifische Immunreaktion auszulösen. Diese Zellen werden als professionelle APCs bezeichnet. Zu diesen zählen DCs, Makrophagen und B-Zellen (Kashem et al., 2017).

#### 1.2.1.1 Dendritische Zellen

DCs wurden erstmals von Paul Langerhans beschrieben, der ihnen aufgrund ihrer zytoplasmatischen Zellfortsätze und ihrem verzweigten Aufbau zunächst neurologische Funktionen zuordnete. Erst 1973 konnten Steinman und Cohn diese Zellen aufgrund ihrer Befähigung zur Antigenpräsentation den Immunzellen zuordnen (Steinman & Cohn, 1973). Steinman wurde für die Beschreibung der zentralen Rolle der DCs im Immunsystem im Jahr 2011 *posthum* mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

DCs sind in den sekundären lymphatischen Organen und an Kontaktstellen des Körpers mit der Umwelt, vor allem der Haut und den Schleimhäuten, zahlreich vertreten. An diesen Kontaktstellen nehmen sie Antigene auf und migrieren in sekundäre lymphatische Organe, um dort adaptive Immunantworten einzuleiten (Palucka & Banchereau, 1999). Sie stellen somit das zentrale Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar und sind der bedeutendste Vertreter der APCs.

Die Entwicklung von DCs erfolgt aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) im Knochenmark. DCs sind ein plastischer Zelltyp, deren Subtypen sich von der Morphologie, Funktionen und der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden lassen. Ein Großteil der Subtypen der DCs wird in ihrer Entstehung durch das Zytokin Flt3L (*FMS-like tyrosin kinase 3 ligand*) kontrolliert (Karsunky et al., 2003). Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren Vorläuferzellen der DCs in der Blutbahn. Durch die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren, einschließlich CCR1, CCR5 und CCR7,

## Einleitung

werden diese Vorläuferzellen in das Gewebe gelockt und differenzieren sich dort in DCs. DCs können allgemein anhand der Expression von CD11c und MHC-Klasse-II-Molekülen identifiziert werden. In sekundären lymphatischen Organen wie der Milz werden die DCs traditionell in zwei Subtypen unterteilt (Kushwah & Hu, 2011).

**Plasmazytoide DCs (pDCs)** sind ein seltener Typ der DCs, die ihre Benennung dem plasmazellähnlichen Aussehen verdanken. pDCs spielen durch die Produktion großer Mengen Typ I-Interferone (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ) und die Sezernierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  vor allem in der Virusabwehr eine bedeutende Rolle. pDCs zeigen eine geringe Befähigung für die Aufnahme von Antigenen und einer schwachen Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen. Unter inflammatorischen Bedingungen werden die MHC-Moleküle auf pDCs jedoch hochreguliert, so dass sie naiven T-Zellen Antigene präsentieren können (Kushwah & Hu, 2011).

**Konventionelle DCs (cDCs)** werden allgemein in zwei weitere Subtypen unterteilt, die CD8<sup>+</sup> cDC1 und die CD11b<sup>+</sup> cDC2. Nach der Aufnahme des Antigens und der Stimulation aktivierender Rezeptoren produzieren cDC1s die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12(p70) und IFN $\gamma$ , die zur Aktivierung von NK-Zellen, den T-Helferzell-Subtypen T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 und der Rekrutierung von CTLs führen. Durch die Induktion von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen cDC1s eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr von Pathogenen und Tumorzellen. Demgegenüber sind cDC2s an der Aktivierung von ILCs und den T-Helferzell-Subtypen T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17 beteiligt. Der cDC2-Subtyp ist vorrangig bei der Eliminierung von extrazellulären Bakterien und Parasiten von Bedeutung. Die beiden Subtypen der cDCs können durch die Expression von Oberflächenmarkern und Transkriptionsfaktoren unterschieden werden. Während cDC1s durch den Oberflächenmarker XCR1 und die Transkriptionsfaktoren Batf3 und IRF8 charakterisiert werden, exprimieren cDC2s den Oberflächenmarker SIRP $\alpha$  und den Transkriptionsfaktor IRF4 (Sichien et al., 2017).

Außerhalb der sekundären lymphatischen Organe, beispielsweise der Haut, gibt es weitere Subtypen der DCs. Diese können anhand verschiedener Oberflächenmarker grob in gewebesresidente cDCs, migratorische cDCs, Langerhans-Zellen (in der Epidermis) oder inflammatorische monozytäre DCs (*monocyte-derived DCs*, moDCs) unterteilt werden (Zaba et al., 2009).

### 1.2.1.2 Makrophagen

Makrophagen (M $\Phi$ ) sind große, einkernige und bewegliche Zellen, welche stammesgeschichtlich den vermutlich ältesten Teil der angeborenen Immunantwort darstellen. Als Teil des angeborenen Immunsystems erkennen Makrophagen konservierte Oberflächenstrukturen körperfremder Organismen, nehmen diese durch Endozytose auf und

## Einleitung

präsentieren sie aktivierten T-Zellen. Zu den zentralen Aufgaben der Makrophagen zählt die Beseitigung von körperfremden und entarteten körpereigenen Zellen. Die Befähigung zur Phagozytose und die nachfolgende lysosomale Degradierung von Pathogenen sind bei Makrophagen daher stark ausgeprägt (Wong et al., 2017). Makrophagen sind jedoch nur begrenzt fähig, naiven T-Zellen Antigene zu präsentieren. Durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen können Makrophagen jedoch Einfluss auf die Aktivierung von DCs und die Polarisierung von T-Zellen nehmen (Gaudino & Kumar, 2019).

In der Gesamtheit der Makrophagen werden die sogenannten residenten Gewebemakrophagen von den *monocyte-derived macrophages* (MDMs) unterschieden (van de Laar et al., 2016). Während die residenten Vertreter der Makrophagen ihren Ursprung bereits in der Embryonalentwicklung haben, entwickeln sich die MDMs aus HSCs des Knochenmarks. Die HSCs differenzieren sich unter bestimmten Bedingungen in patrouillierende Ly6C<sup>-</sup> Monozyten oder inflammatorische Ly6C<sup>+</sup> Monozyten, die während einer Entzündungsreaktion durch Chemokine in das entzündete Gewebe gelockt werden (Oishi & Manabe, 2018). Die Freisetzung von Zytokinen durch inflammatorische Zellen am Entzündungsort bewirkt deren Differenzierung in gewebsresidente Makrophagen. Der Monozyten-Kolonien stimulierende Faktor (M-CSF) nimmt bei der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen in Monozyten und der Differenzierung in Makrophagen entscheidenden Einfluss. Koloniestimulierende Faktoren werden vor allem von Stromazellen des Knochenmarks, Endothelzellen und Fibroblasten erzeugt (Jones & Ricardo, 2013).

Klassischerweise werden die heterogenen Mitglieder der Makrophagen-Familie anhand ihrer Polarisierung in zwei übergeordnete Phänotypen eingeordnet. Mit dem M1/M2-Schema sollen die „klassisch aktivierten“ M1-Makrophagen von den „alternativ aktivierten“ M2-Makrophagen unterschieden werden. M1- und M2-Makrophagen stellen in Realität die beiden Extreme in einem Kontinuum unterschiedlichster Phänotypen dieses plastischen Zelltyps dar (Martinez & Gordon, 2014).

**M1-Makrophagen** entstehen *in vitro* durch die Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLRs) und den Zytokinen IFN $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ . Durch die Sezernierung der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12(p70) und IL-23 haben M1-Makrophagen eine pro-inflammatorische Wirkung (Orecchioni et al., 2019). Der M1-Subtyp kann direkt zur Eliminierung von Pathogenen oder Tumorzellen beitragen und gleichzeitig DCs aktivieren, welche daraufhin eine adaptive Immunantwort einleiten. Darüber hinaus bilden M1-Makrophagen eine Vielzahl verschiedener Chemokine, beispielsweise CXCL16, welche T-Zellen zur Chemotaxis in das entzündete Gewebe anregen (Van Der Voort et al., 2005).

## Einleitung

**M2-Makrophagen** stellen den anderen Extremzustand der Makrophagen-Polarisierung dar. Diese entstehen *in vitro* durch eine Behandlung mit M-CSF, IL-4 und IL-13. M2-Makrophagen produzieren unter anderem die Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  und haben einen anti-inflammatorischen Phänotyp. Durch die Freisetzung weiterer Faktoren, einschließlich von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), und der Beseitigung von Detritus spielen M2-Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Reparatur von geschädigtem Gewebe und in der Gewebshomöostase (Jantsch et al., 2014).

### 1.2.2 Aktivierungsmechanismen professioneller APCs

#### 1.2.2.1 Phagozytose

Die Phagozytose bezeichnet die aktive Aufnahme von Makromolekülen und Partikeln in eine einzelne eukaryotische Zelle und ist eine Sonderform der rezeptorvermittelten Endozytose. Als Teil der Immunabwehr wird die Phagozytose vor allem von Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und DCs durchgeführt. Diese werden als professionelle Phagozyten bezeichnet. Der Mechanismus der Phagozytose beinhaltet die rezeptorvermittelte Erkennung von hochkonservierten molekularen Strukturen eines Pathogens. Diese werden als PAMPs bezeichnet und mit Hilfe spezieller Rezeptoren, den sogenannten PRRs, von Phagozyten erkannt (Takeuchi & Akira, 2010). Da es sich bei PAMPs zumeist um funktionell unabdingbare Sequenzen der Pathogene handelt, sind diese hochkonserviert und werden stabil von den Pathogenen exprimiert. Zu der Gruppe der PRR werden C-Typ-Lektine, Scavenger-Rezeptoren und Toll-like Rezeptoren gezählt. Während der Phagozytose werden Pathogen und Rezeptor in ein pH-neutrales intrazelluläres Kompartiment internalisiert, welches als Phagosom bezeichnet wird. Diese Phagosome verschmelzen im Zytoplasma der Phagozyten mit einem Lysosom und bilden so das sogenannte Phagolysosom. Durch die Absenkung des pH-Wertes im Phagolysosom werden lysosomale Enzyme aktiviert (einschließlich Glykosidasen, Proteasen, Lipasen, Nukleasen und Phosphatasen), welche den Abbau des aufgenommenen Pathogens vermitteln. Bestimmte Sequenzen der Pathogene können im Anschluss an eine intrazelluläre Prozessierung auf MHC-Molekülen präsentiert werden (Flannagan et al., 2012).

#### 1.2.2.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind bedeutende Vertreter der PRR, welche in der 1980er Jahren bei experimentellen Arbeiten an der Embryogenese der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden (Sprenger et al., 1989). Ein Zusammenhang der TLR mit dem Immunsystem konnte hingegen erst deutlich später illustriert werden. Seit deren Entdeckung konnten insgesamt 13 Vertreter der TLR-Familie zugeordnet werden, welche vor allem von Monozyten, Makrophagen, DCs und B-Zellen exprimiert werden. Darüber hinaus sind diese Rezeptoren

## Einleitung

bei nicht-myeloiden Zelltypen, einschließlich Epithelzellen und Fibroblasten, nachweisbar. Die TLR werden entweder extrazellulär als Typ I-Transmembranproteine oder intrazellulär auf endosomalen Membranen exprimiert.

Die Erkennung der PAMPs und die Signalweiterleitung erfolgt durch charakteristische Leucinreiche Sequenzen in der extrazellulären Domäne der TLR. Durch die Bindung eines Liganden vollzieht der TLR eine Konformationsänderung, welche die Bindung eines Adapterproteins an eine intrazelluläre TIR-Domäne ermöglicht. *Myeloid differentiation factor 88* (MyD88) ist das am häufigsten vorkommende der fünf bekannten Adapterproteine. Eine Auflistung aller bisher identifizierten TLR, deren Lokalisation, ihre Liganden und das verwendete Adapterprotein sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Auflistung aller bekannten humanen und murinen TLR und deren Charakteristika.**

TLR	Ligand	Adapter	Spezies	Lokalisation
1	Pam3CSK4	MyD88, MAL	Mensch/Maus	Zelloberfläche
2	Pam3CSK4, Lipopeptide, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure	MyD88, MAL	Mensch/Maus	Zelloberfläche
3	Doppelsträngige DNA, poly I:C	TRIF	Mensch/Maus	Endosomal
4	LPS, HMGB1	TRIF, MyD88, MAL, TRAM	Mensch/Maus	Zelloberfläche
5	Flagellin	MyD88	Mensch/Maus	Zelloberfläche
6	Diacyl-Lipopeptide	MyD88/MAL	Mensch/Maus	Zelloberfläche
7	Einzelsträngige RNA, Imidazoquinoline	MyD88	Mensch/Maus	Endosomal
8	Einzelsträngige RNA, Imidazoquinoline	MyD88	Mensch	Endosomal
9	CpG	MyD88	Mensch/Maus	Endosomal
10	Pam3CSK4	Unbekannt	Mensch	Zelloberfläche
11	Flagellin, Profilin	MyD88	Maus	Endosomal
12	Unbekannt	Unbekannt	Maus	Endosomal
13	Unbekannt	Unbekannt	Maus	Endosomal

## Einleitung

Das Adapterprotein MyD88 kann nach der Bindung an die intrazellulären TIR-Domänen des TLR mit der Todesdomäne der Serin/Threonin-Kinase IRAK-4 interagieren. Dies ermöglicht der Kinase IRAK-4 die Phosphorylierung von TRAF-6, welches nachfolgend die Aktivierung von TAK-1 bewirkt. Durch die Bildung eines Kinasen-Komplexes aktiviert TAK-1 den MAPK-Signalweg und hebt die inhibitorische Wirkung des I $\kappa$ B auf den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B auf. Ungebundenes NF $\kappa$ B kann vom Zytoplasma in den Zellkern migrieren und im Zusammenspiel mit dem Transkription AP-1 die Expression von Genen regulieren, welche beispielsweise bei der Aktivierung von APCs beteiligt sind. Aktivierte APCs sezernieren daraufhin pro-inflammatorische Zytokine (unter anderem IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6) und exprimieren eine erhöhte Anzahl von MHC und kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche (Akira & Takeda, 2004).

### 1.2.2.3 Inflammasome

Das Inflammasom ist ein intrazellulärer Multiproteinkomplex, welcher im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine bedeutende Rolle einnimmt (Malik & Kanneganti, 2017; Sharma & Kanneganti, 2016). Inflammasome nehmen entscheidenden Einfluss auf die Reifung und Sekretion der pro-inflammatorischen IL-1-Familien-Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18.

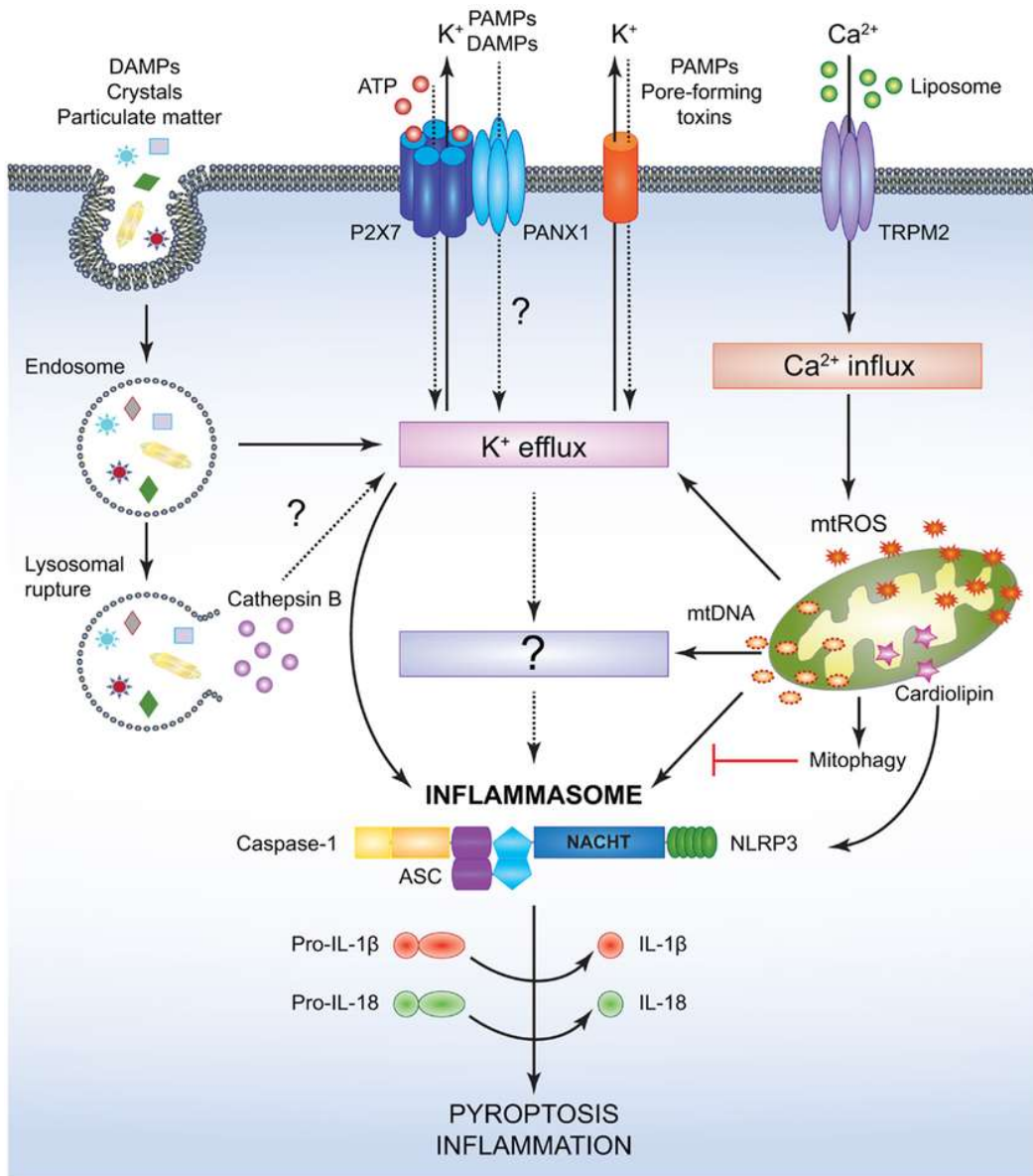
Inflammasome treten vor allem im Zytoplasma von Zellen des angeborenen Immunsystems auf. Neuere Studien weisen darauf hin, dass Inflammasome überdies in Epithelzellen vorkommen und von Bedeutung für die Pathogenabwehr in der Haut sind (Malik & Kanneganti, 2017). Es existieren verschiedene Subtypen von Inflammasomen, welche durch unterschiedliche Stimuli, einschließlich DAMPs (*danger associated molecular patterns*), PAMPS, Toxine und das Adjuvans Aluminiumhydroxid, aktiviert werden können. Von übergeordneter Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist das NLRP3-Inflammasom.

#### 1.2.2.3.1 Das NLRP3-Inflammasom

NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*)-Proteine sind intrazelluläre Sensoren einer Vielzahl mikrobieller PAMPS. DAMPs, Toxinen und mitochondrialer ROS (Kelley et al., 2019). NLRP3-Inflammasome bestehen allgemein aus einem Sensor (NLRP3), einem Adapterprotein (ASC/PYCARD) und einem Effektor (Caspase 1). Die Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms beginnt mit der Oligomerisierung von NLRP3-Proteinen, welche durch homotypische Interaktionen ihrer NACHT-Domänen erfolgt. NLRP3-Proteine rekrutieren die Adapterproteine ASC, welche durch PYD-PYD-Interaktionen an den Komplex binden und sogenannte ASC-Filamente bilden. Diese ASC-Filamente rekrutieren über CARD-CARD-Interaktionen die Caspase 1, welche nach der Bindung an den Komplex durch Selbstspaltung aktiviert wird. Die Serin-Threonin-Kinase NEK7 (*NIMA-related kinase 7*) konnte kürzlich als eine weitere, für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasomes essentielle Komponente

## Einleitung

identifiziert werden. Der Aufbau und die Signalkaskade des NLRP3-Inflammasoms sind in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Aufbau und Funktion des NLRP3-Inflammasoms.**

NLRP3-Proteine sind Sensoren von PAMPs und DAMPs. Durch Verschiebungen der zellulären Ionenkonzentrationen und Induktion mitochondrialer ROS erfolgt die Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms. NLRP3-Inflammasome setzen sich aus dem Effektor Caspase 1, dem Adapterprotein ASC und den NLRP3-Sensorproteinen zusammen. Durch die Überführung von Vorstufen der IL-1-Familie-Mitglieder IL-1 $\beta$  und IL-18 nehmen NLRP3-Inflammasome Einfluss auf Entzündungsreaktionen und die Immunabwehr. (Saxena & Yeretssian, 2014)

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wird klassischerweise als zweistufiger Prozess betrachtet – das Priming und die Aktivierung. Das Priming erfolgt durch die stimulatorischen Effekte von PAMPs, DAMPs, ROS oder durch pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) und induziert die vermehrte Bildung von Inflammasom-Komponenten. Darüber hinaus erfolgt

## Einleitung

durch das Priming eine post-translationale Modifikation des NLRP3, welche zur Stabilisierung des Proteins führt.

Die nachfolgende Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kann durch eine Vielzahl bakterieller und viraler PAMPs erfolgen. Die molekularen Ursachen der Aktivierung sind ebenso vielfältig wie unspezifisch und beinhalten den Efflux von Kalzium- und Chlorid-Ionen, den Influx von Calcium-Ionen, die Degradation von Lysosomen, mitochondriale Dysfunktion und metabolische Veränderungen der Zelle.

Aktivierte NLRP3-Inflammasome bewirken die Maturation unreifer Vorstufen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18. Zusätzlich zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen bewirkt das NLRP3-Inflammasom die Induktion der Pyroptose (Xueliang Chen et al., 2019). Bei der Pyroptose handelt es sich um eine inflammatorische Form des programmierten Zelltods, welche durch Gasdermin D (GSDMD) vermittelt wird (Ramos-Junior & Morandini, 2017). Gasdermin D fördert die Porenbildung innerhalb der Zellmembran und leitet damit gleichzeitig den Zelltod ein. Durch die Apoptose erfolgt die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18. Die Pyroptose führt darüber hinaus zur Bildung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\alpha$  und weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, welche zur Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen beitragen.

### 1.2.2.3.2 ROS sind wichtige Effektoren und Signalmoleküle des Immunsystems

Als ROS bezeichnet man eine heterogene Gruppe von Sauerstoff-Verbindungen, welche durch eine partielle Reduktion von elementarem Sauerstoff ( $O_2$ ) gebildet werden. Dazu gehören unter anderem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ , auch als Hydroxid-Anion bezeichnet) und das Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\cdot}$ ). Durch ihre hohe chemische Reaktionsfähigkeit können ROS zur oxidativen Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden führen. ROS spielen bei der Zellerterung, dem Zelltod und vielen Erkrankungen, z. B. Krebs oder Autoimmunität, eine bedeutende Rolle. Gleichmaßen sind ROS auch zelluläre Signalmediatoren, welche in physiologischen Konzentrationen metabolische Prozesse und funktionelle Charakteristika von Immunzellen regulieren (R. Kohen & Nyska, 2002).

ROS können durch unterschiedliche zelluläre Vorgänge in jeder Körperzelle gebildet werden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen ROS, welche in den Mitochondrien oder durch Mitglieder der NADPH-Oxidasen (NOX) - Familie entstehen. Mitochondriale ROS entstehen bei der nicht-enzymatischen Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff an den mitochondrialen Proteinkomplexen (I–IV). Bei funktionstüchtigen Mitochondrien erfolgt diese

## Einleitung

Reaktion nur bei etwa 0,1 - 2 % der übertragenen Elektronen. Aus dieser Reaktion folgt eine partielle Reduktion des Sauerstoffs und die Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  (Murphy, 2009).

Zusätzlich zu den Mitochondrien werden ROS auch von Mitgliedern der NOX-Protein-Familie generiert. Die unterschiedlichen NOX-Isoformen sind in verschiedenen Organellen wie dem Mitochondrium, dem endoplasmatischen Retikulum oder der nukleären Membran lokalisiert. NOX-Enzyme der Plasmamembran von neutrophilen Granulozyten katalysieren die Bildung der erforderlichen Sauerstoffradikale im oxidativen Burst (Bedard & Krause, 2007). Verschiedene andere Enzyme, beispielsweise Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen und Cytochrome P450 können überdies ROS produzieren (Bobba et al., 2008).

In Proteinen können ROS reversible, posttranslationale Modifikationen durch die Oxidation freier Thiole bewirken. Dabei handelt es sich vornehmlich um die Oxidation der Sulfhydryl-Gruppe von Cysteinresten, wodurch Sulfonsäurereste, Disulfidbindungen, Sulfonamidreste oder Glutathionylierungen entstehen können. Diese Modifikationen können die Aktivität der betroffenen Signalmoleküle erheblich beeinflussen und spielen bei der Regulation von Kinasen, Transkriptionsfaktoren, Histon-Deacetylasen, antioxidativen Enzymen und Phosphatasen eine wichtige Rolle (R. Kohen & Nyska, 2002). Die Kontrolle des intrazellulären ROS-Levels ist daher von fundamentaler Bedeutung für die zelluläre Homöostase.

Die Menge der ROS wird hauptsächlich von NRF2, einem ROS-sensitiven Transkriptionsfaktor, kontrolliert. Steigt die ROS-Konzentration in der Zelle an, wird NRF2 aktiviert und initiiert die Expression von antioxidativen Molekülen, die der zellulären ROS-Anreicherung entgegenwirken. NRF2 kontrolliert verschiedene antioxidative Systeme wie z. B. Superoxid-Dismutasen (SODs), Peroxiredoxin (PRX), Thioredoxin (TRX), die Glutathion-Peroxidase (GPX) und die Synthese von Glutathion (GSH). Diese antioxidativen Systeme führen zur Überführung des hochreaktiven  $O_2^{\cdot-}$  in  $H_2O$ . Oxidierte Proteine können durch diese Enzyme ebenfalls wieder in den reduzierten Zustand überführt werden (Ray et al., 2012).

Die Bildung von niedrigen oder mittleren ROS-Konzentrationen beeinflusst durch die oben aufgeführten Interaktionen beispielsweise die Antigenpräsentation von DCs und nimmt Einfluss auf die Aktivierung, Differenzierung und das Überleben von T-Zellen (Maemura et al., 2005; Matsue et al., 2003; Oberkampf et al., 2018; Yarosz & Chang, 2018).

### 1.3 T-Zellen

T-Zellen sind bedeutende zelluläre Vertreter des adaptiven Immunsystems, welche durch den Körper wandern und körperfremde oder entartete, körpereigene Antigene auf MHC-Molekülen mit Hilfe des TCR erkennen. Der TCR hat im Gegensatz zu den Rezeptoren des angeborenen

## Einleitung

Immunsystems eine Spezifität für ein Antigen und ermöglicht dem Immunsystem bei einer Infektion eine zielgerichtete Immunantwort.

### 1.3.1 Entwicklung und Lebenszyklus der T-Zellen

T-Zellen entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark, welche für die weitere Reifung in den kortikalen Bereich des Thymus einwandern. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung werden diese Vorläuferzellen als Thymozyten bezeichnet (Kurd et al., 2017). Im Thymus angekommen differenzieren sich die Thymozyten und treten in eine Phase der Proliferation ein. Da in diesem Stadium der Entwicklung noch nicht die Korezeptormoleküle CD4 und CD8 auf der Zelloberfläche exprimiert werden, spricht man von doppelt negativen Thymozyten.

In diesem Entwicklungsstadium beginnen genetische Rekombinationen in den Genen, die Untereinheiten des TCR codieren. In diesem frühen Stadium der T-Zell-Entwicklung unterscheidet man bereits zwei grundsätzlich verschiedene T-Zell-Linien, die sogenannten  $\alpha:\beta$ - oder  $\gamma:\delta$ -T-Zellen (Kreslavsky et al., 2010). Die beiden Linien werden durch die charakteristischen Untereinheiten des jeweiligen TCR voneinander abgegrenzt. Etwa 95 % der Subpopulationen entspringen den  $\alpha:\beta$ -T-Zellen und können in einem späteren Entwicklungsstadium durch die Expression von Korezeptormolekülen in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen unterteilt werden.  $\gamma:\delta$ -T-Zellen treten hingegen vorrangig in epithelialen Geweben wie der Haut auf.

Nachdem die Expression des TCR und der Korezeptormoleküle CD4 und CD8 auf der Zelloberfläche erfolgt ist, durchlaufen die unreifen Thymozyten im Thymus Selektionsprozesse (Takaba & Takayanagi, 2017). Man unterscheidet hierbei die positive und die negative Selektion. Bei der positiven Selektion werden Antigene auf MHC-Klasse-I -oder MHC-Klasse-II-Molekülen den  $CD4^+$   $CD8^+$  Thymozyten im Kortex des Thymus präsentiert. Thymozyten mit geringer Affinität zu MHC-Molekülen erhalten ab diesem Entwicklungsstadium keine Wachstumssignale und werden apoptotisch. In einem zweiten Selektionsschritt werden den positiv selektierten Thymozyten körpereigene Antigene präsentiert. Autoreaktive Thymozyten erhalten nach dieser Selektion keine weiteren Wachstumssignale und sterben ab. Dieser Vorgang verhindert die Entstehung von Autoimmunität und wird als negative Selektion bezeichnet (Rosenblum et al., 2015).

Nur etwa 10 % der Thymozyten überleben diese beiden Selektionsvorgänge im Thymus und wandern nachfolgend in T-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Organe aus. Diese werden als naive T-Zellen bezeichnet, da sie zu diesem Zeitpunkt noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen hatten. Erst nach der Interaktion des TCR mit einem

## Einleitung

spezifischen MHC-Antigen-Komplex auf einer professionellen APC werden naive T-Zellen aktiviert und entwickeln ihre funktionellen Eigenschaften (Takaba & Takayanagi, 2017).

### 1.3.2 Aufbau und Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors

Der T-Zell-Rezeptor ist ein Proteinkomplex auf der Zelloberfläche von T-Zellen, der die Unterscheidung von körperfremden und körpereigenen Antigenen ermöglicht. Nach der Bindung des TCR an einen passenden MHC-Antigen-Komplex erfolgt eine Veränderung der Genexpression in T-Zellen, welche zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung führt.

Der TCR setzt sich strukturell aus zwei Proteinunterheiten ( $\alpha:\beta$  oder  $\gamma:\delta$ ) zusammen, welche über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Darüber hinaus besteht der TCR aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus zwei V- und J-Segmenten, die  $\beta$ -Untereinheit hingegen aus drei V, D- und J-Segmenten. Die beiden Untereinheiten des TCR besitzen je drei hypervariable Bindungsstellen, welche als *complementary determining regions* (CDRs) bezeichnet werden. Diese CDRs interagieren sowohl mit den MHC-Molekülen als auch dem präsentierten Antigen und erzeugen so die Spezifität des TCR (Wucherpfennig et al., 2010).

Da der TCR selbst nur eine sehr kurze zytoplasmatische Domäne besitzt, liegt er im Komplex mit CD3-Adaptermolekülen vor. CD3-Moleküle setzen sich wiederum aus verschiedenen Modulen zusammen ( $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$ ) und dienen im TCR-Komplex der Signalübertragung ins Innere der T-Zelle. Der zytoplasmatische Anteil der verschiedenen CD3-Module besitzt sogenannte *immunoreceptor tyrosin-based activation motifs* (ITAMs). Diese dienen als Bindungsstellen für Kinasen, welche nach der Bindung eines MHC-Antigen-Komplexes das Signal des TCR ins Zellinnere weiterleiten (Hwang et al., 2020).

Nach der Bindung eines MHC-Antigen-Komplexes an einen spezifischen TCR werden die ITAMs der CD3-Module durch die Src-Kinase Lck phosphoryliert. Lck ist mit den beiden Korezeptoren CD4 oder CD8 assoziiert und Teil des TCR-Komplexes. Die phosphorylierten ITAMs dienen wiederum als Bindungsstellen für die Tyrosinkinase ZAP-70 (*zeta-chain-associated protein kinase 70*). ZAP-70 bindet mit einer SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste der ITAMs und wird daher in die unmittelbare Nähe von Lck gebracht, wodurch die Phosphorylierung von ZAP-70 ermöglicht wird. Nach deren Aktivierung kann ZAP-70 das Transmembranprotein LAT (*linker for activation of T cells*) an mehreren Tyrosinresten phosphorylieren. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen der Rekrutierung von Signalmolekülen, einschließlich der Phospholipase  $C\gamma 1$  und SOS. Durch die Rekrutierung dieser Signalmoleküle an die Zellmembran wird die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

## Einleitung

NFκB, NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und AP-1 im Zellkern induziert, welche daraufhin die Expression von Genen der T-Zell-Differenzierung induzieren (Wucherpfennig et al., 2010).

### 1.3.3 Subtypen der T-Zellen

T-Zellen sind ein plastischer Zelltyp, der anhand der Expression von Oberflächenmolekülen und der Sekretion von charakteristischen Zytokinen in verschiedene Subtypen unterteilt werden kann.

**CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen** (*cytotoxic T lymphocyte*, CTLs) patrouillieren durch den Körper und eliminieren infizierte oder entartete körpereigene Zellen nach der Aktivierung durch APCs. Die Eliminierung der Zielzelle erfolgt vor allem durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen. CTLs können durch die Expression des Korezeptors CD8 und die Freisetzung der Zytokine IFNγ und TNF-α charakterisiert werden (N. Zhang & Bevan, 2011).

**CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen** haben im Gegensatz zu den CTLs keine zytotoxische Aktivität. Ihre Hauptaufgabe liegt im Zusammenspiel mit den APCs in der Einleitung einer adäquaten Immunantwort (Gaudino & Kumar, 2019). T-Helferzellen koordinieren durch die Produktion von Zytokinen die Aktivierung von APCs, welche nachfolgend sowohl die Entstehung zytotoxischer CTLs als auch Antikörper-produzierender Plasmazellen ermöglichen. Anhand der charakteristischen Zytokine erfolgt eine Einteilung in die verschiedenen Subtypen der T-Helferzellen (Zhu & Paul, 2008). Die Polarisierung der verschiedenen T-Helferzell-Subtypen wird durch das umgebende Zytokinmilieu maßgeblich beeinflusst:

- **T<sub>H</sub>1-Zellen** entstehen in Anwesenheit der Zytokine IFNγ und IL-12. Durch die Bindung an ihre entsprechenden Rezeptoren aktivieren diese Zytokine die signalvermittelnden Proteine STAT1 und STAT4, welche die Bildung des Transkriptionsfaktors T-bet bewirken. T-bet induziert die Sekretion des für T<sub>H</sub>1-Zellen charakteristischen Zytokins IFNγ. T<sub>H</sub>1-Zellen koordinieren vor allem gegen Viren und intrazelluläre Bakterien gerichtete Immunreaktionen.
- Die Polarisierung von **T<sub>H</sub>2-Zellen** erfolgt durch die Freisetzung des Zytokins IL-4 in Abwesenheit von IL-12. Die Bindung von IL-4 an den entsprechenden Rezeptor führt über STAT6 zur Bildung des Transkriptionsfaktors GATA-3. Dieser bewirkt die Freisetzung des charakteristischen T<sub>H</sub>2-Zytokins IL-4. T<sub>H</sub>2-Zellen aktivieren B-Zellen und sind am Klassenwechsel von IgE zu IgA beteiligt. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Allergien und Asthma (Deo et al., 2010).

## Einleitung

- **T<sub>H</sub>9-Zellen** differenzieren sich durch die Signalwege der Zytokine IL-4 und TGF- $\beta$ . Sie sind durch eine hohe Expression des Zytokins IL-9 charakterisiert. T<sub>H</sub>9-Zellen sind vor allem bei der Immunabwehr von Parasiten und bei allergischen Reaktionen von Bedeutung. Darüber hinaus spielt dieser Subtyp bei verschiedenen Erkrankungen, beispielsweise Autoimmunität, Krebs und Rheuma, eine wichtige Rolle (Kaplan, 2013).
- **T<sub>H</sub>17-Zellen** werden in Abwesenheit von IL-12 und IL-4 durch die Zytokine IL-6, IL-21 und TGF- $\beta$  gebildet. Vor allem IL-6 und TGF- $\beta$  induzieren den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ T. T<sub>H</sub>17-Zellen sezernieren charakteristischerweise das Zytokin IL-17. Zusammen mit den Subtypen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 sind T<sub>H</sub>17-Zellen bei der Immunabwehr extrazellulärer Pathogene von Bedeutung. Eine Vielzahl von Autoimmun-erkrankungen ist überdies mit einer Überproduktion von T<sub>H</sub>17-Zytokinen assoziiert (Yasuda et al., 2019).
- **Regulatorische T-Zellen (T<sub>regs</sub>)** sind ein spezialisierter Subtyp der T-Zellen und kontrollieren die Intensität von Immunantworten. T<sub>regs</sub> dämpfen die Intensität von Immunantworten sowohl durch die Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  als auch die Fas/FasL-vermittelte Apoptose überschüssiger oder selbstreaktiver T-Zellen. Sie verhindern somit das Auftreten von Autoimmunität oder chronischen Entzündungen (Vignali et al., 2008). T<sub>regs</sub> können durch die Expression des Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert werden.

**CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen** verbleiben nach der primären Immunantwort im Organismus und schützen diesen bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen vor einer neuerlichen Infektion (MacLeod et al., 2010; Pennock et al., 2013). Innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen gibt es verschiedene Subtypen, die sich phänotypisch und funktionell voneinander unterscheiden:

- Die **Effektor-T-Gedächtniszellen** (*effector memory T cells*, T<sub>EM</sub>) exprimieren CCR7, CD44 und kein CD62L (L-Selektin). Sie können daher nicht in lymphatische Gewebe einwandern und migrieren zwischen Blutbahn und Gewebe. Mit Hilfe von Chemokinrezeptoren erkennen sie Entzündungssignale und wandern daraufhin in das betroffene Gewebe ein, um eingedrungene Pathogene zu eliminieren.
- **Zentrale T-Gedächtniszellen** (*central memory T cells*, T<sub>CM</sub>) exprimieren auf ihrer Oberfläche CCR7, CD44 und CD62L. Sie sezernieren IL-2, aber weder IFN $\gamma$  noch IL-4. T<sub>CM</sub> patrouillieren im Gegensatz zu den T<sub>EM</sub> zwischen Blut und den lymphatischen Organen (Martin & Badovinac, 2018).

## Einleitung

- Nicht-zirkulierende, **gewebsresidente T-Gedächtniszellen** (*tissue resident memory cells*,  $T_{RM}$ ) bewohnen beispielsweise die Haut, die Lunge oder den Gastrointestinaltrakt und unterscheiden sich phänotypisch wie funktionell von  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$ .  $T_{RM}$  schützen den Organismus an Grenzflächen zur Umwelt vor eindringenden Pathogenen und sind durch die Expression der Oberflächenmarker CD69 und CD103 charakterisiert (Schenkel & Masopust, 2014).

Eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Subtypen der T-Zellen ist in Abbildung 4 dargestellt.

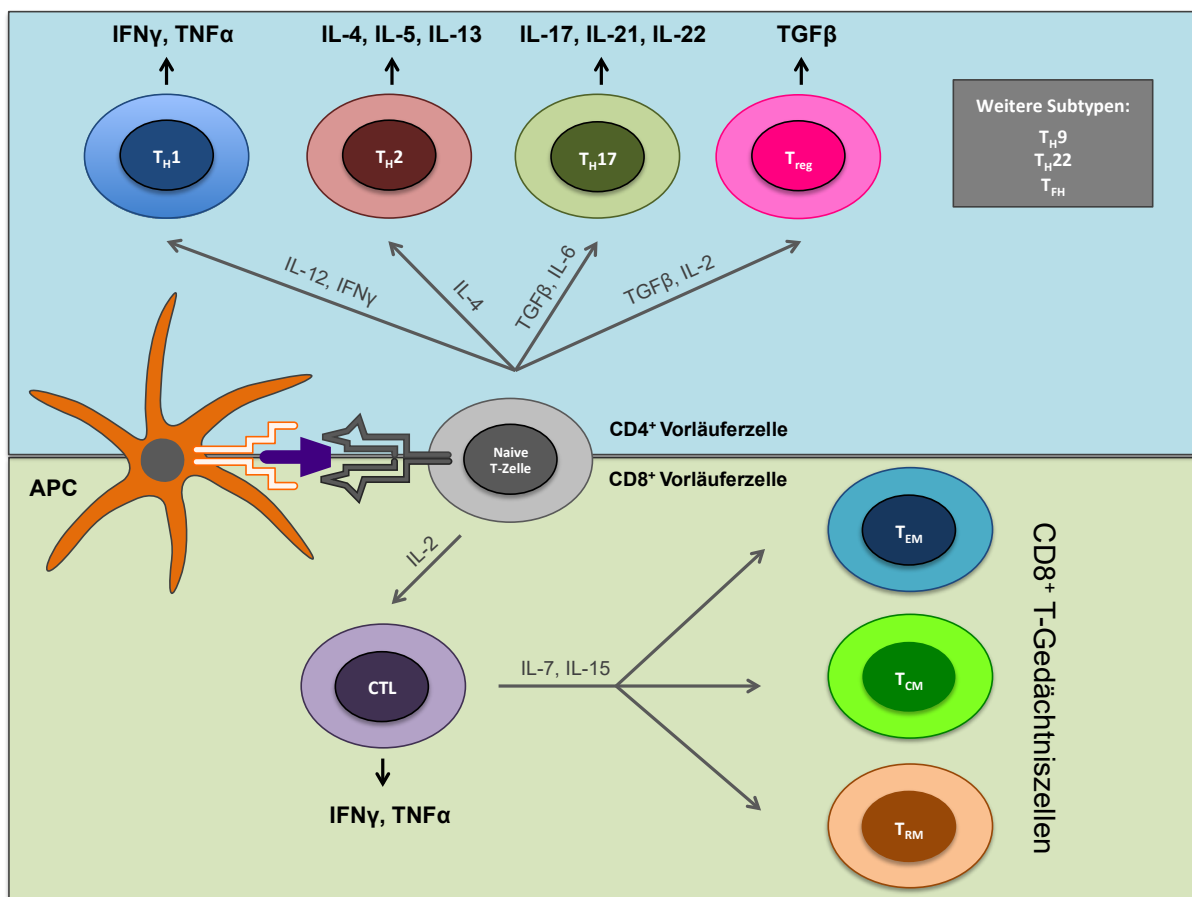


Abbildung 4: Subtypen der T-Zellen.

Naive CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen interagieren bei der Antigenpräsentation über den TCR-Komplex mit einem MHC-Antigen-Komplex auf APCs. APCs sezernieren in Abhängigkeit von ihrer Polarisierung verschiedene Zytokine, welche direkten Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen nehmen. Jeder Subtyp der ausdifferenzierten, antigenspezifischen T-Zellen sezerniert nach ihrer Aktivierung charakteristische Effektorzytokine.

## Einleitung

### 1.3.4 Die Interaktion kostimulatorischer Moleküle und das Zytokinmilieu beeinflussen das Priming naiver T-Zellen

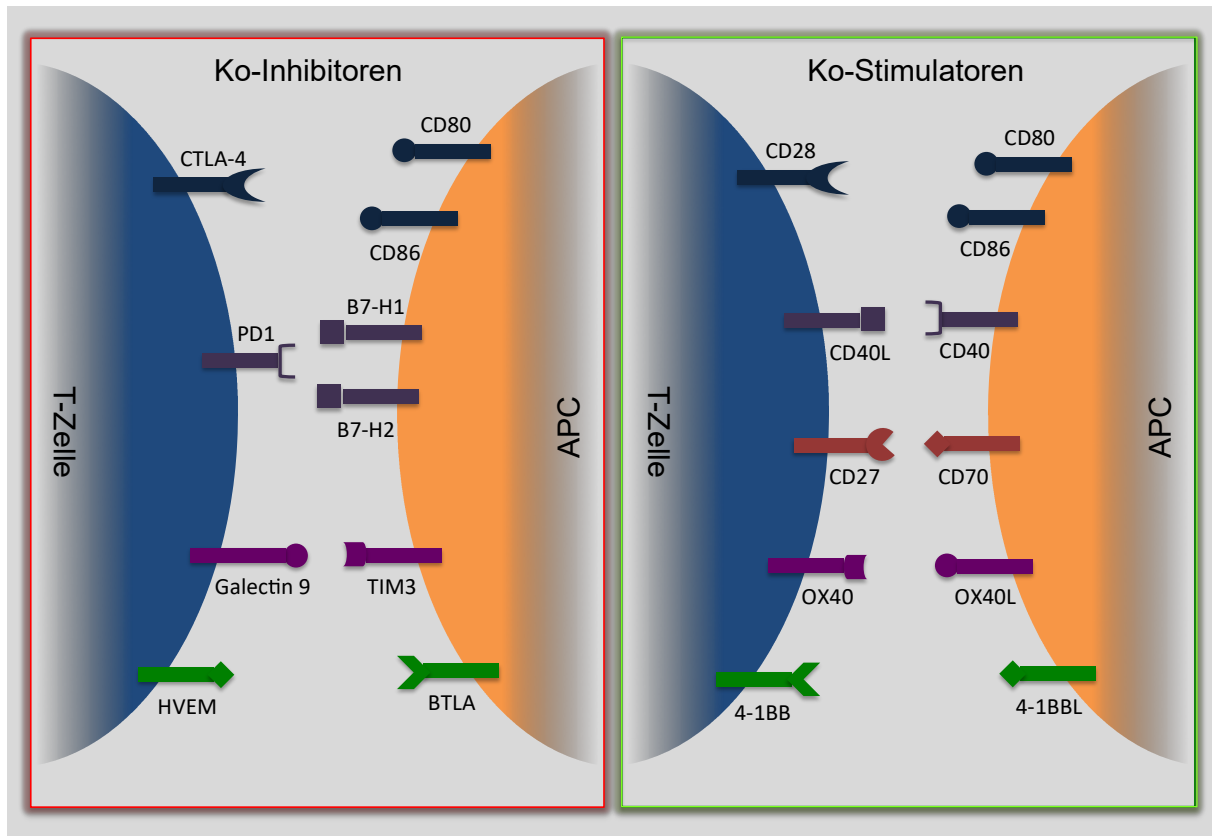
Naive T-Zellen werden nach ihrer Reifung im Thymus durch die Interaktion mit einem MHC-Antigen-Komplex aktiviert. Die Präsentation von Antigenen ohne weitere stimulierende Einflüsse bewirkt jedoch die Entstehung aneurer T-Zellen. Man bezeichnet diese Induktion von ausdifferenzierten, aber funktionslosen T-Zellen als periphere Toleranz. Die periphere Toleranz ist neben der zentralen Toleranz ein Mechanismus, der die Entstehung von autoreaktiven T-Zellen und Autoimmunität verhindert (Lechler et al., 2001).

Für die vollständige Aktivierung der adaptiven Immunantwort sind neben der Stimulation des TCRs weitere Signale erforderlich. Zu diesem Zweck werden auf der Oberfläche von T-Zellen und APCs sogenannte kostimulatorische Moleküle gebildet, welche bei der Antigenpräsentation miteinander interagieren und die Signalstärke des TCR amplifizieren (Liping Chen & Flies, 2013a). Die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf den APCs kann beispielsweise nach der Stimulation eines PRR durch ein entsprechendes PAMP induziert werden.

