

Transkutane Immunisierung – Mechanismen und Optimierungsstrategien

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Pamela Christin Stein

geboren am 16. März 1982

in Bad Kreuznach

Mainz, September 2010

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2011

Meinem Mann

1 EINLEITUNG 7

1.1 Das Immunsystem.....	7
1.1.1 Die angeborene Immunität	7
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	9
1.2 Die MHC-Moleküle	10
1.2.1 Bildung der MHC I:Peptid-Komplexe	11
1.2.2 Bildung der MHC II:Peptid-Komplexe	12
1.3 Dendritische Zellen.....	14
1.3.1 Aktivierungsmechanismen dendritischer Zellen	15
1.3.1.1 Phagozytose	15
1.3.1.2 Die Toll-like Rezeptoren.....	16
1.4 T-Lymphozyten.....	18
1.4.1 Entwicklung der T-Lymphozyten	20
1.4.2 Die Signalweiterleitung des T-Zell-Rezeptors	21
1.4.3 Kooperation zwischen DCs und T-Lymphozyten	23
1.5 Die transkutane Immunisierung	25
1.5.1 Mechanismen der transkutanen Immunisierung	26
1.5.2 Therapeutische Tumorstoffe	27
1.6 Effekte der UV B-Strahlung	29
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	30

2 MATERIAL UND METHODEN..... 31

2.1 Material.....	31
2.1.1 Versuchstiere	31
2.1.2 Zelllinien	33
2.1.3 Medien.....	33
2.1.4 Puffer.....	34
2.1.5 Antikörper	35
2.1.6 Reagenzien und Chemikalien	36
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	37
2.1.8 Laborgeräte	38
2.2 Methoden.....	39
2.2.1 Methoden der Zellkultur.....	39
2.2.1.1 Kultur der Zelllinien EL-4 und EG.7.....	39
2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	39
2.2.2 Durchflusszytometrie	39
2.2.2.1 Tetramer- und Antikörper-Färbung	40
2.2.2.2 Intrazelluläre IFN γ -Analyse	41
2.2.2.3 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest.....	41
2.2.3 Ex vivo Präparation von Organen und Zellen.....	43
2.2.3.1 Gewinnung von Epidermispräparaten	43
2.2.3.2 Milzentnahme	44
2.2.3.3 Präparation und Aufbereitung von Lymphknoten	44
2.2.3.4 Präparation von CD4 ⁺ - und regulatorischen T-Zellen	44
2.2.4 Tierexperimentelle Methoden	45
2.2.4.1 Blutabnahme.....	45
2.2.4.2 Herstellung von Knochenmarkchimeren	45
2.2.4.3 Betäubung von Versuchsmäusen	46

2.2.4.4	Rasur.....	46
2.2.4.5	Transkutane Immunisierung (TCI).....	46
2.2.4.6	UV B-Bestrahlung	47
2.2.4.7	DTH (delayed type hypersensitivity)-Modell	47
2.2.4.8	Auftragen einer FITC-Lösung.....	48
2.2.4.9	Injektion von Antikörpern	48
2.2.4.10	Tumornokulation und Größenbestimmung	48
2.2.5	Bestimmung der IL-12p35 Menge nach Immunisierung.....	49
2.2.5.1	RNA-Präparation.....	49
2.2.5.2	Reverse Transkription	49
2.2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50

3 ERGEBNISSE 51

3.1	Die primäre Immunantwort wird durch Vorbehandlung mit einer UV B-Bestrahlung verstärkt	51
3.1.1	Suppressierende Effekte nach einer UV B-Bestrahlung können durch Behandlung mit einem TLR 7-Liganden aufgehoben werden	51
3.1.2	Die Kombination von UV B und TCI führt zu einer verstärkten primären Immunantwort	52
3.1.3	Etablierung des Immunisierungsprotokolls.....	54
3.1.4	Induktion einer Gedächtnisantwort durch die verbesserte CTL-Antwort nach UV B und TCI	57
3.2	TCI und UV B führen zu einer verstärkten Protektion gegen Tumorwachstum.....	59
3.3	Mechanismen der CTL-Aktivierung	62
3.3.1	Die Signaltransduktion nach TCI bzw. UV B und TCI ist abhängig von TLR 7	62
3.3.2	Für die Signalweiterleitung in der Zelle wird das Adapter-Molekül MyD88 benötigt	64
3.3.3	Die verstärkenden Effekte, induziert durch UV B-Bestrahlung, werden nicht durch die Freisetzung endogener TLR 4 vermittelt.....	65
3.4	Beitrag verschiedener Zelltypen zur Induktion einer Immunantwort nach TCI bzw. UV B/TCI.....	67
3.4.1	Vermehrte Immigration von CD11c ⁺ -DCs in drainierende Lymphknoten	68
3.4.2	Nach Depletion der CD11c ⁺ Zellen kann kein Priming mehr erfolgen.....	69
3.4.3	Die Induktion einer Immunantwort wird nur teilweise durch Langerin ⁺ Zellen vermittelt	71
3.4.4	Erhöhte Produktion von IL-12 in drainierenden Lymphknoten	73
3.4.5	UV B/TCI ist abhängig von Typ I Interferonen.....	74
3.4.6	Die Depletion von GR-1 ⁺ Zellen führt zu einem vollständigen Ausbleiben einer Immunantwort	76
3.5	Die suppressierende Wirkung von regulatorischen T-Zellen auf die induzierte CTL-Antwort	78
3.5.1	T regulatorische Zellen supprimieren die durch TCI vermittelten Effekte.....	78
3.5.2	Die suppressierende Wirkung der Tregs wird durch die Freisetzung von IL-10 vermittelt.....	80
3.5.3	Applikation eines IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpers führt zu einer verstärkten CTL-Antwort in Wildtypen	81
3.5.4	Regulatorische T-Zellen supprimieren UV B/TCI teilweise in Abhängigkeit von IL-10	82

4 DISKUSSION 84

4.1	UV B verstärkt die transkutane Immunisierung hin zu einer Gedächtnis-Antwort	84
4.2	Durch UV B/TCI kann eine effizientere Tumorprotektion erzeugt werden.....	85
4.3	Mechanismen der Verstärkung nach UV B/TCI.....	87
4.4	Dermale DCs übernehmen das Priming der T-Zellen nach TCI	88
4.5	Die induzierte Immunantwort wird durch IL-10 supprimiert.....	90

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	92
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
7 LITERATUR	96
8 PUBLIKATION	111
9 LEBENS LAUF.....	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Jeder Organismus ist einer Vielzahl von Mikroorganismen, wie Viren, Pilzen, Bakterien sowie einzelligen (Protozoen) und mehrzelligen (Bandwürmer) Parasiten ausgesetzt. Daher hat sich im Laufe der Evolution, vor allem bei den Säugetieren, ein komplexes System aus Abwehrmechanismen gebildet, das den Körper vor eintretenden Pathogenen schützt und ausgelöste Infektionen bekämpfen soll. Dabei gibt es allgemeine Schutzmechanismen, aber auch spezifische Reaktionen, wie die Bildung von Antikörpern. Aufgebaut wird das Immunsystem aus einem Netzwerk aus lymphatischen Organen im Körper und verschiedenen Zelltypen, die in der Lage sind, durch unterschiedliche Rezeptoren und lösliche Mediatoren auf Pathogene zu reagieren.

Die unterschiedlichen Immunreaktionen des Körpers werden in angeborene beziehungsweise adaptive Immunität unterteilt.

1.1.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität stellt die ersten Abwehrmechanismen gegen ein Pathogen. Hierzu gehören zunächst verschiedene Körperfunktionen wie die physikalische Barriere der Haut und der Schleimhäute durch den leicht sauren pH-Wert bzw. die Durchlässigkeit der einzelnen Hautschichten, aber auch die Talg- und Schweißproduktion. Die Augen werden durch die Tränenproduktion und dem Enzym Lysozym, welches sich auch im Speichel der Mundhöhle befindet, vor Mikroorganismen und Infektionen geschützt. Bei den Atemwegen übernehmen diese Aufgabe der produzierte Schleim und die Flimmerepithelien, die gebundene Erreger abtransportieren können. Die Magensäure und verschiedene Enzyme sind für die Zerstörung der Pathogene im Magen verantwortlich. Der Darm wird durch die natürliche Darmflora geschützt. Außerdem werden durch die Entleerung des Darms, sowie der Harnblase, Pathogene ausgeschieden.

Neben diesen physikalischen Barrieren des Körpers zählen zum angeborenen Immunsystem Zellen, die zur Phagozytose befähigt sind, das Komplementsystem und Entzündungsreaktionen. Phagozytierende Zellen sind zum Beispiel Makrophagen, die allgemeine Bakterienbestandteile erkennen, diese dann aufnehmen und anschließend Zytokine und Chemokine freisetzen. Die Zytokine und Chemokine beeinflussen andere Zellen des Immunsystems und lösen unter anderem deren Auswanderung aus dem Blut an den Infektionsherd aus. Die Gesamtheit der durch Zytokine und Chemokine ausgelösten Vorgänge bezeichnet man als Entzündungsreaktion. Diese wird durch verschiedene Merkmale charakterisiert wie Rötung, Wärme, Schmerz und Schwellung.

Röte, Wärme und Schwellung werden durch die Erweiterung und erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße bedingt, wodurch der Blutfluss verstärkt wird und Flüssigkeit austreten kann. Der Schmerz entsteht durch die Migration und Diapedese von angelockten Leukozyten und deren Aktivität. Zu diesen Leukozyten gehören hauptsächlich neutrophile Granulozyten, die ebenfalls Bakterien erkennen und aufnehmen.

Sowohl Makrophagen als auch neutrophile Granulozyten besitzen außerdem die Fähigkeit das Komplementsystem zu aktivieren, welches aus einer Reihe von Plasmaproteinen besteht. Durch das Komplement werden die Oberflächen der Mikroorganismen mit Fragmenten bedeckt, die anschließend von phagozytierenden Zellen erkannt werden können. Außerdem werden zusätzlich Mediatoren produziert, die zur Entzündungsreaktion beitragen.

Kann der Erreger nicht allein durch das angeborene Immunsystem eingedämmt werden, wird das adaptive Immunsystem aktiviert. Die Verbindung zwischen beiden Systemen bilden antigenpräsentierende Zellen (APCs), hauptsächlich dendritische Zellen (DCs). Diese sind in der Lage, Pathogene aufzunehmen, zu den drainierenden Lymphknoten zu wandern und dort Peptide der aufgenommenen Pathogene den Lymphozyten zu präsentieren (Macatonia et al., 1987). Die Auswanderung der DCs in die Lymphknoten wird bei der Entzündungsreaktion durch die erhöhte Flussrate der Lymphflüssigkeit begünstigt.

Um das adaptive Immunsystem aktivieren zu können, müssen phagozytierende Zellen bestimmte Rezeptoren an ihrer Oberfläche tragen, mit denen sie das Pathogen erkennen. Zu den wichtigsten Rezeptoren in diesem Zusammenhang gehören die Rezeptoren der Toll-like Familie. Die Signalweiterleitung über diese

Rezeptoren führt zur Produktion von Chemokinen und Zytokinen. Diese sind nicht nur für die angeborene Immunität von Bedeutung, sondern auch zur Expression von kostimulatorischen Molekülen, die wiederum für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort essentiell sind.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Zusätzlich zum angeborenen Immunsystem verfügen Vertebraten über das so genannte adaptive Immunsystem. Dieses entwickelte sich vor etwa 500 Millionen Jahren. Es wird aktiv, wenn das angeborene System einen Erreger nicht alleine eindämmen kann. Die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem bilden antigenpräsentierende Zellen, vor allem DCs (Akira et al., 2001). Eine aktivierte DC sezerniert Zytokine, welche die angeborene und die adaptive Immunität fördern. Die Zelle aktiviert anschließend Lymphozyten in den regionalen Lymphknoten durch Präsentation von einem Peptid über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC; *major histocompatibility complex*). Im Gegensatz zur angeborenen Immunität, bei der mit verschiedenen Rezeptoren konservierte Oberflächenmerkmale erkannt werden, besitzen die Lymphozyten jeweils nur Rezeptoren für ein spezifisches Peptid, die sich unter den einzelnen Lymphozyten unterscheiden. Dabei entsteht die Erkennungsvielfalt durch die Anzahl der Zellen. Wird ein Lymphozyt durch Erkennung seines Antigens auf einer DC aktiviert, kommt es zur klonalen Selektion. Dabei teilt sich die Zelle und bildet Klone, welche die gleiche Spezifität besitzen, wie die Ursprungszelle.

Antigenrezeptoren finden sich auf T- und auf B-Lymphozyten, die jeweils unterschiedliche Bereiche der Antigenerkennung abdecken. B-Zellen sind in der Lage, Antigene außerhalb von Körperzellen zu erkennen, wohingegen T-Zellen Antigene erkennen können, die innerhalb von Zellen gebildet werden.

1.2 Die MHC-Moleküle

Für die Antigenerkennung im Lymphknoten muss das Peptid in gebundener Form auf einem MHC-Molekül von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) vorliegen. Es gibt zwei verschiedene MHC-Moleküle, die in ihrer Gesamtheit vergleichbare Strukturen zeigen (Abbildung 1).

Das MHC I-Molekül besteht aus zwei Polypeptidketten, einer größeren α -Kette, mit den Untereinheiten $\alpha 1$ -3, welche die Membran durchspannt, und einer kleineren Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (Abbildung 1 a). Das Peptid wird in einer Furche gehalten, die durch die Einheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ gebildet wird. Für die Bindung befinden sich an den Enden der Furche unveränderliche Bereiche, die mit den freien Amino- und Carboxylenden Kontakt aufnehmen. Außerdem gibt es zusätzliche Verankerungspunkte mit ähnlichen Aminosäuren im Peptid. Die restliche Sequenz des Peptides ist für die Bindung nicht von Bedeutung. Allerdings darf die Länge nur 8 bis 10 Aminosäuren betragen (Falk et al., 1990). Der MHC-Lokus wird im Menschen mit HLA (*human leukocyte antigen*) und in der Maus mit H2 (*histocompatibility 2*) bezeichnet. Sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus gibt es drei Hauptloci, die human HLA-A, -B und -C und murin H2-K, -D und -L benannt sind.

Die MHC I-Moleküle interagieren mit $CD8^+$ T-Zellen zur Präsentation intrazellulärer Proteine. Klassisch werden zelleigene, endogene Proteine prozessiert, die aber auch von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen stammen können und somit der Identifizierung solcher Zellen dienen. Über einen Mechanismus, der als Cross-Präsentation bezeichnet wird, können auch nicht zelleigene, exogene Antigene auf MHC I-Molekülen exprimiert werden. Dies ist für die Aktivierung von naiven $CD8^+$ T-Zellen hin zu Effektor-CTLs unerlässlich.

Das MHC II-Molekül besteht aus einer α - und einer β -Kette, die beide die Membran durchziehen (Abbildung 1 b). Die Peptidbindungsfurche unterscheidet sich von der der MHC I-Moleküle. Die Furche ist an den Enden geöffnet, wodurch die Enden der Peptide zugänglich sind. Gebunden werden Peptide, die von Enzymen auf eine Länge von 13 bis 17 Aminosäuren gekürzt werden. Die Peptide werden über Seitengruppen in Taschen des MHC-Moleküls verankert. Außerdem interagiert das Peptidrückgrat mit Seitengruppen konservierter Aminosäurereste. Die Gene des MHC II bezeichnet man beim Menschen mit HLA-DR, -DP und -DQ, bei der Maus mit H2-A und -E.

MHC II-Moleküle interagieren mit $CD4^+$ T-Zellen. Die Aufgabe dieser Zellen ist es, andere Immunzellen zu aktivieren, weswegen sich MHC II-Moleküle nicht auf Gewebezellen, sondern auf B-Zellen, DCs und Makrophagen befinden. $CD4^+$ T-Zellen lösen in den verschiedenen Zelltypen, nach Erkennung des Antigen:MHC-Komplexes, unterschiedliche Reaktionen aus. So werden B-Zellen zur Freisetzung von Antikörpern und Makrophagen zur Zerstörung des Erregers in ihren Vesikeln angeregt.

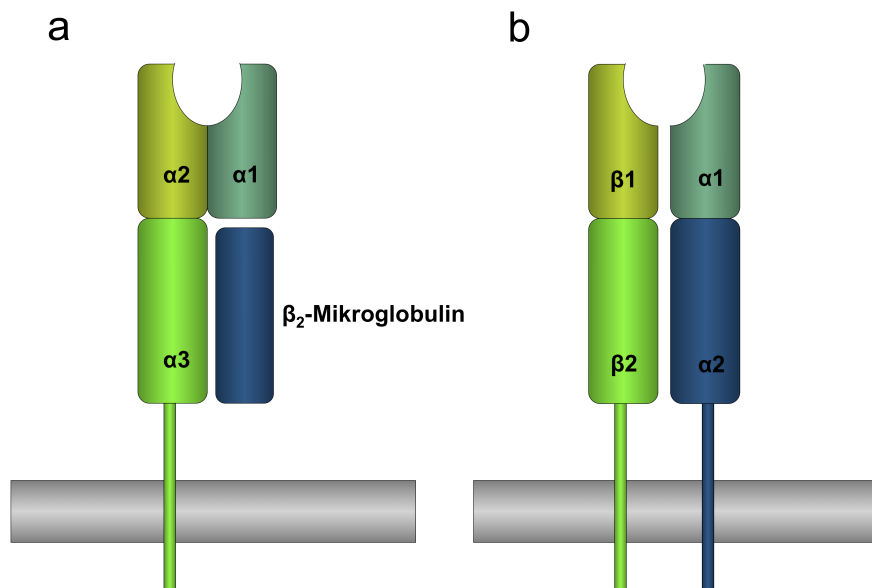


Abbildung 1 Schematische Darstellung der MHC I- und -II-Moleküle

(a) Das MHC I-Molekül besteht aus einer α -Kette mit den Untereinheiten $\alpha1$ - $\alpha3$ und dem $\beta2$ -Mikroglobulin. Die geschlossene Peptidbindungsfurche wird gebildet aus den Einheiten $\alpha1$ und $\alpha2$ und beherbergt Peptide einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren. (b) Das MHC II-Molekül besteht aus einer α - und einer β -Kette, die sich jeweils aus zwei Untereinheiten zusammensetzen. Die offene Peptidbindungsfurche wird gebildet aus den Einheiten $\alpha1$ und $\beta1$. Die Peptidlänge beträgt 13 bis 17 Aminosäuren. (Janeway et al., 2001)

1.2.1 Bildung der MHC I:Peptid-Komplexe

Die Peptide, die von einem MHC I-Molekül präsentiert werden können, stammen von Proteinen, die im Zytosol der Zelle zirkulieren und konstitutiv durch das Proteasom degradiert werden. Wurde eine Zelle mit Viren infiziert, welche die Biosynthesemechanismen der Zelle übernehmen, um ihre eigenen Proteine produzieren zu können, befinden sich virale Proteine im Zytosol, die ebenfalls degradiert werden können. Die Peptide werden vom Proteasom, einem zylindrischen

Komplex, durch zytosolische Proteolyse gespalten (Schubert et al., 2000; Yewdell, 2002; Yewdell and Bennink, 2001), wobei der richtige C-Terminus des Peptides gebildet wird. Aus dem Zytosol werden die Peptide durch TAP (*transporter associated with Antigen processing*), einem Heterodimer aus TAP-1 und -2, in das Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) transportiert (Momburg et al., 1994). Der TAP-Komplex bevorzugt Peptide mit hydrophoben oder basischen Aminosäureresten am Carboxylende. Im ER sind für die Bildung des richtigen N-Terminus intrazelluläre Aminopeptidasen (Kloetzel, 2004) wie zum Beispiel ERAP I verantwortlich. Eine besondere Eigenschaft von ERAP I ist, dass es vornehmlich Peptide mit einer Länge von 9 bis 16 Aminosäuren kürzt, was der Länge, der von TAP transportierten Peptide entspricht (Uebel and Tampe, 1999). Wenn das Peptid mit dem MHC I-Molekül im ER assoziiert, kann es von einer zweiten Aminopeptidase (ERAP II) erneut getrimmt werden.