Wichtige Vertreter der Kostimulatoren sind zum Beispiel B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche auf der Zelloberfläche von APCs exprimiert werden. Diese interagieren mit CD28 auf der Zelloberfläche der T-Zelle und leiten Signalwege ein, die zusammen mit der Signalkaskade des TCR zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zelle führen (Subauste et al., 1998). Der CD80/CD86-CD28-Signalweg führt beispielsweise zur Sezernierung des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2, welcher die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen fördert.

Darüber hinaus kann durch die Interaktion der APCs mit inhibitorischen Molekülen auch eine Repression der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation erfolgen. CTLA-4 ist ein inhibitorisches Molekül auf der Zelloberfläche von T-Zellen und wirkt als Antagonist der T-Zell-Aktivierung, da es mit höherer Affinität als CD28 an CD80/CD86 bindet (Buchbinder & Desai, 2016). Die Interaktion solcher Moleküle auf APCs und T-Zellen verhindert eine Überreaktion des Immunsystems. Diese Interaktionen werden daher als „Immuncheckpoints“ bezeichnet. Die Blockade solcher Immuncheckpoints wird in der Immunonkologie zu therapeutischen Zwecken genutzt (Darvin et al., 2018). Eine Übersicht stimulierender oder hemmender Interaktionen von APCs und T-Zellen ist in Abbildung 5 dargestellt.

## Einleitung



**Abbildung 5: Das Priming naiver T-Zellen wird durch kostimulatorische Moleküle beeinflusst.**

APCs und naive T-Zellen interagieren bei der Antigenpräsentation über verschiedene Rezeptoren und Liganden auf der Zelloberfläche. Diese Interaktionen können sowohl eine stimulierende als auch eine inhibierende Wirkung auf die Expansion und die Funktionalität der antigenspezifischen T-Zellen haben.

Die vollständige Ausbildung von Effektorfunktionen sowie die Langlebigkeit antigenspezifischer T-Zellen werden überdies durch pro-inflammatorische Zytokine reguliert (Schluns & Lefrançois, 2003). Das Zytokinmilieu in der Mikroumgebung naiver T-Zellen nimmt einen entscheidenden Einfluss auf deren Differenzierung und Polarisierung in verschiedene Subtypen (siehe 1.3.3). Die Zytokine IL-12 und IFN $\alpha/\beta$  regulieren beispielsweise die Genexpression von Granzymen, IFN $\gamma$ , CD25, OX40 und Bcl-3, welche essentiell für das Überleben, die Proliferation, die Migration und die Effektorfunktionen von CTLs sind. Darüber hinaus wird die Induktion langlebiger, antigenspezifischer T-Gedächtniszellen maßgeblich durch ein entsprechendes Zytokinmilieu, charakterisiert durch IL-7 und IL-15, gesteuert (Rubinstein et al., 2008).

Die Entstehung effektiver und langanhaltender T-Zell-Antworten ist daher von einer komplexen Interaktion von APCs und T-Zellen bei der Antigenpräsentation abhängig. Das zunehmende Verständnis über die molekularen Grundlagen bei der Entstehung adaptiver Immunantworten wird bei der Entwicklung neuartiger Impfstoffe genutzt.

# Einleitung

## 1.4 Impfungen

Impfungen (auch als Vakzinierung bezeichnet, abgeleitet vom lateinischen Wort *vacca*, „Kuh“) erzeugen die Immunität eines Organismus gegenüber einem spezifischen Pathogen und sind die erfolgreichste Errungenschaft im Kampf gegen Infektionskrankheiten in der Geschichte medizinischer Forschung. Bereits am Ende des 18. Jahrhunderts angewandt, konnte die Durchführung von Massenimpfprogrammen die Verbreitung einer Vielzahl teils lebensbedrohlicher Infektionskrankheiten, einschließlich Pocken, Kinderlähmung, Masern, Diphtherie, Keuchhusten und Tetanus, massiv einschränken. Der englische Landarzt Edward Jenner gilt als Pionier der modernen Schutzimpfung, da er die Zusammenhänge zwischen der Verabreichung von abgeschwächten Kuhpocken und dem nachfolgenden Schutz vor einer Infektion mit humanen Pocken erkannte (Plotkin, 2014). Die Weltgesundheitsorganisation (*world health organisation*, WHO) nimmt an, dass Impfungen jährlich zwei bis drei Millionen Menschen vor einer tödlichen Infektion schützen.

### 1.4.1 Klassische Impfungen

Bei der klassischen Impfung werden attenuierte Pathogene prophylaktisch verabreicht. Durch die Verabreichung des Impfstoffes wird das Immunsystem dazu angeregt, eine erregerspezifische Immunkompetenz zu entwickeln, ohne die eigentliche Infektion durchleben zu müssen. Man bezeichnet diese Herangehensweise als aktive Impfung, da sie die eigenständige Reaktion des Immunsystems auf Sequenzen eines Pathogens voraussetzt. Demgegenüber steht die Verabreichung von Antikörpern, welche in einem anderen Organismus erzeugt wurden. Diese Form der Impfung wird als passive Impfung bezeichnet (Federman, 2014).

Klassische Impfungen basieren auf der intramuskulären (in den *Musculus deltoideus* am Oberarm) oder subkutanen Injektion des Impfstoffes mit Spritzen und Kanülen. Klassische Impfstoffe lösen eine Entzündung an der Injektionsstelle aus, welche zur Einwanderung von Immunzellen an die Injektionsstelle führt. Die eingewanderten Immunzellen, vor allem APCs, nehmen Sequenzen des verabreichten Pathogens an der Injektionsstelle auf und migrieren in sekundäre lymphatische Organe, um sie naiven B- oder T-Zellen zu präsentieren. Klassische Impfungen induzieren meist die Reifung von antigenspezifischen B-Zellen in Plasmazellen, welche nachfolgend Antikörper produzieren. Diese zirkulieren im Blut des immunisierten Organismus und erkennen bei einem entsprechend hohen Antikörpertiter auch nach längerer Zeit eingedrungene Pathogene mit der entsprechenden Spezifität. Darüber hinaus verbleiben nach der Impfung B-Gedächtniszellen im Körper, welche bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen expandieren und erneut erregerspezifische Antikörper produzieren. Die Sezernierung von Antikörpern dient dem Schutz des Organismus vor extrazellulären Pathogenen.

## Einleitung

Klassische Impfungen führen in geringerer Ausprägung auch zur Entstehung von antigenspezifischen CTLs, welche infizierte Zellen erkennen und diese durch verschiedene Effektorfunktionen eliminieren.

Trotz des immensen Erfolgs klassischer Impfungen steht die Weiterentwicklung bestehender Impfstoffe im Fokus einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten. Im Zentrum dieser Forschungsprojekte steht häufig die Verabreichungsstelle des Impfstoffes. Muskeln und das Unterhautfettgewebe, welche die gewöhnlichen Verabreichungsstellen klassischer Impfstoffe darstellen, weisen nur eine geringe Anzahl von Immunzellen auf und erfordern eine hohe Dosis des Impfstoffes. Klassische Impfungen basieren zudem vorrangig auf einer prophylaktischen Verabreichung des Impfstoffes. Durch den steigenden Bedarf an therapeutisch wirksamen Impfmethode ist die permanente Weiterentwicklung bestehender Impfverfahren unerlässlich.

### 1.4.2 Transkutane Immunisierungen

Durch das gestiegene Verständnis über die Entstehung von Immunantworten und durch den technologischen Fortschritt konnten in den vergangenen Jahren neuartige Strategien für die Verabreichung von Impfstoffen entwickelt werden. Eine vielversprechende Strategie stellt hierbei die transkutane Immunisierung (*Transcutaneous Immunization*, TCI) dar. Bei der TCI werden Impfstoffe im Gegensatz zu herkömmlichen Impfungen direkt auf die Haut verabreicht (Gregory M. Glenn et al., 2000; Karande & Mitragotri, 2010). Im Vergleich zu herkömmlichen Impfungen zeichnet sich die TCI durch eine leichte Handhabung aus, die kein medizinisch geschultes Personal erfordert und vor allem bei der Logistik von Massenimpfungen einen Vorteil darstellen könnte. Darüber hinaus kann die Vakzinierung bei der TCI ohne Nadeln erfolgen, was vor allem in Schwellen- und Entwicklungsländern zur Vermeidung von nadelassoziierten Übertragungen lebensbedrohlicher Krankheitserreger beitragen kann. Die Entwicklung nadelfreier Applikationssystemen wurde von der WHO daher als ein Ziel von übergeordneter Bedeutung eingestuft.

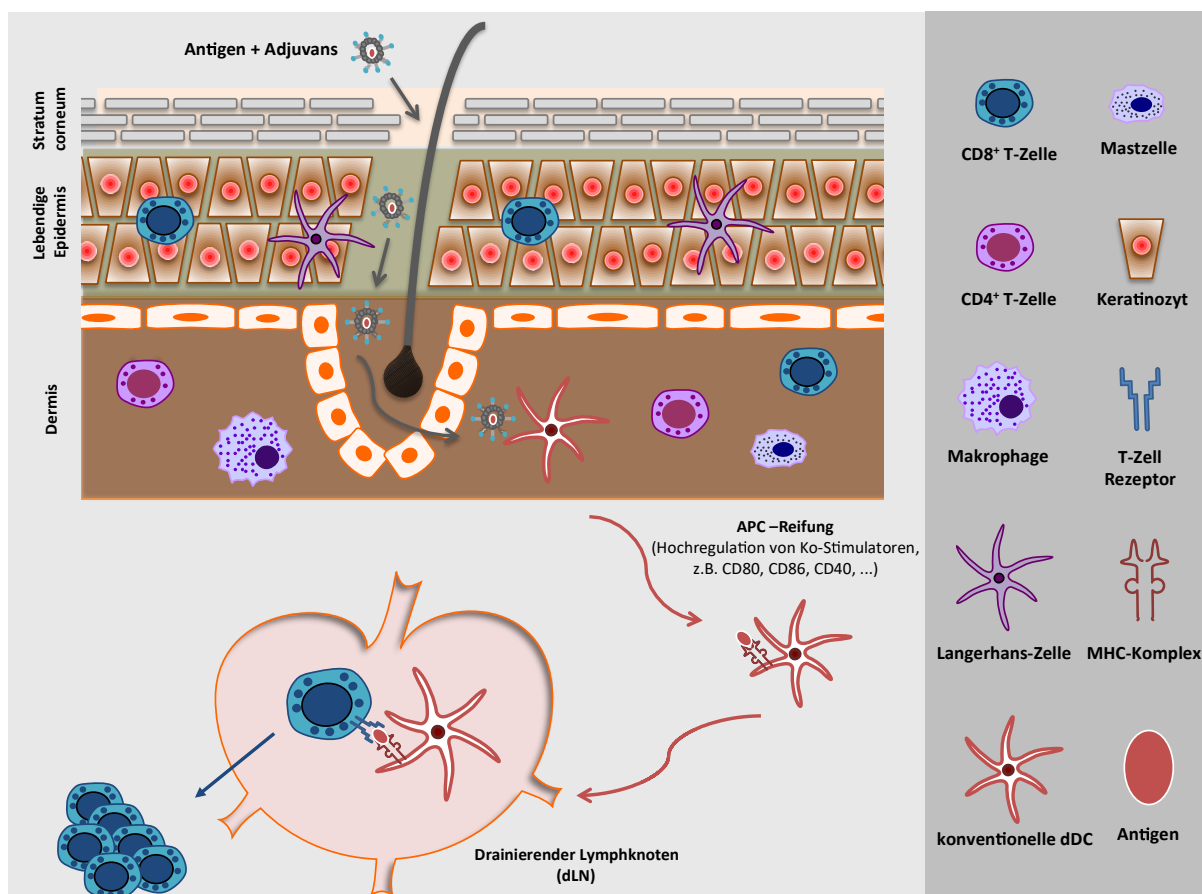
Vor allem aufgrund des SALT stellt die Haut ein attraktives Ziel für die Verabreichung von Impfstoffen dar (Egawa & Kabashima, 2011). Während der schichtartige Aufbau der Haut und vor allem das *Stratum corneum* einen effektiven Schutz vor eindringenden Pathogenen bietet, stellt diese Außenbarriere jedoch gleichzeitig ein immenses Hindernis beim Transport von Medikamenten oder Impfstoffen dar, welche ausschließlich den Transport niedermolekularer Substanzen erlaubt. Die Auswahl geeigneter Antigene und Hilfsstoffe ist bei einem Teil der TCI-Strategien aus diesem Grund limitiert (M. Y. Lee et al., 2013).

Der Stofftransport der Antigene erfolgt in der TCI vor allem durch interzelluläre Penetration oder durch Haarfollikel. Gelangt das Antigen zu den APCs kann es von diesen gebunden oder durch Endozytose aufgenommen werden, diese reifen daraufhin und migrieren in drainierende

## Einleitung

Lymphknoten. Dort angekommen präsentieren vor allem DCs den naiven T-Zellen MHC-Antigen-Komplexe und fördern deren Aktivierung, Proliferation und Differenzierung in T-Effektorzellen. Langerhans Zellen und migratorische dermale DCs sind hierbei befähigt, exogene Antigene CD8<sup>+</sup> T-Zellen via Kreuzpräsentation zu präsentieren (Stoitzner et al., 2006). Neben der Entstehung antigenspezifischer T-Zell-Antworten kann durch TCI-Strategien auch die Produktion von Antikörpern induziert werden (Scharton-Kersten et al., 2000). Während klassische Impfungen durch die Sezernierung von Antikörpern den Organismus prophylaktisch vor der Infektion schützen, erscheint die Induktion von antigenspezifischen CTLs nach der TCI hinsichtlich der Therapie von Virus- oder Tumorerkrankungen nützlich.

Die Entstehung adaptiver Immunantworten in Folge transkutaner Immunisierung ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen in der transkutanen Immunisierung.**

Die Epidermis und Dermis werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Subtypen der Immunzellen bevölkert. Die Verabreichung von Adjuvantien und Antigenen auf die Haut führt zur Aktivierung von APCs, vor allem dermalen DCs oder Langerhans-Zellen. Aktivierte APCsprozessieren oder binden das entsprechende Antigen auf MHC-Komplexen und präsentieren den MHC-Antigen-Komplex in drainierenden Lymphknoten naiven T-Zellen. Die naiven T-Zellen werden durch die Antigenpräsentation aktiviert und zur klonalen Expansion angeregt.

## Einleitung

In transkutanen Impfstoffen verwendete Antigene weisen, vergleichbar mit klassischen Impfstoffen, eine schwache Immunogenität auf, welche nicht ausreicht, um eine adaptive Immunantwort auszulösen. Aus diesem Grund enthalten transkutane Impfstoffe Hilfsstoffe, welche die Effizienz der Impfung amplifizieren.

### 1.4.2.1 Adjuvantien in der transkutanen Immunisierung

Adjuvantien sind Hilfsstoffe, welche die Wirksamkeit einer Substanz verstärken. Aufgrund der geringen Immunogenität der meisten Antigene sind Adjuvantien essentielle Bestandteile von Impfstoffen (Prendergast & Metz, 2012). Die gemeinsame Verabreichung von Antigen und Adjuvans ist hierbei entscheidend, um die Anergie von T-Zellen und der damit einhergehenden peripheren Toleranz zu verhindern.

Bei klassischen Adjuvantien handelt es sich um bakterielle Toxine, mikrobielle Produkte, Zytokine, Liposome und Mineralsalze, welche die Aktivierung von APCs bewirken. Die in klassischen Impfstoffen am häufigsten verwendeten Adjuvantien Alaun, Monophosphoryl Lipid A und MF59 sind aufgrund der beschränkten Durchlässigkeit des *Stratum corneum* ungeeignet, um diese als Wirkverstärker in der TCI einzusetzen (Del Giudice et al., 2018). Nachfolgend sind Adjuvantien transkutaner Impfstoffe und deren Wirkmechanismen exemplarisch aufgeführt:

#### ADP-ribosylierende Exotoxine

Zu der Gruppe der ADP-ribosylierenden Exotoxine gehören das Cholera-Toxin (CT), das hitzestabile Toxin (LT) aus *E. coli* und deren Derivate. Das CT wurde beispielsweise in der Pionierarbeit zur transkutanen Immunisierung von Glenn und Kollegen verwendet (Scharton-Kersten et al., 2000). Der exakte Wirkmechanismus des CT ist nicht bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass die gesteigerte Bildung von cAMP als Signalmolekül die Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine fördert (Barbieri, 2014). Während der Adjuvanseffekt des CT unabhängig von TLR-Signalwegen und dem Inflammasom ist, konnte eine Abhängigkeit von Typ 1 Interferonen aufgezeigt werden. In Folge der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine konnte eine verstärkte Aktivierung von APCs und deren Migration in drainierende Lymphknoten beobachtet werden. Im Zusammenhang mit der Verwendung des CT als Adjuvans in der TCI konnte sowohl die Produktion von Antikörpern als auch Induktion CD8<sup>+</sup> T-Zellen illustriert werden. Die Verabreichung von CT auf intakte murine Haut wird überdies mit der Entstehung von Autoimmunität in Verbindung gebracht (Palazzo et al., 2019).

#### CpG

CpG-Motive sind unmethylierte CpG-Dinukleotide innerhalb der DNA, welche in menschlicher und bakterieller DNA differenziell auftreten. Synthetisch hergestellte, nukleasestabile CpG-

## Einleitung

Oligonukleotide erzielen ihren Adjuvanseffekt durch die Induktion des TLR9/MyD88-Signalweges (Bode et al., 2011). TLR9-Agonisten regen pDCs zur Sekretion von Typ I Interferonen an und erhöhen die Anzahl der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche. Darüber hinaus werden Zytokine und Chemokine induziert, die zur Aktivierung von NK-Zellen, T<sub>H</sub>1-Zellen und CTLs führen.

### TLR-Liganden

Toll-like Rezeptoren stellen einen Subtyp der PRRs dar und werden meist von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert. Für jeden Subtyp der TLR gibt es verschiedene natürliche oder synthetisch hergestellte Agonisten, welche als Adjuvantien in der TCI eingesetzt werden können. Ein Beispiel für adjuvante TLR-Liganden sind Imidazoquinoline, deren Derivate häufig in antiviralen oder antiallergischen Cremes Verwendung finden. Imiquimod, Resiquimod oder Gardiquimod sind synthetisch hergestellte Vertreter der Imidazoquinoline, welche ihre immunstimulierende Wirkung durch die Bindung an den TLR7 erzielen. Imiquimod-haltige Cremes (z.B. Aldara®) werden beispielsweise bei der Behandlung von Basaliomen, aktinischen Keratosen und Feigwarzen eingesetzt (Rosso, 2008). Die Wirkung der Imidazoquinoline wird auf die Induktion des TLR7/MyD88-Signalweges zurückgeführt, welcher die Reifung von APCs und die Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine fördert (Prins et al., 2006). Synthetische TLR7-Agonisten bewirken vor allem die Entstehung von T<sub>H</sub>1-polarisierten Immunantworten und die Produktion von Antikörpern (Wagner et al., 1999).

#### *1.4.2.2 Die Methode der transkutanen Immunisierung mit der Imiquimod-haltigen Nanoemulsion IMI-Sol*

Die Methode der transkutanen Immunisierung mit dem TLR7-Liganden Imiquimod wurde vor einigen Jahren am Institut für Immunologie Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Radsak entwickelt. Ziel dieser Methode ist die Induktion von antigenspezifischen Immunantworten durch die topische Verabreichung des TLR7-Liganden Imiquimod auf die intakte Haut. Ursprünglich wurde diese Methode mit der kommerziell erhältlichen Imiquimod-haltigen Creme Aldara® durchgeführt (Rechtsteiner et al., 2005). Das MHC-Klasse-I restringierte Antigen SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>) aus dem Hühnereiweiß Ovalbumin wurde in Aldara® eingerührt und auf die rasierte, murine Rückenhaut aufgetragen. Eine Woche nach dem Auftragen von Aldara® mit dem Antigen konnten OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen im Blut der immunisierten Mäuse detektiert werden. Durch TLR7-unabhängige Effekte von Aldara® wurden jedoch auch MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) und regulatorische T-Zellen zur Expansion angeregt, was bei dieser Methode zu Limitierungen hinsichtlich der Entstehung immunologischer Gedächtnisantworten führte.

## Einleitung

Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Langguth, Institut für Pharmazie und Biochemie der JGU Mainz, die Imiquimod-haltige Nanoemulsion IMI-Sol entwickelt (Gogoll et al., 2016). Während der Anteil des Imiquimod in dieser Nanoemulsion identisch mit dem der kommerziell erhältlichen Creme Aldara® ist, konnten Unterschiede in den pharmazeutischen Eigenschaften beider Formulierungen beobachtet werden. Die Formulierung von Imiquimod in IMI-Sol ermöglicht im Vergleich zu Aldara® überdies die Verabreichung des MHC-Klasse-II-restringierten Antigens OVA<sub>323-337</sub>. Bei der topischen Verabreichung von IMI-Sol konnte im Vergleich zu Aldara® eine erhöhte Anzahl von IgG-Antikörpern und OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut immunisierter Mäuse detektiert werden. Die Induktion der adaptiven Immunantwort durch IMI-Sol wurde hierbei maßgeblich durch den TLR7/MyD88-Signalweg und die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR7 gesteuert, während IL-1R-Signalwege einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Immunisierungseffizienz hatten (Lopez et al., 2017).

Die Entstehung langanhaltender, anti-tumoraler oder anti-viraler Immunantworten war sowohl bei der TCI mit Aldara® als auch IMI-Sol von der Zugabe weiterer Adjuvantien abhängig. Durch die Blockade der inhibitorischen Signale des Koinhibitors CTLA-4 bei der TCI mit IMI-Sol konnte die Anzahl antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen im Blut erhöht und die mittlere Überlebensrate der Mäuse nach der Inokulation von B16OVA-Tumoren erhöht werden (Rausch et al., 2017). Die Ligation des Kostimulators CD40 auf APCs durch einen agonistischen Antikörper (Klon FGK-45) steigerte gleichermaßen die Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen und verlangsamte das Wachstum von B16OVA-Tumoren nach den TCI mit Aldara® oder IMI-Sol signifikant (Bialojan et al., 2019; Warger et al., 2007). Die hierbei verabreichten Co-Adjuvantien wurden aufgrund ihrer Größe und chemischen Eigenschaften durch intraperitoneale Injektionen verabreicht. Die Identifizierung von hautgängigen Adjuvantien im Rahmen der TCI mit Imiquimod ist daher von großem Interesse.

### 1.5 Das Hydroxyanthron Anthralin

Anthralin (1,8-Dihydroxy-9(10H)-anthracenone, auch als Dithranol bezeichnet) ist ein der Gruppe der Hydroxyanthrone zugehöriges synthetisches Derivat des Chrysarobin, welches ursprünglich aus dem Stamm und den Ästen des Goabaums gewonnen wurde und in der brasilianischen Naturheilkunde Verwendung findet. Die Synthese von Anthralin wurde in 1916 von der Bayer AG unter Paul Galewsky patentiert. Anthralin war der erste speziell für die Behandlung der *Psoriasis vulgaris* hergestellte Wirkstoff.

## Einleitung

Auf molekularer Ebene setzt sich Anthralin aus einem Anthracen (drei miteinander verknüpfte Benzolringe), zwei Hydroxylgruppen in Position 1 und 8 und einer Keto-Gruppe an Position 9 zusammen. In wässriger Lösung ist Anthralin extrem instabil und bildet durch lichtkatalysierte Autooxidation das Anthrachinon Danthron (Sa e Melo et al., 1983). Durch eine Protonen-Eliminierungsreaktion an C-10, dem reaktiven Zentrum des Moleküls, entsteht das hochreaktive 10-Anthranyl-Radikal. Dieses reagiert mit Sauerstoff ( $O_2$ ) und erzeugt dabei weitere Anthralin-Radikale und reaktive Sauerstoffspezies (Singulett-Sauerstoff, Superoxid-Radikale und Hydroxyl-Radikale). Die molekularen Veränderungen von Anthralin während der Oxidation sind in Abbildung 7 dargestellt.

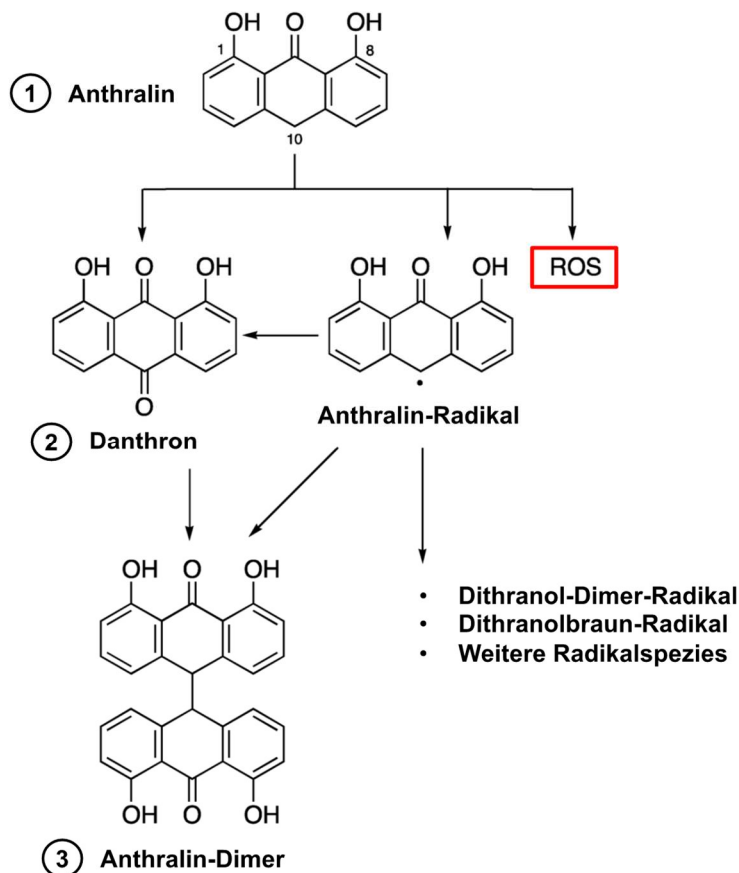


Abbildung 7: Strukturformel und Derivate des Anthralin.

Das Hydroxyanthron Anthralin setzt sich aus drei miteinander verknüpften Benzolringen zusammen. Charakteristisches Merkmal des Moleküls ist das reaktive Zentrum an C-10 (1). Durch lichtkatalysierte Autooxidation entstehen Anthralin-Radikale oder das Anthrachinon Danthron (2). Hochreaktive Anthralin-Radikale können darüber hinaus weitere Radikalspezies induzieren oder das inaktive Anthralin-Dimer bilden (3). Abgewandelt nach (Lau et al., 2013)

Anthralin hat amphiphile Eigenschaften und kann daher sowohl in hydrophilen als auch in lipophilen Formulierungen vorliegen. In lipophiler Umgebung konnte jedoch eine gesteigerte Durchlässigkeit des *Stratum corneum* für Anthralin beobachtet werden (Kammerau et al., 1975). Vorangegangene Studien konnten zudem bereits 60 Minuten nach der Behandlung die

## Einleitung

maximale Konzentration von Anthralin in der Epidermis messen, was im Kontext der *Psoriasis vulgaris* zur Anwendung von Anthralin in der hochdosierten Kurzkontakt- („Minuten“-) Therapie führte (Boer & Smeenk, 1986; Schaefer, 1985).

Trotz der andauernden Verwendung von Anthralin als Antipsoriatikum konnte dessen Wirkmechanismus bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Experimentelle Arbeiten mit Keratinozyten konnten eine Akkumulation von Anthralin in den Mitochondrien aufzeigen, was zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der Mitochondrien führte (McGill et al., 2005). Anthralin bewirkte in diesen Studien eine Inhibition von mitochondrialen Enzymen, welche für den Ablauf der oxidativen Phosphorylierung essentiell sind. Über die Einschränkungen des oxidativen Energiestoffwechsels hinaus wurden inhibierende Effekte von Anthralin auf den Pentose-Phosphat-Weg, die Calmodulin-Aktivität, die Polyamin-Biosynthese und Lipoxygenase-Signalwege festgestellt (E. Kohen et al., 1986; McGill et al., 2005; Tucker et al., 1986). Obwohl der Wirkmechanismus von Anthralin bisher nur unzureichend geklärt werden konnte, deutet eine Vielzahl von Studien auf antiproliferative und immunsuppressive Effekte von Anthralin in psoriatischer Haut hin.

Ein Nebeneffekt bei der topischen Verabreichung von Anthralin auf gesunde Haut ist die Entstehung einer Entzündungsreaktion (Lawrence et al., 1984). Anthralin induziert innerhalb der ersten 24 Stunden eine Rötung der Haut und führt zu einem Anschwellen des behandelten Hautgewebes. Die für die Entzündung verantwortlichen Mediatoren konnten trotz zahlreicher Studien nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass die entzündungsfördernde Wirkung von Anthralin mit der Induktion von Sauerstoffradikalen zusammenhängt (Finnen et al., 1984; Lange et al., 1998; K. Müller & Kappus, 1988; Klaus Müller, 1997; Klaus Müller et al., 1987). Während Hydroxyl-Radikale scheinbar einen vernachlässigbaren Anteil leisten, werden vor allem Superoxid-Radikale mit einer entzündungsfördernden Wirkung in Anthralin-behandelter Haut in Verbindung gebracht (Bruce et al., 1987). Die entzündungsfördernden Eigenschaften von Anthralin sind in psoriatischer Haut grundsätzlich geringer ausgeprägt als in gesunder Haut.

Potentielle Effekte von Anthralin auf Immunzellen wurden hingegen bisher nur unzureichend untersucht. So konnten unterschiedliche Studien widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen von Anthralin auf neutrophile Granulozyten und Monozyten präsentieren (Benezeder et al., 2020; Mrowietz et al., 1992; Schröder, 1986; Schroder et al., 1985). Dermale DCs, Langerhans-Zellen und gewebsresidente T-Zellen zeigten in psoriatischer Haut einen weitestgehend unveränderten Phänotyp (Baker et al., 1985). Da sich ein Großteil der Studien bezüglich des immunmodulatorischen Effekts von Anthralin auf psoriatische Haut bezieht, sind die Auswirkungen auf gewebsresidente Immunzellen in gesunder Haut weitgehend ungeklärt.

# Einleitung

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die von Rechtsteiner und Kollegen entwickelte TCI mit dem TLR7-Liganden Imiquimod erzeugt antigenspezifische T-Zell-Antworten, welche jedoch hinsichtlich ihrer Qualität und Langlebigkeit limitiert sind. Adjuvantien spielen bei der Entwicklung von Impfstoffen eine zentrale Rolle, da sie Immunantworten in Folge der Impfung verstärken. Durch die einzigartige Struktur der Haut sind geeignete Adjuvantien für die TCI jedoch rar. Die Identifizierung eines hautgängigen Adjuvans, welches die antigenspezifischen T-Zell-Antworten in Folge der TCI mit Imiquimod optimiert, war daher das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung eines potentiellen Adjuvanseffektes des Hydroxyanthrons Anthralin auf die Qualität und Langlebigkeit der T-Zell-Antwort nach der Imiquimod-basierten TCI. Von großer Bedeutung war daher auch der Einfluss der verwendeten Agenzien auf APCs, welche die Grundlage für die Entstehung adaptiver Immunantworten darstellen. Die Beeinflussung von APCs durch Anthralin und Imiquimod sollte *in vivo* anhand des Kostimulators CD70 beispielhaft untersucht werden. *In vitro* Studien sollten darüber hinaus direkte Effekte von Anthralin und Imiquimod auf APCs analysieren.

Der Wirkmechanismus von Anthralin bei der Behandlung der *Psoriasis vulgaris* wird in vorangegangenen Arbeiten vor allem mit hochreaktiven Anthralin-Derivaten und der Entstehung von ROS assoziiert. Der Einfluss reaktiver Oxidationsprodukte und des ROS-induzierten NLRP3-Inflammasoms auf quantitative und qualitative Aspekte der T-Zell-Antwort sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, um molekulare Ursachen für den Adjuvanseffekt von Anthralin in der TCI zu identifizieren.

Abschließend sollten neben der Darstellung einer prophylaktischen Wirksamkeit neuartige Immunisierungsprotokolle mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod entwickelt werden, welche in nachfolgenden Arbeiten wirksame therapeutische Impfungen in Tumormodellen ermöglichen.

## Material und Methoden

### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

**Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Einweg-Wägeschalen	VWR (Leuven, Belgien)
ELISpot Platten	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Entsorgungsbeutel	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kavitäten-Platte 6-well	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kavitäten-Platte 96-well (F, U oder V-Boden)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Latexhandschuhe	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Petrischale	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Reagenzgefäße (Durchflusszytometrie)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reagenzreservoir	Corning incorporated (New York, USA)
Seahorse XFp (8-Kavitätenmikroplatte)	Seahorse Bioscience (Santa Clara, USA)
Skalpell	Dahlhausen (Halberstadt, Deutschland)
Spritzen (1 ml)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzen (5 ml; 10 ml)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Verschlussfolie	Hecht-Assistent (Sondheim, Deutschland)
Zellkulturflasche (25 cm <sup>2</sup> ; 75 cm <sup>2</sup> ; 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellsieb (40 µm; 70 µm)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

## Material und Methoden

### 2.2 Laborgeräte

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius CP64 (Göttingen, Deutschland)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Sanyo (München, Deutschland)
Durchflusszytometer (LSRII, Symphony)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Elektrorasierer	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
ELISpot Reader AiD iSpot (ELR08IFL)	AiD Diagnostika (Straßberg, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-8000K)	Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland)
Gefrierschrank/-truhe (-20°C, -70°C)	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Infrarotlampe (INFRARED-H95E)	Philips (Hamburg, Deutschland)
Injektionskäfig	Kent Scientific (Torrington, USA)
Inkubations-Wasserbad (Aqualine AL12)	Lauda (Königshofen, Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Hereaus (Hanau, Deutschland)
Langhaarschneider	Panasonic (Hamburg, Deutschland)
MACS-Seperator	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Messschieber	Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Minizentrifuge (MCF-2360)	LMS (Tokyo, Japan)
Neubauerzählkammer	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pipetboy comfort	INTEGRA bioscience (Fernwald, Deutschland)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Plattformschüttler (Titramax 100)	Heidolph(Schwabach, Deutschland)
Seahorse XFp Analyzer	Seahorse Bioscience (Santa Clara, USA)
Sterilbank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Vortex Mixer 230V	VWR (Leuven, Belgien)
Zellzählgerät (Vet Animal blood counter)	Scil veterinary excellence (Viernheim, Deutschland)

## Material und Methoden

### 2.3 Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen und Reagenzien

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen und Chemikalien angegeben. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen der höchsten Reinheitsstufe (*p.a.*).

#### 2.3.1 Medien zur Kultivierung von Zellen

##### Aminosäure-Mischung

Alanin	32 mM
Asparagin	17 mM
Asparaginsäure	26 mM
Glutaminsäure	58 mM
Prolin	40 mM
Natriumpyruvat	114 mM

Die aufgeführten Aminosäuren wurden in vollentsalztem (VE) Wasser gelöst und für 3 h bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde eine zweite Lösung in VE-Wasser vorbereitet (1 mM Biotin, 184 µM Vitamin B12 und 50 µM HCl) und im Verhältnis 1:185 zu der Aminosäure-Mischung hinzugefügt.

##### Fötale Kälberserum (FCS)

Das fötale Kälberserum (FCS) wurde von der Firma Gibco bezogen. Zur Inaktivierung der Komplementkomponenten wurde das FCS vor Gebrauch 60 min bei 56 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend 20 min bei 600 x g zentrifugiert.

##### Iscove's Medium

Natriumhydrogencarbonat	44 mM
HEPES	12,5 mM
Aminosäure-Mischung	1:100
Cystein-Lösung (58 µM in 0,25 M HCl)	1:2500
Natrium-Selenit	128 µM
Penicillin-Streptomycin	1 ‰ (v/v)
β-Mercaptoethanol	50 µM

## Material und Methoden

mit Trockenpulver DMEM, pH-Wert: 6,9

### Minimal Essential Medium (MEM)

MEM-Trockenpulver	10,58 g/l
HEPES-Puffer	4,77 g/l
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
2-Mercaptoethanol	50 µM

in VE-Wasser gelöst und steril filtriert (0,2 µm)

### Natriumpyruvat-Lösung

Es wurde eine 0,1 M Natriumpyruvat-Lösung in VE-Wasser angesetzt. Diese wurde anschließend 0,2 µm steril filtriert.

### Penicillin/Streptomycin-Lösung

Penicillin	172 µM
Streptomycin	137 µM

in VE-Wasser

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

FCS	5 % /10 % (v/v)
Natriumpyruvat	0,1 M
Glutamin	200 mM

in Iscove's Medium

## 2.3.2 Puffer und Lösungen

### ACK-Puffer

Ammoniumchlorid	155 mM
Kaliumhydrogencarbonat	10 mM

## Material und Methoden

EDTA 0,1 mM

### AEC-Lösung

AEC-Tablette 1

Dimethylformamid 2,5 ml

in Natriumacetatpuffer auf 50 ml auffüllen und 0,45 µm steril filtrieren

### EDTA-Puffer

EDTA 30 mM

Natriumazid 0,01 % (w/v)

in 1x PBS gelöst

### FACS-Puffer

BSA (0,2 µM) 0,5 % (v/v)

Natriumazid 0,01 % (w/v)

EDTA 5 mM

### Gey's Lysepuffer

Ammoniumchlorid 16 mM

Kaliumhydrogencarbonat 10 mM

EDTA 126 µM

in 1x PBS gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und 0,2 µm steril filtriert

### GM („MACS“)-Puffer

BSA 0,5 % (v/v)

EDTA 5 mM

NaN<sub>3</sub>-Lösung 0,01 % (v/v)

in PBS und unmittelbar vor der Verwendung entgast

## Material und Methoden

### Ketamin-Rompun-Narkoselösung

Für die Herstellung einer Narkose-Stammlösung wurde eine Ampulle Ketamin (2 ml, 50 mg/ml) mit 800 µl Rompun (2 %) gemischt. Die angesetzte Narkose-Stammlösung wurde für die Herstellung einer Narkose-Arbeitslösung 1:5 mit PBS verdünnt und die Arbeitslösung für maximal 14 Tage bei 4 °C gelagert.

### Kristallviolett-Färbelösung

Kristallviolett	5 g
Formaldehyd (37 %)	50 ml
NaCl	8 g
ddH <sub>2</sub> O	450 ml
EtOH (96 %)	500 ml

### Natriumacetatpuffer

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

### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Natriumchlorid	8,18 g/l
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,56 g/l
in VE-Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und 0,2 µm steril filtriert	

### Trypanblaulösung

Trypanblau (in VE-Wasser)	0,2 % (w/v)
Natriumchlorid (in VE-Wasser)	4,25 % (w/v)

Die beiden Lösungen wurden im Verhältnis 1:5 gemischt. Diese Lösung wurde vor der Verwendung 1:10 in PBS verdünnt.

## Material und Methoden

### 2.3.3 Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
3-Amino-9-ethyl-carbazole (AEC)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BSA	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
CFSE	Invitrogen™ Molecular Probes
Dithranol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DNase-I	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanol (96 %)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
FCS	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Foxp3/ Transcription Factor Staining	eBioScience™ (San Diego, USA)
Histofix	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ketamin Inresa 2ml (Ketaminhydrochlorid)	Inresa (Freiburg, Deutschland)
Kollagenase-4	Worthington Biochemical Corporation (New Jersey, USA)
Kristiallviolett	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumpyruvat	Serva (Tübingen, Deutschland)
OVA <sub>257-264</sub> (SIINFEKL)/ OVA <sub>323-337</sub> (OT-II)	Peptides & elephants (Henningsdorf, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Serva (Tübingen, Deutschland)
Resiquimod (R-848)	InvivoGen (San Diego, USA)
Rompun 2 % (Xylazinhydrochlorid)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
RPMI	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Trypanblau	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Tween-20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Vectastain ABC-Kit	Maravai Life Sciences (San Diego, USA)
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
α-Tocopherol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

## Material und Methoden

### 2.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper.

Verwendung	Epitop	Fluorophor	Klon	Konzentration	Hersteller
<b>FACS</b>	CD8	Pacific Blue	53-6.7	1:500	BioLegend
	CD8	BV510	53-6.7	1:500	BioLegend
	CD4	BV711	RM4-5	1:500	BioLegend
	CD3	PE-Cy5	145-2C11	1:400	BioLegend
	CD11b	PE-Cy7	M1/70	1:400	BioLegend
	CD11c	PE-Cy7	N418	1:500	BioLegend
	MHCII	Pacific Blue	M5/114.15.2	1:1000	BioLegend
	CD44	APC	IM7	1:400	BioLegend
	CD62L	FITC	MEL-14	1:1000	BioLegend
	CD69	BV605	H1.2F3	1/400	BioLegend
	CD103	BV421	M290	1:200	BD
	CD80	BV605	16-10A1	1:1000	BioLegend
	CD86	PE	GL-1	1:1000	eBioscience
	CD40	APC	1C10	1:500	eBioscience
	CD45pan	BV785	30-F11	1:500	BioLegend
SIINFEKL-Tetramer	PE	25.D1.16	1:125	Eigenherstellung	
<b>ELISpot</b>	IFN $\gamma$	-	AN18	1:100	Mabtech
	anti-IFN $\gamma$ -bio	-	R4-6A2	1:500	Mabtech
	IL-4	-	11B11	1:100	Mabtech
	anti-IL-4-bio	-	BVD6-24G2	1:500	Mabtech
	IL-17A	-	IL-17-I	1:100	Mabtech
	anti-IL-17A-bio	-	MT2270	1:500	Mabtech
	<b>in vivo</b>	CD40	-	FGK-45	30 $\mu$ g
CD70		-	FR-70	250 $\mu$ g	Hideo Yagita
CD4		-	GK-1.5	500 $\mu$ g	Eigenherstellung

## Material und Methoden

### 2.5 Verwendete Zelllinien

**RAW309:** Die murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW309 (ATCC® TIB-69™) wurde *in vitro* in TM10 bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

**L929:** Die murine Fibroblasten-Zelllinie L929 wurde von der AG Bopp, Institut für Immunologie Mainz, zur Verfügung gestellt und in TM10 bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

**BSC-40:** Die Nierenzellen-Zelllinie BSC-40 aus der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*; ATCC® CRL-2761™) wurde von der AG Probst, Institut für Immunologie Mainz, zur Verfügung gestellt und in DMEM (mit 10 % FCS) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.6 Verwendete Mausstämme

Alle Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen gezüchtet und gehalten. Sie waren einem künstlichen 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Raumtemperatur lag konstant bei 25 ± 3 °C. Die Haltung erfolgte in Tierhaltungseinrichtungen des „*Translational Animal Research Center*“ (TARC) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz nach aktuellen Tierschutzbedingungen. C57B6/J OlaHsd-Mäuse wurden von der Firma Envigo bezogen und nach ihrer Anlieferung für mindestens zwei Wochen in den Tierhaltungseinrichtungen des TARC Mainz gehalten, bevor sie in Experimenten eingesetzt wurden. Die Tiere für die *in vivo* Experimente waren zwischen 8-14 Wochen alt.

Tabelle 6: Verwendete Mausstämme.

Mausstamm	Herkunft	Beschreibung
C57B6/J	Eigenzucht	-
C57B6/J OlaHsd	Envigo	-
CD11cCre	Institut für Molekulare Medizin, Mainz, Prof. Ari Waismann	Expression der Rekombinase Cre in Dendritischen Zellen. Stamm kann zusammen mit loxP-flankierten Gensegmenten zur Generierung zellspezifischer Gen-Deletionen verwendet werden.

## Material und Methoden

NLRP3 <sup>-/-</sup>	Prof. Alexander Weber, Uni Tübingen	Deletion des NLRP3-Genes
LysMCre	Centrum für Thrombose und Hämostase, Mainz, Prof. Philip Wenzel	Expression der Rekombinase Cre in myeloiden Zellen. LysMCre Mäuse erlauben eine Deletion von loxP-flankierten Zielgenen in myeloiden Zellen.
TLR7 <sup>fl/fl</sup>	Helmholtz-Institut, München	Mäuse deren <i>tlr7</i> -Gene loxP-flankiert sind

### 2.7 Virus

Vaccinia Virus OVA  
(VV-OVA)

Rekombinantes Vaccinia Virus, welches Epitope des Ovalbumin auf der Virusoberfläche präsentiert. Das Virus wurde von der AG Probst, Institut für Immunologie Mainz, zur Verfügung gestellt.

### 2.8 Adjuvantien für die transkutane Immunisierung

#### 2.8.1 Anthralin- und Danthron/Vaseline

Die Anthralin- und Danthron/Vaseline wurden von der Apotheke der Universitätsmedizin Mainz nach standardisierten Protokollen hergestellt. Diesen Rezepturen wurde zur Stabilisierung 0,1 % Ascorbyl-6-palmitat (Antioxidationsmittel und Emulgator) beigefügt.

#### 2.8.2 IMI-Sol

Die Imiquimod-haltige Nanoemulsion IMI-Sol wurde im Rahmen einer Kooperation von der AG Langguth, Institut für Pharmazie und Biochemie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, unter standardisierten Bedingungen nach folgendem Protokoll hergestellt: Gereinigtes Wasser, Sucrose-Fettsäureester S-1670 und Imiquimod wurden gemeinsam mit 25 g Zirkoniumoxid-Mahlkugeln (Ø 1mm) in einen 45 ml Fritsch™ Zirkoniumoxid-Mahlbecher gegeben und mithilfe einer Fritsch™ Pulverisette 6 Planetenmühle bei 650 x g für zwei Zyklen á 20 min mit je 10 min Pausenzeiten vermahlen. Nach Abtrennen der Mahlkegel von der Suspension wurde die Formulierung unter Verwendung eines Avestin Emulsiflex C3

## Material und Methoden

Hochdruckhomogenisators für vier Zyklen bei 500 bar und für acht Zyklen bei 1000 bar homogenisiert. Anschließend wurde die Ölkomponente, bestehend aus Squalen:Tocopherol 6:4 (m/m), zu der Suspension zugegeben und mithilfe eines Ultra Turrax® bei 8000 x g für 5 min präemulgiert. Für die Herstellung einer Nanoemulsion wurde die Dispersion für jeweils vier Zyklen bei 500, 1000 und 1500 bar hochdruckhomogenisiert. Die Nanoemulsion wurde anschließend für 15 min bei -85 °C eingefroren. Die Probenhöhe auf dem Probenteller der wässrigen Formulierung betrug etwa 5 mm. Die 24-stündige Primärtrocknung der gefrorenen Nanoemulsion erfolgte mithilfe eines Christ alpha 1-4 *freeze dryers* bei -21 °C und einem maximalen Vakuum von 0,055 mbar. Im Anschluss erfolgte die Sekundärtrocknung bei welcher die Formulierung für 2 h bei 25 °C und 0,055 mbar getrocknet wurde. Die Nanoemulsion wurde nachfolgend bis zu ihrer Verwendung in der TCI bei -20 °C gelagert, um eine gleichbleibende Wirksamkeit über einen langen Zeitraum (max. vier Wochen) zu gewährleisten.

### 2.8.3 Salbengrundlage (Basiscreme DAC, *cremor basalis*)

Die im Rahmen der TCI verwendete Salbengrundlage entspricht einer Basiscreme nach DAC (Deutscher Arzneimittel Codex). Es handelt sich um eine amphiphile Öl-in-Wasser-Emulsion, welche in großen Mengen sowohl lipophile als auch hydrophile Substanzen aufnehmen kann. Die Salbengrundlage wurde zur Verabreichung der Ovalbumin-Peptide OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> in der TCI verwendet. Nachfolgend sind die einzelnen Bestandteile der Salbengrundlage aufgelistet: Glycerolmonostearat, Cetylalkohol, Mittelkettige Triglyceride (MCT), Vaseline, Macrogol-20-glycerolmonostearat; Propylenglycol, gereinigtes Wasser.

## 2.9 *In vivo*-Experimente

### 2.9.1 Betäubung von Versuchstieren mit Ketamin und Rompun

Vor der Durchführung der TCI wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von 150-250 µl Ketamin-Rompun-Arbeitslösung (abhängig vom Körpergewicht der Maus) narkotisiert.

### 2.9.2 Transkutane Immunisierung

Die transkutane Immunisierung (*transcutaneous immunization*, TCI) der Mäuse erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Ohrhaut narkotisierter Mäuse wurde topisch mit Anthralin/Vaseline (1/16 % - 1/128%; 25 mg/ Ohr) oder Danthron/Vaseline (1/16 %; 25 mg/ Ohr) behandelt (Tag 0). Am darauffolgenden Tag wurde die Imiquimod-haltige Nanoemulsion IMI-Sol auf die vorbehandelte Ohrhaut aufgetragen (50 mg/ Ohr, Tag 1). Je 100 µg OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (je Ohr, gelöst in je 10 µl DMSO) wurden in Salbengrundlage verrührt und auf

## Material und Methoden

die Anthralin und IMI-Sol behandelte Ohrhaut aufgetragen (Tag 1). Abbildung 9 veranschaulicht das in dieser Arbeit angewandte Protokoll der TCI.

### 2.9.3 Injektion von monoklonalen Antikörpern und Radikalfängern in der TCI

Die nachfolgenden Substanzen wurden im Rahmen der TCI *in vivo* verabreicht:

#### Monoklonaler CD70-Antikörper (Klon FR-70)

Der CD70/CD27-Signalweg ist an der Kostimulation und Expansion naiver CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren Differenzierung in T-Gedächtniszellen beteiligt (Borst et al., 2005). Der monoklonale Antikörper FR-70 bindet an CD70 auf APCs, verhindert die Interaktion von CD70 mit CD27 auf T-Zellen und unterbindet somit die Induktion des CD70/CD27-Signalwegs. FR-70 wurde von Prof. Dr. Hideo Yagita (Juntendo University, Tokyo, Japan) bereitgestellt und an Tag 0, 1, 4 und 7 des Immunisierungsprotokolls durch eine intraperitoneale Injektion verabreicht (je 250 µg FR-70 in 100 µl PBS).

#### Monoklonaler CD4-Antikörper (Klon GK1.5)

Der CD4-Rezeptor wird auf der Zelloberfläche von Immunzellen, vorrangig T-Helferzellen, exprimiert. Der monoklonale Antikörper GK1.5 bindet an den CD4-Rezeptor und ermöglicht die Depletion von CD4<sup>+</sup> Zellen, einschließlich aller Subtypen der T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen. GK1.5 wurde einen Tag vor Beginn der TCI durch eine intravenöse Injektion verabreicht (500 µg GK1.5 in 100 µl PBS). Eine vollständige Depletion CD4<sup>+</sup> Zellen wurde vor Beginn der TCI durch durchflusszytometrische Analysen von Blutproben verifiziert. An Tag 7 des Immunisierungsprotokolls wurde GK1.5 erneut appliziert.

#### α-Tocopherol

Freie Radikale, einschließlich *reactive oxygen species* (ROS) und *reactive nitrogen species* (RNS), entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukte der Zellatmung und fungieren im Immunsystem als bedeutendes Signalmoleküle, unter anderem in der Migration von Immunzellen und der Aktivierung von T-Zellen. α-Tocopherol (Vitamin E) bindet mit seinem Chromanring freie Radikale und unterbindet deren nachfolgende Signalkaskade (Yamauchi et al., 1995). α-Tocopherol wurde 2 h vor der Verabreichung von Anthralin oder IMI-Sol intraperitoneal injiziert (15 mg, gelöst in Maisöl).

### 2.9.4 Charakterisierung der Entzündungsreaktion nach transkutanen Immunisierungen

Die Schwellungsreaktion (*tumor*) des immunisierten Ohrhautgewebes wurde durch die Bestimmung der Ohrdicke mit einem Mikrometer quantifiziert (Tag 0 bis 6). Die Entzündungsreaktion des Ohrhautgewebes in Folge transkutaner Immunisierung wurde

## Material und Methoden

zudem makroskopisch durch die Entstehung von Rötung (*rubor*) und Wärme (*calor*) charakterisiert.

### 2.9.5 Entnahme von Blutproben und Nachweis von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Blutentnahme erfolgte 7, 14 oder 35 Tage nach der TCI durch Punktion der Schwanzvene mit einem Skalpell. Im Rahmen der „Prime-Boost“-Immunisierungen erfolgte die Entnahme der Blutproben wöchentlich bis Tag 49. Es wurden 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl EDTA-Puffer vorbereitet, in welchen die Blutropfen aufgefangen und mit dem EDTA-Puffer vermischt wurden. Das Gemisch aus Blut und EDTA-Puffer wurde anschließend in 15 ml Reagenzgefäße überführt und die Erythrozyten durch die Zugabe von 3 ml ACK-Puffer (10 min, RT) lysiert. Nach Beendigung der Lyse (500 x g, 4 min, 4 °C) wurden die Zellpellets in eine 96-Kavitäten-Platte mit Spitzboden überführt und zweimal in FACS-Puffer gewaschen. Die Oberflächenfärbung der Zellen wurde wie unter 2.10.6 beschrieben durchgeführt. Die Färbung der Zellen erfolgte nach dem Prinzip der Oberflächenfärbung. Dabei wurden OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch folgende murine Antikörper fluoreszenzgefärbt und durchflusszytometrisch analysiert: CD8α-Pacific Blue; OVA<sub>257-264</sub> H-2K<sup>b</sup>-spezifisches Tetramer-PE; CD44-APC; CD62L-FITC.

### 2.9.6 *In vivo*-Zytotoxizitätstest

Der *in vivo* - Zytotoxizitätstest diente der Quantifizierung der Zytotoxizität OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. An Tag 8 oder 36 nach transkutaner Immunisierung wurden CFSE-gefärbte, OVA<sub>257-264</sub>-beladene Zielzellen intravenös in immunisierte Mäuse injiziert und die Lyse der Zielzellen durch antigenspezifische CTLs *in vivo* untersucht.

#### Vorbereitung der CFSE-gefärbten, OVA<sub>257-264</sub>-beladenen Zielzellen:

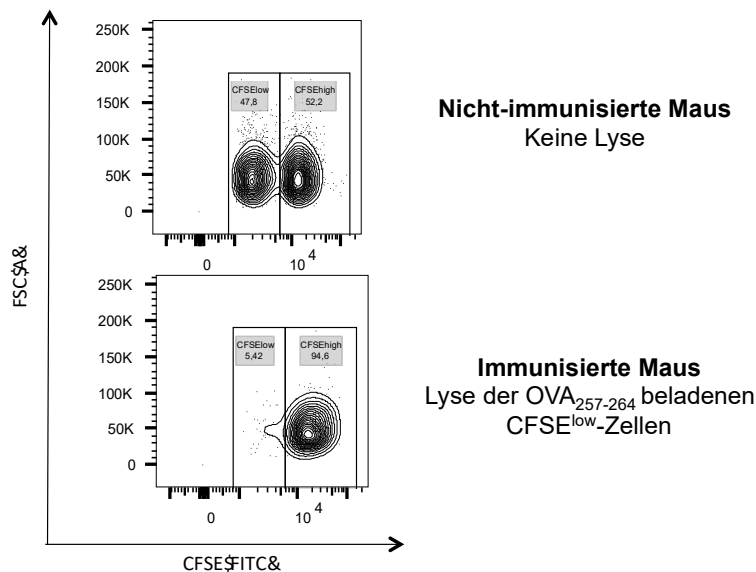
Als Zielzellen wurden murine Milzzellen verwendet. Hierzu wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> euthanasiert, die Milz entnommen und eine Milzzellsuspension hergestellt (siehe 2.10.2) Eine Hälfte der Milzzellen wurde mit einer hohen Konzentration (4 µM; CFSE<sup>high</sup>), die andere mit einer zehnfach niedrigeren Konzentration (0,4 µM; CFSE<sup>low</sup>) CFSE für 5 min bei 37 °C in einem Wasserbad markiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml FCS abgestoppt und die Zellen mit MEM-Kulturmedium (+ 2 % FCS) gewaschen (500 x g, 4 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in MEM-Kulturmedium aufgenommen und die CFSE<sup>high</sup>/CFSE<sup>low</sup>-markierten Zellen für 1 h bei 37 °C mit OVA<sub>257-264</sub> (1 µg/ml) beladen. Ungebundenes OVA<sub>257-264</sub>-Peptid wurde nach der Inkubation mit 1x PBS in einem Waschschrift entfernt (500 x g, 4 min, 4 °C). Die Lebendzellzahlen beider Ansätze wurden daraufhin bestimmt, die CFSE<sup>high</sup> und CFSE<sup>low</sup> Suspensionen auf je 2 x 10<sup>7</sup> Zellen/ 300 µl in 1x PBS eingestellt und beide Ansätze 1:1 vereinigt. Abschließend wurden je 300 µl der CFSE-markierten Zellsuspension intravenös in

## Material und Methoden

die Schwanzvene immunisierter oder unbehandelter Mäuse injiziert.

### Analyse der *in vivo* Zytotoxizität mittels Durchflusszytometrie:

Die Analyse der Zytotoxizität erfolgte standardmäßig 20 h nach der intravenösen *Verabreichung* der CFSE-gefärbten Zielzellen. Hierzu wurden die immunisierten Mäuse entweder mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und eine Milzzellsuspension hergestellt (siehe 2.10.2) oder eine Blutprobe an der Schwanzvene entnommen (siehe 2.9.5). Die Messung und Auswertung des *in vivo* - Zytotoxizitätstests erfolgte an einem Durchflusszytometer. Die injizierten CFSE-gefärbten Zielzellen bildeten bei der Analyse am Durchflusszytometer zwei abgrenzbare Populationen (CFSE<sup>high</sup> und CFSE<sup>low</sup>) im FITC-Kanal. Kommt es bei einer erfolgreichen Immunisierung zur Entstehung funktionstüchtiger OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, erkennen und lysieren diese CTLs die OVA<sub>257-264</sub>-beladenen, CFSE<sup>low</sup>-markierten Zielzellen. Diese Reaktion ist durch eine prozentuale Abnahme des Anteils der CFSE<sup>low</sup>-Population an den FITC<sup>+</sup> Zellen zu erkennen. Zur Bestimmung des Anteils der CFSE<sup>low</sup>-Zellen an den FITC<sup>+</sup> Zielzellen wurde bei jeder Probe eine konstante Anzahl CFSE<sup>high</sup>-markierter Zellen gemessen. Die durchflusszytometrische Analyse CFSE-gefärbter Zielzellen ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen lysieren peptid-beladene Zielzellen.**

Der *in vivo*-Zytotoxizitätstest dient dem Nachweis antigen-spezifischer CTL nach einer Immunisierung mit dem selbigen Peptid. Dafür wurden Zielzellen mit zwei unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen (0,4µM; 4µM) gefärbt. Die CFSE<sup>low</sup>-Fraktion wurde zusätzlich mit dem Peptid beladen. Bei einer Anwesenheit von CTL ist eine Lyse der peptid-beladenen CFSE<sup>low</sup>-Zellen zu erkennen. Die CFSE<sup>high</sup>-Fraktion bleibt erhalten.

Die spezifische Lyse der CFSE<sup>low</sup>-Zellen durch OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde wie folgt berechnet:

## Material und Methoden

$$\text{Spezifische Lyse (in \%)} = 100 \times (1 - (\text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{negativ}} / \text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{immunisiert}}))$$

$\text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{negativ}}$  = Mittelwert (in %) der  $\text{CFSE}^{\text{low}}$ -Zellen nicht-immunisierter Mäuse

$\text{CFSE}^{\text{low}}_{\text{immunisiert}}$  = Prozentualer Anteil der  $\text{CFSE}^{\text{low}}$ -Zellen einer immunisierten Maus

### 2.9.7 Nachweis der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-17A nach der Restimulation antigenspezifischer T-Zellen mittels ELISpot-Analysen

Die Durchführung der ELISpot (*Enzyme Linked Immuno Spot*) - Analysen diente dem Nachweis von *ex vivo* sezernierten Zytokinen von antigenspezifischen T-Zellen in Folge transkutaner Immunisierung. Für diesen Nachweis wurden Multiscreen Filter-Platten der Firma Merck Millipore verwendet, deren Membran zunächst mit 35 % Ethanol (20  $\mu\text{l}$  je Kavität) aktiviert und mit einem murinen Erstantikörper gegen das zu detektierende Zytokin beschichtet wurde (20 h bei 4 °C; siehe 2.4). Anschließend wurden ungebundene Erstantikörper mit ELISpot-Waschpuffer entfernt und unspezifische Bindungsstellen mit TM10 abgesättigt (1 h, 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ ). Währenddessen wurde die Konzentration der Leukozyten in Milz- oder Hautzellsuspensionen transkutan immunisierter Mäuse unter Verwendung des *Scil Vet animal blood cell counter* (Scil veterinary excellence) bestimmt.  $5 \times 10^5$  splenogene oder  $2 \times 10^5$  kutane Leukozyten (in je 50  $\mu\text{l}$  TM5) wurden für 20 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  mit den Ovalbumin-Epitopen OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub> restimuliert (final 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in 50  $\mu\text{l}$  TM5). In Folge der Restimulation sezernierten antigenspezifische T-Zellen Zytokine, welche von immobilisierten Erstantikörpern an der Membran gebunden wurden. An die Restimulation anschließend wurde die Membran mit ELISpot-Waschpuffer gewaschen und ein biotinylierter Zweitantikörper für 2 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  zugegeben, welcher an den immobilisierten Zytokin-Erstantikörper-Komplex bindet (siehe 2.4). Ungebundene Zweitantikörper wurden anschließend mit ELISpot-Waschpuffer entfernt und das Vectastain Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben verwendet, um einen Avidin-Biotin Enzym-Komplex (ABC) an der Membran zu bilden (1 h, RT, in Dunkelheit). Eine abschließende Enzym-Substrat-Reaktion diente dem Nachweis des an der Membran gebundenen Komplexes. Hierfür wurde eine AEC-Lösung (3-Amino-9-ethylcarbazol; Sigma-Aldrich) vorbereitet und auf die Membran gegeben. Die Reaktion wurde nach 5-10 Minuten mit Leitungswasser abgestoppt und die Platte bei Raumtemperatur im Dunklen getrocknet. Durch die Umsetzung des Substrates entstanden rote Punkte auf der Membran. Diese sogenannten Spot-erzeugenden Einheiten (SFU, *spot forming units*) dienten der Quantifizierung und Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von Zytokin-produzierenden  $\text{CD4}^+$  oder  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in Folge der TCI. Die Quantifizierung der SFU auf der Membran erfolgte mit einem automatisierten Bild-Analyse-

## Material und Methoden

System (AiD iSpot) der Firma AiD Diagnostika

### 2.9.8 Zellaufschluss aus Hautgewebe mittels *gentleMACS™ Dissociator*

Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Immunzellinfiltraten im Hautgewebe erfolgte in der immunologischen Gedächtnisphase in Folge der TCI. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse an Tag 36 des Immunisierungsprotokolls euthanasiert und die Ohren mit einer Präparierschere abgetrennt. Mit einer gebogenen Pinzette wurden die verbliebenen Haare an den abgetrennten Ohren entfernt. Die beiden Ohrhälften wurden mit einer Pinzette voneinander separiert und der Knorpel abgetrennt. Anschließend wurden die beiden Ohrhälften in ein *gentleMACS C Tube* (Miltenyi Biotec) überführt und mit der Präparierschere in etwa 2-4 mm große Stücke zerkleinert. Für den Zellaufschluss wurde eine Aufschlusslösung (3 ml RPMI1640 + 800 U Kollagenase 4 und 100 µg/ml DNase I) vorbereitet und je 3 ml der Lösung zu den Ohrgewebstücken in den *gentleMACS C Tubes* gegeben. Der Hautgewebeprobe wurden für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend im *gentleMACS Dissociator* (Miltenyi Biotec, Programm: 37 °C Multi\_H) enzymatisch und mechanisch zerkleinert. Die entstandene Hautzellsuspension wurde durch ein Zellsieb (70 µm) in ein 50 ml Reagenzgefäß filtriert und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Immunzellen dieser Hautzellsuspension wurden anschließend durch ELISpot-Analysen oder mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Für die durchflusszytometrischen Analysen der T-Zellen aus dem immunisierten Ohrhautgewebe wurden die isolierten Zellen mit folgenden murinen Antikörper fluoreszenzmarkiert: CD45-BV785; CD3-BV605; CD8α-BV510; CD4-BV711; OVA<sub>257-264</sub> H-2K<sup>b</sup>-spezifisches Tetramer-PE; CD44-APC; CD62L-FITC; CD103-BV421 und CD69-BV605 (siehe 2.4).

### 2.9.9 Infektion mit dem Ovalbumin-transfizierten Vaccinia Virus (VV-OVA) und Virustiter-Bestimmung mittels *Plaque-Assay*

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten *Plaque-Assays* wurden in Kooperation mit F. Melchior und H.C. Probst, Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz, durchgeführt.

#### Infektion mit dem Ovalbumin-transfizierten Vaccinia Virus

Weibliche wildtypische Mäuse wurden prophylaktisch transkutan immunisiert. An Tag 7 nach der TCI wurde die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CTLs ermittelt und die immunisierten Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit  $2 \times 10^6$  pfu des Ovalbumin-transfizierten Vaccinia Virus (VV-OVA) systemisch infiziert.

#### Bestimmung des Virustiters mittels *Plaque-Assay*

## Material und Methoden

Die infizierten Mäuse wurden an Tag 5 nach der Infektion euthanasiert. Die Ovarien der infizierten Mäuse wurden mit einer Präparierschere isoliert, in DMEM-Kulturmedium (+ 10 % FCS) aufgenommen und homogenisiert. Die homogenisierte Ovarien-Suspension wurde in die Vertiefungen einer 96-Kavitäten-Platte überführt und mit einer Mehrkanalpipette serielle 1:10-Verdünnungen durchgeführt. Die seriellen Verdünnungen erfolgten in Duplikaten. Die Duplikate der einzelnen Verdünnungsstufen der Ovarien-Suspension (je 100 µl) wurden anschließend vereint und in die Vertiefungen einer 24-Kavitäten-Platte überführt, in deren Kavitäten am Vortag je  $2 \times 10^5$  BSC-40 Zellen je Kavität in DMEM + 10% FCS ausgesät wurden. Durch ein leichtes Schwenken auf einem Plattformschüttler (450 x g) wurde die Virus-Ovarien-Suspension gleichmäßig auf dem BSC-40- Zellrasen verteilt. Abschließend wurde 1 ml DMEM-Kulturmedium (mit 10 % FCS) je Kavität zugefügt und die Proben für etwa 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit waren Löcher im Zellrasen erkennbar, welche auf eine Infektion und nachfolgende Lyse der BSC-40-Zellen durch da Vaccinia Virus hindeuten. Das Medium wurde daraufhin mit einer Pasteurpipette entfernt und die BSC-40 Zellen in den Vertiefung mit einer Kristallviolettlösung überschichtet (2h bei RT). Nach Entfernung der Kristallviolettlösung konnten die farblosen Plaques im violett eingefärbten BSC-40-Zellrasen über einem Lichttisch ausgezählt werden. Durch die Multiplikation mit der entsprechenden Verdünnungsstufe der Ovarienzellsuspension konnte der Virustiter (*pfu/ml*) für die Proben berechnet werden.

### 2.10 *In vitro*-Experimente

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Materialien und Medien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre im Brutschrank.

#### 2.10.1 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Eine exakte Bestimmung der Lebendzellzahl war in den *in vitro*-Experimenten erforderlich, um eine Standardisierung der Versuche zu ermöglichen. Hierfür wurden 10 µl der entsprechenden Zellsuspension mit 90 µl Trypanblaulösung gemischt. 10 µl der entsprechenden Verdünnungen wurden in eine Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Kammertiefe, Kammerfaktor 10<sup>4</sup>) gegeben. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der für die sogenannte Vitalfärbung der Zellen verwendet wird. Tote Zellen nehmen diesen sauren Farbstoff auf und erscheinen nach einigen Minuten blau. Ausgezählt wurden lediglich die farblosen, lebenden Zellen in den vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer. Aus den Einzelergebnissen wurde ein Mittelwert (MW) ermittelt. Die Gesamtzellzahl errechnete sich wie folgt:

## Material und Methoden

**Gesamtzellzahl** = MW x Verdünnungsfaktor x Gesamtvolumen x Kammerfaktor

### 2.10.2 Entnahme von Milzen und Herstellung einer Splenozyten-Einzelzellsuspension

Vor der Entnahme der Milzen wurden die Mäuse euthanasiert und die Haut unterhalb des linken Rippenbogens mit Hilfe einer Präparierschere 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 dieses mit 5 ml PBS (1x) gespült. Nach einem Zentrifugationsschritt (500 x g, 4 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zur Lyse der vorhandenen Erythrozyten wurde das Zellpellet in Gey's-Lysepuffer aufgenommen (1 ml je Milz; 3 min bei RT). Durch Zugabe von PBS (1x) wurde die Lyse abgestoppt und die Zellen nach einem Waschschrift in FACS-Puffer oder Kulturmedium aufgenommen.

### 2.10.3 Isolation von CD11c<sup>+</sup> DCs aus einer Splenozyten-Einzelzellsuspension mittels Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)

Funktionsprinzip des *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS):

Bei der MACS-Technologie werden kleine magnetische Partikel zur Separation von Zellsuspensionen verwendet. Zu diesem Zweck werden die magnetischen Partikel (50 nm) an einen monoklonalen Antikörper gekoppelt. Nachdem der Antikörper ein spezifisches Antigen auf der Zelloberfläche gebunden hat, erfolgt die Auftrennung der Zellsuspension in einer Säule, deren ferromagnetische Matrix aus Metallkugeln und -drähten besteht. Diese Säule wird in ein homogenes Magnetfeld gebracht (*MACS separator*), was zur Bindung der magnetisch-markierten Zellen an der Matrixoberfläche führt. Während ungebundene Zellen aus der Säule ausgewaschen werden, können die separierten Zellen nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld ausgespült werden.

Vorgehensweise bei der Isolation CD11c<sup>+</sup> DCs:

Die Isolation CD11c<sup>+</sup> DCs erfolgte unter einer Sterilbank. Für die Anreicherung CD11c<sup>+</sup> DCs wurde eine splenogene Einzelzellsuspension hergestellt und die Lebendzellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (max. 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ 400 µl GM-Puffer). Je 100 µl der *CD11c MicroBeads UltraPure* (Miltenyi Biotec) wurden mit 400 µl der Einzelzellsuspension gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurden die MACS-Säulen (*LS columns*, Miltenyi Biotec) am MACS-Separator befestigt und durch Spülen mit MACS-Puffer nach Herstellerangaben vorbereitet. Nach der Inkubationszeit der Zellsuspension mit den *CD11c MicroBeads UltraPure* wurden ungebundene Partikel in einem Waschschrift mit GM-Puffer entfernt und der Überstand verworfen (500 x g, 5 min, 4 °C). Die Milzzellen wurden anschließend erneut in GM-Puffer aufgenommen (max. 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ 500 µl GM-Puffer) und

## Material und Methoden

über ein Zellsieb (70 µm) in die Säulen im Magnetfeld filtriert. Nachdem die Zellsuspension die Säule vollständig durchlaufen hat, wurden die Säulen dreimal mit GM-Puffer (je 3 ml) gespült und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt und die separierten Zellen mit Hilfe eines Spritzenstempels und 5 ml GM-Puffer abgelöst. Die Reinheit und Viabilität der separierten Zellen wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen unter Verwendung der folgenden Fluorophor-konjugierten Antikörper bestimmt: CD11c-PeCy7, MHCII-BV421. Der Anteil toter Zellen wurde durch die Verwendung von Propidiumiodid bestimmt.

### **2.10.4 Isolation von Knochenmarkszellen und Differenzierung in *bone-marrow derived macrophages* (BMMs)**

Die Isolation von Knochenmarkszellen erfolgte unter einer Sterilbank. Die Mäuse wurden zunächst euthanasiert und die Hinterbeine von Fell und Haut befreit. Anschließend wurden jeweils Femur und Tibia präpariert und mit Isopropanol desinfiziert. Isopropanol auf der Knochenoberfläche wurde mit MEM-Kulturmedium abgespült und die Knochen für den Zeitraum der Präparation in einem separaten, mit MEM-Kulturmedium befüllten Gefäß aufbewahrt. Nach Abschluss der Präparation wurden die Enden der Knochen abgeschnitten und das darin befindliche Knochenmark mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) und je 5 ml MEM-Kulturmedium in eine sterile Petrischale ausgespült. Die Knochenmarks-Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert, um Knochensplinter aus der Suspension zu entfernen. Nach einer anschließenden Zentrifugation (500 x g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Erythrozyten mit Hilfe von 1 ml Gey's Lysepuffer für 1 min lysiert. Der Lysevorgang wurde durch die Zugabe von 10 ml MEM beendet.

Die Generierung von *bone marrow derived macrophages* (BMMs) erfolgte durch Kultivierung der unreifen Knochenmarks-Vorläuferzellen in TM10 und 10 % L929-Fibroblasten-Kulturüberstand („Makrophagen-Kulturmedium“).  $4 \times 10^6$  unreife Knochenmarkszellen wurden dazu in die Vertiefungen einer 6-Kavitäten-Platte (*low adhesive*, Greiner) ausgesät. In zeitlichen Abständen von zwei bis drei Tagen wurde je die Hälfte des Kulturmediums aus den Vertiefungen entfernt und durch frisches Makrophagen-Kulturmedium ersetzt. Die Zytokine aus den Fibroblasten-Kulturüberständen induzierten eine Differenzierung der Knochenmarkszellen in reife BMMs (F4/80<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>). Die BMMs konnten frühestens sechs und maximal 13 Tage nach der Isolation aus dem Knochenmark aus den 6-Kavitäten-Platten geerntet und für weiterführende Experimente verwendet werden.

### **2.10.5 Stimulation und Analyse von APCs *in vitro***

Die Aktivierung und Polarisierung von APCs wurde durch *in vitro* Stimulationen von DCs und Makrophagen untersucht. Für diese Analysen wurden splenogene CD11c<sup>+</sup> DCs oder *bone*

## Material und Methoden

*marrow derived macrophages* (BMMs) verwendet (siehe 2.10.3 und 2.10.4).  $2 \times 10^5$  APCs wurden in TM10 aufgenommen und in die Vertiefungen einer U-förmigen 96-Kavitäten-Platte ausgesät. Die APCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen Anthralin (gelöst in DMSO und verdünnt in TM10) für 24-48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert. Es wurden stets eine nicht stimulierte Negativkontrolle und eine Positivkontrolle (10 µg/ml des TLR7/8-Agonisten Resiquimod, gelöst in VE-Wasser und verdünnt in TM10) mitgeführt. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf APCs wurde nach 24 h durchflusszytometrisch unter Verwendung folgender Fluoreszenz-markierter Antikörper überprüft:

### DCs:

MHCII-BV421, CD11c-PE-Cy7, CD40-APC, CD80-BV605, CD86-PE

### Makrophagen:

F4/80-PE-Cy5, MHCII-BV421, CD11b-PE-Cy7, CD40-APC, CD80-BV605, CD86-PE

Die Oberflächenfärbung der Zellen erfolgte wie in 2.10.6 beschrieben. Tote Zellen wurden durch den Fluoreszenzfarbstoff *Fixable Viability Dye eFluor™ 780* (eBioscience™) in der durchflusszytometrischen Analyse ausgeschlossen. Die stimulierten APCs wurden für 20 Minuten bei 4 °C fixiert und permeabilisiert (Fixations- und Permeabilisierungskit von eBioscience™). Adhärente Zellen konnten anschließend aus den Vertiefungen der 96-Kavitäten-Platte geerntet werden und nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer durchflusszytometrisch analysiert werden.

Die Analyse pro-inflammatorischer Zytokine im Kulturüberstand stimulierter APCs erfolgte mit Hilfe von *Multiplex Cytokine Bead Arrays* (CBA) in Kooperation mit der AG Grabbe, Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz. Die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12 (p70) und wurde im Kulturüberstand von stimulierten BMMs nach 48 h bestimmt.

### **2.10.6 Durchflusszytometrische Analysen**

Durchflusszytometrische Analysen dienen dem Nachweis fluoreszenzmarkierter Zellen. Dafür wird eine zu analysierende Einzelzellsuspension durch eine Nadel angesaugt, wodurch es zu einem laminaren Strom der Zellen kommt. Abgegrenzte Tropfen der Suspension, in denen sich je nur eine Zelle befindet, werden im Durchflusszytometer an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt. Durch das Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle und die daraus entstehende Beugung (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. Um charakteristische Antigene auf den analysierten Zellen identifizieren zu können, wurden Fluorophor-gekoppelte Antikörper verwendet. Diese

## Material und Methoden

Fluorophore werden in der durchflusszytometrischen Analyse mit Lasern zur Fluoreszenz angeregt und emittieren daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Verwendung verschiedener Fluorophore mit unterschiedlichen Emissionsspektren ermöglicht die Zuordnung mehrerer Signale von einer Zelle. Überlagerten sich die Emissionsspektren unterschiedlicher Fluorophore, wurde vor der Messung der fluoreszenzmarkierten Zellen eine sogenannte Kompensation durchgeführt. Hierbei werden die Überlagerungen der Emissionsspektren und damit einhergehende falsch-positive Signale in einem Fluoreszenzkanal gemessen und durch die Software FACS DIVA rechnerisch korrigiert.

Die Fluoreszenzfärbung von Antigenen auf der Zelloberfläche erfolgte in 96-Kavitäten-Platten mit Spitzboden. Für die Oberflächenfärbung wurden Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper entsprechend ihrer optimalen Konzentration in FACS-Puffer verdünnt und die Zellen in je 50 µl Färbelösung/ Kavität resuspendiert. Die Proben wurden anschließend für 20-30 min bei 4 °C inkubiert. Die verwendeten Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper, deren optimale Konzentration und Ursprung können Tabelle 5 entnommen werden. Nach der Inkubation mit der Färbelösung wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen (500 x g, 2 min, 4 °C), um ungebundene Antikörper zu entfernen. Abschließend wurden die Proben in FACS-Puffer aufgenommen und an einem Durchflusszytometer (LSR-II oder Symphony, BD Pharmingen) mit Hilfe der Software FACS Diva (BD Pharmingen) gemessen und analysiert.

### 2.10.7 Metabolismus-Analyse von Makrophagen mittels *Seahorse extracellular flux (XF) analyzer*

Die in dieser Dissertation dargestellten Metabolismus-Analysen wurden in Kooperation der AG Guezguez, III. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz, durchgeführt. In dieser Dissertation sollte mit Hilfe eines *Seahorse XFp Analyzers* (Seahorse Bioscience) der Metabolismus von Makrophagen mit und ohne Stimulation durch Anthralin charakterisiert werden. Der *Seahorse XFp Analyzer* ermittelt zwei metabolische Messgrößen, die sogenannte *extracellular acidification rate* (ECAR) und *oxygen consumption rate* (OCAR). Die ECAR gibt die extrazelluläre Ansäuerung des Kulturmediums durch saure Stoffwechselprodukte (u.a. Protonen, Laktat) in Folge anaerober Glykolyse an, während die OCAR den Sauerstoffverbrauch im Kulturmedium durch oxidative Phosphorylierung anzeigt. Der Vergleich dieser beiden Messgrößen ermöglicht die Bestimmung des bevorzugten Metabolismus zur Energiegewinnung. Durch die Zugabe verschiedener Inhibitoren des zellulären Metabolismus kann mithilfe des *Seahorse XFp Analyzers* zudem die Reaktion der Zellen unter stress analysiert werden.

Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren in den Metabolismus-Analysen.

Inhibitor	Konzentration	Beschreibung
-----------	---------------	--------------

## Material und Methoden

Oligomycin	1 $\mu$ M	ATP-Synthase-Inhibitor; blockiert die mitochondriale ATP-Produktion und verschiebt den Metabolismus in Richtung Glykolyse (stress-induzierte ECAR)
FCCP	0,75 $\mu$ M	Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone; Entkoppler der mitochondrialen OXPHOS (stress-induzierte OCAR)

Für die Metabolismus-Analysen in dieser Arbeit wurden *bone-marrow derived macrophages* (BMMs) verwendet (siehe 2.10.4). Die optimale Zellzahl je Kavität und die Konzentration der Inhibitoren wurde in Vortests ermittelt. Für die Metabolismus-Analysen wurden  $3 \times 10^4$  BMMs je Kavität in 8-Kavitäten-Platten (Seahorse Bioscience) ausplattiert und mit 1  $\mu$ M Anthralin für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert. Direkt vor der Messung im *Seahorse XFp Analyzer* wurde der Kulturüberstand verworfen und durch 180  $\mu$ l Seahorse-Assay-Medium ersetzt. Die Messung im *Seahorse XFp Analyzer* erfolgte bei 37 °C. Die beiden Inhibitoren wurden in den jeweiligen Konzentrationen in Seahorse-Assay-Medium vorbereitet und im Verlauf der Messung automatisiert in die Vertiefungen der Kavitäten-Platte injiziert. Da die Werte für die ECAR und die OCAR Zellzahl-abhängigen Schwankungen unterliegen, wurde eine Normalisierung der Zellzahl durch die Färbung der Makrophagen mit einer Calcein AM (2  $\mu$ M)/Ethidium-Homodimer III (4  $\mu$ M)-Lösung durchgeführt (30 min, bei 37°C & 5 % CO<sub>2</sub>). Die Zellzahl auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde anschließend mit Hilfe der Software Image J quantifiziert und ECAR- und OCAR-Werte dahingehend normalisiert.

### 2.10.8 Histologische Analyse des Ohrgewebes nach transkutaner Immunisierung

Die Mäuse wurden an Tag 7 nach der TCI euthanasiert und die Ohren mit einer Präparierschere abgetrennt. Das Ohrgewebe wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und mit Histofix (Roth) überschichtet. In der Core Facility Histologie, Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz, wurden die Ohrgewebeproben in Paraffin eingebettet, mit Hilfe eines Mikrotoms 5  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbt. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, welcher seine färbenden Eigenschaften durch die Oxidation in Hämatein entwickelt. Hämatein färbt saure Strukturen, speziell Zellkerne und Ribosomen am rauen Endoplasmatischen Retikulum blau. Eosin, ein synthetischer Farbstoff, färbt hingegen basische Strukturen, wie beispielsweise Zellplasmaproteine, Mitochondrien, Kollagene und Keratin rot. Die HE-gefärbten Präparate des immunisierten Ohrgewebes wurden anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-8000K analysiert. Es wurden zehn zufällig ausgewählte Stellen in den HE-gefärbten Präparaten bestimmt und Aufnahmen bei 200-facher Vergrößerung erstellt. Die Dicke der Epidermis wurde durch die zugehörige Software BZ-H3M ermittelt.

## Material und Methoden

### 2.10.9 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 ungepaarte t-Test mit Welch-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. Signifikante Unterschiede in Vaccinia Virus-Titern wurden auf Grund der nicht normalverteilten Datenpunkte mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt. 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 GraphPad Prism 7 und 8 (Software MacKiev) durchgeführt.

## Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Kombination der Agenzien Anthralin und Imiquimod verstärkt die Induktion antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Primärantwort der TCI

Im Fokus dieser Arbeit steht die Untersuchung eines potentiellen Adjuvanseffektes des Hydroxyanthrons Anthralin bei der Entstehung antigenspezifischer T-Zellen nach der Imiquimod-basierten TCI. Zu Beginn dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss der Agenzien Anthralin und Imiquimod auf murines Hautgewebe charakterisiert werden.

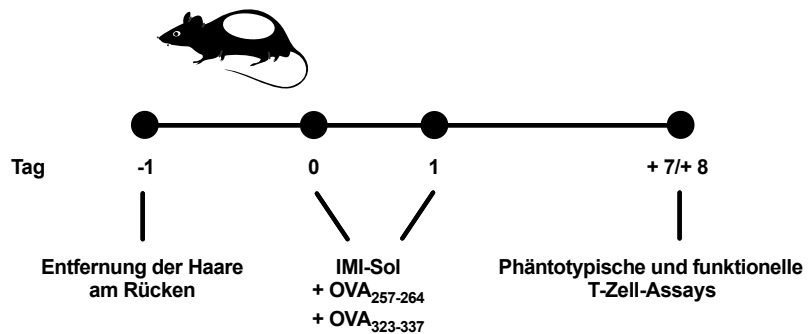
##### 3.1.1 Die Verwendung von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI erfordert die Anpassung des etablierten Immunisierungsprotokolls

Die topische Verabreichung von Anthralin ist als immunsuppressive Behandlung der *Psoriasis vulgaris* seit Beginn des 20. Jahrhunderts etabliert (Klaus Müller, 1997). Vorangegangene Arbeiten illustrieren, dass Anthralin vor der Ausheilung psoriatischer Plaques jedoch eine Entzündungsreaktion in der Haut fördert (Lawrence et al., 1984). Zu Beginn dieser Arbeit wurden die optimale Anthralin-Konzentration und die idealen Zeitpunkte für die Verabreichung der beiden potentiellen Adjuvantien getestet (unveröffentlichte Daten v. Dr. rer. nat. Ann-Kathrin Hartmann). Aufgrund der Anthralin-induzierten Entzündungsreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit die Immunisierungsfläche reduziert. Die Verabreichung der Agenzien sollte fortan auf dem Ohrhautgewebe erfolgen. Im Vergleich zur Rückenhaut (~ 10 cm<sup>2</sup>) führt die Verabreichung der TCI auf der Ohrhaut (~ 3 cm<sup>2</sup>) zu einer dreifachen Reduktion der benötigten Hautfläche.

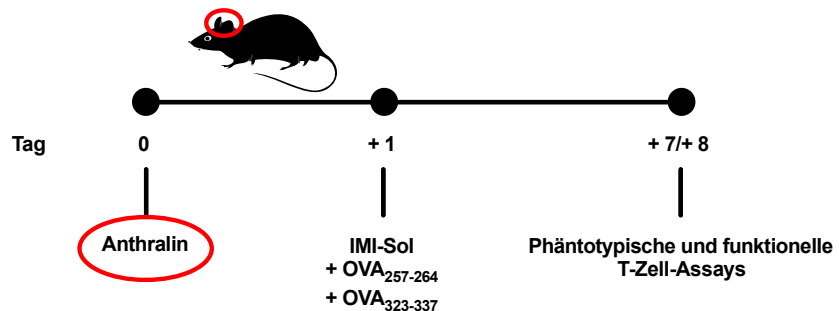
Abbildung 9 veranschaulicht das zu Beginn dieser Arbeit etablierte und nachfolgend angewandte Immunisierungsprotokoll im Vergleich zur alleinigen Imiquimod-basierten TCI aus vorangegangenen Arbeiten:

## Ergebnisse

### TCI-Protokoll in vorangegangenen Arbeiten



### Angepasstes TCI-Protokoll in dieser Arbeit



**Abbildung 9: Anpassung des Immunisierungsprotokoll durch die Vorbehandlung der Haut mit Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI.**

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden vor der Durchführung der TCI die Haare auf der Rückenhaut der Mäuse entfernt (Tag -1) und an zwei aufeinander folgenden Tagen je 50 mg IMI-Sol zusammen mit 100 µg OVA<sub>257-264</sub> und 100 µg OVA<sub>323-337</sub> auf die rasierte Rückenhaut aufgetragen (Tag 0 & 1). In dieser Arbeit erfolgte die TCI durch die topische Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; verschiedene Konzentrationen in Vaseline vorliegend), gefolgt von 50 mg IMI-Sol, 100 µg OVA<sub>257-264</sub> und 100 µg OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1) auf der Ohrhaut. Die Auswertung der Immunisierungseffizienz in der Primärantwort erfolgte mit Hilfe von T-Zell-Analysen an Tag 7 und 8 des Immunisierungsprotokolls.

### 3.1.2 Die topische Verabreichung von Anthralin fördert die Entstehung einer Entzündungsreaktion in gesunder, muriner Haut

Im Anschluss an die Etablierung des neuartigen Immunisierungsprotokolls sollten die Auswirkungen der TCI mit dem Hydroxyanthron Anthralin, dem synthetischen TLR7-Liganden Imiquimod (formuliert in IMI-Sol) oder der Kombination beider Agenzien (nachfolgend zum Teil als Kombi-TCI bezeichnet) auf murines Ohrhautgewebe charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden wildtypische Mäuse transkutan immunisiert und die Auswirkungen der TCI bis Tag 7 des Immunisierungsprotokolls analysiert (Abbildung 10).

## Ergebnisse

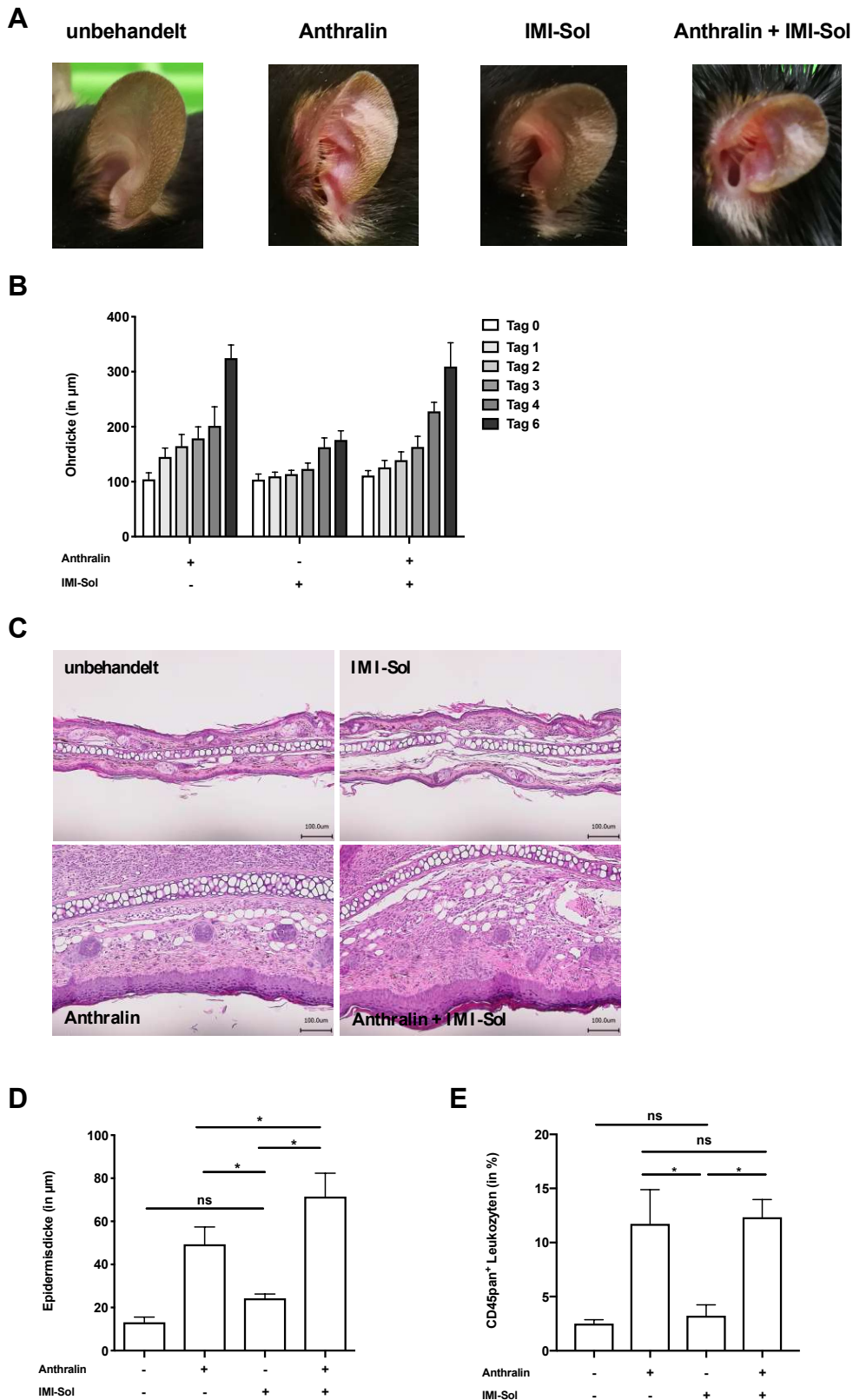


Abbildung 10: Anthralin verursacht in gesunder, muriner Haut eine Entzündungsreaktion.

Nach der TCI mit Anthralin, IMI-Sol oder beiden Agenzien wurde **A)** an Tag 7 des Immunisierungsprotokolls die Ohrhaut auf Symptome einer Entzündungsreaktion untersucht, **B)** bis Tag 6 des Immunisierungsprotokolls die Dicke der Ohrhaut (in  $\mu\text{m}$ ) bestimmt, **C)** an Tag 7 des Immunisierungsprotokolls HE-gefärbte Ohrhautpräparate erstellt, **D)** an Tag 7 des Immunisierungsprotokolls anhand HE-gefärbter Ohrhautpräparate die Dicke der Epidermis

## Ergebnisse

ermittelt und **E**) an Tag 7 des Immunisierungsprotokolls durchflusszytometrisch der Anteil CD45pan<sup>+</sup> Leukozyten im Ohrhautgewebe bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 8-12). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p <0,05; ns = nicht signifikant).

Die oberflächliche Betrachtung der behandelten Ohrhaut an Tag 7 nach der TCI veranschaulicht, dass die topische Verabreichung von Anthralin und die Kombi-TCI eine Rötung und Schorfbildung des behandelten Gewebes induzieren. Die Verabreichung von IMI-Sol allein führt hingegen zu geringen Veränderungen des Ohrhautgewebes (Abbildung 10 A). Während die alleinige Verabreichung von IMI-Sol im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe eine 1,7-fache Steigerung der Ohrdicke bis Tag 6 nach der TCI bewirkt, verursachen Anthralin und die Kombi-TCI eine 3,1-fache Zunahme der Ohrdicke (Abbildung 10 B).