Die Zusammensetzung des MHC I-Moleküls findet ebenfalls im ER statt. Neu synthetisierte MHC I- α -Ketten werden ins ER transportiert und binden dort an Calnexin, einem Chaperon-Protein. Dieses wird durch das β 2-Mikroglobulin abgelöst. Das Heterodimer aus α : β 2-Mikroglobulin lagert sich nun an mehrere Proteine an, zu denen Calreticulin und Tapasin gehören. Das Tapasin ermöglicht eine Bindung an den TAP-Komplex, an dem das Heterodimer auf ein geeignetes Peptid warten kann. Die MHC I-Moleküle liegen im ER in einem nur teilweise gefalteten Zustand vor. Die endgültige Faltung vollzieht sich erst mit der Bindung des Peptides.

Der fertige Komplex aus Peptid und MHC I wird letztlich an die Zelloberfläche transportiert und kann dort mit CD8⁺ T-Zellen interagieren.

1.2.2 Bildung der MHC II:Peptid-Komplexe

Peptide für den MHC II-Komplex werden aus extrazellulären Proteinen gebildet. Bei der Phagozytose oder der rezeptorvermittelten Endozytose werden Pathogene aufgenommen und in einem Phagosom eingeschlossen. Mikroorganismen werden unter anderem durch H₂O₂, NO und O₂ abgetötet. Proteine werden im sauren Bereich durch proteolytische Spaltung in Peptide zerlegt (Villadangos et al., 1999).

Wie die MHC I- werden auch die MHC II-Moleküle im ER gebildet. Im ER befinden sich zahlreiche Polypeptidketten, deren Bindung in der freien Furche des MHC II es

zu verhindern gilt. Diese Rolle übernimmt die MHC II-assoziierte invariante Kette (Ii), welche die Bindungsfurche blockiert. Außerdem sorgt die invariante Kette für den Transport des Moleküls aus dem ER zu einem endosomalen Kompartiment mit niedrigem pH-Wert, den Lysosomen (Lamb and Cresswell, 1992; Roche et al., 1991). Die invariante Kette wird von Proteasen geschnitten, so dass nur noch ein Rest in der Furche verbleibt, den man als CLIP-Fragment (*class-II-associated invariant-chain peptide*) bezeichnet. Das CLIP-Fragment muss die Bindungsfurche durch Abdissoziation oder Verdrängung räumen, um die Peptidanlagerung zu ermöglichen. Dieser Vorgang und die Beladung der MHC II-Moleküle werden durch M-Moleküle katalysiert (Cella et al., 1997; Inaba et al., 2000; Watts, 2001). Anschließend wird der MHC II:Peptid-Komplex an die Zelloberfläche transportiert.

Neben den klassischen MHC II-Molekülen existieren weitere MHC II-Moleküle. Eine Variante besitzt einen genetischen Defekt im humanen HLA-DM-Gen (murin H-2M). Aus dieser Mutation resultieren Moleküle, die ebenfalls aus einer α - und einer β -Kette bestehen, allerdings eine geschlossene Bindungsfurche besitzen und somit nicht zur Peptidpräsentation befähigt sind. Ihre Aufgabe besteht vielmehr in der Stabilisierung leerer MHC II-Moleküle, sowie in der Katalyse der Peptidbindung und der Freisetzung des CLIP-Fragments. Eine weitere wichtige Funktion von HLA-DM ist das Lösen von Peptiden aus der Bindungsfurche, die lediglich instabil gebunden werden können. Dadurch können andere Peptide mit einer festeren Bindung präsentiert werden, was als „peptide editing“ bezeichnet wird. Der Vorteil einer stabileren Bindung liegt in der Zeitspanne, die von der Präsentation an der Zelloberfläche bis zum Kontakt mit der T-Zelle überbrückt werden muss.

Eine zweite Variante (human HLA-DO, murin H-2O) wird von Thymusepithelzellen und B-Zellen produziert. Anders als HLA-DM wird HLA-DO nicht an der Zelloberfläche präsentiert, sondern in intrazellulären Vesikeln. Seine Hauptaufgabe ist die Regulation des HLA-DM. Durch die Bindung der beiden atypischen MHC II-Moleküle aneinander, wird die katalytische Funktion des HLA-DM bei der CLIP-Freisetzung und die Bindung anderer Peptide inhibiert. Gesteuert wird das Verhältnis zwischen HLA-DM beziehungsweise –DO durch die Produktion von $\text{IFN}\gamma$. Während einer Immunantwort wird $\text{IFN}\gamma$ von T-Zellen und NK-Zellen produziert und führt zu einer erhöhten Bildung von HLA-DM, welches schließlich die inhibitorische Wirkung des HLA-DO überwinden kann.

1.3 Dendritische Zellen

Zuerst beschrieben wurde eine Subpopulation von dendritischen Zellen in der Haut durch Paul Langerhans, der ihnen eine neurologische Funktion zuordnete. Erst als um 1970 Ralph Steinman dendritische Zellen in der Milz beschrieb, konnten die nach ihrem Entdecker benannten Langerhans Zellen dieser Zellart zugeordnet werden (Steinman et al., 1980). Dendritische Zellen (DCs) entstehen aus myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark. Nach ihrer Bildung verteilen sich DCs über die Blutbahn im Körper bzw. migrieren zu peripheren lymphatischen Organen. Im immaturren Zustand sind die Zellen klein und rund und exprimieren nur geringe Mengen an MHC- und kostimulatorischen Molekülen. Nach ihrer Aktivierung bilden sie Zellausläufer (Dendriten) aus, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Außerdem exprimieren die Zellen große Mengen an MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen. Durch die Oberflächenvergrößerung kann eine aktivierte DC mit 100 bis 3000 T-Zellen interagieren (Banchereau and Steinman, 1998).

Dendritische Zellen der Milz können in zwei Klassen unterteilt werden. Die plasmacytoiden DCs (pDC) sezernieren große Mengen an Interferonen und sind hauptsächlich bei der Immunantwort gegen Viren beteiligt (Colonna et al., 2004), nicht aber bei der Aktivierung von naiven T-Zellen. Charakterisiert werden die Zellen durch die Expression von B220 und einer mittleren Expression von CD11c. Sie entwickeln sich im Knochenmark und können in der Peripherie lange überleben (Liu et al., 2007). Im Gegensatz dazu dienen die konventionalen DCs (cDC) der Aufnahme und Präsentation von Antigenen und der T-Zell-Aktivierung. Sie exprimieren hohe Level an CD11c und lassen sich in die Unterklassen der CD11b⁺ cDCs, der CD11b⁺CD4⁺ cDCs und der CD11b⁻CD8⁺ cDCs unterteilen (Shortman and Naik, 2007). Anders als die DCs in der Milz, die auch als residente DCs bezeichnet werden, entwickeln sich migratorische DCs in peripheren Geweben und wandern konstitutiv zu den Lymphknoten. Zu ihnen zählen verschiedene epitheliale DCs, wie pulmonale CD103⁺CD11b⁻ (Bursch et al., 2007a; Sung et al., 2006) und CD103⁻CD11b⁺DCs, dermale CD103⁺CD11b⁻ langerin⁺ und CD103⁻CD11b⁺ langerin⁻ und die bereits erwähnten langerin⁺ Langerhans Zellen (LC) (Romani et al., 2003).

1.3.1 Aktivierungsmechanismen dendritischer Zellen

1.3.1.1 Phagozytose

Dendritische Zellen besitzen im unreifen Zustand vielfältige Mechanismen zur Aufnahme von extrazellulärem Material über die Phagozytose. Sie exprimieren eine Vielzahl an Phagozytoserezeptoren, wie Lektine, Scavenger Rezeptor und Pathogen-Rezeptoren (Banchereau et al., 2000). Die Expression der verschiedenen Rezeptoren wirkt selektiv für verschiedene DC-Subpopulationen, wodurch eine selektive Aufnahme von Pathogenen ermöglicht wird. CD8⁺ DCs in der Milz können apoptotische Zellen effektiver aufnehmen, als andere Populationen in dem gleichen Organ (Iyoda et al., 2002). Im Vergleich dazu werden Leishmanien hauptsächlich von CD8⁻ DCs phagozytiert (Ritter et al., 2004). Bei der Phagozytose werden die gebundenen Pathogene zunächst von der Zellmembran umschlossen, anschließend schnüren sich Vesikel, sogenannte Phagosomen oder endozytotische Vakuolen, vom Aktin-Cytoskelett ab. Die Phagosomen beinhalten verschiedene Endopeptidasen, Exopeptidasen, Esterasen und Reduktasen (Maric et al., 2001; Riese and Chapman, 2000). Im Vergleich zu Makrophagen ist das Potenzial von DCs zur Degradation eher gering (Delamarre et al., 2005). Zum Teil aufgrund einer ineffizienten Rekrutierung von lysosomalen Proteasen zum Phagosom (Lennon-Dumenil et al., 2002), aber auch durch eine fehlende Ansäuerung der Phagosomen, deren pH zwischen 7 und 7,5 im neutralen Bereich liegt (Savina et al., 2006). DCs bilden demnach ein Milieu, das die Proliferation von Mikroben verhindert und diese teilweise degradiert. Allerdings fungieren sie eher als Produktionsstätte für Peptide und induzieren somit die T-Zellaktivierung.

Manche Mikroben haben Strategien entwickelt der Erkennung durch rezeptorvermittelter Phagozytose zu entgehen. Diese Pathogene können durch Makropinozytose, der rezeptorunabhängigen Aufnahme von umgebender Flüssigkeit, erkannt werden (Sallusto et al., 1995).