Um die Entzündungsreaktion in der Haut detaillierter zu charakterisieren, wurden an Tag 7 nach der TCI HE-gefärbte Präparate des Ohrhautgewebes erstellt und mikroskopisch analysiert (Abbildung 10 C). H/E-gefärbte Präparate von IMI-Sol-behandelten Mäusen weisen eine hohe Ähnlichkeit zu unbehandelten Proben auf. In Präparaten von Anthralin oder Kombi-TCI behandeltem Ohrhautgewebe kann eine massive Zunahme der Dicke von Epidermis und Dermis beobachtet werden (Abbildung 10 C). Die H/E-Färbungen ermöglichen darüber hinaus die Analyse der Proliferation epidermaler Zellen in Folge der TCI (dunkelviolette Umrandung der Präparate, Abbildung 10 D). Anthralin induziert hierbei alleine oder in Kombination mit Imiquimod eine epidermale Hyperkeratose, welche bei alleiniger Behandlung mit IMI-Sol und in unbehandeltem Gewebe ausbleibt (Abbildung 10 D).

Durchflusszytometrische Analysen von Ohrhautgewebe nach der TCI zeigen, dass Anthralin (durchschnittlich 11,8 % CD45pan<sup>+</sup> Leukozyten) und die Kombi-TCI (durchschnittlich 12,4 %) die Migration von Immunzellen in die Haut fördern. Der Anteil der CD45pan<sup>+</sup> Leukozyten in IMI-Sol-behandeltem Gewebe ist hingegen signifikant geringer (durchschnittlich 3,2 %; Abbildung 10 E) und vergleichbar mit unbehandeltem Ohrhautgewebe.

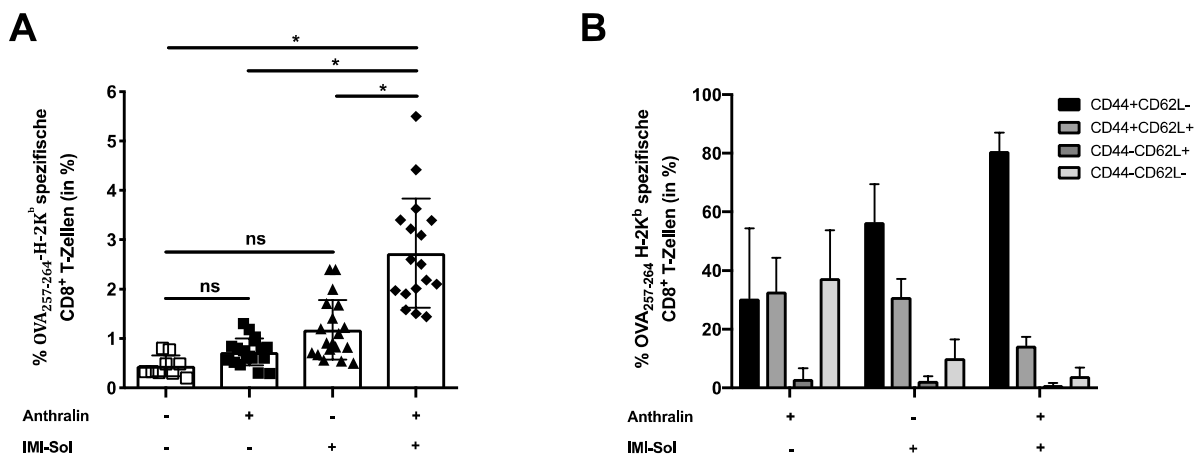
Zusammenfassend zeigen diese Analysen, dass topische Verabreichungen von Anthralin, im Gegensatz zu Imiquimod, die Entstehung einer Entzündung in muriner Haut fördern, welche durch die Zunahme der Ohrdicke, der Proliferation von Keratinozyten und der Infiltration von Immunzellen in das Ohrhautgewebe charakterisiert ist. Auf diese Ergebnisse aufbauend sollten nachfolgende Experimente die Auswirkungen Anthralin-induzierter Veränderungen der Haut auf die Entstehung von T-Zell-Antworten nach der Imiquimod-basierten TCI untersuchen.

### **3.1.3 Anthralin erhöht die Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen und verstärkt deren Effektorfunktionen nach der Imiquimod-basierten TCI**

Ein grundlegendes Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung der erzeugten T-Zell-Antwort nach der Imiquimod-basierten TCI. Um den Einfluss von Anthralin auf die Entstehung

## Ergebnisse

antigenspezifischer T-Zellen in der Primärantwort der TCI zu untersuchen, wurde an Tag 7 nach der TCI der Anteil OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von wildtypischen Mäusen bestimmt (Abbildung 11 A).



**Abbildung 11: Die kombinierte Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol erhöht die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> Effektor-CTLs in der Primärantwort.**

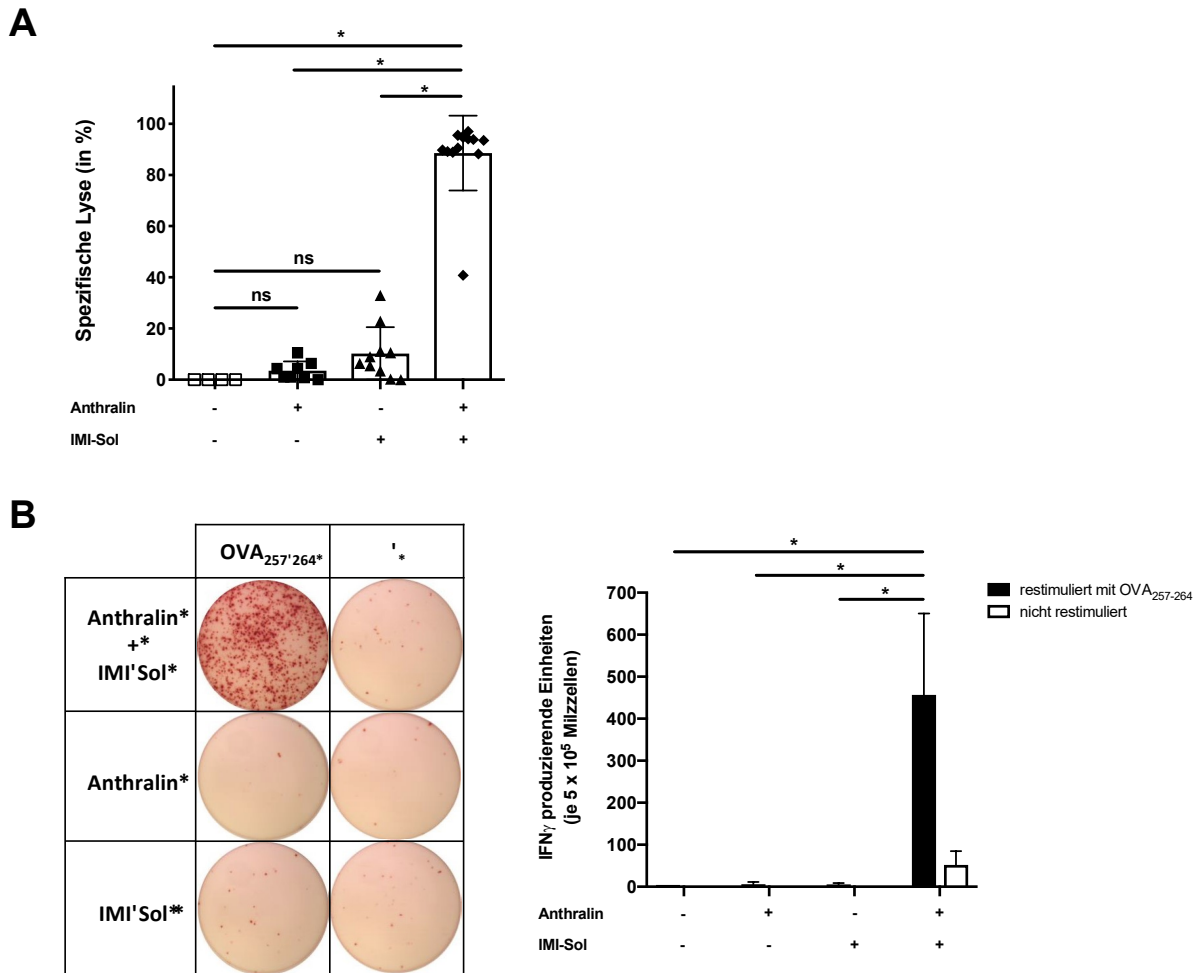
Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. An Tag 7 des Immunisierungsprotokolls wurde durchflusszytometrisch **A**) die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CTLs im Blut quantifiziert und **B**) deren Phänotyp durch die Oberflächenmarker CD44 und CD62L charakterisiert. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 8-17). Bei der Charakterisierung des Phänotyps sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die TCI mit Anthralin (durchschnittlich 0,72 %) oder IMI-Sol (1,2 %) allein führt im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (0,4 %) zu keiner signifikanten Zunahme der Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut. Die aufeinanderfolgende Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol auf die Ohrhaut bewirkt hingegen die Entstehung von durchschnittlich 2,72 % OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der primären Immunantwort (Abbildung 11 A). Die in der Primärantwort identifizierten OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden durchflusszytometrisch durch die Oberflächenmarker CD44 und CD62L charakterisiert. Diese Moleküle sind bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Aktivierung, Zirkulation im Blut und Rekrutierung in sekundäre lymphatische Organe beteiligt (Gerberick et al., 1999). Die OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen weisen nach den unterschiedlichen TCIs (Anthralin, IMI-Sol oder Kombi-TCI) einen CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup>-Phänotyp auf, welcher auf die Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen hindeutet (Abbildung 11).

Die quantitative Zunahme der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI deutet auf einen Adjuvanseffekt von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI hin. Die Effektorfunktionen der identifizierten OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen T-Effektorzellen waren

## Ergebnisse

gleichermaßen von Interesse und wurden mit Hilfe des *in vivo*-Zytotoxizitätstests und IFN $\gamma$ -ELISpot-Analysen untersucht (Abbildung 12). Die durch den *in vivo*-Zytotoxizitätstest ermittelten Werte für die spezifische Lyse stellen hierbei ein Maß für die zytolytische Aktivität OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in immunisierten Mäusen dar (siehe 2.9.6).



**Abbildung 12: Die kombinierte Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol steigert die funktionellen Eigenschaften OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Primärantwort.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100  $\mu$ g in Basiscreme) immunisiert. **A**) Die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CTLs wurden an Tag 8 mittels *in vivo* - Zytotoxizitätstests durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4  $\mu$ M und 4  $\mu$ M) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die Population, welche mit der niedrigeren CFSE-Konzentration markiert wurde (0,4  $\mu$ M), wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1  $\mu$ g/ml) beladen. **B**) Milzzellen wurden an Tag 8 aus immunisierten Mäusen entnommen und für 20 h mit OVA<sub>257-264</sub> restimuliert. IFN $\gamma$ -produzierende Einheiten wurden als rote Punkte auf einer Membran detektiert (links) und anschließend mit einem ELISpot-Reader quantifiziert (rechts). Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 4-10). Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Abbildung 12 A veranschaulicht, dass nach den TCIs mit Anthralin oder IMI-Sol nur ein geringer Anteil der OVA<sub>257-264</sub>-beladenen Zielzellen durch antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen

## Ergebnisse

lysiert wird. Nach der aufeinanderfolgenden Verabreichung beider Agenzien in der Kombi-TCI wird hingegen ein Großteil der peptidbeladenen Zielzellen durch OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CTLs lysiert. Die Ergebnisse der *in vivo*-Zytotoxizitätstests illustrieren, dass durch die Kombination der Agenzien Anthralin und Imiquimod in der TCI OVA<sub>257-264</sub>-spezifische T-Effektorzellen mit einer hohen lytischen Aktivität entstehen.

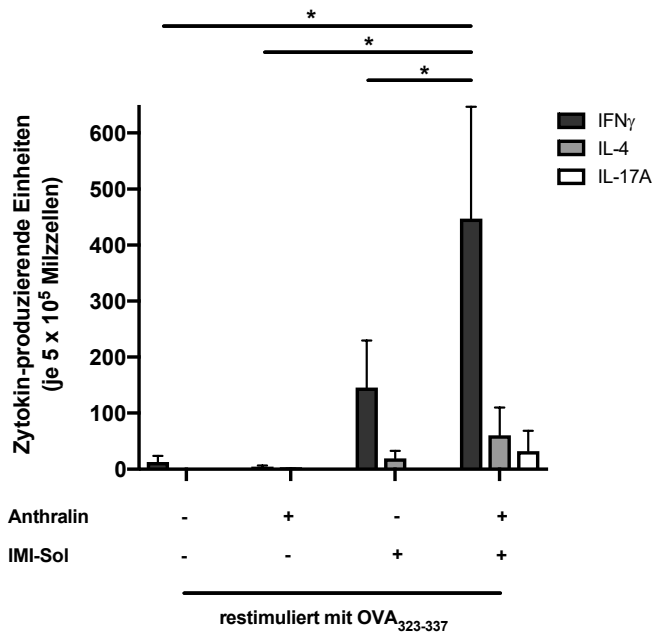
Die funktionellen Eigenschaften der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in ELISpot-Analysen weiterführend charakterisiert (Abbildung 12 B). Die Sezernierung des Zytokins IFN $\gamma$  wurde nach der Restimulation mit dem Antigen OVA<sub>257-264</sub> durch eine Farbreaktion an einer Membran detektiert (Abbildung 12 B, links) und mit Hilfe eines *ELISpot-Readers* quantifiziert (Abbildung 12 B, rechts). Die TCIs mit Anthralin ( $4,73 \pm 4,21$  SFU) oder IMI-Sol ( $5,23 \pm 5,88$  SFU) erzeugen bei dieser Analyse nur eine geringe Menge IFN $\gamma$ -produzierender Einheiten, wohingegen die Kombi-TCI die Entstehung einer signifikant höheren Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender CTLs in der primären Immunantwort ermöglicht (Mittelwert:  $456,3 \pm 193,8$  SFU).

Die phänotypischen und funktionellen Analysen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der primären Immunantwort illustrieren somit eine Vervielfachung der Immunisierungseffizienz transkutaner Immunisierungen durch die Kombination der Agenzien Anthralin und Imiquimod.

### **3.1.4 Anthralin induziert T<sub>H</sub>1-polarisierte, antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Imiquimod-basierten TCI**

Aufbauend auf die Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde im Folgenden eine Charakterisierung der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in der primären Immunantwort der TCI durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Freisetzung verschiedener charakteristischer Zytokine durch OVA<sub>323-337</sub>-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen mit Hilfe von ELISpot-Analysen untersucht (Abbildung 13). Die in Abbildung 13 quantifizierten Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4 oder IL-17A werden in Folge der Aktivierung und Differenzierung von naiven T-Zellen in den entsprechenden Subtyp der T-Helferzellen gebildet (Zhou et al., 2009).

## Ergebnisse



**Abbildung 13: Die Kombi-TCI erzeugt eine Vielzahl T<sub>H</sub>1-polarisierter T-Helferzellen in der Primärantwort.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100  $\mu$ g in Basiscreme) immunisiert. Milzzellen wurden an Tag 8 aus immunisierten Mäusen entnommen und für 20 h mit OVA<sub>323-337</sub> restimuliert. Auf verschiedenen Membranen wurden IFN $\gamma$ , IL-4 oder IL-17 produzierende Einheiten detektiert und mit einem ELISpot-Reader quantifiziert. Abgebildet sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die TCIs mit Anthralin oder IMI-Sol induzieren in diesen ELISpot-Analysen nur eine mäßige Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender OVA<sub>323-337</sub>-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Des Weiteren können nach der alleinigen Verabreichung der beiden Agenzien nur geringe Mengen IL-4 oder IL-17A in den Kulturüberständen der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen nachgewiesen werden. Demgegenüber erfolgt nach der Kombi-TCI die Sezernierung großer Mengen IFN $\gamma$  durch OVA<sub>323-337</sub>-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Die Kombi-TCI bewirkt zusätzlich die Entstehung einer geringen Anzahl IL-4 oder IL-17A-produzierender CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Abbildung 13).

Die funktionellen Analysen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der primären Immunantwort deuten somit darauf hin, dass die Kombination der Agenzien Anthralin und IMI-Sol in der TCI die Entstehung einer überwiegend T<sub>H</sub>1-polarisierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzell-Antwort begünstigt.

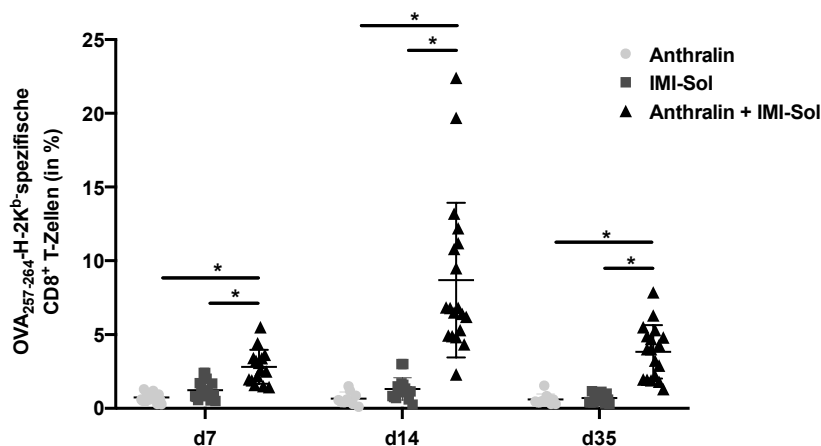
## Ergebnisse

### 3.2 Anthralin ermöglicht die Entstehung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der Imiquimod-basierten TCI

Eines der übergeordneten Ziele dieser Arbeit ist die Optimierung der Imiquimod-basierten TCI hinsichtlich der Entstehung langlebiger T-Zell-Antworten. Antigen-spezifische T-Gedächtniszellen lösen bei erneutem Kontakt mit einem Antigen eine schnelle und effektive Immunreaktion aus, die zur Eliminierung des Pathogens führt. Die Induktion solcher nachhaltigen Immunantworten ist daher auch ein zentraler Aspekt bei der Entwicklung transkutaner Impfstoffe. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die kombinierte Verabreichung der Agenzien Anthralin und IMI-Sol in der TCI die Generierung kutaner und systemischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen ermöglicht.

#### 3.2.1 Anthralin ermöglicht die Induktion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen nach der Imiquimod-basierten TCI

Die Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut transkutan immunisierter Mäuse wurden an Tag 7, 14 und 35 des Immunisierungsprotokolls quantifiziert. Der Verlauf der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CTL-Frequenzen von Tag 7 bis 35 nach den unterschiedlichen TCIs ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14** Die Verwendung von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI ermöglicht die Entstehung OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen.

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. An Tag 7, 14 und 35 des Immunisierungsprotokolls wurde die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut durchflusszytometrisch ermittelt. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 9-19). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

## Ergebnisse

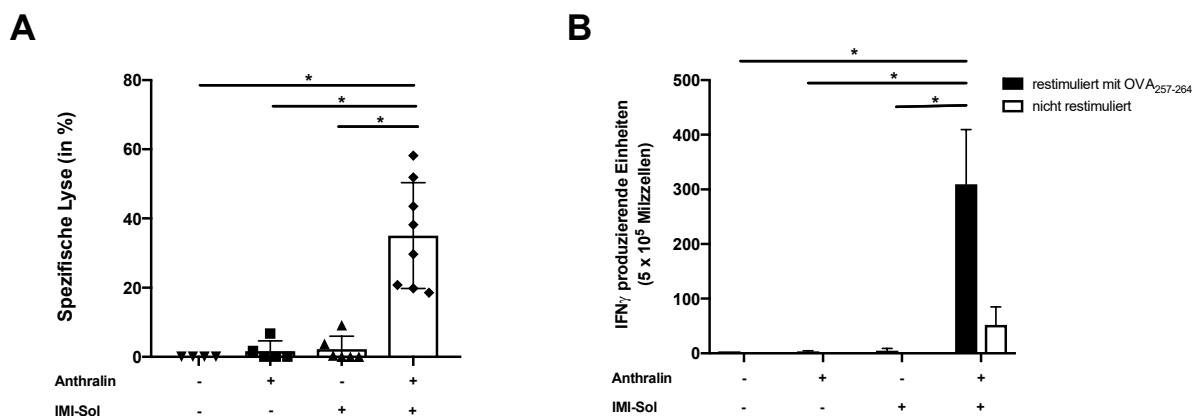
In Anthralin (0,66 %) oder IMI-Sol (1,31 %) behandelten Mäusen verändern sich die Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bis Tag 14 im Vergleich zu Tag 7 nur geringfügig. In Folge der Kombi-TCI können hingegen durchschnittlich 8,7 % OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 14 detektiert werden, was einer dreifachen Expansion der primären CTL-Population von Tag 7 entspricht (Abbildung 14).

In der Gedächtnisphase der TCI (Tag 35) verdeutlichen die Frequenzen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, dass weder die alleinige Verabreichung von Anthralin (0,6 %) noch IMI-Sol (0,7 %) die Induktion einer relevanten systemischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellantwort ermöglicht. Nach der aufeinanderfolgenden Verabreichung beider Agenzien verbleiben durchschnittlich 3,82 % OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen bis Tag 35, was auf die Entstehung eines systemischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Gedächtnisses in Folge der Kombi-TCI hindeutet (Abbildung 14).

Auf diese Erkenntnisse aufbauend sollte die Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen untersucht werden. Nachfolgend wurden daher sowohl die Lyse peptidbeladener Zielzellen als auch die Produktion des Zytokins IFN $\gamma$  durch OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen analysiert (Abbildung 15). Die TCIs mit Anthralin oder IMI-Sol führen in der immunologischen Gedächtnisphase, übereinstimmend mit den niedrigen Frequenzen der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach diesen Behandlungen, zu einer geringen spezifischen Lyse der OVA<sub>257-264</sub>-beladenen Zielzellen. Die antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellpopulation in Folge der Kombi-TCI induziert hingegen innerhalb von 20 h die Lyse von durchschnittlich 35 % der peptidbeladenen Zielzellen, was auf eine hohe Funktionalität der T-Gedächtniszellpopulation nach dieser Immunisierung hindeutet (Abbildung 15 A).

Um die Ergebnisse der *in vivo*-Zytotoxizitätstests in funktioneller Hinsicht zu verifizieren, wurde die Produktion des Zytokins IFN $\gamma$  nach Restimulation mit dem Antigen OVA<sub>257-264</sub> in ELISpot-Analysen untersucht (Abbildung 15). Die Ergebnisse der ELISpot-Analysen in der immunologischen Gedächtnisphase veranschaulichen, dass die Kombi-TCI (Mittelwert: 304,9  $\pm$  98,73 SFU) im Vergleich zur alleinigen Verabreichung beider Agenzien (Anthralin: 2,5  $\pm$  2,0 oder IMI-Sol: 4,73  $\pm$  4,2 SFU) eine vermehrte Erzeugung IFN $\gamma$ -produzierender OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufweist.

## Ergebnisse



**Abbildung 15: OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen lysieren peptidbeladene Zielzellen effektiv und produzieren IFN $\gamma$ .**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100  $\mu$ g in Basiscreme) immunisiert. An Tag 36 wurde die Immunisierungseffizienz der TCI mit funktionellen Analysen der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CTLs überprüft. **A)** Die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden an Tag 8 mittels *in vivo* - Zytotoxizitätstests durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4  $\mu$ M und 4  $\mu$ M) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die niedriger konzentrierte Population (0,4  $\mu$ M) wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1  $\mu$ g/ml) beladen. **B)** Die Milzzellen von immunisierten Mäusen wurden für 20h mit OVA<sub>257-264</sub> restimuliert und die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Einheiten mittels ELISpot-Analysen detektiert. Abgebildet sind in die Einzelwerte mit deren Mittelwerten und der Standardabweichung (n= 4-8). Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

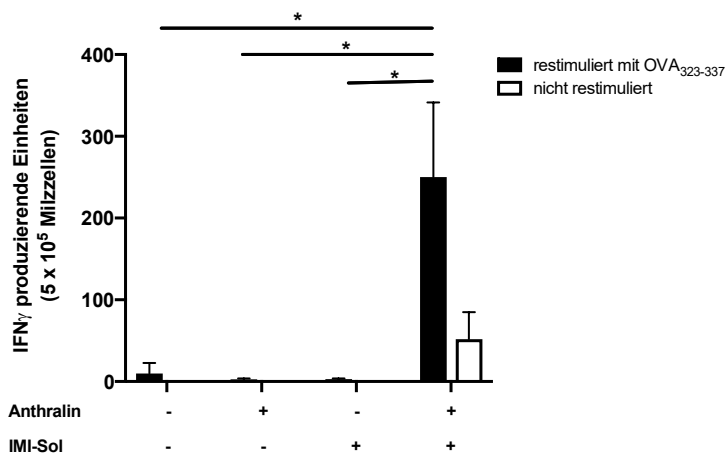
Die phänotypischen und funktionellen Analysen in der immunologischen Gedächtnisphase veranschaulichen somit die Entstehung hochfunktioneller CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen durch die Kombination der Agenzien Anthralin und Imiquimod in der TCI.

### 3.2.2 Anthralin fördert die Entstehung IFN $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der TCI

An die Charakterisierung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen anschließend sollte die Entstehung OVA<sub>323-337</sub>-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der TCI untersucht werden.

Die Durchführung von ELISpot-Analysen in der immunologischen Gedächtnisphase sollte zeitgleich Aufschluss über die Entstehung langlebiger T-Helfer-Gedächtniszellen und deren funktionellen Eigenschaften geben. Milzzellen transkutan immunisierter Mäuse wurden zu diesem Zweck in der Gedächtnisphase der TCI isoliert und die Sezernierung des Zytokins IFN $\gamma$  nach Restimulation mit dem Antigen OVA<sub>323-337</sub> quantifiziert (Abbildung 16).

## Ergebnisse



**Abbildung 16 Die TCI mit Anthralin und IMI-Sol erzeugt antigenspezifische, IFN $\gamma$ -produzierende CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Helferzellen.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100  $\mu$ g in Basiscreme) immunisiert. Milzzellen von immunisierten Mäusen wurden in IFN $\gamma$ -ELISpot-Analysen mit dem Antigen OVA<sub>323-337</sub> (1  $\mu$ g/ml) restimuliert und die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender Einheiten mit einem ELISpot-Reader quantifiziert. Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse der ELISpot-Analysen veranschaulichen die Sezernierung großer Mengen IFN $\gamma$  durch OVA<sub>323-337</sub>-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Gedächtnisphase der Kombi-TCI. Nach den Immunisierungen mit den einzelnen Agenzien können hingegen kaum IFN $\gamma$ -produzierenden Einheiten detektiert werden.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf die Entstehung langlebiger, antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der Kombi-TCI hin.

### 3.2.3 Die topische Verabreichung von Anthralin fördert die Entstehung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Haut

Als Resultat der TCI mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod konnten im Rahmen dieser Arbeit langanhaltende, antigenspezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen im Blut und der Milz immunisierter Mäuse identifiziert werden. Neben der Entstehung und Aufrechterhaltung langlebiger, systemischer T-Zell-Antworten ist die Rekrutierung der T-Gedächtniszellen in das immunisierte Gewebe gleichermaßen von großem Interesse (Gálvez-Cancino et al., 2018).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Identifizierung und Charakterisierung gewebresidenter T-Gedächtniszellen in Folge der TCI erfolgen. Zu diesem Zweck wurden

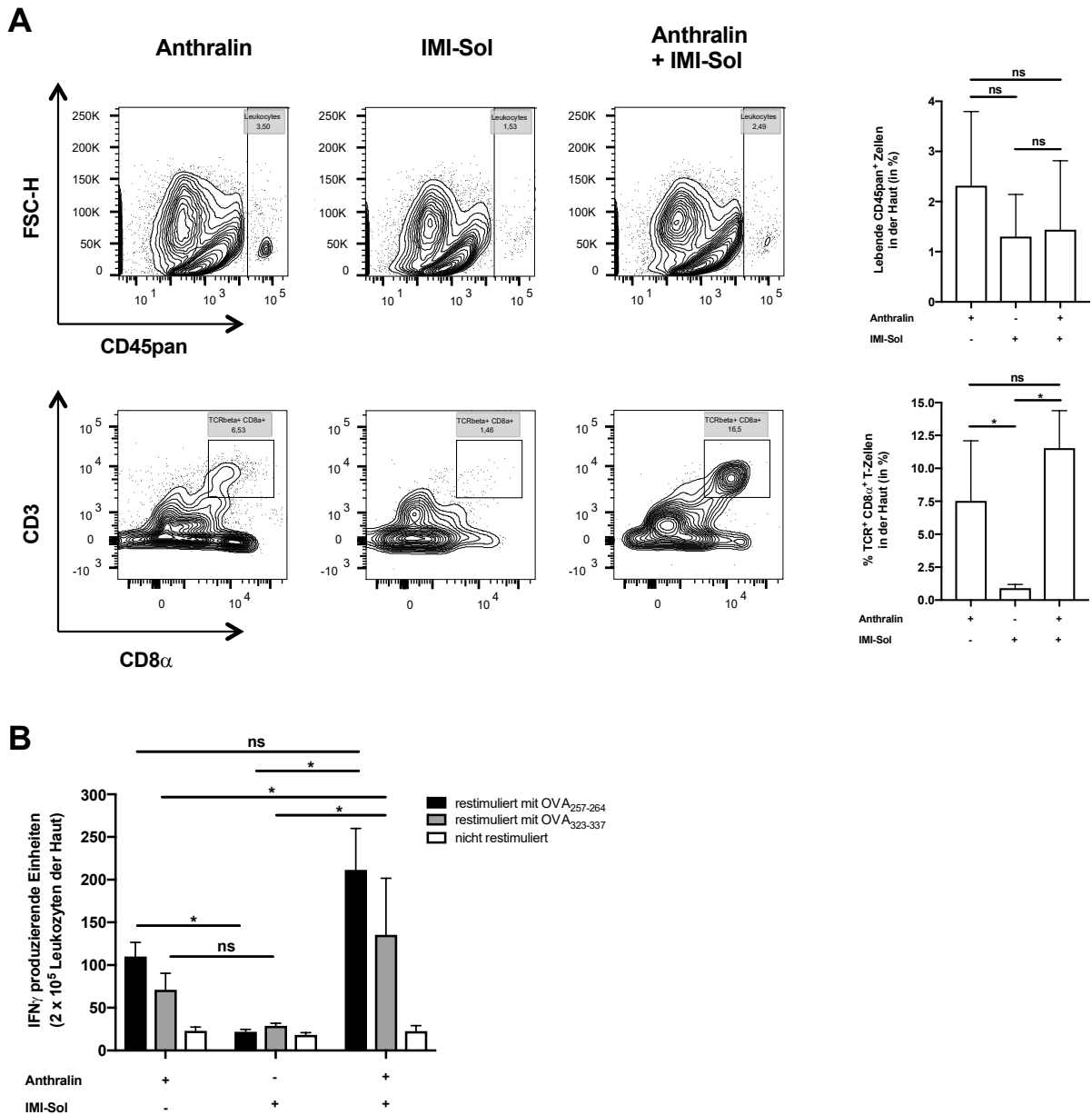
## Ergebnisse

Immunzellen in der Gedächtnisphase transkutaner Immunisierungen aus dem Ohrhautgewebe isoliert und sowohl phänotypisch (Abbildung 17 A) also auch funktionell (Abbildung 17 B) analysiert.

In Abbildung 17 A sind die repräsentativen, durchflusszytometrischen Analyseresultate (links) und die Quantifizierung (rechts) grafisch dargestellt. In der Gedächtnisphase der TCI weicht der prozentuale Anteil der CD45pan<sup>+</sup> Leukozyten bei den unterschiedlichen Behandlungsgruppen nicht signifikant voneinander ab (durchschnittlich 1,3 - 2,3 % CD45pan<sup>+</sup> Zellen in den lebenden Einzelzellen). Nach der Verabreichung von IMI-Sol sind durchschnittlich 0,9 % dieser Leukozyten in der Haut TCR<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> T-Zellen. Sowohl die TCI mit Anthralin (7,53 %) als auch die Kombi-TCI (11,54 %) bewirken eine signifikante Steigerung der Frequenz CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Haut. Ein Großteil dieser CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist überdies spezifisch für das Antigen OVA<sub>257-264</sub> (Mittelwert Anthralin: 58,32 ± 16,68 %, Mittelwert Kombi-TCI: 70,48 ± 5,63 %; Daten nicht gezeigt). Die Expression der Oberflächenmarker CD69 und CD103, typische Marker für *tissue resident memory cells* (TRMs), konnten auf diesen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden (Topham & Reilly, 2018) (Daten nicht gezeigt).

Die funktionellen Eigenschaften der identifizierten TRMs im Ohrhautgewebe wurden mit ELISpot-Analysen untersucht (Abbildung 17 B). Die Ergebnisse der IFNγ-ELISpot-Analysen veranschaulichen, dass die alleinige Verabreichung von IMI-Sol zur Entstehung einer geringen Anzahl an IFNγ-produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TRMs führt. Die Kombi-TCI bewirkt hingegen die Generierung einer Vielzahl antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TRMs, welche in Folge einer Restimulation mit dem entsprechenden Antigen (OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub>) beträchtliche Mengen IFNγ sezernieren. Vergleichbar mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Charakterisierung der TRMs in der Haut führt die alleinige Behandlung mit Anthralin zur Bildung IFNγ-produzierender CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TRMs, welche in der Menge nicht signifikant von der Kombi-TCI abweichen.

## Ergebnisse



**Abbildung 17: Anthralin, alleine oder in Kombination mit Imiquimod, induziert antigenspezifische, IFN<sub>γ</sub>-produzierende CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Haut.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. An Tag 36 wurde das Ohrhautgewebe von transkutan immunisierten Mäusen entnommen, eine Einzelzellsuspension hergestellt und sowohl durchflusszytometrisch als auch mit ELISpot-Analysen untersucht. **A)** Der Anteil CD45pan<sup>+</sup> Leukozyten an den lebenden Einzelzellen und der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots (links) und deren Quantifizierung (rechts). **B)** Die Hautzellsuspension immunisierter Mäuse wurde für 20 h mit OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub> (1 µg/ml) restimuliert und die Anzahl IFN<sub>γ</sub>-produzierender Einheiten mit einem ELISpot-Reader detektiert. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 10). Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

## Ergebnisse

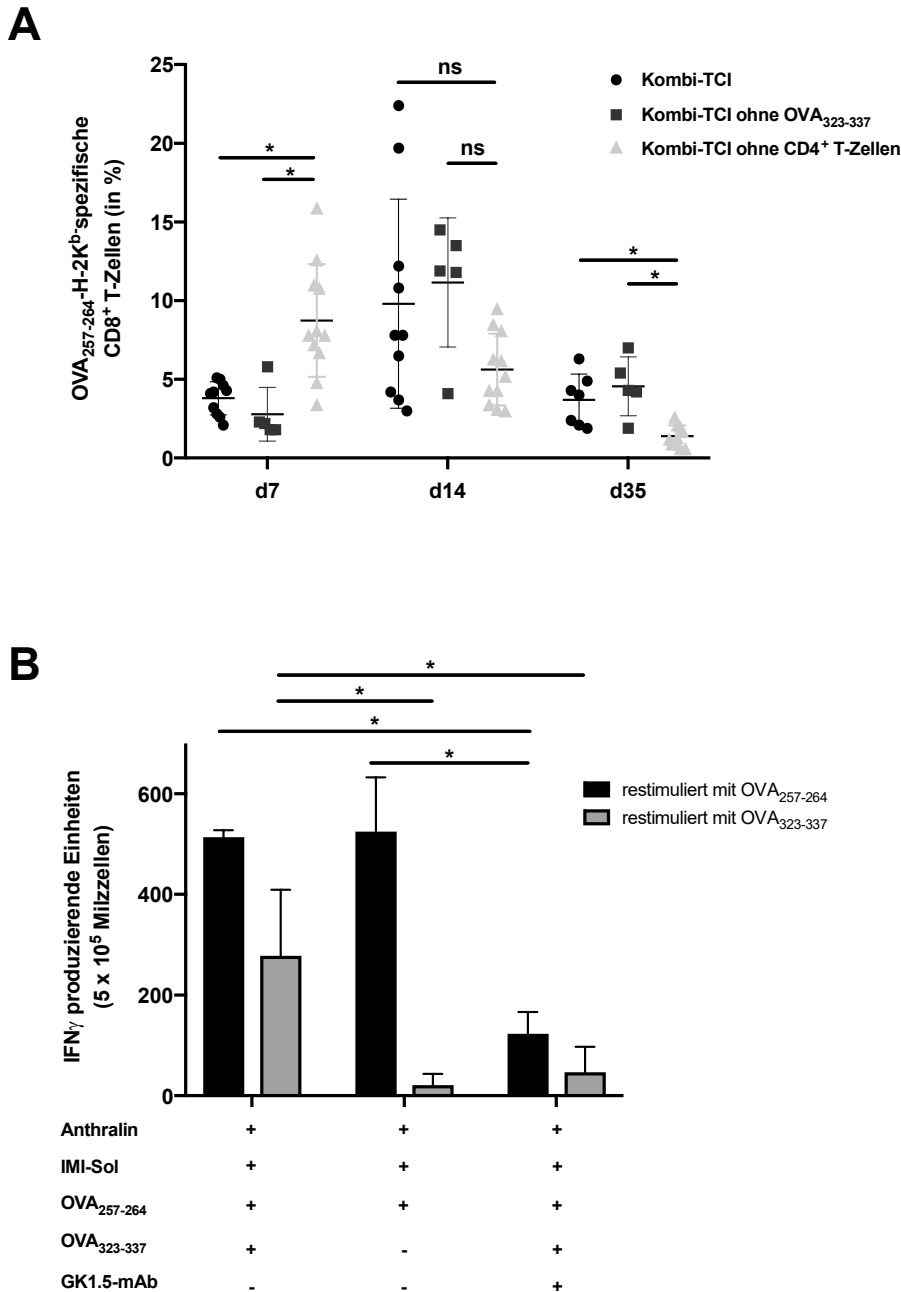
Die vorliegenden phänotypischen und funktionellen Analysen von T-Zellen deuten auf die Entstehung und Rekrutierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in das Ohrhautgewebe nach der Kombi-TCI hin. Darüber hinaus veranschaulichen diese Daten einen alleinigen Adjuvanseffekt von Anthralin bei der Generierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TRMs in der Haut.

### **3.2.4 Das Auftreten immunologischer Gedächtnisantworten in der Haut und peripheren lymphatischen Organen wird durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen beeinflusst**

In dieser Arbeit konnte die Induktion T<sub>H</sub>1-polarisierter CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und deren Differenzierung in langlebige CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in Folge der Kombi-TCI beobachtet werden. Die Generierung von primären CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen korrelierte in vorangegangenen Arbeiten mit der Entstehung und der Ausbildung funktioneller Charakteristika bei CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen (einschließlich der Produktion wichtiger Effektorproteine wie Granzym B und IFN $\gamma$ ) (Ahrends et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit sollten weiterführende Analysen einen Zusammenhang zwischen der verstärkten primären T-Helferzellantwort nach der Kombi-TCI und der nachfolgenden Entstehung OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor der Kombi-TCI durch die intravenöse Verabreichung eines CD4-spezifischen, monoklonalen Antikörpers (Klon GK1.5) depletiert. Die vollständige Depletion der CD4<sup>+</sup> Zellen wurde vor der Durchführung der Kombi-TCI anhand durchflusszytometrischer Analysen von Blutproben der behandelten Mäuse verifiziert (Daten nicht gezeigt). Nach der Durchführung der Kombi-TCI bei Mäusen mit oder ohne CD4<sup>+</sup> Zellen wurden die Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 7, 14 und 35 des Immunisierungsprotokolls bestimmt. In der immunologischen Gedächtnisphase wurden darüber hinaus die funktionellen Eigenschaften der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 18 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 18: Die Induktion antigenspezifischer IFN<sub>γ</sub>-produzierender CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Kombi-TCI wird durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. An Tag -1 und 7 wurde, wenn angezeigt, 500 µg des monoklonalen Antikörpers GK1.5 *i.v.* verabreicht. **A)** An Tag 7, 14 und 35 des Immunisierungsprotokolls wurden die Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut durchflusszytometrisch ermittelt. **B)** An Tag 36 wurden Milzzellen aus immunisierten Mäusen entnommen und für 20 h mit OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub> (1 µg/ml) restimuliert. IFN<sub>γ</sub>-produzierende Einheiten wurden als rote Punkte auf einer Membran detektiert und mit einem ELISpot-Reader quantifiziert. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (A, n = 4-10). Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet (B). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

## Ergebnisse

Abbildung 18 A veranschaulicht den zeitlichen Verlauf des Anteils antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen von der Primärantwort bis in die immunologische Gedächtnisphase der Kombi-TCI. Nach der Kombi-TCI ohne CD4<sup>+</sup> T-Zellen entsteht eine größere Anzahl OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (durchschnittlich 8,7 %) als in der Vergleichsgruppe mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen (durchschnittlich 3,8 %). Während in Anwesenheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Expansion der primären OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population bis zu Tag 14 nach der TCI beobachtet wird (durchschnittlich 9,8 %), ist der Verlauf der Frequenzen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegenläufig (durchschnittlich 5,6 %).

In der Gedächtnisphase der Kombi-TCI können im Blut immunisierter Mäuse mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchschnittlich 3,7 % OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nachgewiesen werden. Die Entstehung langlebiger T-Gedächtniszellen erfolgt in Abwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur eingeschränkt (durchschnittlich 1,39 % an Tag 35). Während diese eingeschränkte Generierung von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen auf eine entscheidende Beteiligung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Aufrechterhaltung und der Langlebigkeit der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation hindeutet, wirkt sich die fehlende Verabreichung des CD4<sup>+</sup> T-Zell-Epitops OVA<sub>323-337</sub> in der Kombi-TCI nicht nachteilig auf den Verlauf der Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus (Abbildung 18 A).

Die Bedeutung CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Ausbildung funktioneller Charakteristika von OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen wurde anschließend mit IFN $\gamma$ -ELISpot-Analysen überprüft (Abbildung 18 B). Die Restimulation von murinen Milzzellen durch die Antigene OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub> nach der Kombi-TCI bewirkt in Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Immunisierung die Sezernierung beträchtlicher Mengen IFN $\gamma$ . Demgegenüber ist die Anzahl OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub>-spezifischer IFN $\gamma$ -produzierender Einheiten in der Gedächtnisphase der TCI durch die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant geringer. Die Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor der Durchführung der Kombi-TCI führt überdies zum Ausbleiben CD8<sup>+</sup> TRMs in der Haut (nicht gezeigte Daten).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten einheitlich auf eine Bedeutung CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Entstehung gewebsresidenter und systemischer T-Gedächtniszellen nach der Kombi-TCI hin.

## Ergebnisse

### 3.3 Mechanismen der Induktion antigenspezifischer T-Zellen durch die Kombination von Anthralin und Imiquimod in der TCI

#### 3.3.1 Die Bedeutung oxidativer Ereignisse und der Bildung von ROS für die Entstehung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der TCI

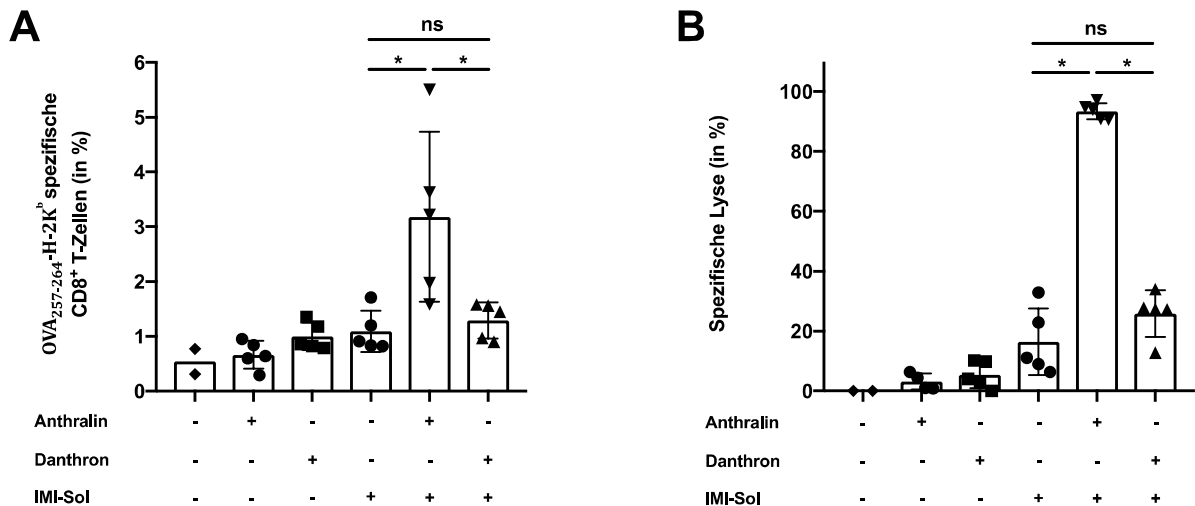
Die topische Verabreichung von Anthralin als Therapie der *Psoriasis vulgaris* ist bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts etabliert. Der Wirkmechanismus von Anthralin in psoriatischer Haut konnte bisher jedoch nicht vollständig entschlüsselt werden. Eine Vielzahl von Studien weist auf einen Zusammenhang zwischen der Oxidation von Anthralin, der Bildung freier Radikale (sogenannte „Anthralin-Radikale“ und reaktive Sauerstoffspezies) und der therapeutischen Effizienz darauf folgender Signalwege hin (Klaus Müller, 1997). Der Mechanismus des in der vorliegenden Arbeit identifizierten Adjuvanseffektes von Anthralin in der Kombi-TCI sollte anhand dieser Hypothese untersucht werden.

##### 3.3.1.1 Danthron hat keinen vergleichbaren Adjuvanseffekt in der Imiquimod-basierten TCI

Anthralin ist ein extrem instabiles Molekül, welches in wässriger Lösung unverzüglich durch licht-katalysierte Autooxidation in das chemisch inaktive Danthron reagiert. In gesunder Haut führt die topische Verabreichung von Anthralin zu einer Entzündung, was in vorangegangenen Arbeiten sowohl durch die Interaktion auto-oxidativer Zwischenprodukte von Anthralin mit Proteinen, Lipiden und Carbohydraten im Gewebe als auch durch die Induktion sekundärer Entzündungsmediatoren durch inflammatorische Zellen erklärt wurde (Mahrlé, 1997). Nachfolgend soll in dieser Arbeit überprüft werden, ob die Autooxidation von Anthralin in der Haut einen entscheidenden Einfluss auf die Entfaltung des Adjuvanseffektes in der Imiquimod-basierten TCI hat.

Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von Danthron, welches durch Photooxidation von Anthralin mit angeregtem Sauerstoff gewonnen werden kann, auf die Entstehung adaptiver Immunantworten nach der Imiquimod-basierten TCI untersucht. Die Ergebnisse der phänotypischen und funktionellen Analysen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI mit Danthron oder Anthralin sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Danthron hat keinen vergleichbaren Adjuvanseffekt wie Anthralin auf die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren funktionelle Eigenschaften nach der Imiquimod-basierten TCI.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin oder Danthron (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. Durchflusszytometrisch wurden **A**) an Tag 7 die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut quantifiziert und **B**) an Tag 8 die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *in vivo* - Zytotoxizitätstests untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4 µM und 4 µM) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die niedriger konzentrierte Population (0,4 µM) wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1 µg/ml) beladen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 2-5). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die oberflächliche Betrachtung der mit Danthron behandelten Ohrhaut bis Tag 7 verdeutlicht, dass im Gegensatz zu der topischen Behandlung mit Anthralin keine Entzündungsreaktion erkennbar ist. Überdies sind die Symptome der Entzündungsreaktion auch nach der aufeinanderfolgenden Verabreichung von Danthron und IMI-Sol nur geringem Maße ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 19 A sind die Frequenzen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 7 nach der TCI dargestellt. Während die aufeinanderfolgende Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol durchschnittlich 3,18 % OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erzeugt, führt die TCI mit Danthron und IMI-Sol zu einer signifikant geringeren Häufigkeit antigenspezifischer CTLs (durchschnittlich 1,29 %). Die alleinige Verabreichung von IMI-Sol (durchschnittlich 1,09 %) erzeugt im Vergleich zur Kombi-TCI mit Danthron keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 19 A).

Überdies ist die spezifische Lyse peptidbeladener Zielzellen durch OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der topischen Verabreichung von Danthron und IMI-Sol (durchschnittlich 25,84 %) signifikant geringer als bei der Kombi-TCI mit Anthralin und IMI-Sol (durchschnittlich

## Ergebnisse

93,41 %). Die Kombi-TCI mit Danthron induziert zudem nur eine geringfügige und nicht signifikante Steigerung der spezifischen Lyse im Vergleich zur alleinigen TCI mit IMI-Sol.

Diese phänotypischen und funktionellen Studien antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen heben die Bedeutung oxidativer Ereignisse und der darauffolgenden Signalwege bei der Entfaltung des Adjuvanseffektes von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI hervor.

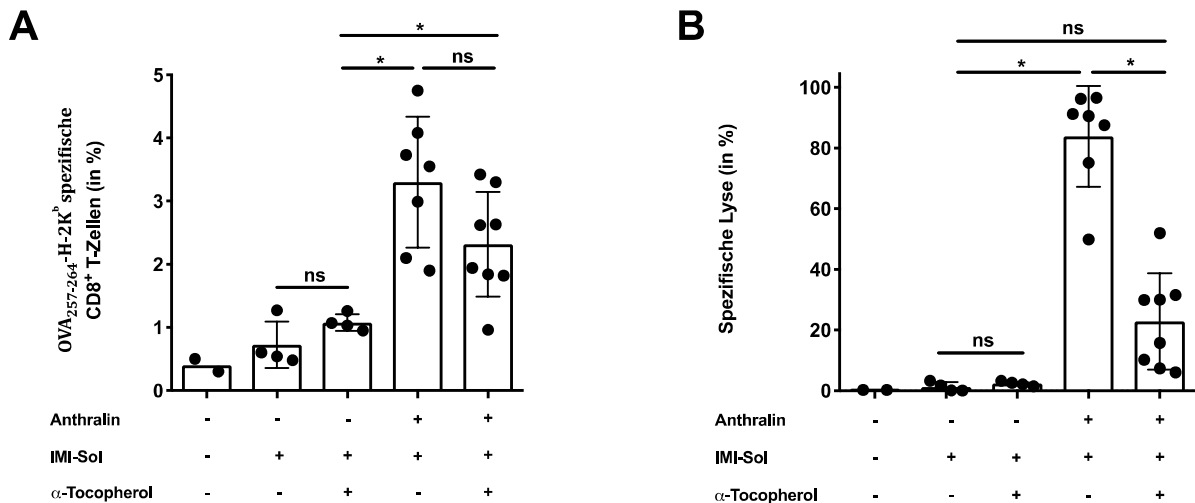
### *3.3.1.2 Radikalfangende Substanzen minimieren die Immunisierungseffizienz der Kombi-TCI*

Vorangegangene Experimente in dieser Arbeit konnten einen Zusammenhang von oxidativen Ereignissen und der vollständigen Entfaltung des Adjuvanseffektes von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI demonstrieren. In Folge der Oxidation von Anthralin in psoriatischer Haut konnte die Entstehung sogenannter „Anthralin-Radikale“ (10-Anthranyl-Radikal, Dithranolperoxy-Radikal und Dithranolhydroperoxy-Radikal) und ROS nachgewiesen werden (Klaus Müller, 1997). Die Induktion der ROS ist überdies mit der Initiation verschiedener immunmodulatorischer Signalkaskaden im angeborenen und adaptiven Immunsystem verknüpft (J. Zhang et al., 2016). Um den Wirkmechanismus von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI detaillierter beschreiben zu können, sollte die auf die Oxidation von Anthralin folgende Signalkaskade der ROS mit Hilfe radikalfangender Substanzen unterbrochen werden.

Tocopherole sind die am häufigsten vorkommenden Formen des Vitamin E und können über einen Chromanring mit freien Radikalen interagieren, was zu einer Unterbrechung der Kettenreaktion in der Radikalbildung führt (Hajibabaei, 2016). Diese radikalfangenden Eigenschaften der Tocopherole sollten im Rahmen der Kombi-TCI genutzt werden, um den Einfluss der Radikalsynthese nach der Oxidation von Anthralin und der resultierenden Signalwege auf die Effizienz der Kombi-TCI zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurde  $\alpha$ -Tocopherol jeweils direkt vor den topischen Behandlungen mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod in der TCI systemisch verabreicht. Abbildung 20 illustriert den Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Entstehung OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren Fähigkeit zur Lyse peptidbeladener Zielzellen in der primären Immunantwort.

## Ergebnisse



**Abbildung 20: Die radikalangefangene Substanz  $\alpha$ -Tocopherol vermindert die funktionellen Eigenschaften OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Kombi-TCI.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100  $\mu$ g in Basiscreme) immunisiert. Je 2 h vor der topischen Verabreichung der Substanzen in der TCI wurde den Mäusen  $\alpha$ -Tocopherol (15 mg, gelöst in Maisöl) *i.p.* injiziert. Durchflusszytometrisch wurden **A**) an Tag 7 die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut quantifiziert und **B**) an Tag 8 die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *in vivo* - Zytotoxizitätstests untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4  $\mu$ M und 4  $\mu$ M) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die niedriger konzentrierte Population (0,4  $\mu$ M) wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1  $\mu$ g/ml) beladen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 2-8). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Abbildung 20 A zeigt, dass die Verabreichung von  $\alpha$ -Tocopherol vor der Kombi-TCI zu einer nicht-signifikanten Reduktion der Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 3,3 % auf 2,3 % führt. Die Frequenzen antigenspezifischer CTLs sind nach der Verabreichung von  $\alpha$ -Tocopherol vor der Kombi-TCI signifikant höher als nach den alleinigen Verabreichungen von Anthralin oder IMI-Sol. Beim Vergleich der Frequenzen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Mäusen, welche mit IMI-Sol (mit oder ohne  $\alpha$ -Tocopherol) behandelt wurden, werden keine signifikanten Unterschiede beobachtet (Abbildung 20 A).

Überdies sind in Abbildung 20 B die Auswirkungen radikalangefangener Substanzen auf die funktionellen Eigenschaften der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der TCI dargestellt. Die Bestimmung der spezifischen Lyse veranschaulicht, dass die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Folge der Verabreichung von  $\alpha$ -Tocopherol vor der Kombi-TCI deutlich eingeschränkt sind. Die funktionellen Einschränkungen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Folge der Kombi-TCI mit  $\alpha$ -Tocopherol konnten zusätzlich in IFN $\gamma$ -ELISpot-Analysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse

Diese Ergebnisse deuten auf eine bedeutende Rolle der Radikalsynthese und deren nachfolgende Signalkaskade für die Induktion adaptiver Immunantworten nach der Kombi-TCI hin.

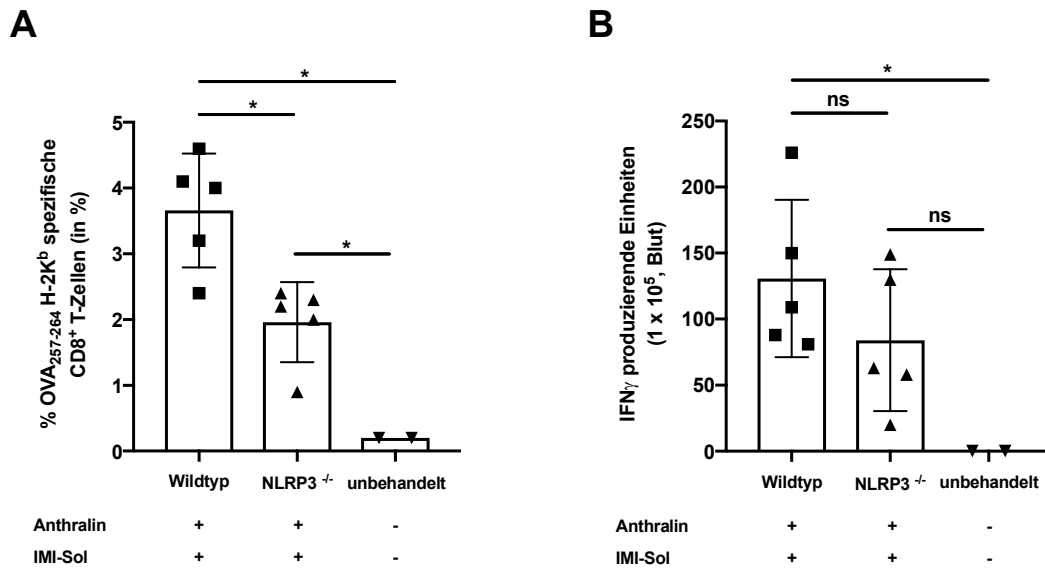
### *3.3.1.3 ROS-induzierten NLRP3-Inflammasome beeinflussen die Induktion adaptiver Immunantworten nach der Kombi-TCI*

Vorangegangene Experimente in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Entstehung des Adjuvanseffekt von Anthralin mit dessen Oxidation und der Entstehung von ROS zusammenhängt. In früheren Publikationen konnte bereits ein Zusammenhang von der Entstehung von ROS nach der Oxidation von Anthralin und der nachfolgenden Entzündungsreaktion beschrieben werden.

Inflammasome sind zytosolische Sensoren inflammatorischer Signale und verantwortlich für die Aktivierung von Entzündungsreaktionen. Vor allem die Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms wird hierbei durch ROS positiv beeinflusst (Minutoli et al., 2016). Darüber hinaus zeigen in unserem Labor durchgeführte Massen-NGS-Analysen von Anthralin-behandelter, muriner Ohrhaut eine gesteigerte Expression einzelner Komponenten des NLRP3-Inflammasoms und der assoziierten Zytokine der IL-1-Familie (nicht gezeigte Daten). Auf diese Erkenntnisse aufbauend sollte die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms für die Entstehung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der TCI mit Anthralin und Imiquimod untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden wildtypische und NLRP3-defiziente Mäuse transkutan mit Anthralin und Imiquimod immunisiert und die Immunantwort in der Primärantwort an Tag 7 analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 21 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 21: Das NLRP3-Inflammasom beeinflusst die Entstehung CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Primärantwort der Kombi-TCI.**

Wildtypische Mäuse oder NLRP3-defiziente Mäuse (NLRP3<sup>-/-</sup>) wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. An Tag 7 des Immunisierungsprotokolls wurde **A**) durchflusszytometrisch die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut quantifiziert und **B**) die Anzahl IFN<sub>γ</sub>-produzierender Einheiten im Blut immunisierter Mäuse nach der Restimulation mit dem Antigen OVA<sub>257-264</sub> (1 µg/ml) bestimmt. Abgebildet sind in die Einzelwerte mit deren Mittelwerten und der Standardabweichung (n = 2-5). Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Abbildung 21 A veranschaulicht, dass die Kombi-TCI in wildtypischen Mäusen (3,66 %) signifikant mehr OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen als in NLRP3-defizienten Mäusen (1,96 %) erzeugt. Die Anzahl IFN<sub>γ</sub>-produzierender Einheiten im Blut ist in NLRP3-defizienten Mäusen (84 ± 53,74 SFU) nach der Restimulation mit dem Antigen OVA<sub>257-264</sub> zudem geringer als in wildtypischen Mäusen (130,8 ± 59,62 SFU) (Abbildung 21 B).

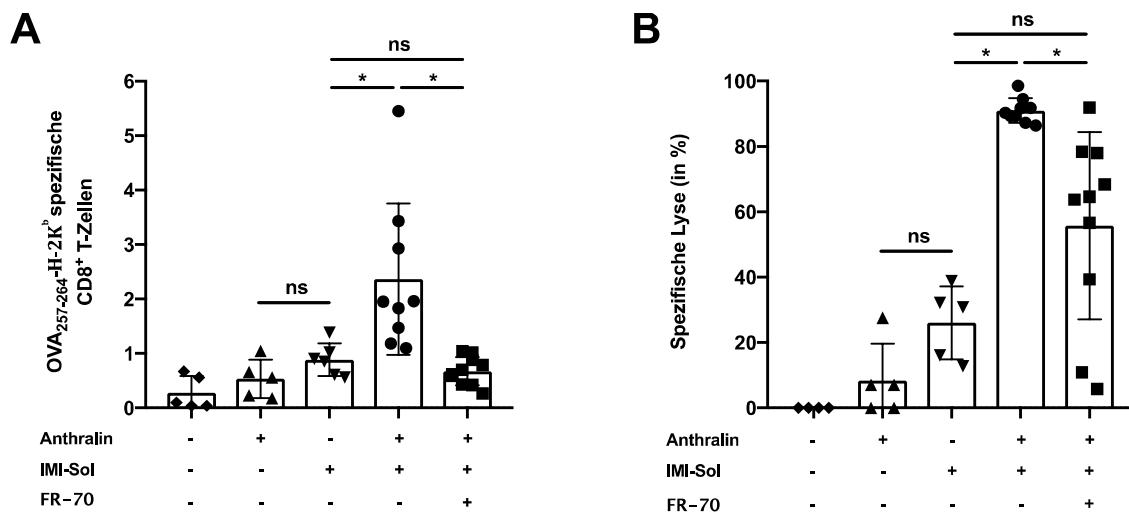
Die in Abbildung 21 dargestellten Daten deuten auf eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms bei der Entstehung OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Kombi-TCI hin.

## Ergebnisse

### 3.3.2 Die Blockade von CD70 führt zu einer verringerten Frequenz antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI

Die Induktion potenter und langanhaltender T-Zell-Antworten ist maßgeblich von einer hinreichenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems abhängig. Professionelle APCs nehmen Antigene in der Körperperipherie auf, wandern in sekundäre lymphatische Organe und präsentieren diese Antigene auf MHC-Komplexen naiven T-Zellen, um diese zu primen und zur klonalen Expansion anzuregen. Um eine weiterführende Differenzierung solcher geprimter T-Zellen in funktionstüchtige Effektor- und Gedächtniszellen zu ermöglichen, werden sogenannte kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche der APCs exprimiert (siehe 1.3.4). Diese interagieren mit zugehörigen Kostimulatoren von T-Zellen. Ein bekanntes Beispiel für solche Interaktionen ist die Interaktion des Kostimulators CD70 auf APCs und CD27 auf T-Zellen. CD27 ist ein bedeutender Immuncheckpoint, welcher bei hinreichender Interaktion mit CD70 auf APCs zur klonalen Expansion der T-Zellen führt (Wajant, 2016).

Nachfolgend sollte durch die systemische Verabreichung des CD70-spezifischen Antagonisten FR-70 die Notwendigkeit des CD70/CD27-Signalweges für die Induktion und Expansion antigenspezifischer T-Zellen in Folge der Kombi-TCI untersucht werden. Abbildung 22 veranschaulicht die Ergebnisse der Blockade von CD70 in der primären Immunantwort der TCI mit den Agzien Anthralin und Imiquimod.



**Abbildung 22: Die Blockade des Kostimulators CD70 verringert die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber nicht deren Effektorfunktionen, in der Kombi-TCI.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin oder Danthron (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. Der monoklonale Antikörper FR-70 wurde *i.p.* verabreicht (je 250 µg an Tag 0, 1 und 4). Durchflusszytometrisch wurden **A**) an Tag 7 die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut quantifiziert und **B**) an Tag 8 die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *in vivo* -

## Ergebnisse

Zytotoxizitätstests untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4  $\mu$ M und 4  $\mu$ M) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die niedriger konzentrierte Population (0,4  $\mu$ M) wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1  $\mu$ g/ml) beladen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 5-10). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p <0,05; ns = nicht signifikant).

Die Kombi-TCI mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod erzeugt durchschnittlich 2,4 % OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 7 des Immunisierungsprotokolls (Abbildung 22 A). Die zusätzliche Verabreichung des CD70-Antagonisten FR-70 bewirkt eine signifikante Abnahme des Anteils antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI auf durchschnittlich 0,7 %. Die Verabreichung des CD70-Antagonisten in der Kombi-TCI führt zu vergleichbaren Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie in den TCIs mit Anthralin (0,5 %) oder IMI-Sol (0,9 %).

Abbildung 22 B verdeutlicht darüber hinaus eine signifikante Abnahme der spezifischen Lyse von OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Verabreichung des CD70-Antagonisten in der Kombi-TCI. Trotz der Verabreichung des CD70-Antagonisten in der Kombi-TCI ist der Anteil lysierter Zielzellen jedoch höher als nach den alleinigen TCIs mit Anthralin oder IMI-Sol.

Diese Experimente weisen somit auf die Expansion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der TCI unter maßgeblicher Beteiligung des Kostimulators CD70 hin, während die funktionellen Eigenschaften der antigenspezifischen CTLs in geringerem Maße durch die Blockade des Kostimulators CD70 eingeschränkt sind. Basierend auf diesen Ergebnissen, welche die Bedeutung einer suffizienten Antigenpräsentation hervorheben, sollten im Folgenden die Auswirkungen der Agenzien Anthralin und Imiquimod auf APCs untersucht werden.

## Ergebnisse

### 3.4 Die Bedeutung von APCs für die Induktion adaptiver Immunantworten nach der Kombi-TCI

Professionelle APCs sind das Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Während in dieser Arbeit bereits eine Beteiligung von APCs bei der Expansion antigenspezifischer CTLs durch den Kostimulator CD70 veranschaulicht wurde, korrelierte die Entstehung antiviraler oder antitumoraler T-Zell-Antworten in vorangegangenen Arbeiten mit einer hinreichenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte folglich überprüft werden, welche Subtypen der APCs die Entstehung und die Qualität adaptiver Immunantworten durch die TCI mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod beeinflussen.

#### 3.4.1 Die Bedeutung des TLR7-Signalweges in verschiedenen Subtypen der APCs für die Induktion antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI *in vivo*

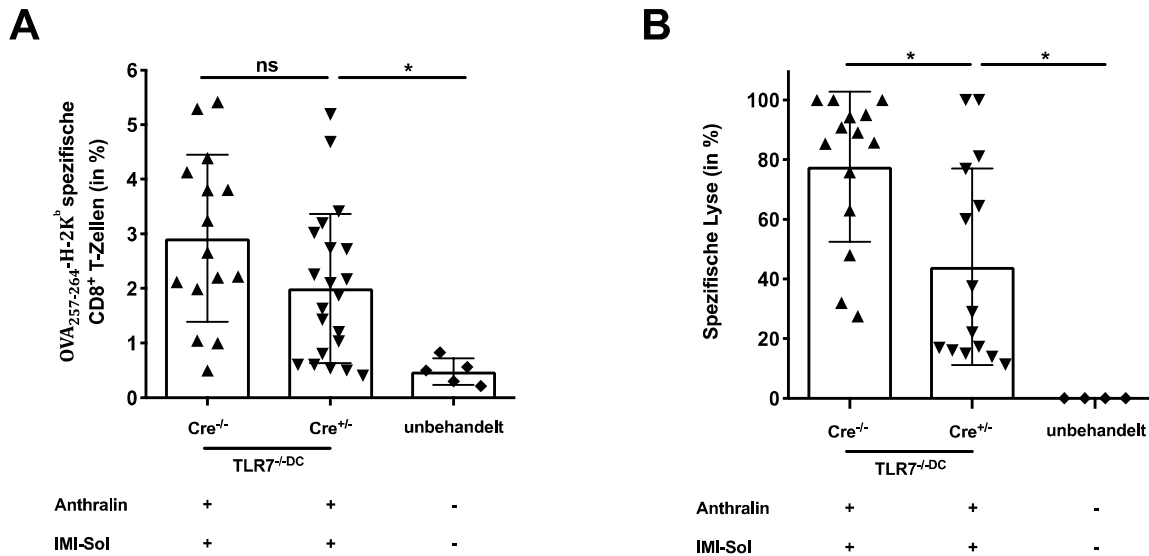
Die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen und deren Differenzierung in langanhaltende T-Gedächtniszellen nach der Kombi-TCI werden maßgeblich durch den TLR7-Signalweg beeinflusst. Die Immunisierung TLR7-defizienter Mäuse mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod erzeugt keine OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Auf diese Erkenntnisse aufbauend sollte die Effizienz der Kombi-TCI in konditionellen TLR7-defizienten Mäusen *in vivo* analysiert werden. Von großem Interesse waren der potentielle Einfluss des TLR7-Signalweges in DCs (TLR7<sup>-DC</sup>) oder Makrophagen (TLR7<sup>-Mφ</sup>) bei der Entstehung antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI.

##### 3.4.1.1 Der TLR7-Signalweg in CD11c<sup>+</sup> DCs ist essentiell für die Entstehung hochqualitativer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der Kombi-TCI

DCs stellen aufgrund der effizienten Präsentation von Antigenen an naive T-Zellen den wichtigsten Vertreter der APCs dar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Verwendung von TLR7<sup>-DC</sup>-Mäusen, deren DCs charakteristischerweise keine TLR7 exprimieren, Aufschlüsse über die Bedeutung des TLR7-Signalweges in CD11c<sup>+</sup> DCs für die Effizienz der Kombi-TCI erlauben.

Zu diesem Zweck wurden TLR7<sup>-DC</sup>-Mäuse und wildtypische Wurfgeschwister transkutan immunisiert und die Immunisierungseffizienz in der immunologischen Primär- und Gedächtnisantwort bestimmt. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Primärantwort zusammengefasst.

## Ergebnisse



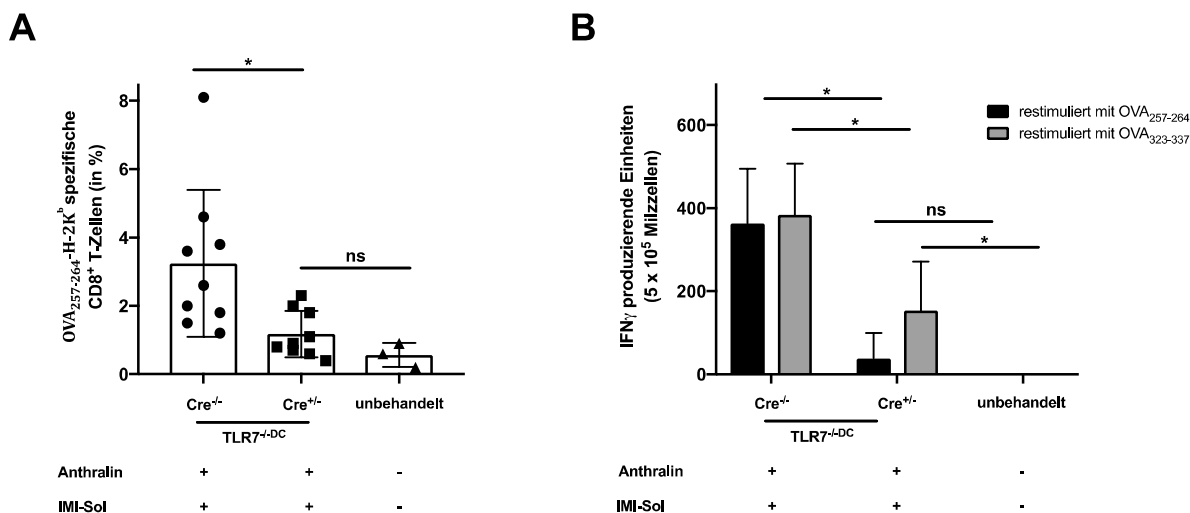
**Abbildung 23: Die Effektorfunktionen, aber nicht die Frequenz, von OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Primärantwort der Kombi-TCI in TLR7<sup>-/-</sup>DC-Mäusen eingeschränkt.**

TLR7<sup>-/-</sup>DC (Cre<sup>+/-</sup> KOs oder Cre<sup>-/-</sup> Geschwistertiere) wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin oder Danthron (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. Durchflusszytometrisch wurden **A**) an Tag 7 die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut quantifiziert und **B**) an Tag 8 die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *in vivo* - Zytotoxizitätstests untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4 µM und 4 µM) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die niedriger konzentrierte Population (0,4 µM) wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1 µg/ml) beladen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 4-21). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die in Abbildung 23 A dargestellten Ergebnisse zeigen eine nicht signifikante Abnahme der Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TLR7<sup>-/-</sup>DC-Mäusen im Vergleich zu deren wildtypischen Wurfgeschwistern an Tag 7 des Immunisierungsprotokolls. Demgegenüber ist die Befähigung der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur spezifischen Lyse von peptidbeladenen Zielzellen in TLR7<sup>-/-</sup>DC-Mäusen im Vergleich zu deren wildtypischen Wurfgeschwistern signifikant reduziert (Abbildung 23 B).

Um überdies die Auswirkungen der TLR7-Defizienz in DCs auf die Entstehung langlebiger T-Gedächtniszellen zu überprüfen, wurden phänotypische und funktionelle Analysen antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der immunologischen Gedächtnisphase der Kombi-TCI durchgeführt (Abbildung 24).

## Ergebnisse



**Abbildung 24: Die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen und deren Effektorfunktionen sind nach der Kombi-TCI in TLR7<sup>-DC</sup>-Mäusen reduziert.**

TLR7<sup>-DC</sup> (Cre<sup>+/-</sup> KOs oder Cre<sup>-/-</sup> Geschwistertiere) wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin oder Danthron (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. **A**) An Tag 35 des Immunisierungsprotokolls wurde die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut durchflusszytometrisch ermittelt. **B**) An Tag 36 wurden Milzzellen aus immunisierten Mäusen entnommen und für 20 h mit OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub> (1 µg/ml) restimuliert. IFN $\gamma$ -produzierende Einheiten wurden als rote Punkte auf einer Membran detektiert und mit einem ELISpot-Reader quantifiziert. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (A, n = 3-9). Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet (B). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die fehlende TLR7-Signalkaskade in TLR7<sup>-DC</sup>-Mäusen führt in der Gedächtnisphase der Kombi-TCI zu einer signifikanten Abnahme der Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu deren wildtypischen Wurfgeschwistern (Abbildung 24 A). Die Menge des sezernierten Zytokins IFN $\gamma$  von Milzzellen aus TLR7<sup>-DC</sup>-Mäusen nach der Restimulation mit den T-Zell-Epitopen OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub> ist durch Fehlen des TLR7-Signalweges in DCs minimiert (Abbildung 24 B).

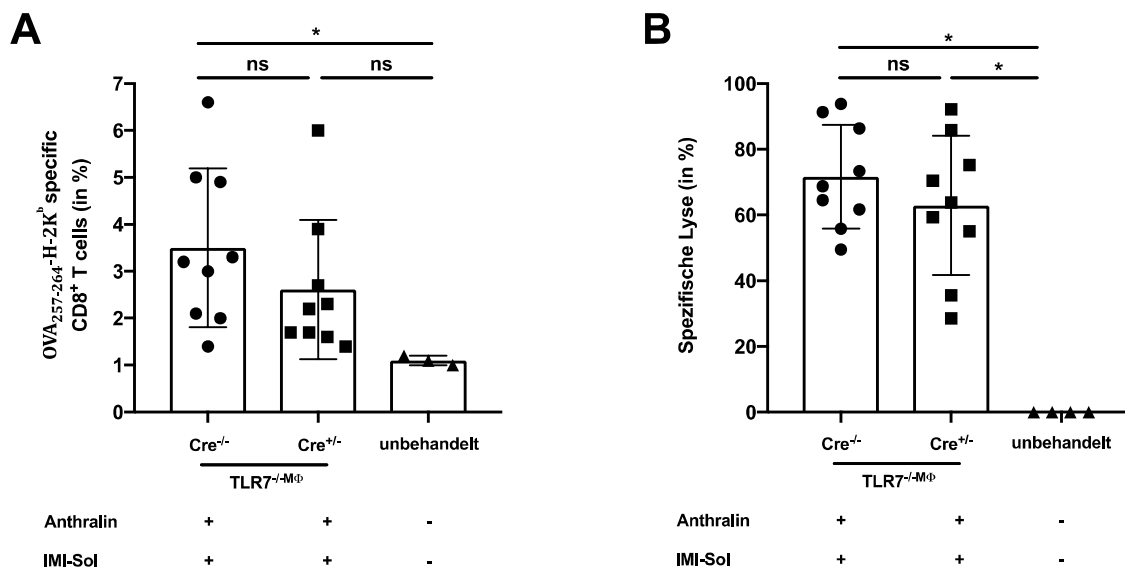
Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse eine hohe Relevanz des TLR7-Signalweges in DCs für die Entstehung qualitativ hochwertiger und langlebiger CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI

### 3.4.1.2 Der TLR7-Signalweg in Makrophagen nimmt geringfügigen Einfluss auf die Entstehung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der Kombi-TCI

Makrophagen eliminieren Pathogene durch Phagozytose und präsentieren Antigene nach der Aufnahme und Prozessierung auf MHC-Molekülen T-Zellen. Darüber hinaus sezernieren Makrophagen in Folge der Stimulation von PRRs (*pattern recognition receptors*) pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und weitere inflammatorische Faktoren, welche

## Ergebnisse

indirekt zur Initiation adaptiver Immunantworten beitragen (Celhar et al., 2016). Durch die Verwendung von TLR7<sup>-/-MΦ</sup>-Mäusen, welche durch TLR7-defiziente Makrophagen charakterisiert sind, und deren wildtypischen Wurfgeschwistern sollte die Bedeutung des TLR7-Signalweges in Makrophagen für die Entstehung und Aufrechterhaltung von antigenspezifischen T-Zell-Antworten nach der Kombi-TCI untersucht werden. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Analysen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TLR7<sup>-/-MΦ</sup>-Mäusen in der primären Immunantwort der Kombi-TCI dargestellt.



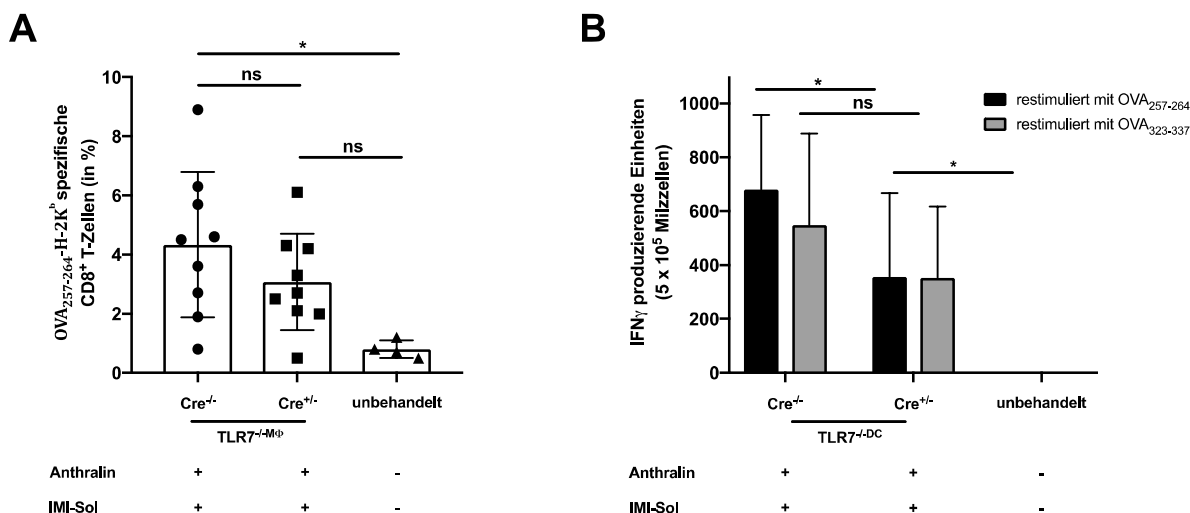
**Abbildung 25: Die Frequenz und die Effektorfunktionen von OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Primärantwort der Kombi-TCI in TLR7<sup>-/-MΦ</sup>-Mäusen nicht eingeschränkt.**

TLR7<sup>-/-MΦ</sup> (Cre<sup>+/-</sup> KOs oder Cre<sup>-/-</sup> Geschwistertiere) wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin oder Danthron (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. Durchflusszytometrisch wurden **A**) an Tag 7 die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CTLs im Blut quantifiziert und **B**) an Tag 8 die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch *in vivo*-Zytotoxizitätstests untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4 µM und 4 µM) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die niedriger konzentrierte Population (0,4 µM) wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1 µg/ml) beladen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 3-9). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die Frequenz der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 25 A) und deren lytische Eigenschaften (Abbildung 25 B) sind nach der Kombi-TCI in Mäusen mit TLR7-defizienten Makrophagen im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern nicht signifikant beeinträchtigt.

Während diese Ergebnisse aus der immunologischen Primärantwort auf einen geringen Einfluss des TLR7-Signalweges in Makrophagen für die Entstehung von OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren Effektorfunktionen nach der Kombi-TCI hindeuten, wurde nachfolgend deren Differenzierung in langlebige T-Gedächtniszellen untersucht (Abbildung 26).

## Ergebnisse



**Abbildung 26: Die Effektorfunktionen, aber nicht die Frequenz, OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen sind nach der Kombi-TCI in TLR7<sup>-/-Mφ</sup>-Mäusen geringfügig reduziert.**

TLR7<sup>-/- Mφ</sup> (Cre<sup>+/-</sup> KOs oder Cre<sup>-/-</sup> Geschwistertiere) wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin oder Danthron (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. **A**) An Tag 35 des Immunisierungsprotokolls wurde die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut durchflusszytometrisch ermittelt. **B**) An Tag 36 wurden Milzzellen aus immunisierten Mäusen entnommen und für 20 h mit OVA<sub>257-264</sub> oder OVA<sub>323-337</sub> (1 µg/ml) restimuliert. IFN $\gamma$ -produzierende Einheiten wurden als rote Punkte auf einer Membran detektiert und mit einem ELISpot-Reader quantifiziert. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (A, n = 3-9). Bei den ELISpot-Analysen sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten abgebildet (B). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Sowohl die Expansion der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CTLs bis Tag 14 (Daten nicht gezeigt) als auch deren Frequenz in der immunologischen Gedächtnisphase variieren bei TLR7<sup>-/-Mφ</sup>-Mäusen (3 %) und wildtypischen Wurfgeschwistern (4,3 %) in nicht signifikantem Ausmaß (Abbildung 26 A).

Die in Abbildung 26 B dargestellten Ergebnisse der ELISpot-Analysen in der Gedächtnisphase weisen auf eine signifikant geringere Menge IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TLR7<sup>-/-Mφ</sup>-Mäusen nach der Stimulation mit dem Antigen OVA<sub>257-264</sub> hin. Die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterscheidet sich bei TLR7<sup>-/-Mφ</sup>-Mäusen und deren wildtypischen Wurfgeschwistern hingegen nicht signifikant. Im Vergleich zu unbehandelten Mäusen erzeugt die Kombi-TCI in TLR7<sup>-/-Mφ</sup>-Mäusen eine signifikante Steigerung der Anzahl OVA<sub>323-337</sub>- und OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer IFN $\gamma$ -produzierender Einheiten.

Die Verwendung des konditionellen TLR7-Defizienz-Modells in Makrophagen zeigt, dass der TLR7-Signalweg in Makrophagen die Entstehung und die funktionellen Eigenschaften von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI in geringem Maß beeinflusst.

## Ergebnisse

### 3.4.2 Untersuchung direkter Adjuvanseffekte von Anthralin und Imiquimod auf professionelle APCs *in vitro*

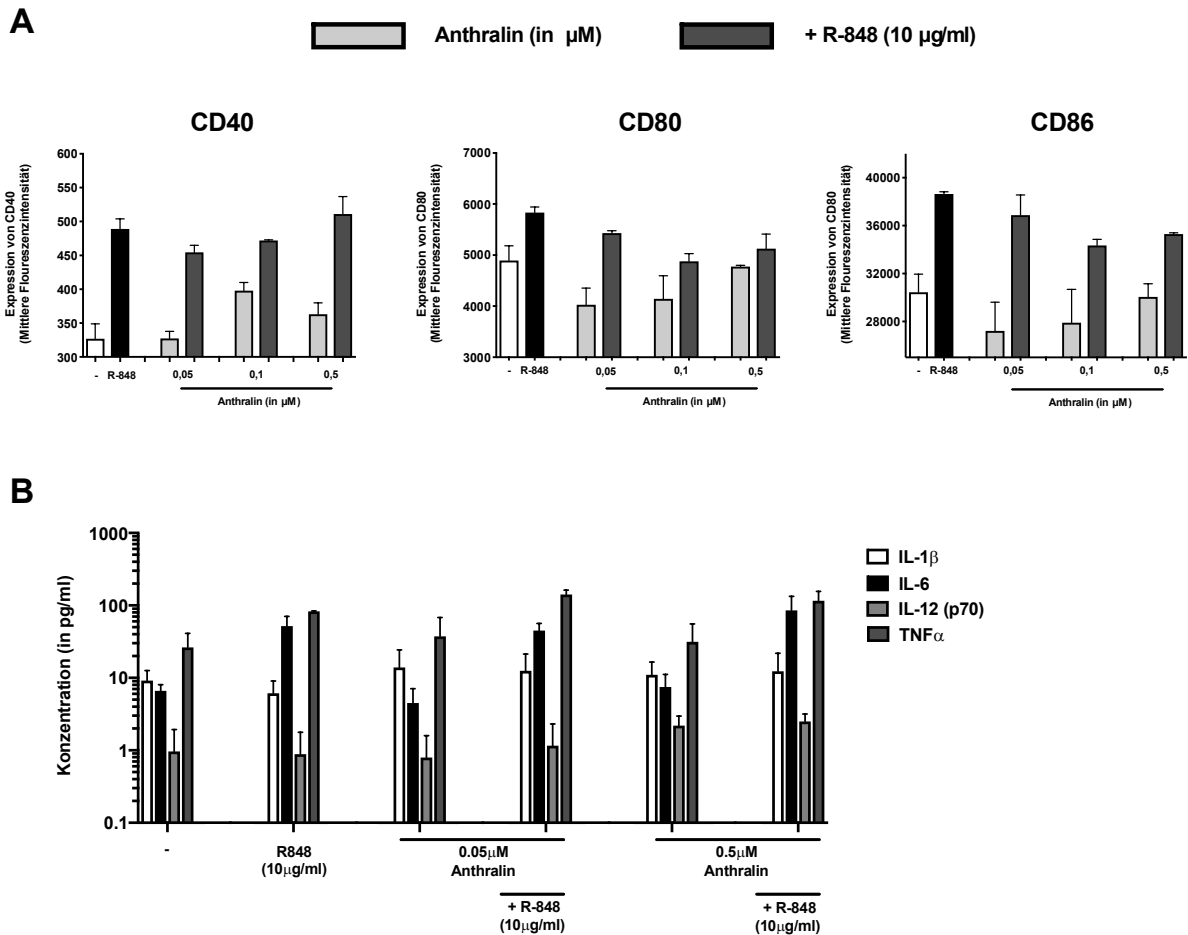
In der vorliegenden Arbeit konnte veranschaulicht werden, dass die funktionellen Eigenschaften und die Langlebigkeit antigenspezifischer T-Zellen nach der TCI mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod maßgeblich durch den TLR7-Signalweg in DCs beeinflusst werden. Die alleinige Stimulation des TLR7-Rezeptors durch die Imiquimod-haltige Nanoemulsion IMI-Sol genügt bei der TCI an der Ohrhaut jedoch nicht, um eine langanhaltende, adaptive Immunantwort auszulösen. Vor diesem Hintergrund war die Untersuchung direkter Effekte von Anthralin auf professionelle APCs von großem Interesse. Um Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen *in vivo* ausschließen zu können, wurden nachfolgend Analysen von DCs und Makrophagen *in vitro* durchgeführt.

#### 3.4.2.1 Anthralin hat keinen stimulierenden Effekt auf CD11c<sup>+</sup> Milz-DCs *in vitro*

Durch die Verwendung konditioneller TLR7-Defizienz-Modelle konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD11c<sup>+</sup> DCs von immenser Bedeutung für die Induktion effektiver und langlebiger T-Zellen sind. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollte nachfolgend untersucht werden, ob die Kombination von Anthralin und Imiquimod zu einer optimierten Aktivierung von DCs führt.

Zu diesem Zweck wurden CD11c<sup>+</sup> Milz-DCs *in vitro* mit verschiedenen Konzentrationen Anthralin, dem TLR7/8 Agonisten Resiquimod (R-848) oder der Kombination beider Agenzien stimuliert. In Abbildung 27 sind die Auswirkungen der Agenzien auf die Expression kostimulatorischer Moleküle und die Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine bei DCs dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 27: Anthralin beeinflusst den Aktivierungszustand von CD11c<sup>+</sup> DCs *in vitro* nicht.**

CD11c<sup>+</sup> DCs wurden mittels MACS aus der Milzzellsuspension von wildtypischen Mäusen isoliert und für 24 h mit dem TLR7/8-Agonisten Resiquimod, verschiedenen Konzentrationen Anthralin oder einer Kombination beider Agenzien behandelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrollen bei der Untersuchung des Aktivierungszustandes. Der Aktivierungszustand CD11c<sup>+</sup> DCs wurde nach 24 h **A**) durchflusszytometrisch durch die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität der Aktivierungsmarker CD40, CD80 und CD86 und **B**) die Konzentrationen (in pg/ml) der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70) und TNF- $\alpha$  im Kulturüberstand mit CBA-Analysen untersucht. Dargestellt sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Kostimulatoren in Abbildung 27 A verdeutlicht, dass die Ligation des TLR7-Rezeptors durch Resiquimod zu einer erhöhten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf der Oberfläche von CD11c<sup>+</sup> Milz-DCs führt. Die Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Anthralin bewirkt hingegen keine Hochregulation der untersuchten Kostimulatoren. Darüber hinaus ist die Aktivierung der DCs, welche in Folge der alleinigen Stimulation mit dem TLR7-Liganden Resiquimod beobachtet wurde, nach der zusätzlichen Verabreichung von Anthralin vermindert (Abbildung 27 A). Überdies reduzieren bereits niedrige Konzentrationen von Anthralin die Viabilität der CD11c<sup>+</sup> Milz-DCs, wodurch Stimulationen mit maximal 0,5  $\mu\text{M}$  Anthralin durchgeführt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse

In Abbildung 27 B sind die mittels CBA-Analysen ermittelten Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70) und TNF- $\alpha$  im Kulturüberstand stimulierter DCs dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass die Ligation des TLR7-Rezeptors der DCs durch Resiquimod vorrangig die Freisetzung von IL-6 und TNF- $\alpha$  fördert. Die alleinige Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Anthralin führt im Vergleich zu unbehandelten DCs zu keiner vermehrten Freisetzung der analysierten Zytokine. Die Kombination der TLR7-Ligation und Anthralin führt überdies zu keinem relevanten Anstieg der Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine in den Kulturüberständen stimulierter Milz-DCs.

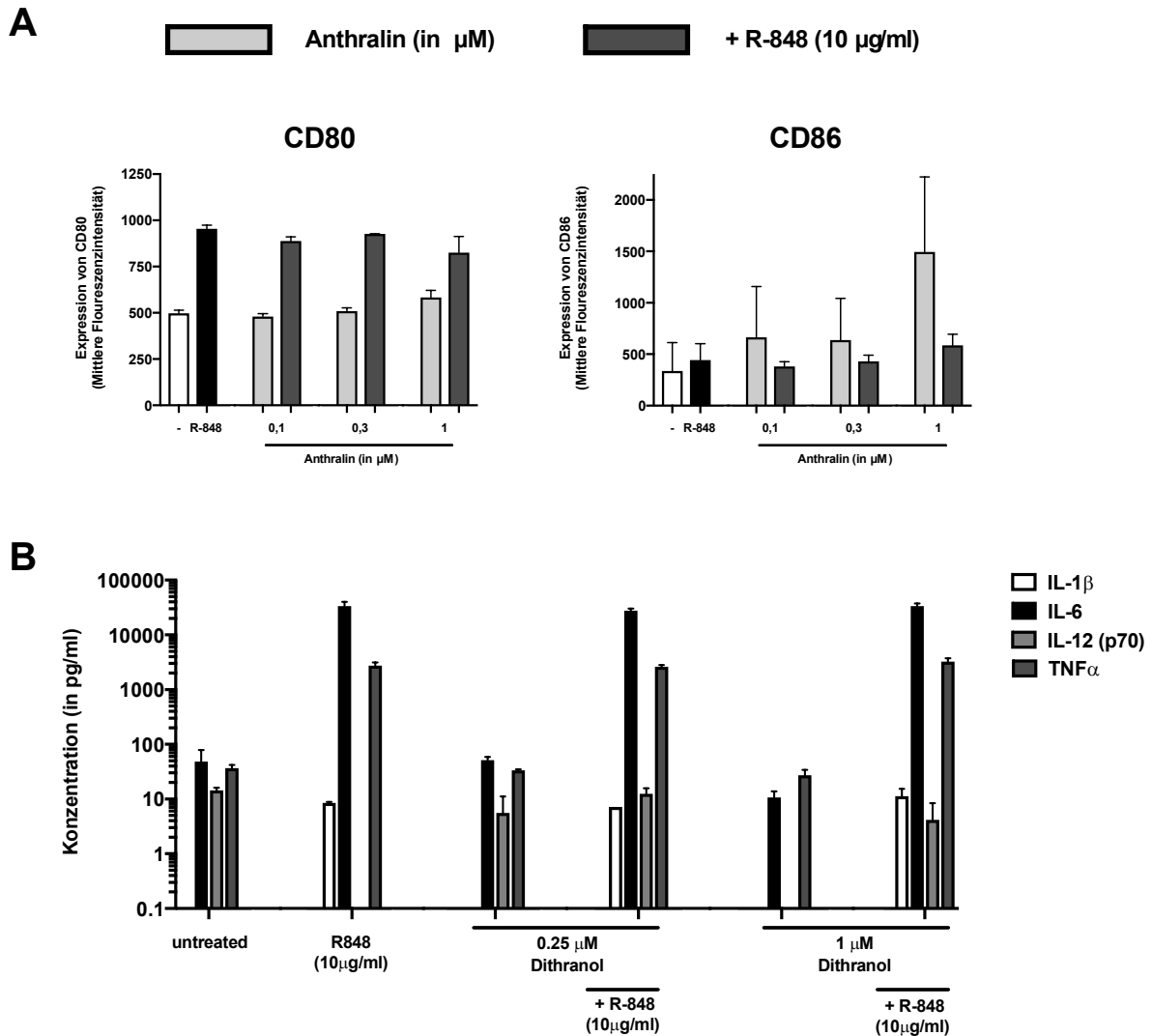
Eine synergistische Aktivierung von DCs durch Anthralin und TLR7-Liganden erscheint im Kontext der vorliegenden Ergebnisse aus den *in vitro* - Studien als unwahrscheinlich.