1.3.1.2 Die Toll-like Rezeptoren

Zuerst entdeckt wurde Toll bei der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) (Anderson et al., 1985), bei der die Toll-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Embryogenese und der Entwicklung der dorso-ventralen Achse spielen. Erst später konnte ein Zusammenhang der Toll-Proteine mit dem Immunsystem der Taufliege hergestellt werden, indem eine antibakterielle und antifungizide Auswirkung gezeigt werden konnte (Lemaitre et al., 1996). Die Sequenzhomologie der *toll*-Gene zwischen Säugetier und Taufliege (Medzhitov et al., 1997) bedingte die gleiche Namensgebung. Bei Säugetieren nehmen die Toll-like Rezeptoren (TLR) eine Schlüsselrolle bei der angeborenen Immunität ein. Dabei besitzt nicht jede Art die gleiche Fülle von Rezeptoren.

Tabelle 1 Spezifitäten der TLRs im Mensch und in der Maus

Ligand	TLR	Adapter	Spezies
PAM ₃ CSK ₄	1,2	MyD88, MAL	Mensch, Maus
PAM ₂ CSK ₄	2,X	MyD88, MAL	Mensch, Maus
MALP-2, LTA, Zym	2,6	MyD88, MAL	Mensch, Maus
dsRNS	3	TRIF	Mensch, Maus
LPS, VSV-G, MMTV-G	4	MyD88, MAL, TRIF, TRAM	Mensch, Maus
Flagellin	5	MyD88	Mensch, Maus
ssRNS, Imidazoquinoline	7	MyD88	Mensch, Maus
ssRNS, Imidazoquinoline	8	MyD88	Mensch
CpG-ODN	9	MyD88	Mensch, Maus
Unbekannt	10	Unbekannt	Mensch
Profilin	11	MyD88	Maus
Unbekannt	12	Unbekannt	Maus
Unbekannt	13	Unbekannt	Maus

TLRs sind transmembrane Proteine, die über die Bindung an so genannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) verschiedene Pathogene erkennen können. PAMPs sind Sequenzen, die häufig der Funktion des Pathogens dienen, wodurch sie nicht entfernt werden oder mutieren können. Zu solchen Strukturen gehören Lipopolysaccharide, Lipoproteine, Lipopeptide, Flagellin, doppelsträngige Virus-RNS, CpG-Motive von bakterieller und viraler DNS sowie andere RNS und DNS. Eine Aufstellung der einzelnen TLRs, ihrer Liganden und ihr Vorkommen im

Mensch und in der Maus ist in Tabelle 1 dargestellt. Charakterisiert wird die Struktur der TLRs durch multiple Kopien von Leucin-reichen Motiven in ihrer extrazellulären Domäne und einem TIR-Motiv (Toll-IL-1-Rezeptor) (O'Neill, 2006) in der cytoplasmatischen Domäne.

Durch die Aktivierung eines Toll-like-Rezeptors können verschiedene Signalketten ausgelöst werden, an deren Ende der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert wird (Abbildung 2).

TLRs, die Nukleinsäuren erkennen, befinden sich intrazellulär in Endosomen. Zu ihnen zählen TLR 3, -7, -8 und -9 (Heil et al., 2003). TLR 1, -2, -4 und -6 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei ihr Vorkommen in Phagosomen und Komponenten des endocytotischen Abbauwegs nicht ausgeschlossen werden kann. Bindet ein Ligand seinen TLR, wird eine Konformationsänderung in der TIR-Domäne im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors ausgelöst, wodurch diese an eine TIR-Domäne eines Adapter-Proteins binden kann. Es existieren fünf verschiedene Adapter-Proteine, von denen das bekannteste MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) ist (Medzhitov et al., 1998).

MyD88 besitzt außerdem eine Todesdomäne, die an die Todesdomäne einer rekrutierten Serin/Threonin-Kinase namens IRAK (*IL1-receptor associated kinase*) bindet. Das aktivierte IRAK bindet an den Adapter TRAF-6 (Cao et al., 1996). TRAF-6 wiederum aktiviert TAK1 (eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase), die den IKK-Komplex phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird die inhibitorische Wirkung des I κ B aufgehoben. Dieses bildet im nicht-phosphorylierten Zustand ein Dimer mit NF κ B (Courtois, 2005). Durch die Freisetzung des NF κ B ist dieses in der Lage in den Zellkern einzuwandern und an verschiedene Promotoren zu binden. Dadurch werden Gene aktiviert, die an der adaptiven Immunantwort und an der Sekretion proinflammatorischer Zytokine beteiligt sind.

Neben dem durch MyD88 induzierten Signalweg, gibt es auch noch einen MyD88-unabhängigen Weg. Als Adapter-Molekül dient hierbei TRIF (*TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN- β*) bzw. TICAM-1 (*TIR-containing-adaptor-molecule-1*) (Kaisho and Akira, 2001). TRIF ist ebenfalls in der Lage, TRAF-6 zu binden, wodurch die gleiche Signalkaskade, wie bei MyD88 ausgelöst wird. Allerdings kann TRIF auch an andere Kinasen binden, was zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, die man mit IRF (*interferon regulatory factors*) bezeichnet. Dieser Signalweg führt zur Transkription von IFN- β .

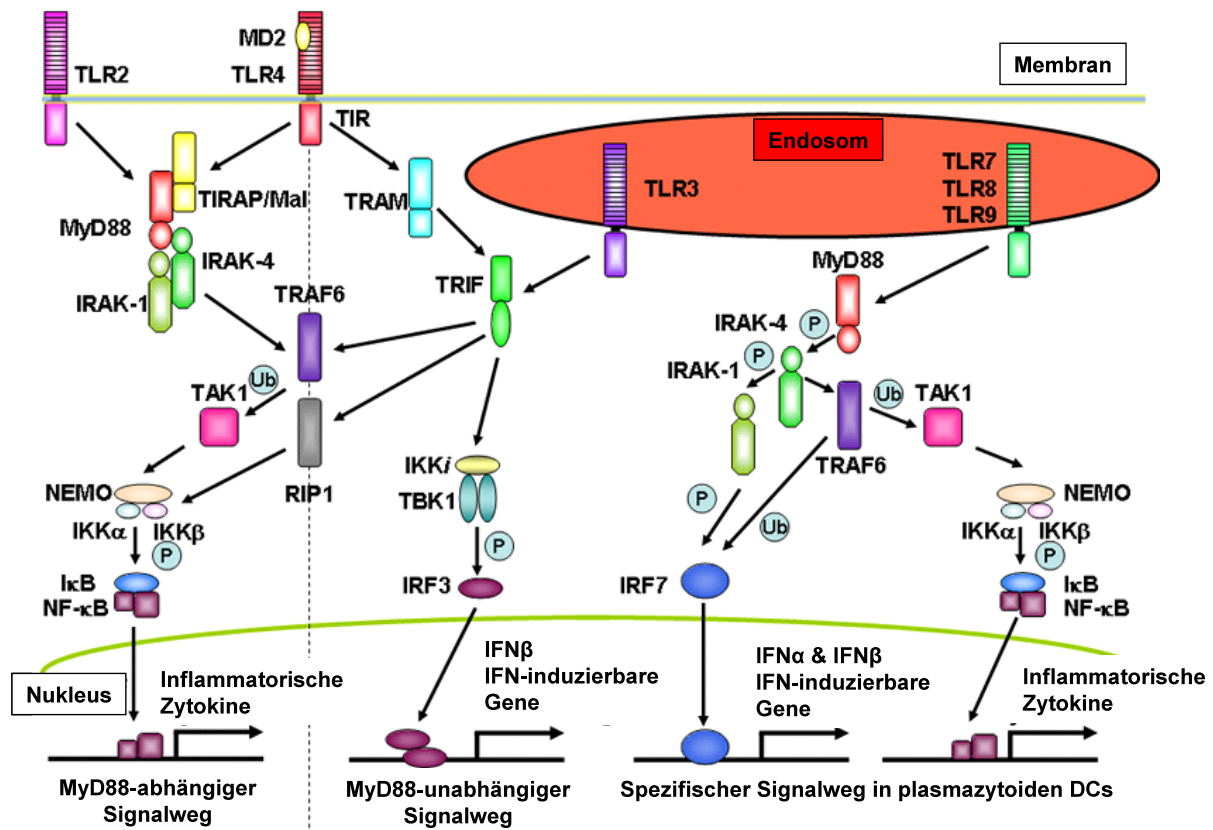


Abbildung 2 TLR-Signalwege

Toll-like-Rezeptoren (TLR) befinden sich an der Zelloberfläche (TLR 1, -2, -4 und -6) beziehungsweise in Endosomen (TLR 3, -7, -8 und -9). Die Signalweiterleitung zum Zellkern erfolgt über verschiedene Adapter-Moleküle, über die Signalkaskaden ausgelöst werden, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. (Verändert nach Akira, www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_akira_e.php)

1.4 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich in verschiedene Subpopulationen aufteilen. Bereits bei ihrer Entwicklung spalten sie sich in $\alpha\beta$ - bzw. $\gamma\delta$ -T-Zellen, je nach Aufbau ihres Rezeptors.

$\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen, im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ -T-Zellen, eine geringere Vielfalt in ihren T-Zell-Rezeptoren (TCR). Sie erkennen unter anderem Lipide und Nukleotide und befinden sich in peripheren Geweben und nur selten in lymphatischen Organen (Hayday, 2000). Allerdings können diese T-Zellen auch als APCs agieren (Moser and Brandes, 2006).

Die meisten Subpopulationen der T-Zellen entspringen der Gruppe der $\alpha:\beta$ -T-Zellen. Diese lassen sich aufgrund der Expression von Corezeptormolekülen in $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -T-Zellen unterscheiden.

Aktivierte $CD8^+$ -T-Zellen werden auch als zytotoxische Lymphozyten (CTLs) bezeichnet. Ihre Aufgabe ist es, virusinfizierte und entartete endogene Zellen zu erkennen und abzutöten.

Im Gegensatz zu den $CD8^+$ -T-Zellen bilden die $CD4^+$ -T-Zellen, auch Helferzellen genannt, eine Vielzahl an Untergruppen aus. Dazu gehört die klassische Unterteilung in TH1- und TH2-Zellen.