### *3.4.2.2 Anthralin führt konzentrationsabhängig zu einer Aktivierung und Polarisierung von „M1“-Makrophagen*

Die Aktivierung und Polarisierung von Makrophagen durch Adjuvantien korrelierte in vorangegangenen Arbeiten mit einer verstärkten T-Zell-Antwort, welche auf eine indirekte Aktivierung von DCs durch inflammatorische Mediatoren zurückgeführt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden stimulierende Effekte von Anthralin und der TLR7-Ligation bei Makrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMMs) untersucht. Für diese Untersuchungen wurden BMMs *in vitro* mit verschiedenen Konzentrationen Anthralin, Resiquimod oder der Kombination beider Agenzien stimuliert und die Expression von Kostimulatoren und die Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 28 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 28: Anthralin induziert die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Makrophagen *in vitro*.**

Unreife Knochenmarkszellen von wildtypischen Mäusen wurden für 6-9 Tage mit Makrophagen-Kulturmedium in bone-marrow derived macrophages (BMMs) differenziert. Ausdifferenzierte MHCII<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> BMMs wurden für 24 h mit dem TLR7/8-Agonisten Resiquimod, verschiedenen Konzentrationen Anthralin oder einer Kombination beider Agenzien behandelt. Der Aktivierungszustand MHCII<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> BMMs wurde nach 24 h **A**) durchflusszytometrisch durch die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 und **B**) die Konzentrationen (pg/ml) der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70) und TNF- $\alpha$  im Kulturüberstand mit CBA-Analysen untersucht. Dargestellt sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten. Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

In Folge der Stimulation von BMMs mit Anthralin konnte durch durchflusszytometrische Analysen ein dosisabhängiger Effekt auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 beobachtet werden. Während die Expression von CD80 bei ansteigenden Anthralin-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Zellen gleichbleibend ist, erfolgt bei der Expression von CD86 eine deutliche Zunahme der Expression, welche bei einer Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Anthralin den Höhepunkt erreicht. Der TLR7-Ligand Resiquimod bewirkt eine vermehrte Expression beider Kostimulatoren. Durch die Kombination der Agenzien

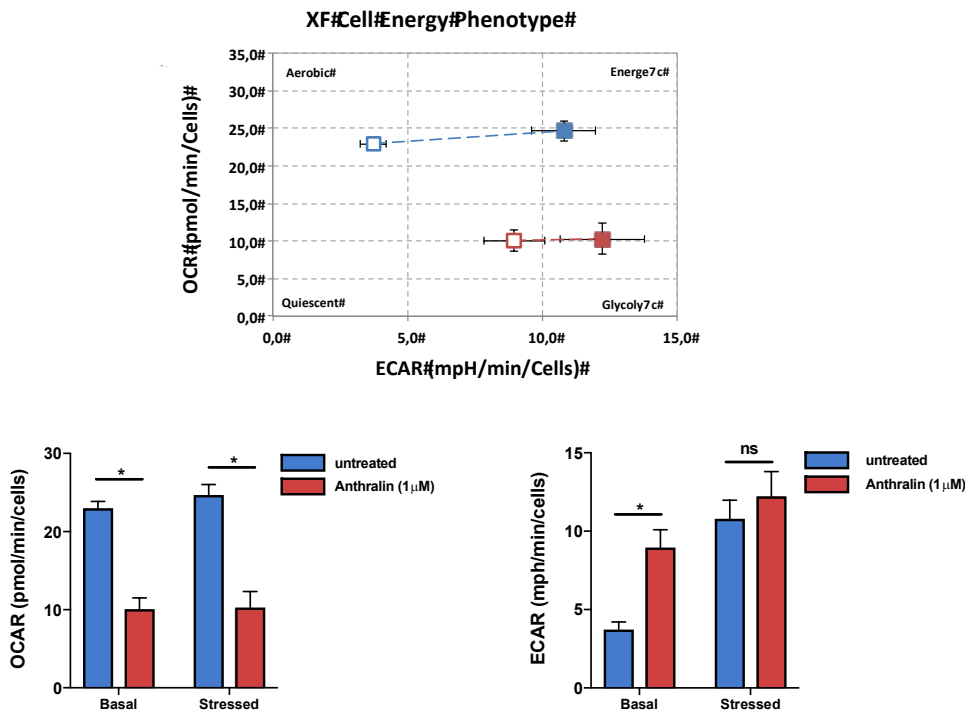
## Ergebnisse

Anthralin und Resiquimod ist die Zunahme der Expression der Kostimulatoren CD80 und CD86 auf BMMs hingegen aufgehoben oder vermindert (Abbildung 28 A). Die verstärkte Expression der Kostimulatoren CD40, CD80 und CD86 auf Makrophagen durch Stimulationen mit Anthralin konnten gleichermaßen bei peritonealen Makrophagen und der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW309 beobachtet werden. Eine negative Auswirkung auf die Viabilität der Makrophagen konnte hingegen erst bei Anthralin-Konzentrationen über 1  $\mu\text{M}$  beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

In den Kulturüberständen der BMMs wurden nach der Stimulation des TLR7-Signalweges durch Resiquimod hohe Konzentrationen der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  detektiert. Nach der alleinigen Stimulation der BMMs mit Anthralin wurden hingegen niedrige Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70) und TNF- $\alpha$  gemessen, welche vergleichbar mit den Konzentrationen dieser Zytokine im Kulturüberstand unbehandelter Makrophagen sind. Die Kombination der Agenzien Anthralin und Resiquimod erzeugt vergleichbare Konzentrationen der analysierten Zytokine wie durch die alleinige Stimulation des TLR7-Rezeptors (Abbildung 28 B).

Die Expression der Kostimulatoren CD40, CD80 und CD86 deutet auf eine Aktivierung der Makrophagen durch Anthralin *in vitro* hin. Mit der Aktivierung der Makrophagen geht zudem eine Polarisierung in pro-inflammatorische M1-Makrophagen oder anti-inflammatorische M2-Makrophagen einher, welche anhand des zellulären Metabolismus analysiert werden kann (Viola et al., 2019). Nachfolgend sollten daher auch die Auswirkungen von Anthralin auf den zellulären Metabolismus von Makrophagen *in vitro* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Makrophagen über Nacht mit Anthralin behandelt und der Energiestoffwechsel anschließend charakterisiert. Mit Hilfe eines Seahorse XFp Analyzer wurden die *extracellular acidification rate* (ECAR; Maß für die Glykolyse) und die *oxygen consumption rate* (OCAR; Maß für die oxidative Phosphorylierung) bestimmt. Das Ergebnis der Metabolismus-Analyse ist in Abbildung 29 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 29: Anthralin beeinflusst den Glukose-Stoffwechsel von Makrophagen *in vitro*.**

Unreife Knochenmarkszellen von wildtypischen Mäusen wurden für 6-9 Tage mit Makrophagen-Kulturmedium in *bone-marrow derived macrophages* (BMMs) differenziert. Die ausdifferenzierten BMMs wurden für 20 h mit Anthralin (1  $\mu$ M, rote Balken) stimuliert oder unbehandelt (blaue Balken) in Makrophagen-Kulturmedium kultiviert. Der Stoffwechsel wurde anschließend in einem *Seahorse XFp Analyzer* mit dem *Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test Kit* analysiert. Es wurden die Stoffwechsel-Inhibitoren Oligomycin (1  $\mu$ M) und FCCP (0,75  $\mu$ M) verwendet. Die charakteristischen Messgrößen ECAR (Glykolyse) und OCAR (oxidative Phosphorylierung) wurden durch den *Seahorse XFp Analyzer* gemessen. Im Anschluss an die Messungen wurden die BMMs mit einer Calcein AM (2  $\mu$ M)/ Ethidium-Homodimer III (4  $\mu$ M)-Lösung angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch die Zellzahl normalisiert. Dargestellt sind die repräsentativen Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem von mindestens drei Experimenten. Statistische Analyse mittels ungepaartem t-Test mit Welch- Korrektur (\* $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant).

In unbehandelten Makrophagen (blaue Balken) liegt die OCAR signifikant höher als nach der Behandlung der BMMs mit 1  $\mu$ M Anthralin (rote Balken). Die ECAR ist hingegen bei unbehandelten BMMs geringer als bei Anthralin behandelten Makrophagen. Diese Beobachtungen weisen auf Veränderungen des Energiestoffwechsels in Makrophagen durch die Behandlung mit Anthralin hin, wobei die Induktion der Glykolyse bei Makrophagen gemeinhin mit einer Polarisierung in einen pro-inflammatorischen „M1“-Phänotyp assoziiert ist (Viola et al., 2019).

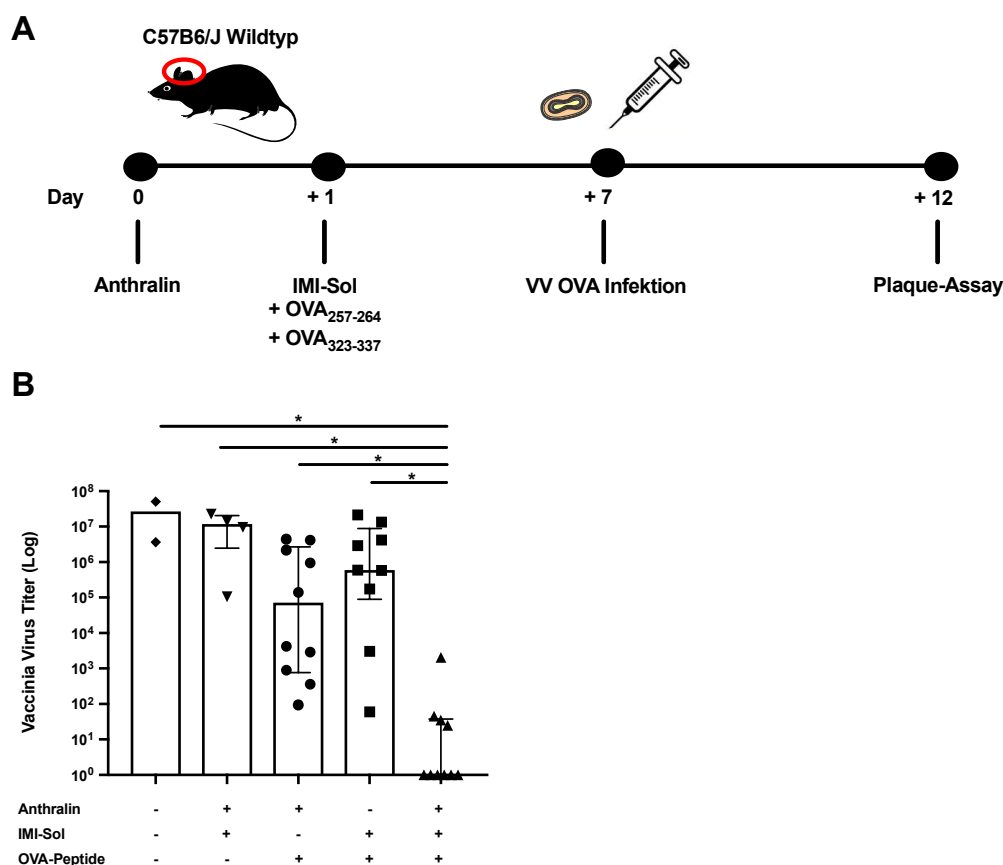
Gemeinsam mit der Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 weisen die Veränderungen des Metabolismus durch Anthralin auf die Entstehung pro-inflammatorischer Makrophagen hin, welche im Ablauf der TCI potentiell einen stimulierenden Einfluss auf die Entstehung adaptiver Immunantworten einnehmen könnten.

## Ergebnisse

### 3.5 Die prophylaktische Immunisierung durch die Kombi-TCI schützt vor einer Infektion mit dem Vaccinia Virus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass die Verwendung von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI trotz einer geringen Hautfläche die Induktion qualitativ hochwertiger und langanhaltender adaptiver Immunantworten ermöglicht. Um diese Erkenntnisse in funktioneller Hinsicht zu verifizieren, wurde die prophylaktische Wirksamkeit der Kombi-TCI in einem Virusmodell überprüft.

Zu diesem Zweck wurden wildtypische Mäuse prophylaktisch transkutan immunisiert und anschließend systemisch mit einem Ovalbumin-exprimierenden Vaccinia Virus infiziert (Abbildung 30 A). Von großem Interesse war in diesem Zusammenhang die Eliminierung des verabreichten Pathogens durch virusspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI. Die vorhandene Viruslast in den immunisierten Mäusen wurde im Anschluss an die Infektion durch *Plaque-Assays* ermittelt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 30 B veranschaulicht.



**Abbildung 30 Die prophylaktische TCI mit Anthralin und IMI-Sol minimiert die Viruslast nach einer Infektion mit dem Ovalbumin-exprimierenden Vaccinia Virus.**

**A, B)** Weibliche wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg

## Ergebnisse

in Basiscreme) immunisiert. An Tag 7 nach der TCI wurden den immunisierten Mäusen  $2 \times 10^6$  pfu des Ovalbumin-exprimierenden Vaccinia Virus (VV-OVA) *i.p.* verabreicht (in 100  $\mu$ l). 5 Tage nach der Infektion mit VV-OVA wurde die Viruslast in den Ovarien mit einem BSC40-*Plaque-Assay* ermittelt. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 2-11). Statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

Die Auswertung der durchgeführten *Plaque-Assays* zeigt, dass unbehandelte Mäuse in Folge der Infektion mit dem Vaccinia Virus einen hohen Virustiter in den Ovarien aufweisen. Die aufeinanderfolgende Verabreichung der beiden Agenzien Anthralin und IMI-Sol in Abwesenheit der beiden T-Zell-Epitope OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> ermöglicht, vergleichbar mit unbehandelten Mäusen, keine Verringerung der Viruslast. Hierbei wird deutlich, dass Anthralin und Imiquimod keinen unspezifischen Effekt auf die Viruslast in infizierten Mäusen haben.

Die alleinigen Verabreichungen von Anthralin oder IMI-Sol mit beiden Ovalbumin-Epitopen führen zu einer geringfügigen Reduzierung des Virustiters in infizierten Mäusen. Einzig die kombinierte Immunisierung mit Anthralin, IMI-Sol und den beiden T-Zell-Epitopen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> induziert die vollständige Eliminierung des Vaccinia Virus in infizierten Mäusen (Abbildung 30 B).

Die vorliegenden Daten verdeutlichen die prophylaktische Wirksamkeit der Kombi-TCI bei der Abwehr viraler Erreger.

## Ergebnisse

### **3.6 Die Verwendung von niedrig-konzentriertem Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI minimiert unerwünschte Nebenwirkungen und amplifiziert die antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population**

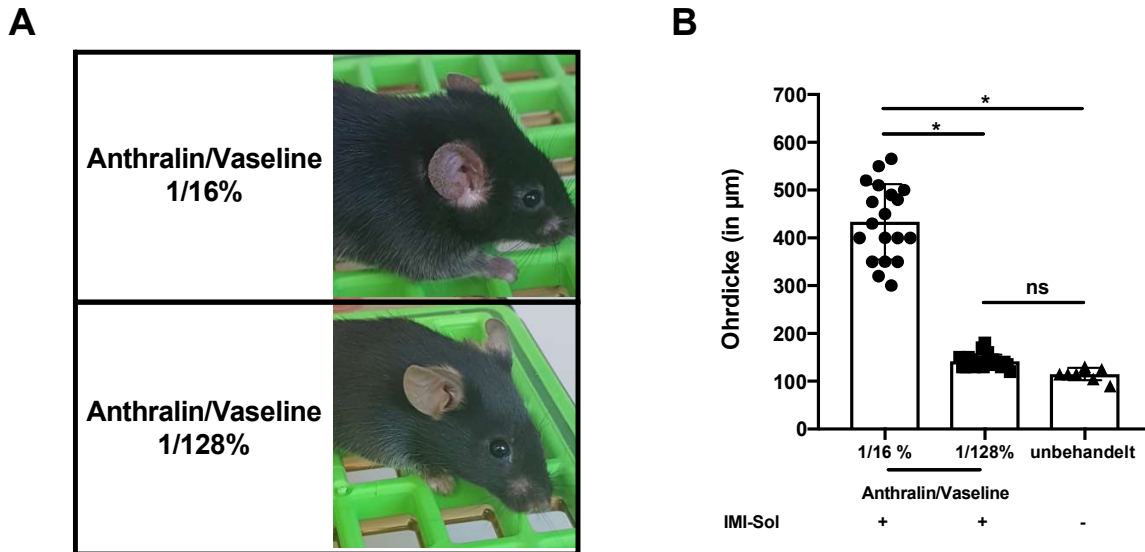
Die in dieser Arbeit etablierte TCI mit den Agenzien Anthralin und Imiquimod ermöglicht eine Verstärkung der primären T-Zell-Antwort und induziert eine Vielzahl langlebiger OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. Die Wirksamkeit dieser CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte zudem in einem prophylaktischen Virusmodell erfolgreich demonstriert werden. Neben dieser prophylaktischen Anwendung ist die Generierung von potenten T-Zell-Antworten in therapeutischen Virus- und Tumormodellen ein perspektivisches Ziel dieser Methode.

Im abschließenden Kapitel des experimentellen Teiles dieser Arbeit sollten daher die Grundlagen für die Durchführung von therapeutischen Immunisierungen geschaffen werden. Hierzu sollen sogenannte „Prime-Boost“-Immunisierungen etabliert werden, welche auf der mehrfachen Verabreichung des transkutanen Impfstoffes in definierten Zeitabständen basieren und die Anzahl hochqualitativer, antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Folge der Kombi-TCI vervielfachen sollen.

#### **3.6.1 Geringere Anthralin-Konzentrationen verursachen keine makroskopische Entzündung und erzeugen einen vergleichbaren Adjuvanseffekt in der Primärantwort der Imiquimod-basierten TCI**

Die topische Behandlung der murinen Haut mit Anthralin fördert die Entstehung einer Entzündungsreaktion, welche durch die Rötung der Haut, Schorfbildung und einer massiven Schwellung des Ohrhautgewebes charakterisiert werden kann. Um die Durchführung der Mehrfach-Immunisierungen zu ermöglichen, sollte die Entzündungsreaktion als unerwünschter Nebeneffekt der Anthralin-Behandlung minimiert werden. Zu diesem Zweck wurde die verabreichte Konzentration des Anthralin in der Vaseline titriert und auf ihre Hautverträglichkeit untersucht. Abbildung 31 veranschaulicht den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Anthralin auf die makroskopische Ausbildung der Entzündung und die Induktion einer Ohrschwellung nach der Kombi-TCI an Tag 7.

## Ergebnisse



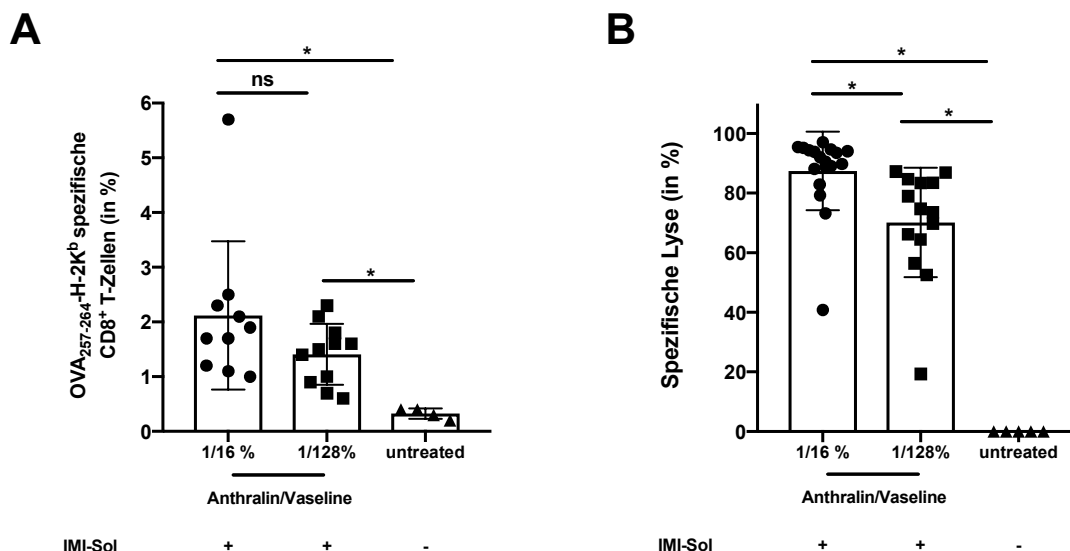
**Abbildung 31: Die Reduktion der Anthralin-Konzentration in der Imiquimod-basierten TCI minimiert die sichtbare Entzündungsreaktion.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % oder 1/128 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100  $\mu\text{g}$  in Basiscreme) immunisiert. An Tag 7 wurde **A**) die Haut auf Symptome einer Entzündungsreaktion analysiert und **B**) die Ohrdicke bestimmt. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n = 8-21). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p < 0,05; ns = nicht signifikant).

In Abbildung 31 sind die unterschiedlichen Auswirkungen der Vorbehandlung durch Anthralin/Vaseline 1/16 % oder 1/128 % an Tag 7 dargestellt. Die Abbildung veranschaulicht, dass durch die Anwendung der geringeren Konzentration des Anthralins eine oberflächlich erkennbare Entzündung ausbleibt (Abbildung 31 A) und eine Minimierung der Ohrschwellung erreicht wird (Abbildung 31 B).

Die Aufrechterhaltung des Adjuvanseffektes von Anthralin sollte nach der erfolgreichen Minimierung der Entzündungsreaktion durch die Reduktion der verwendeten Wirkstoffmenge nachfolgend überprüft werden. Dazu wurden in der immunologischen Primärantwort quantitative und qualitative Analysen der erzeugten OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Folge der Kombi-TCI mit verschiedenen Anthralin-Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 32 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 32: Die Imiquimod-basierte TCIs mit 1/128 % oder 1/16 % Anthralin/Vaseline erzeugen vergleichbare primäre Immunantworten.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/16 % oder 1/128 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. Durchflusszytometrisch wurden **A**) an Tag 7 die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CTLs im Blut quantifiziert und **B**) an Tag 8 die Effektorfunktionen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CTLs durch *in vivo*-Zytotoxizitätstests untersucht. Hierzu wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,4 µM und 4 µM) CFSE-markierte Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere injiziert. Die niedriger konzentrierte Population (0,4 µM) wurde vorab mit OVA<sub>257-264</sub> (1 µg/ml) beladen. Abgebildet sind die Einzelwerte mit Mittelwerten und Standardabweichung (n= 4-18). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p <0,05; ns = nicht signifikant).

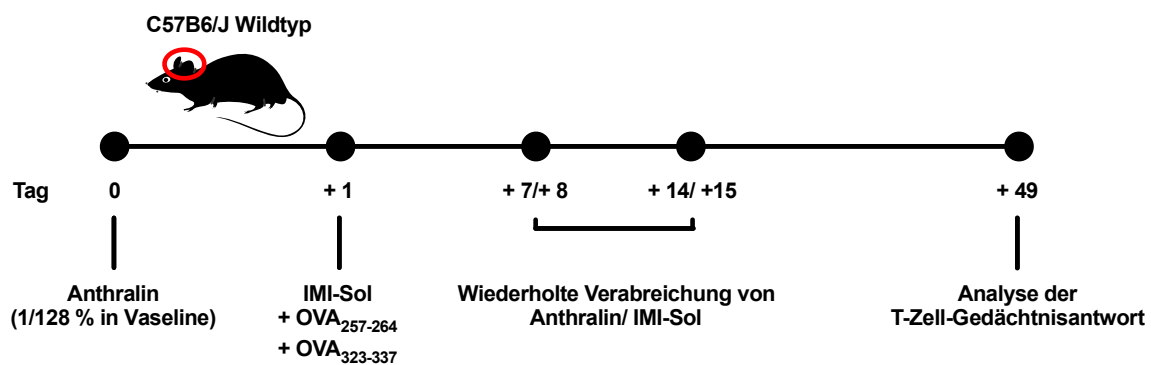
Nach den Kombi-TCI mit 1/128 % Anthralin/Vaseline (durchschnittlich 1,4 %) und 1/16 % Anthralin/Vaseline (durchschnittlich 2,1 %) werden keine signifikanten Unterschiede bei der Frequenzen OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 7 beobachtet (Abbildung 32 A). Die spezifische Lyse von peptidbeladenen Zielzellen durch OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt hingegen in Folge transkutaner Immunisierung mit 1/16 % Anthralin/Vaseline (durchschnittlich 87,7 % lysierte peptidbeladene Zielzellen) signifikant häufiger als nach der Anwendung von 1/128 % Anthralin/Vaseline (durchschnittlich 70,1 % lysierte peptidbeladene Zielzellen; Abbildung 32 B).

Diese Daten illustrieren, dass die Induktion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI bereits durch geringe Konzentrationen von Anthralin gefördert wird. Durch die Induktion nahezu gleichwertiger T-Zell-Antworten in der Primärantwort und der Minimierung der kutanen Entzündungsreaktion sollte 1/128 % Anthralin/Vaseline nachfolgend für die wiederholte Verabreichung der Kombi-TCI genutzt werden.

## Ergebnisse

### 3.6.2 Die wiederholte topische Verabreichung geringer Anthralin-Konzentrationen und Imiquimod ermöglicht eine Vervielfachung der Anzahl antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen

Die wiederholte Verabreichung von Impfstoffen ist in der Medizin ein etabliertes Prinzip, um eine Vervielfachung der Wirksamkeit der einzelnen Impfungen zu erzielen (Stark et al., 2016). Durch die Minimierung der entzündungsfördernden Eigenschaften von Anthralin konnten in dieser Arbeit die Grundlagen geschaffen werden, um transkutane Mehrfach-Immunsierungen durchzuführen. Das Protokoll der Kombi-TCI wurde dahingehend wie in Abbildung 33 dargestellt abgewandelt.



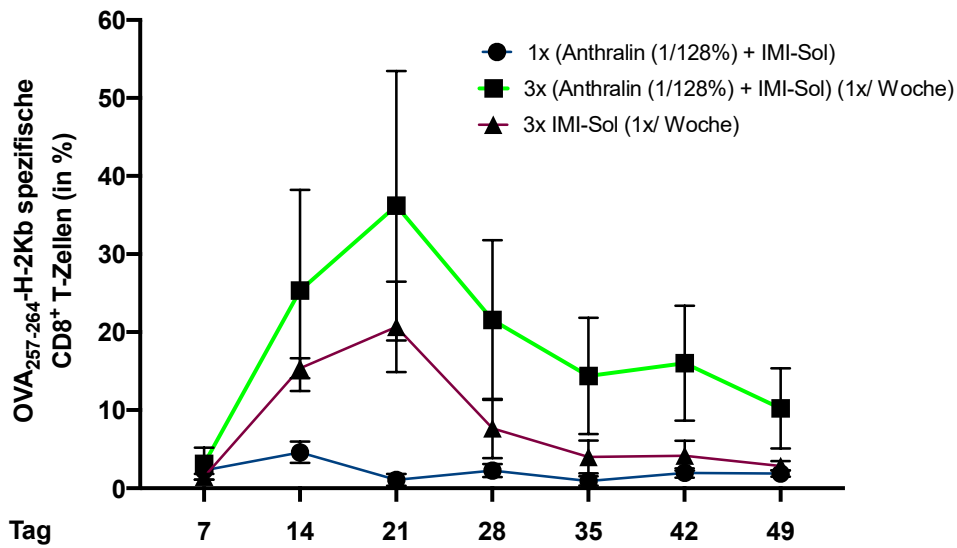
**Abbildung 33: Anpassung des Immunisierungsprotokolls bei der mehrfachen Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol.**

Bei der mehrfachen Wiederholung der TCI wurden 25 mg Anthralin (1/128 % in Vaseline vorliegend; Tag 0, 7 und 14) gefolgt von 50 mg IMI-Sol, 100 µg OVA<sub>257-264</sub> und 100 µg OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1, 8 und 15) bis zu dreimal topisch auf die murine Ohrhaut aufgetragen. Die Auswertung der Immunisierungseffizienz erfolgte durch die durchflusszytometrische Bestimmung der Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wöchentlich (Tag 7 bis 49). An Tag 50 wurden phänotypische und funktionelle Analysen von OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt.

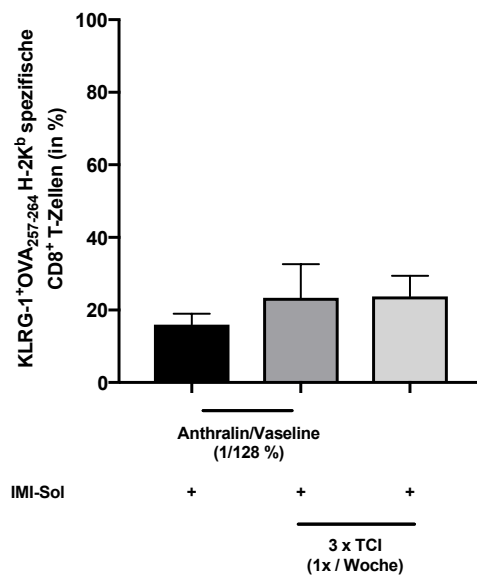
Im Rahmen der Prime-Boost-Immunsierungen wurden die einzelnen Agenzien bis zu dreimal verabreicht und die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut wöchentlich ermittelt. Der Verlauf der Frequenzen von der primären Immunantwort bis in die immunologische Gedächtnisphase der letzten Immunisierung (Tag 49, 35 Tage nach der letzten Immunisierung an Tag 14) ist in Abbildung 34 A dargestellt.

## Ergebnisse

**A**



**B**



**Abbildung 34 Die mehrfache Imiquimod-basierte TCI mit 1/128 % Anthralin/Vaseline steigert die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen.**

Wildtypische Mäuse wurden durch die Verabreichung von 25 mg Anthralin (Tag 0; 1/128 % in Vaseline) und 50 mg IMI-Sol (Tag 1) auf die Ohrhaut transkutan gegen OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-337</sub> (Tag 1; je 100 µg in Basiscreme) immunisiert. Die Immunisierungen wurden wöchentlich bis zu dreimal durchgeführt. Die Auswertung der Immunisierungseffizienz erfolgte durchflusszytometrisch **A**) durch die wöchentliche Bestimmung der Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tag 7 bis 49) und durch **B**) die Expression des Seneszenz-Markers KLRG-1 auf OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichung (n= 5). Statistische Analyse mittels einseitigem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur (\*p <0,05; ns = nicht signifikant).

## Ergebnisse

Bei der Analyse dieser Daten wurde deutlich, dass nach der einmaligen Verabreichung von Anthralin/Vaseline (1/128 %) und IMI-Sol die Expansion der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CTL-Population bis Tag 14 und die Differenzierung in antigenspezifische T-Gedächtniszellen ausbleibt (durchschnittlich 0,93 % an Tag 35). Die mehrmalige Verabreichung von IMI-Sol auf das Ohrhautgewebe fördert die Expansion der primären CTL-Population und hat den Höhepunkt eine Woche nach der letzten Immunisierung an Tag 14 (durchschnittlich 20,65 % OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CTLs an Tag 21). Nach der dritten Immunisierung mit IMI-Sol nimmt die Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch rasch ab (durchschnittlich 2,85 % CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen an Tag 49). Die dreimalige Verabreichung der Agenzien Anthralin/Vaseline (1/128 %) und IMI-Sol steigert hingegen die Frequenz OVA<sub>257-264</sub>-spezifischer CTLs auf durchschnittlich 36,2 % an Tag 21 des Immunisierungsprotokolls. Darüber hinaus verbleibt ein großer Anteil dieser OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CTLs in der Gedächtnisphase der transkutanen Mehrfach-Immunisierung als CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen (durchschnittlich 10,2 % an Tag 49), was einer signifikanten Steigerung im Vergleich zur dreimaligen Verabreichung von IMI-Sol entspricht (Abbildung 34 A).

Im Rahmen durchflusszytometrischer Analysen der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen wurde zudem die Expression des T-Zell-Seneszenzmarkers KLRG-1 überprüft. 80 % der analysierten OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zeigen nach der Kombi-TCI zeigen in dieser Analyse einen KLRG-1-negativen Phänotyp, was auf die Induktion langlebiger und funktionsfähiger T-Gedächtniszellen hindeutet (Abbildung 34 B).

### 4. Diskussion

Klassische Impfungen bieten einen erfolgreichen Schutz vor der Übertragung von teils lebensbedrohlichen Krankheitserregern. Trotz des immensen Erfolgs herkömmlicher, prophylaktischer Impfung gehen mit der nadelbasierten Verabreichung von Impfstoffen Nachteile einher (Criscuolo et al., 2019). Die WHO schätzt, dass bei 4 % der weltweit 600 Millionen verabreichten Impfungen pro Jahr nadelassozierte Unfälle auftreten (World Health Organization, 2015). Das dabei einhergehende Risiko einer Infektion mit einem infektiösen Pathogen, beispielsweise dem Hepatitis B- oder C-Virus (HBV/HCV) und dem humanen Immunodefizienz-Virus (HIV), betrifft somit jährlich etwa 20-30 Millionen Mitarbeiter des Gesundheitswesens.

Durch die wissenschaftlichen Fortschritte bei der Erforschung des Immunsystems und durch den technologischen Fortschritt ist es in den vergangenen Jahrzehnten gelungen, vielfältige Alternativen zu der herkömmlichen, nadelbasierten Verabreichung von Impfstoffen zu schaffen (Criscuolo et al., 2019; Mascola & Fauci, 2020). Im Bestreben nadelfreie Verabreichungsmethoden zu entwickeln, gelang es Gregory Glenn und Kollegen bereits vor etwa 20 Jahren einen Impfstoff zu entwickeln, welcher durch das oberflächliche Auftragen auf die Haut adaptive Immunantworten in Mäusen auslöste (G M Glenn et al., 1998). Diese neuartige, nadelfreie Impfung durch die Haut wurde fortan als transkutane Immunisierung (TCI) bezeichnet. Der Transport von Impfstoffen durch die Haut erzeugt durch die Vielzahl hautresidenter Immunzellen, im Vergleich zur intramuskulären Injektion von Impfstoffen, mit geringeren Impfstoffdosen überlegene Immunantworten (Huang, 2007). Die von Gregory Glenn, dem Pionier der transkutanen Immunisierung, gegründete Firma IOMAI scheiterte jedoch bereits im Jahr 2010 bei der Entwicklung eines transkutanen Impfstoffes zur Behandlung der Reisediarrhoe in einer klinischen Phase 3-Studie. Dieses Scheitern wird trotz der Induktion von IgG- und IgA-Antikörpern durch transdermale Pflaster auf konzeptuelle Schwächen im Studiendesign, vor allem die Verwendung eines einzelnen Antigens, zurückgeführt (Behrens et al., 2014). Trotz der erfolgreichen Darstellung des „*Proof of Concept*“ und einer bis heute zunehmenden Anzahl innovativer TCI-Methoden ist die Zulassung eines transkutanen Impfstoffes bis heute nicht gelungen. So macht beispielsweise die gegenwärtige SARS-CoV-2-Pandemie die Notwendigkeit effizienter, leicht anwendbarer und sicherer Impfstrategien überdeutlich.

Als fehlendes Bindeglied zur klinischen Anwendung der TCI am menschlichen Organismus wird zum jetzigen Zeitpunkt die unzureichende Aktivierung des Immunsystems durch Adjuvantien vermutet (Coffman et al., 2010; Skountzou et al., 2017). Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Identifikation neuartiger Adjuvantien für die TCI. Vor diesem Hintergrund illustriert diese Arbeit den überzeugenden Adjuvanseffekt des Hydroxyanthrons

## Diskussion

Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI und charakterisiert dessen immunologische und molekulare Ursachen. Von elementarem Interesse war hierbei die Untersuchung der Auswirkungen dieser neuartigen Adjuvantien-Kombination auf die Entstehung wirkungsvoller T-Zell-Antworten.

### **4.1) Die Kombi-TCI fördert die Entstehung hochqualitativer und langlebiger CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Optimierung der Qualität und Langlebigkeit antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Imiquimod-basierten transkutanen Immunisierung war das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit. Bedingt durch die geringe Immunogenität der Antigene in peptid-basierten Impfungen ist die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die nachfolgende Einleitung adaptiver Immunantworten in der TCI maßgeblich von der Verwendung geeigneter Adjuvantien abhängig (Coffman et al., 2010). Hautgängige Adjuvantien sind im Kontext der TCI aufgrund der anatomischen Strukturen der Haut jedoch rar und zum Teil unzureichend wirkungsvoll (Moyer et al., 2016). Die vorliegende Arbeit charakterisiert den Einfluss der Agenzien Anthralin und Imiquimod auf die Quantität und Qualität antigenspezifischer T-Zellen nach der TCI.

In einer vorangegangenen Arbeit veranschaulichten Aranda Lopez und Kollegen die Entstehung einer Vielzahl antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der immunologischen Primärantwort nach Verabreichung der Imiquimod-haltigen Nanoemulsion IMI-Sol auf die Rückenhaut der Mäuse (Lopez et al., 2017). Konträr zu diesen Studien bleibt in der vorliegenden Arbeit die Induktion einer entsprechenden OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population nach der Imiquimod-basierten TCI mit IMI-Sol auf dem Ohrhautgewebe aus (Abbildung 11). Die fehlschlagende TCI über das murine Ohrhautgewebe deutet auf die Notwendigkeit einer großflächigen Behandlung der murinen Haut (Rücken = 10 cm<sup>2</sup>; Ohren = 3 cm<sup>2</sup>) mit IMI-Sol für die Entwicklung einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort hin.

Die benötigte Immunisierungsfläche ist ein zentraler Aspekt bei der Übertragbarkeit der Imiquimod-basierten TCI auf den humanen Organismus. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die Limitierungen der Imiquimod-basierten TCI mit IMI-Sol hinsichtlich der perspektivischen Anwendung am humanen Organismus. Die Verwendung von Anthralin, welches in der vorliegenden Arbeit einen starken Adjuvanseffekt auf die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen in der Primärantwort der Imiquimod-basierten TCI zeigt, führt perspektivisch zu einer gesteigerten Anwendbarkeit am menschlichen Organismus (Abbildung 9).

## Diskussion

Qualitative Analysen der antigenspezifischen T-Zellen in Folge der neuartigen TCI mit Anthralin und Imiquimod illustrieren zudem deren hohe Funktionalität. Diese zeigt sich in der vorliegenden Arbeit durch die hohe Wirksamkeit prophylaktischer Immunisierungen mit beiden Wirkstoffen in einem Vaccinia-Virus-Modell. Die lytischen Fähigkeiten der erzeugten CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI können durch die Verwendung des identischen *in vivo* - Zytotoxizitätstests mit der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort nach der TCI mit IMI-Sol in vorangegangenen Arbeiten verglichen werden. Hierbei wird deutlich, dass trotz einer geringeren Anzahl antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI auf der Ohrhaut eine effektivere Lyse peptidbeladener Zielzellen erfolgt (zum Vergleich: (Lopez et al., 2017)). Der überproportional große Anteil lysierter, peptidbeladener Zielzellen deutet auf eine Überlegenheit der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen in der Primärantwort der Kombi-TCI hin. Eine umfangreiche funktionelle Charakterisierung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI steht zum jetzigen Zeitpunkt aus.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Imiquimod-basierten TCI in vorangegangenen Arbeiten kann nach der Kombi-TCI überdies eine Verschiebung der maximalen antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Frequenz im Blut nach Tag 7 beobachtet werden. Im Kontext der Kontakt-Hypersensitivität ist eine verzögerte Expansion antigenspezifischer CTLs durch deren Rekrutierung in das entzündete Hautgewebe bekannt (Hobbs & Nolz, 2019). Die Rekrutierung von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in die Haut erfolgt beispielsweise durch die Interaktion von CCR6 und dem Chemokin CCL20, welche beispielsweise von Keratinozyten in der Haut gebildet wird (Cruz et al., 2018). Ein vergleichbarer Mechanismus erscheint durch die pro-inflammatorischen Effekte von Anthralin in muriner Haut denkbar.

Die Erzeugung eines immunologischen Gedächtnisses, welches den immunisierten Organismus langanhaltend vor einer Infektion durch ein spezifisches Pathogen schützt, ist ein grundlegendes Ziel prophylaktischer Impfungen (Pulendran & Ahmed, 2006). Die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses durch die TCI mit Imiquimod war im Vorfeld dieser Arbeit ohne die Zugabe weiterer Adjuvantien limitiert (Bialojan et al., 2019; Lopez et al., 2017; Rausch et al., 2017). Aranda Lopez und Kollegen illustrieren diesbezüglich in ihrer Arbeit, dass die prophylaktischen TCI mit IMI-Sol auf der Rücken Haut einen unvollständigen Schutz in einem LCMV-Virus-Modell bietet. Auch in der vorliegenden Arbeit können nach der TCI mit IMI-Sol auf einer geringeren Hautfläche keine systemischen T-Gedächtniszellen identifiziert werden (Abbildung 15). Demgegenüber stellt Induktion von systemischen T-Gedächtniszell-Antworten durch die topische Verabreichung der hautgängigen Wirkstoffe Anthralin und Imiquimod einen Meilenstein bei der Weiterentwicklung der verwendeten TCI-Methode dar. Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Frequenzen antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-

## Diskussion

Gedächtniszellen liegen hierbei zudem zumeist oberhalb der vergleichbarer TCI-Technologien (Becker et al., 2015).

Die Induktion systemischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszell-Antworten kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit dem Auftreten einer verstärkten CD4<sup>+</sup> T-Helferzell-Antwort verknüpft werden (Abbildung 13). Mechanismen, welche die Einflussnahme von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bei der Entstehung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen beschreiben, werden in vorangegangenen Arbeiten vielfältig diskutiert (Ahrends et al., 2017; Laidlaw et al., 2016; Phares et al., 2012). Einer der diskutierten Hilfsmechanismen durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen ist das Prinzip der „APC-Lizensierung“ (Smith et al., 2004). Durch die Interaktion mit CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen werden die Befähigung zur Antigenpräsentation und die Expression kostimulatorischer Moleküle bei APCs positiv reguliert. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die funktionelle Reifung von DCs durch die Bindung von CD40 an den Kostimulator CD40L auf CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen induziert wird (Boisvert et al., 2004; Hernandez et al., 2007). Lizensierte APCs rekrutieren naive CCR5<sup>+</sup> CTLs durch die Sekretion der Chemokine CCL3/ CCL4 und primen diese durch die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle effizienter. Die Sezernierung verschiedener Zytokine, einschließlich IL-7 und IL-15, durch lizensierte APCs ist darüber hinaus mit der Expansion antigenspezifischer T-Zellen, der Differenzierung in T-Gedächtniszellen und deren Funktionalität in der Tumormikroumgebung assoziiert (Carreno et al., 2013; Waldmann et al., 2020). Während ein Großteil der Studien vornehmlich auf eine Interaktion von T-Helferzellen mit APCs hindeuten, konnte darüber hinaus auch eine direkte Wechselwirkung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch CD40-CD40L veranschaulicht werden (Ballesteros-Tato et al., 2013). Die zusätzliche Verabreichung des CD40-Agonisten FGK-45 während der Kombi-TCI wirkt sich interessanterweise weder auf die Frequenz noch die Funktionalität antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen vorteilhaft aus (nicht gezeigte Daten). Bei der alleinigen TCI mit IMI-Sol über die Rückenhaut konnte in einer vorangegangenen Arbeit hingegen ein vorteilhafter Effekt des CD40-Agonisten FGK-45 sowohl bei der Induktion von Primär- und Gedächtnisantworten als auch die partielle Protektion in therapeutischen Tumormodellen nachgewiesen werden (Bialojan et al., 2019). Hinsichtlich der vorliegenden Arbeit könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Verabreichung von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI ohnehin eine starke CD40-CD40L-Interaktion bei der Antigenpräsentation erzeugt, welche darüber hinaus nicht gesteigert werden kann.

Interessanterweise ist die Entstehung CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nicht von einer akuten antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Helferzell-Antwort abhängig (Abbildung 18). Vorangegangene Arbeiten konnten dieses Geschehen durch sogenannte „Bystander-Effekte“ erklären. Diese

## Diskussion

Studien deuten auf eine exponierte Bedeutung des Zytokins IL-2 beim Auftreten von Bystander-Effekten von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Boyman, 2010).

Neben der Analyse systemischer T-Gedächtniszell-Antworten wurde auch die Rekrutierung von T-Gedächtniszellen in behandeltes Ohrhautgewebe nach der TCI untersucht. Diese Analyse illustriert, dass die aufeinanderfolgende Verabreichung von Anthralin und Imiquimod eine Vielzahl gewebesresidenter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen erzeugt (Abbildung 17). In diesen Experimenten zeigen sich überdies überraschende Unterschiede hinsichtlich der Erzeugung gewebesresidenter T-Gedächtniszellen nach der TCI mit den einzelnen Agenzien. Während die topische Verabreichung von Imiquimod nahezu keine antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Haut induziert, konnte bereits durch die alleinige TCI mit Anthralin eine nicht signifikant von der Kombi-TCI abweichende Frequenz und Qualität der T-Gedächtniszellen beobachtet werden. Diese Analysen in der Gedächtnisphase der TCI machen deutlich, dass Anthralin bereits ohne die Zugabe von Imiquimod die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen fördert und diese vornehmlich in das behandelte Ohrhautgewebe rekrutiert werden

In Bezug auf gewebesresidentes T-Zell-Gedächtnis konnte in früheren Arbeiten die Bildung von Clustern aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Nähe von Haarfollikeln beobachtet werden (Collins et al., 2016). Durch die Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population in der Haut konnte gleichermaßen der Verlust der CD8<sup>+</sup> TRMs beobachtet werden. Diese Studien deuten auf eine hohe Bedeutsamkeit der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellpopulation in der Haut für die Aufrechterhaltung der CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellpopulation hin. In der vorliegenden Arbeit führte die Depletion CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in der primären Immunantwort gleichermaßen zum Verlust CD8<sup>+</sup> TRMs in der behandelten Haut (nicht gezeigte Daten).

Zusammenfassend kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das Hydroxyanthron Anthralin als ein neues Adjuvans in der TCI identifiziert werden. Die immunologischen und molekularen Ursachen dieses Adjuvanseffektes sollen nachfolgend diskutiert werden.