Die Hauptfunktion der TH1-Zellen liegt in der Kontrolle von bakteriellen Infektionen in Makrophagen. Hierfür sezernieren sie Interleukin 2 (IL-2), Interferon γ ($IFN\gamma$) und Tumornekrosisfaktor- β (TNF- β) (Munoz-Fernandez et al., 1992; Stout and Bottomly, 1989). Einige Bakterien sind in der Lage, sich in den intrazellulären Vesikeln der Makrophagen zu vermehren, da diese nicht mit den zelleigenen Lysosomen verschmelzen. Erkennt eine TH1-Zelle mikrobielle Bestandteile auf einem Makrophagen, interagiert sie mit diesem und steigert die Fähigkeit des Makrophagen, die Infektion zu bekämpfen. Die zweite Funktion besteht in der Produktion von kostimulatorischen Signalen für aktivierte B-Lymphozyten. Dies führt zur Produktion von Antikörpern gegen extrazelluläre Pathogene. Außerdem werden B-Zellen durch TH1-Zellen zum Isotyp-Klassenwechsel angeregt.

TH2-Zellen haben ebenfalls die Aufgabe naive B-Zellen zu aktivieren und einen Isotypwechsel zu induzieren (Parker, 1993). Hierbei wird vor allem der Wechsel zu IgE-Antikörpern gefördert, die für die Parasitenbekämpfung von Nöten sind. Die Zellen setzen dafür IL-4, -5 und -13 frei (Croft and Swain, 1991).

Eine Untergruppe der TH2-Zellen sind die TH17-Zellen. Bisher konnte ihnen nur eine Rolle bei der Helminthen-Bekämpfung zugesprochen werden, über weitere Funktionen ist allerdings noch nichts bekannt (Tato and O'Shea, 2006).

Eine weitere Gruppe der $CD4^+$ -T-Zellen hat, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen, supprimierende Funktionen und werden als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet. Ihre Aufgabe ist es, T-Zell-Antworten einzudämmen und vor autoimmunen Antworten zu schützen.

1.4.1 Entwicklung der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entwickeln sich zunächst aus einer lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark, wandern aber für ihre weitere Reifung in den Thymus. Haben die Zellen den Thymus erreicht, differenzieren sie dort weiter und treten anschließend in eine Phase der Proliferation ein. Bereits zum Beginn der Differenzierung entstehen zwei getrennte T-Zell-Linien, die sich durch den Aufbau ihres Rezeptors unterscheiden und als $\alpha\beta$ - bzw. $\gamma\delta$ -T-Zellen bezeichnet werden. Zunächst fehlen den Vorläuferzellen aber noch jegliche Oberflächenmoleküle. Nach der anfänglichen Proliferation exprimieren die Zellen dann die ersten charakteristischen Marker wie CD2 und Thy-1. Zellen in diesem Stadium werden als „doppelt negativ“ Zellen bezeichnet, da sie keines der beiden Corezeptormoleküle CD4 oder CD8 exprimieren. Außerdem besitzen die Zellen noch keinen CD3:T-Zell-Rezeptor-Komplex. Reifen die Zellen weiter heran, beginnen sie mit der Expression von CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, und von CD44 in geringem Ausmaß (Godfrey et al., 1993). In diesem Stadium wird das Gen für die β -Kette des TCR umgelagert. Die für diese Umlagerung essenziellen Rekombinasen werden von den RAG (*recombination activation genes*)-Genen kodiert. Die Loci für die α - bzw. β -Kette exprimieren beide V- und J-Gen-Segmente. Zusätzlich gibt es für die α -Kette noch ein D-Gen-Segment. Die umgelagerte β -Kette verbindet sich anschließend mit einer prä-T-Zell- α -Kette (pT α). Der dadurch entstehende prä-TCR wird zusammen mit den CD3-Molekülen an der Zelloberfläche exprimiert. Die Zellen vermehren sich und beginnen mit der Expression von CD4 und CD8 (Egerton et al., 1990) und werden als „doppelt positiv“ bezeichnet. Darauf folgt die Umlagerung der Gene für die α -Kette. Der entstandene TCR muss zur weiteren Entwicklung der Zellen eine positive Selektion erfahren. Dabei werden die Zellen auf ihre Fähigkeit getestet, MHC-Moleküle erkennen zu können. Hierfür exprimieren lymphatische DCs, nicht-hämatopoetische Epithelzellen und mesenchymale Fibroblasten MHC I- und -II-Moleküle, welche Selbst-Antigene gebunden haben (Starr et al., 2003). Können die T-Zellen an die MHC-Moleküle binden, erhalten sie ein Überlebenssignal. Zusätzlich durchlaufen die Zellen eine negative Selektion, bei der getestet wird, wie hoch die Affinität bei der Bindung von Selbst-Antigenen ist. Diese darf nur gering sein, da sonst eine Reaktion der T-Zellen auf endogene Peptide unvermeidlich ist (Fowlkes and Pardoll, 1989; von Boehmer et al., 1989). Nach der Selektion beenden die Thymozyten die Expression

eines der beiden Corezeptormoleküle und werden zu „einfach positiven“ T-Zellen (Fowlkes and Pardoll, 1989). Die gereiften Zellen wandern aus dem Thymus in die Peripherie aus, wo sie ständige Überlebenssignale durch die Bindung an MHC:Selbst-Peptid-Komplexe erhalten müssen (Rooke et al., 1997; Takeda et al., 1996).

1.4.2 Die Signalweiterleitung des T-Zell-Rezeptors

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein Heterodimer, bestehend aus den Transmembranglykoproteinketten α und β (Abbildung 3). Beide Ketten sind miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden. Die Ketten bestehen aus einer aminoterminalen variablen (V-)Region, einer konstanten (C-)Region, einer Gelenkregion, die für die Ausbildung der Disulfidbrücke ein Cystein beinhaltet, einer hydrophoben Transmembrandomäne, welche die Lipiddoppelschicht durchdringt und einem cytoplasmatischen Schwanz. Für die Expression des TCR müssen dessen Gene für die α - und die β -Kette umgelagert werden.

Die Antigenerkennung durch den TCR kann nur in einem Komplex mit einem MHC-Molekül auf einer APC erfolgen (Garboczi et al., 1996). Hierfür sind unter anderem die Corezeptoren der T-Zellen CD4 und CD8 von Bedeutung. Sie erhöhen die Bindungsstärke zwischen dem TCR und dem Peptid:MHC-Komplex. Der CD4-Corezeptor besteht aus den Untereinheiten D1-D4. Die D1-Domäne stellt die Bindung zum MHC-Molekül durch Kontakt mit der $\beta 2$ -Kette her. Der CD8-Corezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette, gebildet aus jeweils einer Immunglobulindomäne und einer langen Polypeptidkette. Wahrscheinlich entsteht die Bindung zum MHC durch die α -Kette des Rezeptors mit der $\alpha 3$ -Domäne des MHC I-Moleküls (Zamoyska, 1998). Beide Corezeptoren interagieren mit ihrer zytosolischen Domäne mit der Lck-Kinase.

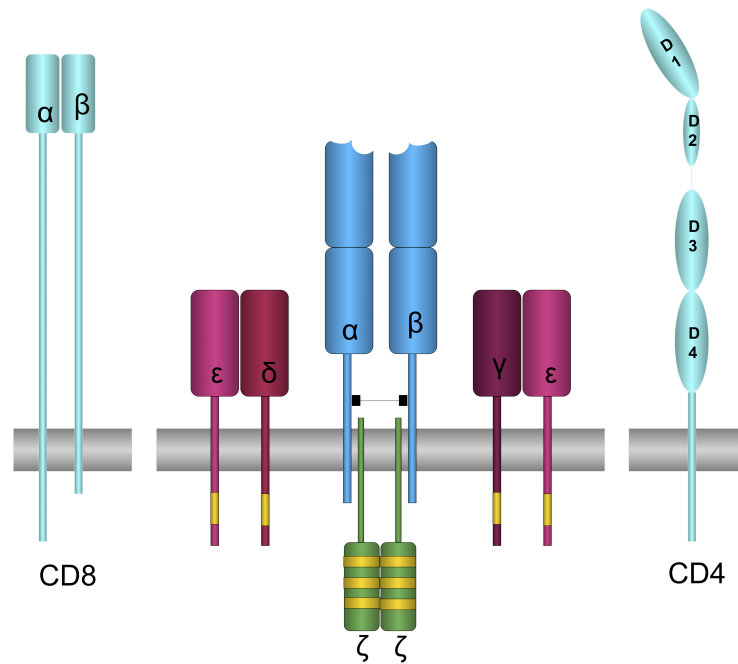


Abbildung 3 Schematische Darstellung des T-Zell-Rezeptors

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette. Beide erkennen zusammen mit einem der beiden Corezeptoren CD4 beziehungsweise CD8 das auf einem MHC-Molekül präsentierte Antigen. Für die Signalweiterleitung in die Zelle dient der assoziierte CD3-Komplex, bestehend aus den Ketten γ , δ und zwei Ketten ϵ , die an der Zelloberfläche exprimiert werden. Im Zellinneren befinden sich zusätzlich zwei ζ -Ketten. (verändert nach Janeway et al., 2001)

Nachdem der TCR seinen Peptid:MHC-Komplex erkannt hat, muss ein Signal in die Zelle weitergegeben werden. Da der cytoplasmatische Teil des Rezeptors nur sehr kurz ist, sind akzessorische Moleküle nötig. Hierfür steht der TCR mit vier anderen Signalketten in Kontakt. Die Ketten werden insgesamt als CD3 bezeichnet und befinden sich ebenfalls auf der Zelloberfläche. Im Zellinneren befinden sich zwei ζ -Ketten. Zur Signalweiterleitung besitzen die CD3-Ketten jeweils ein ITAM-Motiv (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), jede ζ -Kette drei ITAM-Motive. Nach der Erkennung des Antigens, werden zunächst die ITAM-Motive durch die Kinasen Lck und Fyn phosphoryliert (Nakayama et al., 1989). Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, deren nächster Schritt die Bindung von ZAP-70 (ζ -Ketten-assoziiertes-Protein) an die ITAM-Motive der ζ -Ketten ist. Diese Bindung hat eine Aktivierung des ZAP-70 zur Folge. Daraus resultiert wiederum die Aktivierung zweier weiterer Moleküle, LAT (*linker of activation in T-cells*) und BLNK (*b-cell linker*). LAT ist mit der Innenseite der Plasmamembran assoziiert und in der Lage durch seine Tyrosinreste Proteine zu rekrutieren und zu binden, die dann das Signal an andere Zielorte leiten können. Durch die Phosphorylierung von LAT und BLNK werden

letztlich drei Signalwege ausgelöst, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB, NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und AP-1 im Zellkern führen.

1.4.3 Kooperation zwischen DCs und T-Lymphozyten

Haben dendritische Zellen ein Pathogen aufgenommen, reifen sie zu effektiven antigenpräsentierenden Zellen (APCs) heran. Diese Reifung ist mit einer grundlegenden Veränderung der DC verbunden. Sie migrieren über die Lymphe zu den drainierenden Lymphknoten und verlieren ihre Fähigkeit Antigene aufzunehmen (Banchereau et al., 2000). Im Gegenzug werden große Mengen an MHC-Molekülen exprimiert und proinflammatorische Moleküle ausgeschüttet. Für die Aktivierung einer möglichst großen Anzahl an pathogenspezifischen Lymphozyten, vergrößert die DC, durch Ausbildung so genannter Dendriten, ihre Oberfläche. Die Interaktion zwischen DC und Lymphozyt benötigt zunächst verschiedene Adhäsionsmoleküle, die von beiden Zellen exprimiert werden müssen (Sallusto and Lanzavecchia, 2000). Auf der T-Zelle sind dies CD2, LFA-1 und ICAM-3, die auf der DC an LFA-3, ICAM-1, ICAM-2 und DC-SIGN binden (van Kooyk and Geijtenbeek, 2002; van Kooyk et al., 1989) (Abbildung 4 a). Die zunächst leichte Bindung ermöglicht es den T-Zellen die MHC-Moleküle auf den DCs nach ihrem spezifischen Antigen zu untersuchen. Hat die T-Zelle dieses Antigen erkannt, vollzieht sich eine Konformationsänderung im LFA-1, wodurch die Affinität von ICAM-1 und ICAM-2 erhöht wird. Die Bindung der T-Zelle an die DC wird dadurch gefestigt und kann für mehrere Tage anhalten. Außerdem wird das MTOC (*microtubule organizing centre*) im Zellinneren der T-Zelle neu orientiert. Die Kontaktstelle zwischen der DC und der T-Zelle bezeichnet man als immunologische Synapse (Lee et al., 2002). Diese Umlagerung scheint sich nicht nur aufgrund der T-Zell Stimulation zu vollziehen, sondern dient auch der Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung. Die Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle einer Immunzelle sind nicht statisch an eine Stelle der Zelloberfläche gebunden, sondern können sich mehr oder weniger frei bewegen. Beim Kontakt zwischen zwei Zellen konzentrieren sich die Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren an dieser Stelle auf der Zellmembran. Die Anordnung unterliegt dabei einer Unterteilung in zwei Bereiche (Abbildung 4 b). Im zentralen supramolekularen Aktivierungscluster (cSMAC) ordnen sich die Rezeptoren an, die zur Zellaktivierung und zur Signaltransduktion nötig sind.

Im pSMAC, dem peripheren supramolekularen Aktivierungscluster, konzentrieren sich die Adhäsionsmoleküle wie LFA-1, die den anhaltenden Kontakt zwischen den Zellen und die Ausbildung der immunologischen Synapse gewährleisten (Grakoui et al., 1999; Krummel and Davis, 2002; Monks et al., 1998). Der aktivierte Lymphozyt proliferiert, wobei alle seine entstehenden Klone zu Effektor-T-Zellen differenzieren. Um die Aktivierung der T-Zelle in Gang zu setzen, sind zwei Signale von Nöten. Das erste Signal stammt von der Interaktion des Peptid:MHC-Komplexes und dem TCR. Das zweite Signal wird über costimulatorische Moleküle (Figdor et al., 2004; Steinman et al., 2003), wie zum Beispiel B7-Moleküle (CD80/B7.1 und CD86/B7.2), vermittelt, die an den CD28-Rezeptor binden (Borriello et al., 1997). Das costimulatorische Signal muss dann durch die Bindung anderer Liganden an ihre Rezeptoren, wie CD40-Ligand an CD40, aufrecht gehalten werden. Durch die Aktivierung der T-Zelle, tritt diese in die G1-Phase des Zellzyklus ein und synthetisiert IL-2 und die α -Kette des IL-2-Rezeptors. Durch die Bindung von IL-2 an den Rezeptor, können die Zellen den restlichen Zellzyklus durchlaufen.

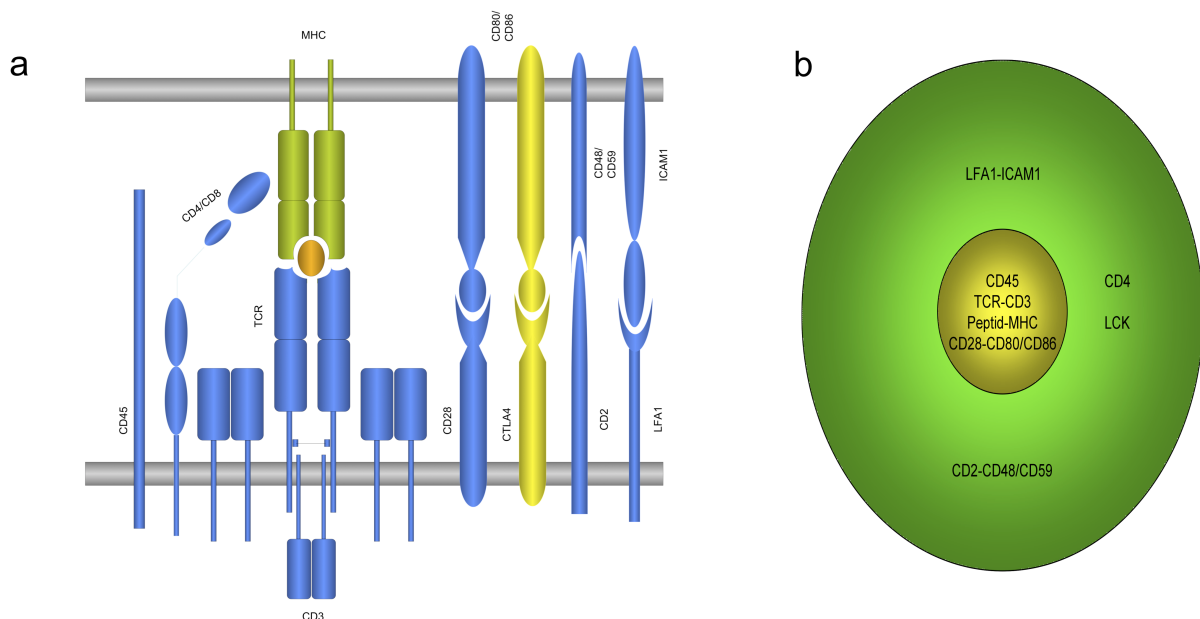


Abbildung 4 Antigenerkennung des TCR auf einem MHC-Molekül durch Bildung einer immunologischen Synapse

(a) Die stabile Bindung des TCR an ein MHC-Molekül und die Peptiderkennung benötigen die Expression verschiedener costimulatorischer Moleküle. Dargestellt ist das MHC-Molekül in grün, costimulatorische Moleküle in blau und inhibitorische Moleküle in gelb. (b) Die immunologische Synapse kann in verschiedene Bereiche unterteilt werden. Im Zentrum des supramolekularen Aktivierungsclusters (cSMAC) befinden sich die Rezeptoren und Liganden, die der Zellaktivierung und der Signalweiterleitung dienen. In der Peripherie des supramolekularen Aktivierungsclusters (pSMAC) ordnen sich Moleküle der Zelladhäsion an.

Hat eine T-Zelle die Entwicklung zur Effektorzelle durchlaufen und trifft erneut auf ihr spezifisches Antigen, bedarf es keinem zweiten Signal durch kostimulatorische Moleküle mehr, um eine Immunantwort auszulösen.

Zur Eindämmung der Immunantwort, werden die meisten Effektorzellen durch Apoptose (programmierter Zelltod) eliminiert. Makrophagen übernehmen die Beseitigung der abgestorbenen Zellen. Einige Effektorzellen bleiben dem Immunsystem allerdings erhalten und dienen als immunologisches Gedächtnis, welches eine schnellere Bekämpfung des Pathogens bei einem erneuten Kontakt ermöglicht.

1.5 Die transkutane Immunisierung

Durch den Fortschritt der letzten Jahrzehnte im Bezug auf das Verständnis der Komplexität des Immunsystems konnten neue Immunisierungsmethoden geschaffen werden. Viel versprechend sind hier Kombinationen aus einem synthetischen Stimulans und antigenen Bestandteilen. Die Ziele sind dabei Immunisierungsmethoden zu generieren, die auf ein breites Spektrum von Pathogenen und Krankheiten angewandt werden können. Außerdem kann auf eine einfache Handhabung geachtet werden, die zum Beispiel auf den Gebrauch von Injektionen und Kanülen verzichtet und somit eine Selbstmedikation der Patienten möglich macht beziehungsweise erleichtert. Speziell in Entwicklungsländern ließen sich auf diese Weise Verschleppungen von Krankheiten durch die Wiederverwendung von Kanülen vermeiden.

Eine vielversprechende Immunisierungsmethode stellt in diesem Zusammenhang die transkutane Immunisierung (TCI) dar. Das Prinzip beruht auf der Kombination eines Antigens und eines Adjuvanzes, die zusammen auf die Haut aufgetragen werden. Durch diese Kombination kann eine potente adaptive Immunantwort ausgelöst werden, die durch das SALT (*skin associated lymphoid tissue*) vermittelt wird (Streilein, 1983).