### **4.2) APCs beeinflussen die Quantität und Qualität von T-Zell-Antworten nach der Kombi-TCI**

Eine effiziente Präsentation von Antigenen durch APCs ist die grundsätzliche Voraussetzung für die Entstehung hochqualitativer, antigenspezifischer T-Effektorzellen (Gatti & Pierre, 2003; Guermonprez et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit ist die Beeinflussung der Antigenpräsentation als potentielle Ursache für eine optimierte adaptive Immunantwort durch die Adjuvantien der neuartige Kombi-TCI von großem Interesse.

## Diskussion

Der Wirkmechanismus von Imiquimod konnte in einer Vielzahl vorangegangener Arbeiten detailliert beschrieben werden. Imiquimod führt durch die Bindung an den endosomalen TLR7 zur Reifung von APCs, der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, einschließlich IFN $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12, sowie einer optimierten Antigenpräsentation (Miller, 2002). Eine grundsätzliche Abhängigkeit der Imiquimod-basierten TCI vom TLR7/MyD88-Signalweges ist bereits durch die alleinige Verabreichung von IMI-Sol aus vorherigen Publikationen bekannt (Lopez et al., 2017). Im Kontext der Kombi-TCI bleibt in TLR7-defizienten Mäusen die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen gleichermaßen gänzlich aus (nicht gezeigte Daten). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass vor allem der TLR7-Signalweg in DCs die funktionellen Eigenschaften antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Primärantwort der Kombi-TCI positiv reguliert (Abbildung 23). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Publikationen abweichender Immunisierungsstrategien, welche die hohe Bedeutsamkeit einer adäquaten Antigenpräsentation durch dermale DCs und Langerhans Zellen hervorheben (Liard et al., 2012; Romani et al., 2010). Die erhebliche Bedeutung des TLR7-Signalweges in DCs wird durch das Ausbleiben einer antigenspezifischen T-Gedächtniszellpopulation in TLR7<sup>-/-DC</sup>-Mäusen unterstrichen (Abbildung 24). Trotz der funktionellen Einschränkungen der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TLR7<sup>-/-DC</sup>-Mäusen verdeutlichen die nicht signifikanten Frequenzunterschiede in der Primärantwort, dass zusätzliche Signalwege überdies auf die Entstehung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen einwirken. Makrophagen, welche naiven T-Zellen in geringerem Ausmaß als DCs Antigene präsentieren, nehmen hingegen durch den TLR7-Signalweg einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Quantität und die Qualität antigenspezifischer T-Zell-Antwort in Folge der Kombi-TCI (Abbildung 25 & Abbildung 26).

Die Expression kostimulatorischer Moleküle auf APCs ist ein entscheidender Faktor für die Expansion und Differenzierung funktionstüchtiger T-Zellen (Lieping Chen & Flies, 2013b). Im Kontext der Kombi-TCI erscheint die Hochregulation des Kostimulators CD70 auf APCs während der Antigenpräsentation als ein potentieller Mechanismus, welcher vor allem die Expansion und in geringerem Ausmaß die Qualität der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen fördert (Abbildung 22). Allgemein erfolgt die Expression von CD70 auf APCs transient und ist der limitierende Faktor bei der Interaktion mit CD27 auf naiven T-Zellen (Nolte et al., 2009). Während die Interaktion von CD70 und CD27 bei infektiösen Erkrankungen vor allem die Qualität der erzeugten Immunantwort beeinflusst, ist die Induktion dieser Wechselwirkung durch Impfstoffe vor allem mit der Expansion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen und funktionellen Aspekten der T-Gedächtniszell-Antwort assoziiert (Arens et al., 2001; Borst et al., 2005). Die verstärkte Interaktion von CD70 und CD27 konnte darüber hinaus vorteilhafte Effekte bei der präklinischen Immuntherapie von Infektionen und Tumoren in Mäusen erzeugen (Arens et al., 2004; Munitic et al., 2013). Die Expression von CD70 auf APCs wird unter anderem durch CD40-CD40L-Interaktionen von APCs mit CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen induziert

## Diskussion

(Bialojan et al., 2019; Sanchez et al., 2007). Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bleibt jedoch fraglich, welche Subtypen der APCs durch die Expression von CD70 auf die Expansion antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI einwirken.

Die Beeinflussung der Antigenpräsentation durch die Kombination der Adjuvantien Anthralin und Imiquimod wird überdies durch die verstärkte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf CD11c<sup>+</sup> DCs in drainierenden Lymphknoten im Vergleich zu den alleinigen Verabreichungen von Anthralin oder IMI-Sol illustriert (Tag 3 nach der TCI, nicht gezeigte Daten). Auf Grundlage der eingeschränkten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort in TLR<sup>-/-</sup>DC-Mäusen und der verstärkten Expression von Kostimulatoren in Folge der Kombi erschien ein direkter additiver Effekt von Anthralin und Imiquimod in DCs, welcher deren Reifung und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf deren Zelloberfläche fördert, als denkbar. Diese Hypothese erscheint allerdings durch die vorliegenden *in vitro*-Studien CD11c<sup>+</sup> DCs aus murinen Milzen als unwahrscheinlich (Abbildung 27).

Durch das Ausbleiben direkter Effekte von Anthralin auf DCs wurde eine indirekte Einflussnahme dieses neuartigen Adjuvans auf die Antigenpräsentation durch eine Wirkung von Anthralin auf andere Immunzellen vermutet. Eine indirekte Beeinflussung der DCs durch Effekte von Anthralin auf hautresidente Makrophagen kann trotz der Steigerung der Expression von Kostimulatoren (CD80, CD86) und einem pro-inflammatorischen M1-Metabolismus durch die fehlende Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine von Makrophagen als unwahrscheinlich erachtet werden (Abbildung 28 & Abbildung 29). Eine solche Aktivierung der DCs durch Makrophagen konnte in verschiedenen Publikationen bereits beschrieben werden (Duque & Descoteaux, 2014; Martinez-Pomares & Gordon, 2012). Neben einer klassischen Aktivierung durch Makrophagen-Zytokine beschreiben Cheng und Kollegen eine Zytokin-unabhängige Beeinflussung von DCs. In deren Arbeit sekretierten M1-polarisierte Makrophagen Exosome, welche die Induktion von T<sub>H</sub>1-assoziierten Zytokinen in DCs bewirken (Cheng et al., 2017). Die Kultivierung im Kulturüberstand Anthralin-stimulierter Makrophagen hat jedoch keinen Einfluss auf die Reifung, die Aktivierung oder die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch murine Milz-DCs (nicht gezeigte Daten). Weitere hautresidente Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Mastzellen) zeigen in Anthralin-behandelter Haut einen verbesserten Aktivierungszustand (u.a. vermehrte Degranulation). *In vitro* zeigt die Stimulation mit Anthralin hingegen keine direkte Wirkung auf Mastzellen (nicht gezeigte Daten).

Die vorliegende Arbeit stellt somit die vielfältigen Auswirkungen der Kombi-TCI auf APCs dar und illustriert durch konditionale TLR7-Defizienz-Modelle in Mäusen die immense Bedeutung der DCs für eine wirkungsvolle Präsentation von Antigenen an naive T-Zellen. Gleichermaßen deuten die schwachen oder ausbleibenden Effekte von Anthralin auf APCs *in vitro* auf eine

## Diskussion

Bedeutung hautinfiltrierender Immunzellen und inflammatorischer, gewebsständiger Zellen in der Kombi-TCI hin. Die Auswirkungen dieser neuartigen Adjuvantien-Kombination auf die Haut sind daher von großem Interesse.

### **4.3) Anthralin verändert die Struktur und das kutane Zytokinmilieu in muriner Haut durch die Beeinflussung von Keratinozyten und die Rekrutierung von Immunzellen**

Das in der vorliegende Arbeit identifizierte Adjuvans Anthralin bewirkt alleine die Entstehung gewebsresidenter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TRMs in der Haut und erzeugt im Zusammenspiel mit Imiquimod systemisch hochqualitative, antigenspezifische T-Gedächtniszellen. Der im immunisierten Hautgewebe beobachtete aktivierte Phänotyp von APCs steht jedoch konträr zum Ausbleiben eines direkten Adjuvanseffekt von Anthralin auf Immunzellen.

Während vorangegangene Arbeiten den Wirkmechanismus von Imiquimod detailliert beschreiben, sind die Auswirkungen der topischen Verabreichung des antipsoriatischen Wirkstoffes Anthralin auf das hautassoziierte Immunsystem unzureichend untersucht (Gibson et al., 2002; Papadavid et al., 2007; Testerman et al., 1995). Ein Großteil der vorangegangenen Studien deutet auf einen antiproliferativen Effekt von Anthralin bei Keratinozyten und eine anti-inflammatorische Wirkung in psoriatischem Hautgewebe hin (Benezeder et al., 2020; Holstein et al., 2017; Reichert et al., 1985). Die These, dass die therapeutische Wirksamkeit von Anthralin in der *Psoriasis vulgaris* mit dem pro-inflammatorischen Effekt, welcher zu Beginn der therapeutischen Behandlung auftritt, korreliert, konnte kürzlich in einer klinischen Studie widerlegt werden (Psomadakis & Han, 2019). Nichtsdestotrotz war die entzündungsfördernde Wirkung von Anthralin in gesunder Haut, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben ist, von großem Interesse für die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI in der vorliegenden Arbeit (Mahrle, 1997). Dieses gesteigerte Interesse resultiert daraus, dass die Entstehung milder Entzündungen eine Grundvoraussetzung für die Wirksamkeit von Adjuvantien in klassischen und modernen Impfstoffen ist (Yun et al., 2015). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wird daher angenommen, dass die zelluläre Zusammensetzung (z.B. die Infiltration von Immunzellen) und die Induktion eines pro-inflammatorischen Zytokinmilieus in der Haut durch Anthralin massiven Einfluss auf die Quantität und Qualität der adaptiven Immunantworten nach der Imiquimod-basierten TCI haben.

Vorangegangene Studien in gesunder menschlicher oder muriner Haut veranschaulichen bereits 20-24 Stunden nach der topischen Verabreichung von Anthralin das Auftreten von

## Diskussion

Erythemen und Ödemen (Kemény et al., 1990). Das Ausmaß der Entzündung war in diesen Studien nicht vom Alter, Geschlecht oder dem Hauttyp der Probanden, jedoch von der Körperstelle, auf die Anthralin verabreicht wurde, abhängig (Kemény et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde Anthralin auf intakte, murine Ohrhaut verabreicht und die Auswirkungen auf die Hautstruktur und zelluläre Zusammensetzung analysiert (Abbildung 10). Die in vorangegangenen Arbeiten beobachtete, Anthralin-induzierte Entstehung von Ödemen und Erythemen kann in der vorliegenden Arbeit gleichermaßen beobachtet werden. Darüber hinaus führt Anthralin (alleine oder in Kombination mit IMI-Sol) zu einer Infiltration von Leukozyten in das behandelte Gewebe, welche in HE-gefärbten Gewebeschnitten und in durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 10 und nicht gezeigte Daten).

Vorangegangene Arbeiten haben die Auswirkungen der Anthralin-induzierten Entzündungsreaktion und der nachfolgenden Immunzellinfiltrate auf das kutane Zytokinmilieu 24 Stunden nach der topischen Verabreichung von Anthralin analysieren können (Lange et al., 1998). In der von Lange und Kollegen durchgeführten Studie waren diese Veränderungen des kutanen Zytokinmilieus unter anderem durch die vermehrte Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine IL-6, GM-CSF, TNF- $\alpha$  und MIP-2 geprägt. Die Sekretion von MIP-2 durch gewebsresidente Makrophagen ist vor allem mit der Chemotaxis von PMNs und hämatopoetischen Stammzellen in die Dermis assoziiert (Ramos et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte ausschließlich nach der Behandlung mit Anthralin (alleine oder in Kombination mit Imiquimod) auf  $\geq 90\%$  der in das Ohrhautgewebe infiltrierten Leukozyten Oberflächenmarker von neutrophilen Granulozyten (MHCII-LyG<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) detektiert werden (Tag 3 und 7, nicht gezeigte Daten).

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten funktionelle Charakteristika von CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen direkt oder indirekt durch die Interaktion mit DCs auf vielfältige Weisen beeinflussen (Kalyan & Kabelitz, 2014; Y. Li et al., 2019; Minns et al., 2019). Aus diesen Studien ist unter anderem bekannt, dass die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und Kostimulatoren auf DCs durch die Interaktion von DC-SIGN mit Mac-1 auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten positiv reguliert wird, was auf die Reifung der DC und eine optimierte Befähigung zur Antigenpräsentation hinweist (Van Gisbergen et al., 2005). Überdies ist auch eine direkte, positive Beeinflussung der Aktivierung und Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen durch neutrophile Granulozyten bekannt (Castell et al., 2019). Fraglich ist zum jetzigen Zeitpunkt, ob die ausgeprägte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten in Anthralin-behandeltes Hautgewebe einen Einfluss auf die Quantität und Qualität antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI hat. In vorangegangenen Arbeiten im Kontext der Imiquimod-basierten TCI konnte durch die

## Diskussion

systemische Depletion Gr-1<sup>+</sup> Zellen eine Abhängigkeit von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (nicht publizierte Daten; Dissertation Pamela Stein, Institut für Immunologie Mainz, 2011). *In vitro*-Analysen nach der Behandlung mit Anthralin konnten hingegen keinen direkten, vorteilhaften Einfluss von Anthralin auf den Aktivierungszustand muriner neutrophiler Granulozyten zeigen (nicht gezeigte Daten).

Da neutrophile Granulozyten gleichermaßen wie APCs *in vitro* keine direkte Beeinflussung durch Anthralin erfahren, wird angenommen, dass residente, inflammatorische Zellen in der Haut eine vermittelnde Funktion bei der Entfaltung des Adjuvanseffektes in der Kombi-TCI einnehmen. In einer Vielzahl vorangegangener Studien konnte in diesem Zusammenhang ein aktivierender Einfluss von Anthralin auf Nicht-Immunzellen beobachtet werden (Benezeder et al., 2020; Kemény et al., 1990; Lange et al., 1998). Der Fokus dieser zurückliegenden Arbeiten liegt meist auf der Beeinflussung von Keratinozyten durch Anthralin, da diesem epithelialen Zelltyp eine Beteiligung bei der Entstehung der *Psoriasis vulgaris* zugesprochen wird (Benhadou et al., 2019). Allgemein ist die inflammatorische Wirkung von Keratinozyten in der Haut bereits seit vielen Jahren bekannt und detailliert beschrieben (Albanesi et al., 2005; Barker et al., 1991).

Die in dieser Arbeit durchgeführten histologischen Analysen von Anthralin-behandeltem Gewebe deuten aufgrund der beobachteten Hyperkeratosen gleichermaßen auf eine Beeinflussung muriner Keratinozyten durch Anthralin hin (Abbildung 10). Wichtige, von Keratinozyten sekretierte, pro-inflammatorische Mediatoren sind Vertreter der IL-1-Familie (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33), TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-24, COX und ROS (Gröne, 2002; Sun et al., 2017). Die Stimulation von Keratinozyten mit Anthralin *in vitro* bewirkte die Sezernierung eines Großteils dieser Mediatoren in den Kulturüberstand (Lange et al., 1998). Keratinozyten sekretieren nach der Stimulation mit Anthralin überdies Alarmine, welche stimulierend auf Immunzellen wirken und eine Entzündungsreaktion in der Haut fördern. Zu diesen Alarminen werden HMGB1, Hitzeschockproteine, antimikrobielle Peptide (Defensine, Cathelicidine, Calgranulin A/B), Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-33) und Chemokine (IL-8) gezählt (Benezeder et al., 2020; Bertheloot & Latz, 2017).

Da Keratinozyten laut aktuellem Stand der Forschung nur in geringem Maße zur Antigenpräsentation befähigt sind, könnte die indirekte Aktivierung von gewebsresidenten DCs, beispielsweise Langerhans-Zellen oder dermalen DCs, durch pro-inflammatorische Zytokine von Keratinozyten einen potentiellen Mechanismus bei der Induktion adaptiver Immunantworten in der Kombi-TCI darstellen (Honda et al., 2019). Hennen und Kollegen konnten bei der topischen Verabreichung von Prähaptenen bereits eine direkte, stimulierende Wechselwirkung von Keratinozyten und DCs beobachten (Hennen et al., 2011). In dieser Studie zeigte sich, dass die Umsetzung der Prähaptenen in ihre aktive Form in der

## Diskussion

Keratinocyten-Zelllinie HaCaT die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren fördert. Diese pro-inflammatorischen Zytokine führten nachfolgend zu einer positiven Beeinflussung des Aktivierungszustandes von DCs.

Inwiefern die inflammatorische Wirkung von Anthralin auf Keratinocyten die Antigenpräsentation und die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI beeinflusst, kann durch die Daten der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Eine zusätzliche Bedeutung des TLR7-Signalweges in Keratinocyten, welcher in vorangegangenen Arbeiten zu der Induktion des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Keratinocyten führte, für die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen nach der Kombi-TCI konnte durch die Verwendung eines Mausstamms mit TLR7-defizienten Keratinocyten ausgeschlossen werden (Z. J. Li et al., 2013) (nicht gezeigte Daten). Die Kultivierung von APCs in den Kulturüberständen Anthralin-stimulierter Keratinocyten, alleine oder in Kombination mit Imiquimod, könnte hingegen Aufschluss über eine potentielle Beeinflussung des Aktivierungszustandes von APCs durch Keratinocyten-assoziierte Zytokine liefern. Eine Analyse über die Beteiligung weiterer, in dieser Arbeit nicht analysierter Zelltypen, einschließlich ILCs, könnte dazu beitragen die komplexen Abläufe in der Kombi-TCI zu erklären.

### **4.4) Reaktive Sauerstoffspezies und das ROS-induzierte NLRP3-Inflammasom nehmen Einfluss auf die Entstehung adaptiver Immunantworten nach der Kombi-TCI**

Die molekularen Ursachen für die pro-inflammatorische Wirkung von Anthralin in gesunder Haut sind trotz der andauernden klinischen Anwendung des Wirkstoffes bei der Therapie der *Psoriasis vulgaris* nicht vollständig geklärt. Um die Entstehung des Adjuvanseffektes von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI aufklären zu können, wurden vorangegangene Arbeiten analysiert, welche die pro-inflammatorische Wirkung von Anthralin vor allem mit der Induktion von ROS verknüpfen (Klaus Müller, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wird durch die Verabreichung von radikalfangenden Substanzen veranschaulicht, dass ROS einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI haben (Abbildung 20). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit vorangegangenen Studien, welche von einer teilweisen Aufhebung der pro-inflammatorischen Effekte von Anthralin durch radikalfangende Substanzen berichten (Fuchs & Packer, 1989). Die Entstehung von ROS ist einerseits mit der Autooxidation von Anthralin und andererseits mit dessen antirespiratorischen Auswirkungen

## Diskussion

auf den Zellmetabolismus assoziiert. In der vorliegenden Arbeit konnten diese antirespiratorischen Effekte von Anthralin erstmals bei Makrophagen beobachtet werden (Abbildung 29). Dieser Effekt ist vorrangig bei Keratinozyten bekannt, welche als primäre Quelle der Anthralin-induzierten, mitochondrialen ROS gelten (McGill et al., 2005). ROS werden darüber hinaus in großer Menge durch neutrophile Granulozyten gebildet, welche in Folge der Anthralin-induzierten Entzündung in das Gewebe infiltrieren. Die Quelle der ROS, welche entscheidend für das Auftreten der Adjuvanseffekte von Anthralin und Imiquimod ist, kann durch die vorliegende Arbeit nicht identifiziert werden.

Die Effekte der ROS im Immunsystem sind hingegen vielfältig. In physiologischen Konzentrationen modulieren ROS etwa die Aktivierung von T-Zellen, APCs und inflammatorischen Nicht-Immunzellen (Bito & Nishigori, 2012; Xinfeng Chen et al., 2016; Oberkampf et al., 2018). ROS, vor allem  $H_2O_2$  und  $O_2^-$ , induzieren beispielsweise die Expression kostimulatorischer Moleküle auf DCs und beeinflussen deren Befähigung zur Antigenpräsentation (Y. Yang et al., 2013).

Wichtige Vertreter der ROS-Sensoren sind NLRP3-Inflammasome. Das NLRP3-Inflammasom ist nach dessen Aktivierung vor allem mit einer entzündlichen Form des Zelltodes, der Pyroptose, und der Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen der IL-1-Familie assoziiert (Swanson et al., 2019). Die Kombi-TCI in NLRP3-defizienten Mäusen führt zu einer eingeschränkten Induktion antigenspezifischer  $CD8^+$  T-Zellen (Abbildung 21). Die Wirkung der Anthralin-induzierten ROS scheint auf Grundlage dieser Ergebnisse zum Teil durch NLRP3-Inflammasomen vermittelt zu werden. Einige Studien weisen bereits auf kooperative Effekte von TLR-Signalwegen und dem NLRP3-Inflammasom hin (Rapsinski et al., 2015; Xing et al., 2016; Junling Yang et al., 2020). Diese Studien zeigen unter anderem, dass von TLR-Signalwegen induzierte, inaktive Transkripte von IL-1 $\beta$  und IL-18 durch das NLRP3-Inflammasom in ihre aktive, pro-inflammatorische Form überführt werden.

Die Bildung von NLRP3-Inflammasomen konnte neben einer Vielzahl von Immunzellen, einschließlich Mastzellen, Makrophagen, Monozyten und DCs, auch in Keratinozyten nachgewiesen werden (Jang et al., 2015; Lei-Leston et al., 2017; Thinwa et al., 2014). Die niedrigen Konzentrationen des inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  im Kulturüberstand Anthralin-stimulierter Mastzellen, Makrophagen und DCs deuten darauf hin, dass das NLRP3-Inflammasom in diesen Zelltypen unzureichend aktiviert wird (Abbildung 27, Abbildung 28 und nicht gezeigte Daten). Die in vorangegangenen Arbeiten beobachtete Sezernierung großer Mengen IL-1 $\beta$  durch Anthralin-stimulierte Keratinozyten lassen hingegen eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasomes in diesem Zelltyp denkbar erscheinen (Dai et al., 2017). Nachfolgende Studien könnten daher einen möglichen Beitrag des NLRP3-Inflammasoms in Keratinozyten für die Entstehung von primären T-Zell-Antworten in Folge der Kombi-TCI untersuchen.

## Diskussion

Diese Hypothese wird durch RNA-Sequenzierungen von Anthralin-behandelter Haut (alleine oder in Kombination mit Imiquimod) in unserem Labor bestärkt, welche eine Vielzahl von Gentranskripten aus der IL-1-Familie, einschließlich IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-18, identifizieren konnte (nicht gezeigte Daten). In diesen RNA-Sequenzierungen und vorangegangenen Arbeiten konnten in Imiquimod-behandeltem Hautgewebe nur geringe Konzentrationen der Zytokine der IL-1-Familie detektiert werden (Benjamin M. Davis, Glen F. Rall, 2013). Interessanterweise ist die Entstehung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der alleinigen TCI mit IMI-Sol überdies unabhängig von Zytokinen der IL-1-Familie (Lopez et al., 2017). Die differentielle Expression der IL-1-Genfamilie durch die zusätzliche Verabreichung von Anthralin könnte aufgrund der vielfältigen Effekte deren Genprodukte im angeborenen und adaptiven Immunsystem ein Indiz für deren Bedeutung für die Kombi-TCI sein.

So konnten vorangegangene Arbeiten bereits eine Amplifikation der Qualität der Antigenpräsentation durch die Induktion des IL-1R-Signalweges in DCs veranschaulichen (Khoruts et al., 2004; Nambu et al., 2006; Rao et al., 2020). Die hierbei erzeugten anti-tumoralen T-Zell-Antworten waren maßgeblich vom IL-1R-Signalweg in DCs abhängig. Eine weitaus größere Anzahl von Untersuchungen konnte einen direkten Einfluss der Zytokine aus der IL-1-Familie auf CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen beobachten. Ben-Sasson und Kollegen konnten beispielsweise feststellen, dass IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Expansion, Effektorfunktionen, Gewebslokalisierung und Gedächtnisantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen positiv regulieren (Shlomo Z. Ben-Sasson et al., 2013). Auf molekularer Ebene konnte nach der Stimulation von IL-1R-Signalwegen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine vermehrte Expression von IL-2 und IL-2R auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, welche das Überleben und die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen begünstigen (Didier et al., 1988). In anderen Arbeiten konnte anhand einer vermehrten Expression von Granzym B und Perforin eine erhöhte Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch IL-1R-Signalwege beobachtet werden (S. Z. Ben-Sasson et al., 2011). In IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten darüber hinaus abgeschwächte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten nach Infektionen mit LCMV, Influenza-Viren, *Mycobacterium tuberculosis*, Vaccinia-Viren und in einigen Tumoren beobachtet werden (Joeckel et al., 2012).

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  die Expansion der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subtypen T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 fördert und deren Differenzierung in Gedächtniszellen begünstigt. Während diese Beobachtung zuerst auf einen Effekt des IL-1R-Signalweges in APCs und ein verbessertes Priming CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zurückgeführt wurde, konnten Ben-Sasson und Kollegen eine direkte Wirkung des IL-1 auf CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen nachweisen (Shlomo Z. Ben-Sasson et al., 2009).

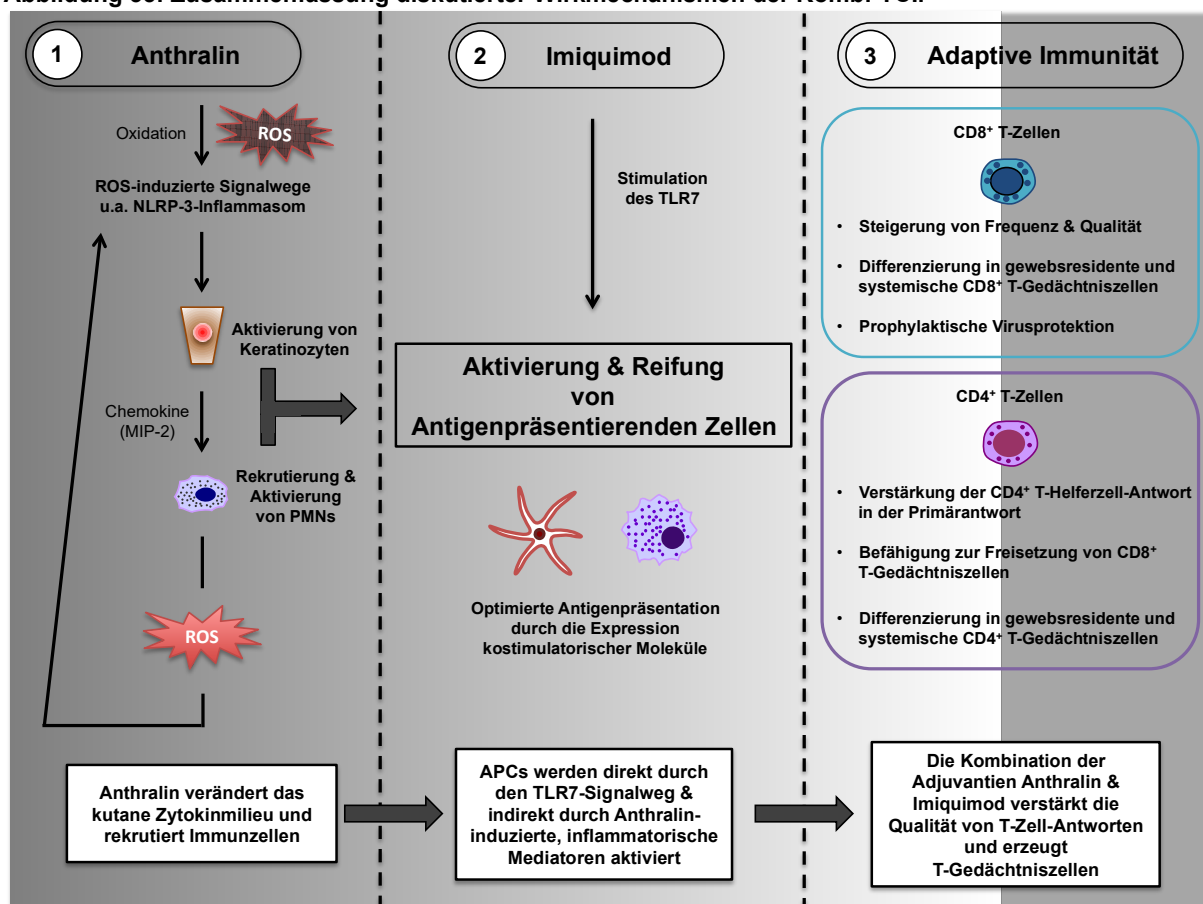
Die Untersuchung eines potentiellen Einflusses der Zytokine aus der IL-1-Familie in der Kombi-TCI erscheint speziell durch die geringe Expression deren Genprodukte in Imiquimod-

## Diskussion

behandeltem Gewebe als ein vielversprechendes Forschungsziel nachfolgender Arbeiten. Primäres Ziel sollte hierbei vorerst die Klärung der Frage sein, ob die in RNA-Sequenzierungen detektierte Zunahme der Expression von Genen aus der IL-1-Familien gleichermaßen auch auf Protein-Ebene nachweisbar ist. Die Verwendung von IL-1R-defizienten Mausstämmen könnte darüber hinaus bei der Aufklärung einer potentiellen Beteiligung des Zytokins IL-1 bei der Entstehung antigenspezifischer T-Zellen in der Kombi-TCI hilfreich sein.

Eine grafische Zusammenfassung der identifizierten und mutmaßlichen Interaktionen, welche die Entstehung von hochqualitativen, antigenspezifischen T-Zellen nach der Kombi-TCI begünstigen, ist in Abbildung 35 dargestellt.

Abbildung 35: Zusammenfassung diskutierter Wirkmechanismen der Kombi-TCI.



In der vorliegenden Arbeit wurde in Folge transkutaner Immunisierungen mit einer neuartigen Adjuvantien-Kombination aus Anthralin und Imiquimod die Entstehung antigenspezifischer T-Zell-Antworten nachgewiesen. **1)** Die Autooxidation des Hydroxyanthrons Anthralin induziert durch die Freisetzung von ROS die Aktivierung von Keratinozyten, welche durch die Freisetzung chemotaktischer Faktoren (u.a. MIP-2) die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe fördern. Pro-inflammatorische Mediatoren von Keratinozyten und neutrophilen Granulozyten sind mit der Aktivierung von APCs in der Haut assoziiert. **2)** Das veränderte Zytokinmilieu in der Haut induziert einen optimierten Aktivierungszustand von APCs. Die Maturierung von APCs, vor allem DCs, wird durch den TLR7-Signalweg entscheidend beeinflusst. In Folge des Zusammenspiels der Anthralin-induzierten Entzündungsmediatoren und der Ligation des TLR7 wird eine vollständige Aktivierung der APCs erzielt, welche u.a. durch die Expression des Kostimulators CD70 auf APCs charakterisiert werden kann. **3)** Durch eine suffiziente Aktivierung von APCs wird in Folge einer optimierten Antigenpräsentation eine antigenspezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort generiert. Antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI zeigen hohe lytische Fähigkeiten, welche zu einer protektiven Immunantwort in prophylaktischen Virusmodellen

## Diskussion

führen. Die antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind darüber hinaus durch ihre Langlebigkeit gekennzeichnet, welche in einem funktionellen Zusammenhang mit einer verstärkten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort steht.

### **4.5) Bestehende Limitierungen und Möglichkeiten zur Weiterentwicklung für die immuntherapeutische Nutzung der Kombi-TCI im humanen Organismus**

Die Entwicklung neuartiger Impfstrategien resultiert neben Sicherheitsaspekten bei der Verabreichung vor allem auch aus dem steigenden Bedarf an wirksamen Immuntherapeutika. Im Kontext der Entwicklung moderner Immuntherapeutika stellt die Entdeckung von Immuncheckpoints und deren Blockade durch spezifische Antikörper einen Meilenstein in der Therapie vieler Krebserkrankungen dar (Allison et al., 1995). Dies wird nicht zuletzt durch die Vergabe des Nobelpreises für Medizin im Jahr 2018 für die Entdeckung der Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1 verdeutlicht. Die Wirksamkeit dieser neuartigen Tumorimmuntherapie unterliegt jedoch in Abhängigkeit von der Entität großen Schwankungen (Darvin et al., 2018).

Eine fortlaufende Weiterentwicklung innovativer, immuntherapeutischer Strategien ist daher unabdingbar (Bashir & Wilson, 2019). Die Generierung antigenspezifischer T-Zell-Antworten durch peptidbasierte transkutane Immunisierungen erscheint in diesem Zusammenhang vor allem bei der Therapie von Virus- und Krebserkrankungen als vorteilhaft (Waldman et al., 2020). Die grundsätzliche Wirksamkeit therapeutischer, peptidbasierter Vakzinierungen ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht ausreichend geklärt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt (September 2020) ist kein peptidbasierter Impfstoff in der klinischen Anwendung am humanen Organismus zugelassen. Zum gleichen Zeitpunkt sind insgesamt 363 klinische Studien zu peptidbasierten Impfungen registriert, wovon aktuell 209 Phase I, 149 Phase II und 5 Phase III durchlaufen (Quelle: ClinicalTrials.gov; September 2020). Eine Vielzahl präklinischer Forschungsarbeiten beschäftigt sich aktuell mit den Ursachen dieser Lücke zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung.

Vorangegangene klinische Studien und von der FDA zugelassene Impfstoffe deuten einheitlich auf die Bedeutung einer suffizienten Stimulation des angeborenen Immunsystems durch geeignete Adjuvantien bei der Entwicklung therapeutischer Vakzine hin (Circelli et al., 2017; Seya et al., 2018). In der Geschichte der Impfstoffentwicklung stellt die Entdeckung der adjuvanten Wirkung von Aluminiumsalze in Impfstoffen durch Alexander Glenny einen Meilenstein bei der Ausrottung vieler infektiöser Erkrankungen, einschließlich Diphtherie, Tetanus, Pertussis und Poliomyelitis, dar. Aluminiumsalzen und ein Großteil der meisten konventionellen Adjuvantien erzeugt jedoch vor allem eine humorale Immunantwort, welche sich bei der Therapie von chronischen Infektionen oder Krebs als unzureichend erwiesen hat (Marrack et al., 2009). Im Kontext der CAR (*chimeric antigen receptor*)-T-Zell-Therapie, einer

## Diskussion

neuartigen Methode bei der T-Zellen aus dem Blut isoliert und nach der gentechnologischem Erzeugung eines synthetischen, tumorspezifischen TCR in den Patienten zurück infundiert werden, konnte beobachtet werden, dass diese Methode vor allem bei einer Expansion der CAR-T-Zellen auf mindestens 40-80 % der gesamten T-Zell-Population erfolgreich war (Miliotou & Papadopoulou, 2018; Pennock et al., 2016). Diese und weitere Studien weisen darauf hin, dass wirksame immunonkologische T-Zell-Therapien hohe Frequenzen qualitativ hochwertiger Effektorzellen erfordern. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch nur sehr wenige Adjuvantien, die eine derartige Expansion antigenspezifischer T-Effektorzellen nach der TCI ermöglichen.

Die einmalige, therapeutische Vakzinierung bei der in der vorliegenden Arbeit etablierten Kombi-TCI hat einen geringen Einfluss auf das Wachstum von Ovalbumin-exprimierenden MC38-Tumoren in Mäusen (nicht gezeigte Daten). Eine Amplifikation der Frequenz antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen erscheint auf Grundlage dieser Ergebnisse und den Erkenntnissen bei der CAR-T-Zell-Therapie als notwendig. Die wiederholte Verabreichung der Kombi-TCI mit gering-konzentriertem Anthralin bewirkt in der vorliegenden Arbeit eine Vervielfachung der Frequenz antigenspezifischer T-Effektorzellen in der Primärantwort und erhöht die Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen (Abbildung 34). Nachfolgende Arbeiten liegen dem Ziel zu Grunde, die Auswirkungen der amplifizierten CD8<sup>+</sup> T-Effektorzell-Population auf die Tumormikroumgebung und das Tumorwachstum zu untersuchen.

Perspektivisch ergeben sich durch den technologischen Fortschritt der vergangenen Jahre zudem vielfältige Möglichkeiten, die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Adjuvantien-Kombination weitaus zielgerichteter einzusetzen (Al-japairai et al., 2020; Jiang et al., 2020; Pielenhofer et al., 2020). Beim Transport von Adjuvantien und Antigenen in der TCI führt vor allem die Barrierefunktion des *Stratum corneum* zu Restriktionen bei der Auswahl geeigneter Epitope. Dahingehend ist die Verabreichung der in dieser Arbeit identifizierten Adjuvantien-Kombination und Antigene mittels Mikronadeln ein perspektivisches Ziel für die Weiterentwicklung dieser Methode. Solche Mikronadeln ermöglichen die Umgehung des Stofftransportes durch das *Stratum corneum* und zeichnen sich zudem durch den Wegfall der Nachteile von klassischen Nadeln aus (Leone et al., 2017; Rodgers et al., 2019; Jian Yang et al., 2019). Vorteilhafterweise ist die Verwendung von Mikronadeln in anderen Anwendungsgebieten bereits hinreichend etabliert (Waghule et al., 2019). Die Verwendung von Mikronadeln ermöglicht zudem den Transport vollständiger Proteine, welche in vorangegangenen Arbeiten gleichermaßen die Induktion von B- und T-Zell-Antworten ermöglichten (S. J. Lee et al., 2019; N. Li et al., 2011). Selbstaflösende Mikronadeln ermöglichen zudem eine zeitlich versetzte Freisetzungen der Adjuvantien, welche in der

## **Diskussion**

vorliegenden Arbeit als entscheidender Faktor für die erfolgreiche Durchführung der Kombi-TCI identifiziert wurden (Fukushima et al., 2011; J. W. Lee et al., 2008).

Überdies sollte eine detailliertere Charakterisierung des Wirkmechanismus der neuartigen Adjuvantien-Kombination in nachfolgenden Arbeiten eine Einschätzung bezüglich der Maus-Mensch-Übertragbarkeit ermöglichen. Aufgrund der anatomischen Unterschiede (v.a. der Hautstruktur) und abweichender Mechanismen des Immunsystems sind klinische Studien im humanen Organismus notwendig, um eine abschließende Einschätzung über die Wirksamkeit der etablierten TCI zu ermöglichen.

## Zusammenfassung

### 5. Zusammenfassung

Neuartige, nicht invasive Impfstrategien sind durch ihre einfache Handhabung und ihre immuntherapeutische Nutzbarkeit in den Fokus der Forschung gerückt. Transkutane Immunisierungen (TCI) mit der topisch verabreichbaren, Imiquimod-haltigen Nanoemulsion IMI-Sol und Antigenen des Ovalbumin induzieren durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems die Entstehung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Qualität und die Langlebigkeit der erzeugten T-Zell-Antwort sind nach einer alleinigen TCI mit dem TLR7-Liganden Imiquimod jedoch begrenzt. Mit dem Ziel die bestehenden Limitierungen aufzuheben und somit effektive Immunisierungen induzieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit Optimierungen der Imiquimod-basierten TCI durch die zusätzliche Verabreichung des hautgängigen Antipsoriatikums Anthralin angestrebt.

Im Vergleich zur alleinigen Immunisierung mit Imiquimod in vorangegangenen Arbeiten konnte die für die Entstehung von systemischen T-Zellen benötigte Hautfläche durch die aufeinanderfolgende Verabreichung von Anthralin und Imiquimod dreifach verringert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die funktionellen Eigenschaften der T-Zellen maßgeblich durch den TLR7-Signalweg in dendritischen Zellen (DCs) reguliert werden. Im Vergleich zur limitierten Immunisierungsstrategie mit Imiquimod allein, ermöglicht die Kombi-TCI durch eine adäquate Aktivierung von DCs darüber hinaus die Erzeugung hochfunktionaler, systemischer T-Gedächtniszell-Antworten. Die Anthralin-induzierten Signalwege fördern zudem die Entstehung gewebesresidenter T-Gedächtniszellen in der Haut, welche nach der alleinigen Verabreichung von Imiquimod ausbleibt. Hierbei ist die Entstehung gewebesresidenter und systemischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen nach der Kombi-TCI maßgeblich von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen abhängig.

Der Wirkmechanismus dieser neuartigen Adjuvantien-Kombination in der TCI ist insbesondere mit der Oxidation von Anthralin und der nachfolgenden ROS-Induktion assoziiert. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Beteiligung des ROS-induzierten NLRP3-Inflammasoms bei der Entstehung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Kombi-TCI.

Zusammenfassend kann in der vorliegenden Arbeit mit dem Hydroxyanthron Anthralin ein neuartiger Hilfsstoff für transkutane Immunisierungen identifiziert werden, welcher darüber hinaus im Zusammenspiel mit Imiquimod die Entstehung systemischer sowie gewebesresidenter T-Zell-Antworten ermöglicht. Neben der bereits nachgewiesenen hohen prophylaktischen Wirksamkeit der Adjuvantien-Kombination aus Anthralin und Imiquimod im Virusmodell, soll durch die Etablierung von *prime-boost*-Immunisierungen zukünftig auch der therapeutische Nutzen der Kombi-TCI in Tumormodellen untersucht werden.

## Abstract

### 6. Abstract

Due to their easy handling and immunotherapeutic usability novel, non-invasive vaccination strategies have become the focus of research. Transcutaneous immunizations (TCI) with the topically administered, imiquimod-containing nanoemulsion IMI-Sol and antigens of ovalbumin induce the formation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by activating the innate immune system. However, the quality and longevity of the generated T-cell response is limited after TCI with the TLR7 ligand imiquimod alone. In order to overcome these limitations and to induce effective immunizations, the present study aims to optimize the imiquimod-based TCI by the additional administration of the skin-permeable antipsoriatic anthralin.

Compared to sole application of imiquimod in previous studies, the skin area required for the development of systemic T cells was reduced threefold by the successive administration of anthralin and imiquimod. Furthermore, it could be shown that the functional properties of T cells are significantly dependent on the TLR7 signaling pathway in dendritic cells (DCs). Compared to the limited immunization strategy with imiquimod alone, the combination TCI also enables the generation of highly functional, systemic T-memory cell responses by an adequate activation of DCs. The anthralin-induced signaling pathways also promote the formation of tissue-resident T-memory cells in the skin, which is absent after administration of imiquimod alone. The development of tissue-resident and systemic CD8<sup>+</sup> T-memory cells after combination TCI is significantly dependent on CD4<sup>+</sup> T-helper cells.

The mechanism of action in this novel adjuvant combination in TCI is particularly associated with the oxidation of anthralin and the subsequent ROS induction. The present work shows a involvement of the ROS-induced NLRP3 inflammasome in the development of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells after combination TCI.

In summary, the present study identifies the hydroxyanthrone anthralin as a novel excipient for transcutaneous immunization, which in combination with imiquimod enables the development of systemic and tissue-resident T cell responses. In addition to the already proven high prophylactic efficacy of the adjuvant combination of anthralin and imiquimod in the virus model, the therapeutic benefit of the combined TCI in tumor models will be investigated by the established prime-boost immunizations.