Da die Haut als äußerste und oftmals erste Barriere gegen eindringende Erreger gilt, kann sie mehr oder weniger zu den immunologischen Organen gezählt werden. Außerdem wird sie bei verschiedenen Methoden benutzt um das Immunsystem zu

beeinflussen. Für die Applikation von Wirkstoffen muss die Beschaffenheit der Haut berücksichtigt werden. Sie besteht aus der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Die Epidermis wiederum besteht aus fünf Schichten: dem Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. Das Stratum corneum besteht wie die beiden nachfolgenden Schichten aus toten Zellen, wohingegen die beiden inneren Schichten aus lebenden Zellen aufgebaut werden. Besonders von Bedeutung ist hier das Stratum basale, welches aus Keratinozyten, Melanozyten und Langerhans Zellen besteht. Ein limitierender Faktor für eine Immunisierung über die Haut ist die Größe der Wirkstoffe, welche die einzelnen Schichten passieren müssen. Das Stratum corneum beschränkt diese Moleküle auf 500 kDa (Bos and Meinardi, 2000). Sind die Wirkstoffe größer, müssen geeignete Behandlungen angewendet werden, die den Durchtritt ermöglichen. Dazu gehören das Behandeln der Haut mit Schmirgelpapier (Belyakov et al., 2004) oder Klebestreifen (Seo et al., 2000; Yagi et al., 2006), was die abgestorbenen Zellen entfernen soll, oder die Behandlung mit Wasser (Glenn et al., 1998a; Glenn et al., 2000), was die Hautschichten aufquellen lassen soll. Alle diese Methoden führen zu einer höheren Durchlässigkeit, aber auch zur Bildung von inflammatorischen Reaktionen der Haut.

Die Dermis zeigt einen völlig anderen Aufbau. Hier ist das SALT lokalisiert. Des Weiteren finden sich Blutgefäße und Immunzellen, wie DCs, Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten. Die Dermis ist elastischer als die Epidermis und beinhaltet außerdem das Interstitium, in dem sich die Immunzellen bei einer Verletzung oder Inflammation schnell bewegen können.

1.5.1 Mechanismen der transkutanen Immunisierung

Die Entwicklung eines Vakzines erfordert die Auswahl eines Antigens, welches vom Immunsystem erkannt werden kann. In vielen Fällen werden hierfür Proteine wie Ovalbumin (Kahlon et al., 2003; Klimuk et al., 2004) genutzt, die bisher eine Vorbehandlung der Haut voraussetzen. Die einfache Anwendbarkeit wird dadurch beschränkt, weswegen die Verwendung von definierten Peptiden zur Induktion einer CTL-Antwort eine gute Alternative darstellt. Ein aufkommendes Problem bei der Applikation von Peptiden, die direkt auf MHC I-Moleküle binden können, ist die

Möglichkeit einer Bindung an jede nicht-professionelle APC. Dadurch kann eine Anergie in T-Zellen ausgelöst werden, die den Verlust von potentiellen Effektorzellen zur Folge hat. Eine Perspektive bildet hier die Verwendung von längeren Peptiden, welche von den MHC I-Molekülen vor der Präsentation prozessiert werden müssen, was maturen APCs vorbehalten ist (Zwaveling et al., 2002).

Für die Induktion einer Immunantwort muss dem Antigen ein geeignetes Adjuvanz beigefügt werden. Neben Enterotoxinen wie CT (Cholera Toxin) oder LT (Escherichia coli Toxin) (Partidos et al., 2004) kommen auch kleinere Komponenten in Frage. Hierzu gehört das synthetische Imidazoquinolin Imiquimod (R837), welches einen Liganden für den TLR7 darstellt (Hemmi et al., 2002). Bereits publiziert wurde, dass Imiquimod IFN α (Sidky et al., 1992), TNF- α , IL-1 α , IL-6 und IL-8 induziert (Gibson et al., 1995; Reiter et al., 1994; Testerman et al., 1995; Witt et al., 1993). Für die Kombination von Imiquimod und einem Antigen ist bekannt, dass potente inflammatorische Immunantworten induziert werden können (Palamara et al., 2004a) ohne die Notwendigkeit einer Vorbehandlung der Haut (Rechtsteiner et al., 2005), allerdings kommt es nicht zur Ausbildung von Gedächtniszellen.

1.5.2 Therapeutische Tumorstoffe

Im Bereich der Tumorforschung ist bekannt, dass so genannte Tumor-assoziierte Antigene (TAA) eine Vielzahl an Epitopen hervorbringen können, die über MHC-Moleküle CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden (Van den Eynde and van der Bruggen, 1997). Die aktivierten CD8⁺ T-Zellen können Tumorzellen durch Ausschüttung ihrer Granula oder Anschalten eines Apoptose-Signalwegs töten. CD4⁺ T-Zellen hingegen sezernieren Zytokine, die die CTL-Antwort unterstützen, sowie die Zell-Proliferation des Tumors inhibieren (Pittet and Mempel, 2008). Die Suche nach diesen TAA und die Charakterisierung der verschiedenen Epitope ermöglicht die Generierung von aktiven Manipulationen der Immunreaktion gegen Tumorzellen, die als Impfstoffe zusätzlich oder alternativ zu bisherigen Therapien, wie Radio- oder Chemotherapie, eingesetzt werden könnten. Impfstoffe oder Vakzine (vom lateinischen *vaccina* „die von Kühen Stammende“) bilden eine erfolgreiche Methode um verschiedenen Krankheiten in Menschen vor zu beugen. In der Vergangenheit

konnten bereits einige Krankheiten nahezu vollständig durch Impfstoffe ausgerottet werden. Hierzu zählen Polio und Pocken (1999). Neuere Entwicklungen zeigen viel versprechende Erfolge gegen bakterielle und virale Infektionen.

Das Prinzip einer erfolgreichen Immuntherapie ist die Induktion von Effektor-T-Zellen aus antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen (Rosenberg et al., 2004). Eine Möglichkeit der Aktivierung und Vermehrung von CTLs ist der Gebrauch von dendritischen Zellen aus dem Patienten. Die Zellen wurden dabei mit verschiedenen Tumorantigenen, wie Peptide, Proteine, Tumorlysate und mRNA, beladen. Die Problematik bei dieser Methode liegt in der Präparation der DCs, da durch die Erkrankung an sich und die zusätzlichen Behandlungen des Patienten sowohl die Qualität als auch die Quantität der Zellen beeinflusst werden (Almand et al., 2000; Sasawatari et al., 2006). Außerdem ist eine solche Behandlung zeitaufwendig und sehr kostenintensiv. Eine mögliche Weiterentwicklung zum Einsatz von DCs in einer Immuntherapie ist deshalb die Peptid-Beladung der Zellen *in vivo* mit gleichzeitiger Applikation eines TLR-Liganden. Erste Erfolge zeigte hier die subkutane Injektion von IFA (*incomplete Freund's adjuvant*) zusammen mit CpG, woraus eine starke CTL-Antwort gegen Tumorzellen resultierte (Davila and Celis, 2000).

Eine geeignete Methode stellt hier die transkutane Immunisierung dar, da sie den DCs in der Haut ein Antigen liefert und die Zellen gleichzeitig aktivieren kann (Glenn et al., 2000). Als Erweiterung zu einer Immunisierung mit einem Peptid der Länge von 8 bis 10 Aminosäuren, wurden bereits Versuche mit längeren Peptiden publiziert. Diese bestehen aus multiplen Epitopen und formen stabile lineare Komplexe (Hiranuma et al., 1999; Shirai et al., 1994). Außerdem werden im Mausmodell Epitope mit überlappenden CTL- und TH-Epitopen mit einigem Erfolg eingesetzt (Fayolle et al., 1991; Noguchi et al., 1994). Warger und Rechtsteiner konnten zeigen, dass in einem prophylaktischen Tumormodell eine erfolgreiche vollständige Abstoßung des Tumors vermittelt werden kann, sofern die Inokulation der Zellen im Zeitraum der primären Immunantwort stattfindet (Warger et al., 2007). Eine vollständige Abstoßung bei Inokulation zu einem späteren Zeitpunkt konnte nur nach Induktion einer Gedächtnisantwort mittel Kombination von TCI und Injektion von anti-CD40-Antikörper erreicht werden.

1.6 Effekte der UV B-Strahlung

Ultraviolette Strahlung lässt sich anhand von Wellenlängen in drei verschiedene Arten einteilen: UV A (320-400 nm), UV B (290-320 nm) und UV C (200-280 nm). Das Sonnenlicht setzt sich hauptsächlich aus UV A und mit geringerer Intensität aus UV B zusammen. UV A-Strahlen durchdringen die Haut bis zur Lederhaut und sorgen für eine Schädigung der Kollagene und erhöhen das Melanomrisiko durch Bildung freier Radikale. Sie induzieren vor allem den Zelltod von dermalen DCs in einer dosisabhängigen Weise. UV B-Strahlen haben Auswirkungen auf die Oberhaut, dringen aber auch tiefer in die Hautschichten ein. Durch UV B wird in der Haut das Vitamin D3 freigesetzt, wodurch diese UV-Strahlen nicht nur hautkrebsfördernde Reaktionen auslösen, sondern durch das Vitamin D3 auch krebsvorbeugend wirken. Durch UV B-Bestrahlung kann eine lokale oder systemische Immunsuppression induziert werden. Dabei lösen geringe UV-Dosen nur lokale Effekte aus, bei denen nichtbestrahlte Hautpartien mit einer normalen Immunantwort reagieren. Hohe Dosen erzielen jedoch systemische Effekte. Bei einer systemischen Immunsuppression kommt es auch zur Beeinflussung von nichtbestrahlten Bereichen. Die immunsuppressiven Effekte sind durch zahlreiche Aspekte bedingt. Die Immunsuppression wird zunächst durch Keratinozyten, später durch Mastzellen vermittelt. Beide Zellarten werden durch die Bestrahlung zur Freisetzung von immunsuppressiven löslichen Mediatoren wie IL-10 (Rivas and Ullrich, 1992), TNF- α (Kurimoto and Streilein, 1992; Moodycliffe et al., 1994), IL-4 und Prostaglandin E2 (Shreedhar et al., 1998) angeregt. Ein weiterer Effekt ist die Depletion der Langerhans Zellen in der Epidermis (Toews et al., 1980), die verstärkt aus der Haut auswandern. Außerdem werden ihre Expression von MHC II-Molekülen und ihre ATP-Aktivität beeinträchtigt, was zu einer verminderten Fähigkeit der Antigenpräsentation führt (Aberer et al., 1981; Stingl et al., 1983). Zusätzlich kann die Zusammenlagerung von Langerhans Zellen und T-Zellen und die T-Zell-Aktivierung durch Inhibition des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Weiss et al., 1995) vermindert werden. Diese eingeschränkte Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung trifft auch auf periphere und aus der Milz stammende DCs nach UV-Kontakt zu. Auf T-Zell-Ebene induziert die UV B-Strahlung die Bildung von regulatorischen T-Zellen. Die suppressive Wirkung der UV-Strahlen kann des Weiteren auf die Wirkung von urocanischer Säure (UCA) zurückgeführt werden