# Anhang

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der schematische Aufbau der Haut. ....	1
Abbildung 2: Die Induktion und der Verlauf antigenspezifischer T-Zell-Antworten. ....	5
Abbildung 3: Aufbau und Funktion des NLRP3-Inflammasoms.....	13
Abbildung 4: Subtypen der T-Zellen. ....	20
Abbildung 5: Das Priming naiver T-Zellen wird durch kostimulatorische Moleküle beeinflusst. .....	22
Abbildung 6: Die Entstehung antigenspezifischer T-Zellen in der transkutanen Immunisierung. .....	25
Abbildung 7: Strukturformel und Derivate des Anthralin.....	29
Abbildung 8: Antigen-spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen lysieren peptid-beladene Zielzellen.....	45
Abbildung 9: Anpassung des Immunisierungsprotokoll durch die Vorbehandlung der Haut mit Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI.....	56
Abbildung 10: Anthralin verursacht in gesunder, muriner Haut eine Entzündungsreaktion. ..	57
Abbildung 11: Die kombinierte Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol erhöht die Frequenz OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD44 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> Effektor-CTLs in der Primärantwort. ....	59
Abbildung 12: Die kombinierte Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol steigert die funktionellen Eigenschaften OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Primärantwort. .....	60
Abbildung 13: Die Kombi-TCI erzeugt eine Vielzahl T <sub>H</sub> 1-polarisierter T-Helferzellen in der Primärantwort. ....	62
Abbildung 14 Die Verwendung von Anthralin in der Imiquimod-basierten TCI ermöglicht die Entstehung OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen.....	63
Abbildung 15: OVA <sub>257-264</sub> -spezifische CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen lysieren peptid-beladene Zielzellen effektiv und produzieren IFN $\gamma$ . ....	65

## Anhang

Abbildung 16 Die TCI mit Anthralin und IMI-Sol erzeugt antigenspezifische, IFN $\gamma$ -produzierende CD4 <sup>+</sup> Gedächtnis-T-Helferzellen. ....	66
Abbildung 17: Anthralin, alleine oder in Kombination mit Imiquimod, induziert antigenspezifische, IFN $\gamma$ -produzierende CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Haut. ....	68
Abbildung 18: Die Induktion antigenspezifischer IFN $\gamma$ -produzierender CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in der Kombi-TCI wird durch CD4 <sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst. ....	70
Abbildung 19: Danthron hat keinen vergleichbaren Adjuvanseffekt wie Anthralin auf die Frequenz OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen und deren funktionelle Eigenschaften nach der Imiquimod-basierten TCI. ....	73
Abbildung 20: Die radikalfangende Substanz $\alpha$ -Tocopherol vermindert die funktionellen Eigenschaften OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Kombi-TCI. ....	75
Abbildung 21: Das NLRP3-Inflammasom beeinflusst die Entstehung CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Primärantwort der Kombi-TCI. ....	77
Abbildung 22: Die Blockade des Kostimulators CD70 verringert die Frequenz OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen, aber nicht deren Effektorfunktionen, in der Kombi-TCI. ....	78
Abbildung 23: Die Effektorfunktionen, aber nicht die Frequenz, von OVA <sub>257-264</sub> -spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen sind in der Primärantwort der Kombi-TCI in TLR7 <sup>-/-DC</sup> -Mäusen eingeschränkt. ....	81
Abbildung 24: Die Frequenz OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen und deren Effektorfunktionen sind nach der Kombi-TCI in TLR7 <sup>-/-DC</sup> -Mäusen reduziert. ....	82
Abbildung 25: Die Frequenz und die Effektorfunktionen von OVA <sub>257-264</sub> -spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen sind in der Primärantwort der Kombi-TCI in TLR7 <sup>-/-M<math>\phi</math></sup> -Mäusen nicht eingeschränkt. ....	83
Abbildung 26: Die Effektorfunktionen, aber nicht die Frequenz, OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen sind nach der Kombi-TCI in TLR7 <sup>-/-M<math>\phi</math></sup> -Mäusen geringfügig reduziert. ....	84
Abbildung 27: Anthralin beeinflusst den Aktivierungszustand von CD11c <sup>+</sup> DCs <i>in vitro</i> nicht. ....	86

## Anhang

Abbildung 28: Anthralin induziert die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Makrophagen <i>in vitro</i> .....	88
Abbildung 29: Anthralin beeinflusst den Glukose-Stoffwechsel von Makrophagen <i>in vitro</i> ....	90
Abbildung 30 Die prophylaktische TCI mit Anthralin und IMI-Sol minimiert die Viruslast nach einer Infektion mit dem Ovalbumin-exprimierenden Vaccinia Virus. ....	91
Abbildung 31: Die Reduktion der Anthralin-Konzentration in der Imiquimod-basierten TCI minimiert die sichtbare Entzündungsreaktion. ....	94
Abbildung 32: Die Imiquimod-basierte TCIs mit 1/128 % oder 1/16 % Anthralin/Vaseline erzeugen vergleichbare primäre Immunantworten.....	95
Abbildung 33: Anpassung des Immunisierungsprotokolls bei der mehrfachen Verabreichung von Anthralin und IMI-Sol. ....	96
Abbildung 34 Die mehrfache Imiquimod-basierte TCI mit 1/128 % Anthralin/Vaseline steigert die Frequenz OVA <sub>257-264</sub> -spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. ....	97
Abbildung 35: Zusammenfassung diskutierter Wirkmechanismen der Kombi-TCI. ....	112

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller humanen und murinen Toll-like Rezeptoren und deren Charakteristika .....	11
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	32
Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.....	33
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.....	38
Tabelle 5: Verwendete Antikörper .....	39
Tabelle 6: Verwendete Mausstämme .....	40
Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren in den Metabolismus-Analysen .....	52

## Anhang

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazole
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenz-Farbstoff für die FACS-Analyse)
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin-7
BMM	<i>bone-marrow derived macrophages</i>
BSA	bovine serum albumin
BV	<i>brilliant violet</i>
bzw.	Beziehungsweise
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR	<i>CC-Chemokin Rezeptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zellen
dDC	dermale dendritische Zelle
dLN	<i>draining lymph node</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECAR	<i>extracellular acidification rate</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et. al.</i>	et alia (und andere)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetale calf serum</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
fl/fl	<i>flox/flox</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
Gr-1	<i>granulocyte-differentiation antigen-1</i>
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSC	hämatopoetische Stammzelle
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
<i>i.v.</i>	Intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphoide cell</i>

## Anhang

IM	Intramuskulär
KO	Knockout
l	Liter
Ly6C/G	<i>lymphocyte antigen 6C/G</i>
MACS	<i>magnet activated cell sorting</i>
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	<i>major histokompatibility complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK	Natürliche Killerzelle
OCAR	<i>oxygen consumption rate</i>
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PB	<i>pacific blue</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SALT	<i>skin associated lymphoid tissue</i>
SC	Subkutan
SFU	<i>spot forming units</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TCI	Transkutane Immunisierung
TCR	<i>T cell receptor</i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TRM	<i>tissue resident memory cell</i>
U	<i>Units (Einheiten)</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VV	Vaccinia Virus

## Anhang

WHO	<i>world health organisation</i>
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

### 7.4 Literaturverzeichnis

- Ahrends, T., Busselaar, J., Severson, T. M., Bąbala, N., de Vries, E., Bovens, A., Wessels, L., van Leeuwen, F., & Borst, J. (2019). CD4+ T cell help creates memory CD8+ T cells with innate and help-independent recall capacities. *Nature Communications*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13438-1>
- Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbala, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., & Borst, J. (2017). CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity*, *47*(5), 848-861.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.009>
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, *4*(7), 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Al-japairai, K. A. S., Mahmood, S., Almurisi, S. H., Reddy, J., Rebhi, A., Azmana, M., & Raman, S. (2020). Current trends in polymer microneedle for transdermal drug delivery. *Int J Pharm*, *25*, 587.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L., & Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, *4*(3), 329–334. <https://doi.org/10.2174/1568010054022033>
- Aldag, C., Teixeira, D. N., & Leventhal, P. S. (2016). Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: A review of the literature. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, *9*, 411–419. <https://doi.org/10.2147/CCID.S116158>
- Allison, J. P., Hurwitz, A. A., & Leach, D. R. (1995). Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Current Opinion in Immunology*, *7*(5), 682–686. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80077-8](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80077-8)
- Arens, R., Schepers, K., Nolte, M. A., Van Oosterwijk, M. F., Van Lier, R. A. W., Schumacher, T. N. M., & Van Oers, M. H. J. (2004). Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8+ T cell formation. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(11), 1595–1605. <https://doi.org/10.1084/jem.20031111>
- Arens, R., Tesselaar, K., Baars, P. A., Van Schijndel, G. M. W., Hendriks, J., Pals, S. T., Krimpenfort, P., Borst, J., Van Oers, M. H. J., & Van Lier, R. A. W. (2001). Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN $\gamma$ -mediated B cell depletion. *Immunity*, *15*(5), 801–812. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00236-9)
- Baker, B. S., Swain, A. F., Griffiths, C. E. M., Leonard, J. N., Fry, L., & Valdimarsson, H. (1985). The Effects of Topical Treatment with Steroids or Dithranol on Epidermal T Lymphocytes

## Anhang

- and Dendritic Cells in Psoriasis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 22(5), 471–477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1985.tb01905.x>
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Lund, F. E., & Randall, T. D. (2013). CD4+ T helper cells use CD154-CD40 interactions to counteract T reg cell- mediated suppression of CD8+ T cell responses to influenza. *Journal of Experimental Medicine*, 210(8), 1591–1601. <https://doi.org/10.1084/jem.20130097>
- Barbieri, N. C. S. K. A. J. T. (2014). Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nat Rev Microbiol.*, 12(9), 599–611. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Barker, J. N. W. N., Griffiths, C. E. M., Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Dixit, V. M., & Nickoloff, B. J. (1991). Keratinocytes as initiators of inflammation. *The Lancet*, 337(8735), 211–214. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92168-2](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92168-2)
- Bashir, B., & Wilson, M. A. (2019). Novel Immunotherapy Combinations. *Current Oncology Reports*, 21(11). <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0851-x>
- Becker, P. D., Hervouet, C., Mason, G. M., Kwon, S. Y., & Klavinskis, L. S. (2015). Skin vaccination with live virus vectored microneedle arrays induce long lived CD8+ T cell memory. *Vaccine*, 33(37), 4691–4698. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.046>
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Behrens, R. H., Cramer, J. P., Jelinek, T., Shaw, H., von Sonnenburg, F., Wilbraham, D., Weinke, T., Bell, D. J., Asturias, E., Pauwells, H. L. E., Maxwell, R., Paredes-Paredes, M., Glenn, G. M., Dewasthaly, S., Stablein, D. M., Jiang, Z. D., & DuPont, H. L. (2014). Efficacy and safety of a patch vaccine containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: A phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial in travellers from Europe to Mexico and Guatemala. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(3), 197–204. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70297-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70297-4)
- Ben-Sasson, S. Z., Caucheteux, S., Crank, M., Hu-Li, J., & Paul, W. E. (2011). IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine*, 56(1), 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.07.006>
- Ben-Sasson, Shlomo Z., Hogg, A., Hu-Li, J., Wingfield, P., Chen, X., Crank, M., Caucheteux, S., Ratner-Hurevich, M., Berzofsky, J. A., Nir-Paz, R., & Paul, W. E. (2013). IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210(3), 491–502. <https://doi.org/10.1084/jem.20122006>
- Ben-Sasson, Shlomo Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C. A., & Paul, W. E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), 7119–7124. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902745106>
- Benezeder, T., Painsi, C., Patra, V., Dey, S., Holcmann, M., Lange-Asschenfeldt, B., Sibilía, M., & Wolf, P. (2020). Dithranol targets keratinocytes, their crosstalk with neutrophils and inhibits the il-36 inflammatory loop in psoriasis. *ELife*, 9, 1–31. <https://doi.org/10.7554/eLife.56991>
- Benhadou, F., Mintoff, Di., & Del Marmol, V. (2019). Psoriasis: Keratinocytes or Immune Cells

## Anhang

- Which Is the Trigger? *Dermatology*, 235(2), 91–100. <https://doi.org/10.1159/000495291>
- Benjamin M. Davis, Glen F. Rall, M. J. S. (2013). IL-1R1 signaling facilitates Munro's microabscess formation in psoriasiform imiquimod-induced skin inflammation. *J Invest Dermatol*, 133(6), 1541–1549. <https://doi.org/doi:10.1038/jid.2012.512>
- Bertheloot, D., & Latz, E. (2017). HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-33 and S100 proteins: Dual-function alarmins. *Cellular and Molecular Immunology*, 14(1), 43–64. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.34>
- Bialojan, A., Sohl, J., Rausch, J., Aranda Lopez, P., Denny, M., Langguth, P., Hartmann, A. K., Yagita, H., Probst, H. C., Schild, H., & Radsak, M. P. (2019). Transcutaneous immunization with CD40 ligation boosts cytotoxic T lymphocyte mediated antitumor immunity independent of CD4 helper cells in mice. *European Journal of Immunology*, 49(11), 2083–2094. <https://doi.org/10.1002/eji.201848039>
- Bito, T., & Nishigori, C. (2012). Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. *Journal of Dermatological Science*, 68(1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.06.006>
- Bobba, A., Atlante, A., Petragallo, V. A., & Marra, E. (2008). Different sources of reactive oxygen species contribute to low potassium-induced apoptosis in cerebellar granule cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 21(6), 737–745. <https://doi.org/10.3892/ijmm.21.6.737>
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., & Klinman, D. M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant (author manuscript). *Expert Reviews Vaccines*, 10(4), 499–511. <https://doi.org/10.1586/erv.10.174.CpG>
- Boer, J., & Smeenk, G. (1986). Effect of short-contact anthralin therapy on ultraviolet B irradiation of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15(2), 198–204. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(86\)70156-4](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(86)70156-4)
- Boisvert, J., Edmondson, S., & Krummel, M. F. (2004). Immunological Synapse Formation Licenses CD40-CD40L Accumulations at T-APC Contact Sites. *The Journal of Immunology*, 173(6), 3647–3652. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3647>
- Borst, J., Hendriks, J., & Xiao, Y. (2005). CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Current Opinion in Immunology*, 17(3), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.04.004>
- Boyman, O. (2010). Bystander activation of CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, 40(4), 936–939. <https://doi.org/10.1002/eji.201040466>
- Bruce, J. M., Kerr, C. W., & Dodd, N. J. F. (1987). Formation of Superoxide during the Auto-oxidation of Anthralin (1,8-Dihydroxy-9-anthrone. *J. Chem. SOC., Faraday Trans. I*, 83, 85–89.
- Buchbinder, E. I., & Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 39(1), 98–106. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239>
- Carreno, B. M., Becker-hapak, M., & Linette, G. P. (2013). CD40 regulates human dendritic cell-derived IL-7 production that, in turn, contributes to CD8+ T-cell antigen-specific expansion. 87(2), 167–177. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.80.CD40>
- Castell, S. D., Harman, M. F., Morón, G., Maletto, B. A., & Pistoiresi-Palencia, M. C. (2019). Neutrophils which migrate to lymph nodes modulate CD4+ T cell response by a PD-L1

## Anhang

- dependent mechanism. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00105>
- Celhar, T., Pereira-Lopes, S., Thornhill, S. I., Lee, H. Y., Dhillon, M. K., Poidinger, M., Connolly, J. E., Lim, L. H. K., Biswas, S. K., & Fairhurst, A. M. (2016). TLR7 and TLR9 ligands regulate antigen presentation by macrophages. *International Immunology*, 28(5), 223–232. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv066>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol*, 125((2Suppl 2)), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview>
- Chen, Lieping, & Flies, D. B. (2013a). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chen, Lieping, & Flies, D. B. (2013b). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405.Molecular>
- Chen, Linlin, Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chen, Xinfeng, Song, M., Zhang, B., & Zhang, Y. (2016). Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 11–16. <https://doi.org/10.1155/2016/1580967>
- Chen, Xueliang, Liu, G., Yuan, Y., Wu, G., Wang, S., & Yuan, L. (2019). NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Death and Disease*, 10(12), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2157-1>
- Cheng, L., Wang, Y., & Huang, L. (2017). Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node. *Molecular Therapy*, 25(7), 1665–1675. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.007>
- Circelli, L., Tornesello, M., Buonaguro, F. M., & Buonaguro, L. (2017). Use of adjuvants for immunotherapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 13(8), 1774–1777. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1321725>
- Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Collins, N., Jiang, X., Zaid, A., Macleod, B. L., Li, J., Park, C. O., Haque, A., Bedoui, S., Heath, W. R., Mueller, S. N., Kupper, T. S., Gebhardt, T., & Carbone, F. R. (2016). Skin CD4+memory T cells exhibit combined cluster-mediated retention and equilibration with the circulation. *Nature Communications*, 7(May), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms11514>
- Criscuolo, E., Caputo, V., Diotti, R. A., Sautto, G. A., Kirchenbaum, G. A., & Clementi, N. (2019). Alternative methods of vaccine delivery: An overview of edible and intradermal vaccines. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8303648>
- Cruz, M. S., Diamond, A., Russell, A., & Jameson, J. M. (2018). Human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells in skin immunity and disease. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01304>
- Dai, X., Tohyama, M., Murakami, M., & Sayama, K. (2017). Epidermal keratinocytes sense dsRNA via the NLRP3 inflammasome, mediating interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 release.

## Anhang

*Experimental Dermatology*, 26(10), 904–911. <https://doi.org/10.1111/exd.13334>

- Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(12), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>
- Del Giudice, G., Rappuoli, R., & Didierlaurent, A. M. (2018). Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in Immunology*, 39(May), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
- Deo, S. S., Mistry, K. J., Kakade, A. M., & Niphadkar, P. V. (2010). Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India*, 27(2), 66–71. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.63609>
- Di Meglio, P., & Conrad, C. (2016). Psoriasis, Cutaneous Lupus Erythematosus and Immunobiology of the Skin. In *Encyclopedia of Immunobiology* (Vol. 5, Issue IIc). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.15008-8>
- Didier, M., Aussel, C., Pelassy, C., Fehlmann, M., & Fehlmann, M. A. X. (1988). IL-1 signaling for IL-2 production in T cells involves a rise in phosphatidylserine synthesis. *J Immunol*, 141, 3078–3080.
- Duque, G. A., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- Egawa, G., & Kabashima, K. (2011). Skin as a peripheral lymphoid organ: Revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(11), 2178–2185. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.198>
- Elias, P. M. et al. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *J Invest Dermatol*, 132(9), 2131–2133. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Embgrenbroich, M., & Burgdorf, S. (2018). Current concepts of antigen cross-presentation. *Frontiers in Immunology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01643>
- Federman, R. S. (2014). Understanding vaccines: A public imperative. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 87(4), 417–422.
- Finnen, M. J., Lawrence, C. M., & Shuster, S. (1984). Inhibition of Dithranol Inflammation By Free-Radical Scavengers. *The Lancet*, 324(8412), 1129–1130. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)91559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)91559-9)
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 61–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Fuchs, J., & Packer, L. (1989). Investigations of anthralin free radicals in model systems and in skin of hairless mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 92(5), 677–682. [https://doi.org/10.1016/0022-202X\(89\)90181-4](https://doi.org/10.1016/0022-202X(89)90181-4)
- Fukushima, K., Ise, A., Morita, H., Hasegawa, R., Ito, Y., Sugioka, N., & Takada, K. (2011). Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of peptide/protein drugs in rats. *Pharmaceutical Research*, 28(1), 7–21. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0097-7>

## Anhang

- Gálvez-Cancino, F., López, E., Menares, E., Díaz, X., Flores, C., Cáceres, P., Hidalgo, S., Chovar, O., Alcántara-Hernández, M., Borgna, V., Varas-Godoy, M., Salazar-Onfray, F., Idoyaga, J., & Lladser, A. (2018). Vaccination-induced skin-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells mediate strong protection against cutaneous melanoma. *Oncot Immunology*, 7(7), 1–12. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442163>
- Gatti, E., & Pierre, P. (2003). Understanding the cell biology of antigen presentation: The dendritic cell contribution. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(4), 468–473. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00069-3)
- Gaudino, S. J., & Kumar, P. (2019). Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00360>
- Gerberick, G. F., Cruse, L. W., Miller, C. M., & Ridder, G. M. (1999). Selective Modulation of T Cell Memory Markers CD62L and CD44 on Murine Draining Lymph Node Cells Following Allergen and Irritant Treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 146, 1–10. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8734>
- Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., Oesterich, J. A. L., Gorden, K. B., Qiu, X., McKane, S. W., Noelle, R. J., Miller, R. L., Kedl, R. M., Fitzgerald-Bocarsly, P., Tomai, M. A., & Vasilakos, J. P. (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular Immunology*, 218(1–2), 74–86. [https://doi.org/10.1016/S0008-8749\(02\)00517-8](https://doi.org/10.1016/S0008-8749(02)00517-8)
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. In *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Glenn, G M, Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Mallett, C. P., Hale, T. L., & Alving, C. R. (1998). Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(7), 3211–3214. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759833>
- Glenn, Gregory M., Taylor, D. N., Li, X., Frankel, S., Montemarano, A., & Alving, C. R. (2000). Transcutaneous immunization: A human vaccine delivery strategy using a patch. *Nature Medicine*, 6(12), 1403–1406. <https://doi.org/10.1038/82225>
- Gogoll, K., Stein, P., Lee, K. D., Arnold, P., Peters, T., Schild, H., Radsak, M., & Langguth, P. (2016). Solid nanoemulsion as antigen and immunopotentiator carrier for transcutaneous immunization. *Cellular Immunology*, 308, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.06.001>
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44(3), 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>
- Gröne, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88(1–2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00136-8)
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 20, 621–667. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
- Hajibabaei, K. (2016). Antioxidant properties of vitamin E. *Annals of Research in Antioxidants*, 1(2), 2–3.

## Anhang

- Hennen, J., Aeby, P., Goebel, C., Schettgen, T., Oberli, A., Kalmes, M., & Blömeke, B. (2011). Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: Impact on the prediction of sensitization. *Toxicological Sciences*, 123(2), 501–510. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr174>
- Hernandez, M. G. H., Shen, L., & Rock, K. L. (2007). CD40-CD40 Ligand Interaction between Dendritic Cells and CD8 + T Cells Is Needed to Stimulate Maximal T Cell Responses in the Absence of CD4 + T Cell Help. *The Journal of Immunology*, 178(5), 2844–2852. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2844>
- Hobbs, S. J., & Nolz, J. C. (2019). Targeted Expansion of Tissue-Resident CD8+ T Cells to Boost Cellular Immunity in the Skin. *Cell Reports*, 29(10), 2990-2997.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.126>
- Holstein, J., Fehrenbacher, B., Brück, J., Müller-Hermelink, E., Schäfer, I., Carevic, M., Schittek, B., Schaller, M., Ghoreschi, K., & Eberle, F. C. (2017). Anthralin modulates the expression pattern of cytokeratins and antimicrobial peptides by psoriatic keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 87(3), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.007>
- Honda, T., Egawa, G., & Kabashima, K. (2019). Antigen presentation and adaptive immune responses in skin. *International Immunology*, 31(7), 423–429. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz005>
- Huang, C. M. (2007). Topical vaccination: The skin as a unique portal to adaptive immune responses. *Seminars in Immunopathology*, 29(1), 71–80. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0059-2>
- Hwang, J. R., Byeon, Y., Kim, D., & Park, S. G. (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(5), 750–761. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>
- Inoue, S. I., Niikura, M., Mineo, S., & Kobayashi, F. (2013). Roles of IFN- $\gamma$  and  $\gamma\delta$  T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Frontiers in Immunology*, 4(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00258>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Jang, Y., Lee, A. Y., Jeong, S. H., Park, K. H., Paik, M. K., Cho, N. J., Kim, J. E., & Cho, M. H. (2015). Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology*, 338, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.09.006>
- Jantsch, J., Binger, K. J., Müller, D. N., & Titze, J. (2014). Macrophages in homeostatic immune function. *Frontiers in Physiology*, 5 MAY(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00146>
- Jiang, T., Xu, G., Chen, G., Zheng, Y., He, B., & Gu, Z. (2020). Progress in transdermal drug delivery systems for cancer therapy. *Nano Research*, 13(7), 1810–1824. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-2664-5>
- Joeckel, L. T., Wallich, R., Metkar, S. S., Froelich, C. J., Simon, M. M., & Borner, C. (2012). Interleukin-1R Signaling Is Essential for Induction of Proapoptotic CD8 T Cells, Viral Clearance, and Pathology during Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection in Mice. *Journal of Virology*, 86(16), 8713–8719. <https://doi.org/10.1128/jvi.00682-12>

## Anhang

- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 557–569. <https://doi.org/10.1038/nri3254>
- Jones, C. V., & Ricardo, S. D. (2013). Macrophages and CSF-1: Implications for development and beyond. *Organogenesis*, 9(4), 249–260. <https://doi.org/10.4161/org.25676>
- Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F., & Egawa, G. (2019). The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology*, 19(1), 19–30. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0084-5>
- Kalyan, S., & Kabelitz, D. (2014). When neutrophils meet T cells: Beginnings of a tumultuous relationship with underappreciated potential. *European Journal of Immunology*, 44(3), 627–633. <https://doi.org/10.1002/eji.201344195>
- Kammerau, B., Zesch, A., & Schaefer, H. (1975). Absolute concentrations of dithranol and triacetyl dithranol in the skin layers after local treatment: in vivo investigations with four different types of pharmaceutical vehicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 64(3), 145–149. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12533307>
- Kaplan, M. H. (2013). Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev.*, 252(1), 104–115. <https://doi.org/10.1111/imr.12028>. Th9
- Karande, P., & Mitragotri, S. (2010). Transcutaneous immunization: An overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, 175–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100948>
- Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L., & Manz, M. G. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 305–313. <https://doi.org/10.1084/jem.20030323>
- Kashem, S. W., Haniffa, M., & Kaplan, D. H. (2017). Antigen-presenting cells in the skin. *Annual Review of Immunology*, 35, 469–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052215>
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kemény, L., Ruzicka, T., & Braun-Falco, O. (1990). Dithranol: a review of the mechanism of action in the treatment of psoriasis vulgaris. *Skin Pharmacol*, 3, 1–20.
- Khoruts, A., Osness, R. E., & Jenkins, M. K. (2004). IL-1 acts on antigen-presenting cells to enhance the in vivo proliferation of antigen-stimulated naive CD4 T cells via a CD28-dependent mechanism that does not involve increased expression of CD28 ligands. *European Journal of Immunology*, 34(4), 1085–1090. <https://doi.org/10.1002/eji.200324170>
- Kitajima, Y. (2015). Implications of normal and disordered remodeling dynamics of corneodesmosomes in stratum corneum. *Dermatologica Sinica*, 33(2), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.03.009>
- Kobayashi, T., Ricardo-Gonzalez, R. R., & Moro, K. (2020). Skin-Resident Innate Lymphoid Cells – Cutaneous Innate Guardians and Regulators. *Trends in Immunology*, 41(2), 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.12.004>

## Anhang

- Kohen, E., Kohen, C., Morliere, P., Santus, R., Reyftamann, J. P., Dubertret, L., Hirschberg, J. G., & Coulomb, B. (1986). A microspectrofluorometric study of the effect of anthralin, an antipsoriatic drug, on cellular structures and metabolism. *Cell Biochemistry and Function*, 4(3), 157–168. <https://doi.org/10.1002/cbf.290040302>
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. <https://doi.org/10.1080/0192623029016672>
- Kreslavsky, T., Gleimer, M., Garbe, A. I., & von Boehmer, H. (2010).  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  fate choice: Counting the T-cell lineages at the branch point. *Immunological Reviews*, 238(1), 169–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00947.x>
- Kurd, N., Robey, E. A., & Biology, C. (2017). T cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev.*, 271(1), 114–126. <https://doi.org/10.1111/imr.12398.T>
- Kushwah, R., & Hu, J. (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology*, 133(4), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03457.x>
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (United Kingdom)*, 45(6), 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.03.004>
- Laidlaw, B. J., Craft, J. E., & Kaech, S. M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), 102–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.10>
- Lange, R. W., Hayden, P. J., Chignell, C. F., & Luster, M. I. (1998). Anthralin stimulates keratinocyte-derived proinflammatory cytokines via generation of reactive oxygen species. *Inflamm. Res.*, 47, 174–181.
- Lau, W. M., Heard, C. M., & White, A. W. (2013). Design, synthesis and in vitro degradation of a novel co-drug for the treatment of psoriasis. *Pharmaceutics*, 5(2), 232–245. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5020232>
- Lawrence, C. M., Howel, D., & Shuster, S. (1984). The inflammatory response to anthralin. *Clinical and Experimental Dermatology*, 9(4), 336–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1984.tb00813.x>
- Lechler, R., Chai, J. G., Marelli-Berg, F., & Lombardi, G. (2001). The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunology*, 103(3), 262–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01250.x>
- Lee, J. W., Park, J. H., & Prausnitz, M. R. (2008). Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials*, 29(13), 2113–2124. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.048>
- Lee, M. Y., Shin, M. C., & Yang, V. C. (2013). Transcutaneous antigen delivery system. *BMB Reports*, 46(1), 17–24. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.1.001>
- Lee, S. J., Lee, H. S., Hwang, Y. H., Kim, J. J., Kang, K. Y., Kim, S. J., Kim, H. K., Kim, J. D., Jeong, D. H., Paik, M. J., & Yee, S. T. (2019). Enhanced anti-tumor immunotherapy by dissolving microneedle patch loaded ovalbumin. *PLoS ONE*, 14(8), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220382>

## Anhang

- Lei-Leston, A. C., Murphy, A. G., & Maloy, K. J. (2017). Epithelial cell inflammasomes in intestinal immunity and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01168>
- Leone, M., Mönkäre, J., Bouwstra, J. A., & Kersten, G. (2017). Dissolving Microneedle Patches for Dermal Vaccination. *Pharmaceutical Research*, 34(11), 2223–2240. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2223-2>
- Li, N., Peng, L. H., Chen, X., Nakagawa, S., & Gao, J. Q. (2011). Effective transcutaneous immunization by antigen-loaded flexible liposome in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3241–3250.
- Li, Y., Wang, W., Yang, F., Xu, Y., Feng, C., & Zhao, Y. (2019). The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0471-y>
- Li, Z. J., Sohn, K. C., Choi, D. K., Shi, G., Hong, D., Lee, H. E., Whang, K. U., Lee, Y. H., Im, M., Lee, Y., Seo, Y. J., Kim, C. D., & Lee, J. H. (2013). Roles of TLR7 in Activation of NF- $\kappa$ B Signaling of Keratinocytes by Imiquimod. *PLoS ONE*, 8(10), 4–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077159>
- Liard, C., Munier, S., Joulin-Giet, A., Bonduelle, O., Hadam, S., Duffy, D., Vogt, A., Verrier, B., & Combadière, B. (2012). Intradermal immunization triggers epidermal langerhans cell mobilization required for CD8 T-cell immune responses. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3 PART 1), 615–625. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.346>
- Lopez, P. A., Denny, M., Hartmann, A. K., Alflen, A., Probst, H. C., von Stebut, E., Tenzer, S., Schild, H., Stassen, M., Langguth, P., & Radsak, M. P. (2017). Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Journal of Dermatological Science*, 87(3), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.012>
- MacLeod, M. K. L., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2010). Memory CD4 T cells: Generation, reactivation and re-assignment. *Immunology*, 130(1), 10–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03260.x>
- Maemura, K., Zheng, Q., Wada, T., Ozaki, M., Takao, S., Aikou, T., Bulkley, G. B., Klein, A. S., & Sun, Z. (2005). Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunology and Cell Biology*, 83(4), 336–343. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01323.x>
- Mahrle, G. (1997). Dithranol. *Clinics in Dermatology*, 15(5), 723–737. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(97\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(97)00019-9)
- Malik, A., & Kanneganti, T. D. (2017). Inflammasome activation and assembly at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(23), 3955–3963. <https://doi.org/10.1242/jcs.207365>
- Marrack, P., McKee, A. S., & Munks, M. W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*, 9(4), 287–293. <https://doi.org/10.1038/nri2510>
- Martin, M. D., & Badovinac, V. P. (2018). Defining memory CD8 T cell. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02692>
- Martinez-Pomares, L., & Gordon, S. (2012). CD169 + macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends in Immunology*, 33(2), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.11.001>

## Anhang

- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6(March), 1–13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Mascola, J. R., & Fauci, A. S. (2020). Novel vaccine technologies for the 21st century. *Nature Reviews Immunology*, 20(2), 87–88. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0243-3>
- Matsue, H., Edelbaum, D., Shalhevet, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M. E., Oeda, J., Masayasu, H., & Takashima, A. (2003). Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cells During Antigen Presentation. *The Journal of Immunology*, 171(6), 3010–3018. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3010>
- McGill, A., Frank, A., Emmett, N., Leech, S. N., Turnbull, D. M., Birch-Machin, M. A., & Reynolds, N. J. (2005). The antipsoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. *The FASEB Journal*, 19(8), 1012–1014. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2664fje>
- Miliotou, A. N., & Papadopoulou, L. C. (2018). CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(1), 5–18. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180418095526>
- Miller, R. (2002). Imiquimod stimulates innate and cell mediated immunity which controls virus infections and tumors. *International Journal of Dermatology*, 41 Suppl 1, 3–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2002.00017.x>
- Minns, D., Smith, K. J., & Findlay, E. G. (2019). Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8968943>
- Minutoli, L., Puzzolo, D., Rinaldi, M., Irrera, N., Marini, H., Arcoraci, V., Bitto, A., Crea, G., Pisani, A., Squadrito, F., Trichilo, V., Bruschetta, D., Micali, A., & Altavilla, D. (2016). ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2183026>
- Moyer, T. J., Zmolek, A. C., Irvine, D. J., Moyer, T. J., Zmolek, A. C., & Irvine, D. J. (2016). Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines Find the latest version: Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(3), 799–808. <https://doi.org/10.1172/JCI81083.the>
- Mrowietz, U., Falsafi, M., Schroder, J. M., & Christophers, E. (1992). Inhibition of human monocyte functions by anthralin. *British Journal of Dermatology*, 127(4), 382–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb00458.x>
- Müller, K., & Kappus, H. (1988). Hydroxyl radical formation by dithranol. *Biochemical Pharmacology*, 37(22), 4277–4280. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90607-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90607-7)
- Müller, Klaus. (1997). Antipsoriatic and proinflammatory action of anthralin: Implications for the role of oxygen radicals. *Biochemical Pharmacology*, 53(9), 1215–1221. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(96\)00732-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00732-0)
- Müller, Klaus, Wiegrebe, W., & Younes, M. (1987). Formation of Active Oxygen Species by Dithranol, III Dithranol, Active Oxygen Species and Lipid Peroxidation in vivo. *Archiv Der Pharmazie*, 320(1), 59–66. <https://doi.org/10.1002/ardp.19873200110>
- Munitic, I., Kuka, M., Allam, A., Scoville, J. P., & Ashwell, J. D. (2013). CD70 Deficiency Impairs

## Anhang

- Effector CD8 T Cell Generation and Viral Clearance but Is Dispensable for the Recall Response to Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *The Journal of Immunology*, 190(3), 1169–1179. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202353>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nambu, A., Nakae, S., & Iwakura, Y. (2006). IL-1 $\beta$ , but not IL-1 $\alpha$ , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *International Immunology*, 18(5), 701–712. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl007>
- Nicholas Dias, Yung Peng, R. K. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Nolte, M. A., Van Olfen, R. W., Van Gisbergen, K. P. J. M., & Van Lier, R. A. W. (2009). Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: The impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunological Reviews*, 229(1), 216–231. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00774.x>
- Oberkampf, M., Guillerey, C., Mouriès, J., Rosenbaum, P., Fayolle, C., Bobard, A., Savina, A., Ogier-Denis, E., Enninga, J., Amigorena, S., Leclerc, C., & Dadaglio, G. (2018). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the induction of CD8<sup>+</sup> T cells by plasmacytoid dendritic cells. *Nature Communications*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04686-8>
- Oishi, Y., & Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology*, 30(11), 511–528. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps<sup>+</sup>) vs. Classically and M2(LPS<sup>-</sup>) vs. Alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
- Palazzo, L., Mikočević, P., Mikoč, A., & Ahel, I. (2019). ADP-ribosylation signalling and human disease. *Open Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1098/rsob.190041>
- Palucka, K., & Banchereau, J. (1999). Dendritic cells: A link between innate and adaptive immunity. *Journal of Clinical Immunology*, 19(1), 12–25. <https://doi.org/10.1023/A:1020558317162>
- Papadavid, E., Stratigos, A. J., & Falagas, M. E. (2007). Imiquimod: An immune response modifier in the treatment of precancerous skin lesions and skin cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(11), 1743–1755. <https://doi.org/10.1517/14656566.8.11.1743>
- Pennock, N. D., Kedl, J. D., & Kedl, R. M. (2016). T cell Vaccinology: Beyond the Reflection of Infectious Responses. *Trends Immunol.*, 37(3), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.001>
- Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., Cheney, E. E., Tamburini, B. A., & Kedl, R. M. (2013). T cell responses: Naïve to memory and everything in between. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 37(4), 273–283. <https://doi.org/10.1152/advan.00066.2013>
- Phares, T. W., Stohlman, S. A., Hwang, M., Min, B., Hinton, D. R., & Bergmann, C. C. (2012). CD4 T Cells Promote CD8 T Cell Immunity at the Priming and Effector Site during Viral Encephalitis. *Journal of Virology*, 86(5), 2416–2427. <https://doi.org/10.1128/jvi.06797-11>

## Anhang

- Pielenhofer, J., Sohl, J., Windbergs, M., Langguth, P., & Radsak, M. P. (2020). Current Progress in Particle-Based Systems for Transdermal Vaccine Delivery. *Frontiers in Immunology*, 11(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00266>
- Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12283–12287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>
- Prendergast, G. C., & Metz, R. (2012). A perspective on new immune adjuvant principles. *Oncology*, 1(6), 924–929. <https://doi.org/10.4161/onci.21358>
- Prins, R. M., Craft, N., Bruhn, K. W., Khan-Farooqi, H., Koya, R. C., Stripecke, R., Miller, J. F., & Liau, L. M. (2006). The TLR-7 Agonist, Imiquimod, Enhances Dendritic Cell Survival and Promotes Tumor Antigen-Specific T Cell Priming: Relation to Central Nervous System Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 176(1), 157–164. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.157>
- Psomadakis, C. E., & Han, G. (2019). New and emerging topical therapies for psoriasis and atopic dermatitis. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 12(12), 28–34.
- Pulendran, B., & Ahmed, R. (2006). Translating innate immunity into immunological memory: Implications for vaccine development. *Cell*, 124(4), 849–863. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.019>
- Ramos-Junior, E. S., & Morandini, A. C. (2017). Gasdermin: A new player to the inflammasome game. *Biomedical Journal*, 40(6), 313–316. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.10.002>
- Ramos, C. D. L., Fernandes, K. S. S., Canetti, C., Teixeira, M. M., Silva, J. S., & Cunha, F. de Q. (2006). Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MiP-2 inducing the sequential release of MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and LTB $_4$ . *European Journal of Immunology*, 36(8), 2025–2034. <https://doi.org/10.1002/eji.200636057>
- Rao, A., Strauss, O., Kokkinou, E., Bruchard, M., Tripathi, K. P., Schlums, H., Carrasco, A., Mazzurana, L., Konya, V., Villablanca, E. J., Björkström, N. K., Lindfors, U., Spits, H., & Mjösberg, J. (2020). Cytokines regulate the antigen-presenting characteristics of human circulating and tissue-resident intestinal ILCs. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15695-x>
- Rapsinski, G. J., Wynosky-Dolfi, M. A., Oppong, G. O., Tursi, S. A., Wilson, R. P., Brodsky, I. E., & Tükel, Ç. (2015). Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infection and Immunity*, 83(2), 693–701. <https://doi.org/10.1128/IAI.02370-14>
- Rausch, J., Lopez, P. A., Bialojan, A., Denny, M., Langguth, P., Probst, H. C., Schild, H., & Radsak, M. P. (2017). Combined immunotherapy: CTLA-4 blockade potentiates anti-tumor response induced by transcutaneous immunization. *Journal of Dermatological Science*, 87(3), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.013>
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2005). Cutting Edge: Priming of CTL by Transcutaneous Peptide Immunization with Imiquimod. *The Journal of Immunology*, 174(5), 2476–2480. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2476>
- Reichert, U., Jacques, Y., Grangeret, M., & Schmidt, R. (1985). Antirespiratory and

## Anhang

- antiproliferative activity of anthralin in cultured human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 84(2), 130–134. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12275369>
- Rodgers, A. M., Cordeiro, A. S., & Donnelly, R. F. (2019). Technology update: Dissolvable microneedle patches for vaccine delivery. *Medical Devices: Evidence and Research*, 12, 379–398. <https://doi.org/10.2147/MDER.S198220>
- Romani, N., Thurnher, M., Idoyaga, J., Steinman, R. M., & Flacher, V. (2010). Targeting of antigens to skin dendritic cells: Possibilities to enhance vaccine efficacy. *Immunology and Cell Biology*, 88(4), 424–430. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.39>
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Rosenblum, M. D., Remedios, K. A., & Abbas, A. K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2228–2233. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>
- Rosso, Q. Del. (2008). Topical Imiquimod Therapy for Actinic Keratosis. *Clinical\_Aesthetic*, 1(3), 44–47.
- Rubinstein, M. P., Lind, N. A., Purton, J. F., Filippou, P., Best, J. A., McGhee, P. A., Surh, C. D., & Goldrath, A. W. (2008). IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood*, 112(9), 3704–3712. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-160945>
- Sa e Melo, T., Dubertret, L., & Prognon, P. (1983). Physicochemical properties and stability of anthralin in model systems and human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12530811>
- Sánchez-Paulete, A. R., Teijeira, A., Cueto, F. J., Garasa, S., Pérez-Gracia, J. L., Sánchez-Arráez, A., Sancho, D., & Melero, I. (2017). Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Annals of Oncology*, 28(September), xii44–xii55. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx237>
- Sanchez, P. J., McWilliams, J. A., Haluszczak, C., Yagita, H., & Kedl, R. M. (2007). Combined TLR/CD40 Stimulation Mediates Potent Cellular Immunity by Regulating Dendritic Cell Expression of CD70 In Vivo. *The Journal of Immunology*, 178(3), 1564–1572. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1564>
- Saxena, M., & Yeretssian, G. (2014). NOD-like receptors: Master regulators of inflammation and cancer. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00327>
- Schaefer, H. (1985). Short-Contact Therapy. *Arch Dermatol*, 121, 1505–1509.
- Scharton-Kersten, T., Yu, J. M., Vassell, R., O'Hagan, D., Alving, C. R., & Glenn, G. M. (2000). Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins, subunits, and unrelated adjuvants. *Infection and Immunity*, 68(9), 5306–5313. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5306-5313.2000>
- Schenkel, J. M., & Masopust, D. (2014). Tissue-resident memory T cells. *Immunity*, 41(6), 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007>
- Schluns, K. S., & Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 269–279. <https://doi.org/10.1038/nri1052>

## Anhang

- Schröder, J. M. (1986). Anthralin (1,8-Dihydroxyanthrone) is a potent inhibitor of leukotriene production and LTB<sub>4</sub>- $\omega$  oxidation by human neutrophils. *Journal of Investigative Dermatology*, 87(5), 624–629. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12456188>
- Schroder, J. M., Kosfeld, U., & Christophers, E. (1985). Multifunctional inhibition by anthralin in nonstimulated and chemotactic factor stimulated human neutrophils. *Journal of Investigative Dermatology*, 85(1), 30–34. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12274997>
- Seya, T., Takeda, Y., Takashima, K., Yoshida, S., Azuma, M., & Matsumoto, M. (2018). Adjuvant immunotherapy for cancer: Both dendritic cell-priming and check-point inhibitor blockade are required for immunotherapy. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 94(3), 153–160. <https://doi.org/10.2183/pjab.94.011>
- Sharma, D., & Kanneganti, T. D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology*, 213(6), 617–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>
- Sichien, D., Lambrecht, B. N., Guillems, M., & Scott, C. L. (2017). Development of conventional dendritic cells: From common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunology*, 10(4), 831–844. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.8>
- Skountzou, I., Brock, N., Lelutiu, N., & Compans, R. W. (2017). Adjuvants for Skin Vaccination. In *Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition* (Issue Im). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00020-7>
- Smith, C. M., Wilson, N. S., Waithman, J., Villadangos, J. A., Carbone, F. R., Heath, W. R., & Belz, G. T. (2004). Cognate CD4<sup>+</sup> T cell licensing of dendritic cells in CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Nature Immunology*, 5(11), 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/ni1129>
- Sprenger, F., Stevens, L. M., & Nüsslein-Volhard, C. (1989). The Drosophila gene torso encodes a putative receptor tyrosine kinase. *Nature*, 338(6215), 478–483. <https://doi.org/10.1038/338478a0>
- Stark, F. C., McCluskie, M. J., & Krishnan, L. (2016). Homologous prime-boost vaccination with OVA entrapped in self-adjuvanting archaeosomes induces high numbers of OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cells that protect against subcutaneous B16-OVA melanoma. *Vaccines*, 4(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/vaccines4040044>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Stoitzner, P., Tripp, C. H., Eberhart, A., Price, K. M., Jung, J. Y., Bursch, L., Ronchese, F., & Romani, N. (2006). Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7783–7788. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509307103>
- Subauste, C. S., de Waal Malefyt, R., & Fuh, F. (1998). Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(4), 1831–1840. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469444>
- Sun, Y., Zhang, J., Zhai, T., Li, H., Li, H., Huo, R., Shen, B., Wang, B., Chen, X., Li, N., & Teng, J. (2017). CCN1 promotes IL-1 $\beta$  production in keratinocytes by activating p38 MAPK signaling in psoriasis. *Scientific Reports*, 7(March), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep43310>

## Anhang

- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, 19(8), 477–489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Takaba, H., & Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in Immunology*, 38(11), 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.010>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Testerman, T. L., Gerster, J. F., Imbertson, L. M., Reiter, M. J., Miller, R. L., Gibson, S. J., Wagner, T. L., & Tomai, M. A. (1995). Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *Journal of Leukocyte Biology*, 58(3), 365–372. <https://doi.org/10.1002/jlb.58.3.365>
- Thinwa, J., Segovia, J. A., Bose, S., & Dube, P. H. (2014). Integrin-Mediated First Signal for Inflammasome Activation in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 193(3), 1373–1382. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400145>
- Topham, D. J., & Reilly, E. C. (2018). Tissue-resident memory CD8+ T cells: From phenotype to function. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00515>
- Tucker, W. F. G., Mac Neil, S., Dawson, R. A., Tomlinson, S., & Bleehen, S. S. (1986). An investigation of the ability of antipsoriatic drugs to inhibit calmodulin activity: A possible mode of action of dithranol (anthralin). *Journal of Investigative Dermatology*, 87(2), 232–235. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12696613>
- van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C. L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B. N., & Guillems, M. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 44(4), 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.017>
- Van Der Voort, R., Van Lieshout, A. W. T., Toonen, L. W. J., Slöetjes, A. W., Van Den Berg, W. B., Figdor, C. G., Radstake, T. R. D. J., & Adema, G. J. (2005). Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis and Rheumatism*, 52(5), 1381–1391. <https://doi.org/10.1002/art.21004>
- Van Gisbergen, K. P. J. M., Ludwig, I. S., Geijtenbeek, T. B. H., & Van Kooyk, Y. (2005). Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Letters*, 579(27), 6159–6168. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.089>
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>
- Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>
- Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S. K., Pandey, M. M., Gupta, G., Singh, M., & Dua, K. (2019). Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(July 2018), 1249–1258. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.078>
- Wagner, T. L., Ahonen, C. L., Couture, A. M., Gibson, S. J., Miller, R. L., Smith, R. M., Reiter, M. J., Vasilakos, J. P., & Tomai, M. A. (1999). Modulation of TH1 and TH2 cytokine

## Anhang

- production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. *Cellular Immunology*, 191(1), 10–19. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1406>
- Wajant, H. (2016). Therapeutic targeting of CD70 and CD27. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(8), 959–973. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1158812>
- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Waldmann, T. A., Dubois, S., Miljkovic, M. D., & Conlon, K. C. (2020). IL-15 in the Combination Immunotherapy of Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11(May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00868>
- Warger, T., Rechtsteiner, G., Schmid, B., Osterloh, P., Schild, H., & Radsak, M. P. (2007). Transcutaneous immunization with imiquimod is amplified by CD40 ligation and results in sustained cytotoxic T-lymphocyte activation and tumor protection. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 32(1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/BF02686082>
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. (2017). Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>
- Wong, C., Gregory, S., Hu, H., Chao, Y., Victoria, E., He, Y., Li-kroeger, D., Goldman, W. E., & Bellen, H. J. (2017). Lysosomal Degradation is Required for Sustained Phagocytosis of Bacteria by Macrophages Ching-On. *Cell Host Microbe*, 21(6), 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.05.002>.Lysosomal
- Wucherpennig, K. W., Gagnon, E., Call, M. J., Huseby, E. S., & Call, M. E. (2010). Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005140>
- Xing, Y., Cao, R., & Hu, H. M. (2016). TLR and NLRP3 inflammasome-dependent innate immune responses to tumor-derived autophagosomes (DRibbles). *Cell Death and Disease*, 7(8). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.206>
- Yamauchi, R., Kato, K., & Ueno, Y. (1995). Free-Radical Scavenging Reactions of  $\alpha$ -Tocopherol during the Autoxidation of Methyl Linoleate in Bulk Phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(6), 1455–1461. <https://doi.org/10.1021/jf00054a008>
- Yang, Jian, Liu, X., Fu, Y., & Song, Y. (2019). Recent advances of microneedles for biomedical applications: drug delivery and beyond. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(3), 469–483. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.007>
- Yang, Junling, Wise, L., & Fukuchi, K. I. (2020). TLR4 Cross-Talk With NLRP3 Inflammasome and Complement Signaling Pathways in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00724>
- Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*, 32(3), 249–270. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>
- Yarosz, E. L., & Chang, C. H. (2018). Role of reactive oxygen species in regulating T cell-mediated immunity and disease. *Immune Network*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e14>

## Anhang

- Yasuda, K., Takeuchi, Y., & Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Seminars in Immunopathology*, 41(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00733-8>
- Yun, C. H., Leite, L. C. C., Tagliabue, A., & Boraschi, D. (2015). Vaccines of the Future: The Role of Inflammation and Adjuvanticity. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2–4. <https://doi.org/10.1155/2015/789595>
- Zaba, L. C., Krueger, J. G., & Lowes, M. A. (2009). Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(2), 302–308. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.225>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, 35(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zhou, L., Chong, M. M. W., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30(5), 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.001>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>

**8. Lebenslauf**

**9. Danksagung**