(Norval et al., 1995). UCA ist ein Produkt des metabolischen Stoffwechsels der Aminosäure Histidin und wird nach der Aktivierung von Histidase gebildet. Es gibt zwei tautomere Formen (*cis* und *trans* UCA). Da den Keratinozyten in der Epidermis die Enzyme zum Katabolismus, die Urocanasen, der UCA fehlen, sammelt sich dieses in der Haut an. Durch UV-Strahlung wird die *trans*- in die *cis*-Form umgewandelt. Diese Reaktion ist dosisabhängig bis ein Zustand erreicht wird, in dem beide Formen zu gleichen Teilen vorkommen. Für die *cis*-Form ist bekannt, dass sie die Fähigkeit der Tumorantigenpräsentation von Langerhans Zellen verringert (Beissert et al., 1997) und bei der Bildung von UV-induziertem Hautkrebs beteiligt ist (Beissert et al., 2001). Ein schwerwiegender Aspekt sind außerdem die durch UV-Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schäden bei Keratinozyten und LCs in der Epidermis und bei DCs in Lymphknoten, die bestrahlte Hautstellen drainieren. Diese Schädigungen führen in Kontakthypersensitivitätstests zur Suppression der Immunantwort. Durch die Gabe von Enzymen, welche die Reparatur der geschädigten DNA fördern, konnte der supprimierende Effekt aufgehoben werden und die Immunantwort war vergleichbar mit der in unbestrahlten Tieren (Vink et al., 1998). Die UV C-Strahlung kann in ihrer biologischen Aktivität vernachlässigt werden, da diese Strahlen sehr kurzwellig sind und nicht bis zur Erdoberfläche durchdringen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die immunsuppressiven Effekte, die durch eine UV B-Bestrahlung ausgelöst werden, zu überwinden. Hierfür wurde sich ein bereits etabliertes System, die transkutane Immunisierung, zu Nutze gemacht. Untersucht werden sollten mögliche Wirkungsmechanismen nach UV B-Bestrahlung und transkutaner Immunisierung, wie die Beteiligung verschiedener Zellpopulationen, sowie die Regulation auf Zytokinebene.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Versuchstiere

C57BL/6	ZVTE Universitätsmedizin Mainz
LangEGFP-DTR	Eine Kasette aus IRES und einem Fusionsgen des EGFP Leserahmens und der humanen DTR cDNA wurde in der untranslatierten 3'Region des Langerin Gens eingebracht. Es resultiert die Expression eines Fusionsproteins aus dem Diphtheria Toxin Rezeptor und EGFP in Langerin exprimierenden dendritischen Zellen. Die Funktion des Langerin-Gens wird nicht beeinträchtigt. Hintergrund ist C57BL/6. Zur Verfügung gestellt von Adrien Kissenpfennig, Marseille (Kissenpfennig et al., 2005)
CD11c-DTR	Ein Fusionsprotein aus dem Diphtheria Toxin Rezeptor und eGFP wurde unter dem Promotor des CD11c-Gens eingebracht. Der Hintergrund ist C57BL/6. (Jung et al., 2002)
DEREG	Die transgenen DEREG- (<i>depletion of regulatory T cells</i>) Mäuse exprimieren einen Diphtherietoxin Rezeptor zusammen mit eGFP unter der Kontrolle des <i>foxp3</i> Locus. (Lahl et al., 2007)
IL-10 ^{-/-}	Das IL-10 Gen wurde in embryonalen Stammzellen durch das Ersetzen eines 500 bp langen Fragments unterbrochen. Betroffen sind die Codons 5 – 55 des ersten Exons, in denen ein Stop-Codon und eine <i>neo</i>

	Expressions-Kassette entstehen, sowie das Exon 3, in welches ein Stop-Codon eingebracht wurde. (Kuhn et al., 1993)
IL-12p40 ^{-/-}	Durch homologe Rekombination in W9.5 embryonalen Stammzellen wurde eine Mutation in das IL-12p40-Gen eingebracht. Eingefügt wurde ein Targeting-Vektor mit einem Neomycin-Resistenzgen, wodurch eine Selektion über G419 ermöglicht wurde. Heterozygote Chimere, entstanden aus der Injektion in Blastocysten, wurden miteinander verpaart. Der Hintergrund ist C57BL/6 (Magram et al., 1996).
IFN α R ^{-/-}	Das Exon 3 des IFN α R-Locus wurde durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6 (Muller et al., 1994).
MyD88 ^{-/-}	Durch homologe Rekombination in E14.1 embryonalen Stammzellen wurde das MyD88-Gen unterbrochen. Eingefügt wurde ein Targeting-Vektor mit einem Neomycin-Resistenzgen, mit dem zwei Exons, die das C-terminale Ende des MyD88 kodieren, ersetzt wurden. Weiterverwertung rekombinanter Stammzellen erfolgte über die Resistenz zu G418. Hintergrund ist C57BL/6. (Adachi et al., 1998)
TLR4 ^{-/-}	Die Sequenzen, die für Transmembran- und zytoplasmatische Domäne kodieren, wurden ersetzt durch eine Neomycinresistenzkassette. Hintergrund ist C57BL/6. Zur Verfügung gestellt von Prof. Wagner, München (Hoshino et al., 1999)
TLR7 ^{-/-}	Das TLR7-Gen wurde durch das Einfügen einer Neomycinresistenzkassette inaktiviert. Ersetzt wurde ein

Lokus, der für einen „leucin-rich repeat“ kodiert. Hintergrund ist C57BL/6. Zur Verfügung gestellt von Philipp Yu, Marburg (Hemmi et al., 2002)

TRIF^{-/-}

Das mutierte Allel Ticam1Lps2 trägt eine durch NEU-Mutagenese induzierte Leserahmen-Mutation des Toll/IL-1 Rezeptor/Resistenz (TIR) Lokus. Deletiert wurde ein Guanin im Codon 708 (Hoebe et al., 2003).

2.1.2 Zelllinien

EL-4

Maus –Lymphom-Zelllinie; H2-D^b;
H2-K^b; ATCC-NR: TIB-39

EG.7

EL-4 mit pAc-neo-OVA-Plasmid;
ATCC-NR: CRL-2113

2.1.3 Medien

Testmedium (TM5)

5 % FCS
1 % Glutamin
1 % Na-Pyruvat
1 % Penicillin / Streptomycin
in Iscove's Medium

Selektionsmedium (SM)

1 mg/ml G418
in TM5

2.1.4 Puffer

ACK-Puffer	0,1 mM EDTA 150 mM NH_4Cl 1 mM KHCO_3 in Wasser (pH 7,3)
Blutpuffer 1	30 mM EDTA 0,01 % Natrium-Acetat in PBS
Blutpuffer 2	5 % FCS 100 U/ml Heparin in Mem
Cytofix / Cytoperm	BD Pharmingen
FACS-Puffer	1 % BSA 0,02 % Natrium-Acetat 1 mM EDTA in PBS
Gey's Lysepuffer	8,29 g NH_4Cl 1 g KHCO_3 0,037 g EDTA in 1 L Wasser (pH 7,29)
GM-Puffer	0,5 % BSA 5 mM EDTA 0,1 % NaN_3 in PBS

PBS (10x)	1,4 M NaCl 0,1 M NaH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O pH 7,2
Saponinpuffer	1 % BSA 0,02 % Natrium-Acetat 0,1 % Saponin in PBS
Trypanblaulösung	0,5 % Trypanblau 0,02 % Natrium-Acetat in PBS

2.1.5 Antikörper

Verwendung	Antigen	Klon	Markierung	Herkunft
FACS	CD8a	53-6.7	APC-Cy7 PE	eBioscience
	CD11b	M1/70	Pacific Blue PE-Cy7	eBioscience
	CD11c	N418	APC-Cy7	eBioscience
	CD19	eBio1D3	biotinyliert	eBioscience
	CD40	1C10	PE	eBioscience
	CD86	GL-1	APC	eBioscience
	CD90.2	30-H12	biotinyliert	BD
	IFN γ	XMG1.2	APC	eBioscience
	Langerin	eBioL31	PE	eBioscience
	MHC II	M5/114.15.2	APC Pacific Blue	eBioscience
	SIINFEKL-K ^b	25.D1.16		Hybridom
	Streptavidin		PerCP	BD
Fluoreszenz- Mikroskopie	MHC II	M5/114.15.2		Culture Collection
	Ziege anti Ratte IgG		Alexa Fluor® 594	Molecular Probes
Zellaufreinigung	CD25	7D4	Biotinyliert	BD
<i>in vivo</i>	CD40	FGK-45		Hybridom
	aIL-10R	1B1.2		Hybridom
	Ly6G	RB68C5		Hybridom

2.1.6 Reagenzien und Chemikalien

Aldara-Creme	3M
AquaPolymount	Polysciences
Brefeldin A	Sigma
BSA	Roth
Chloroform	Roti®
DEPC-Wasser	Roth
di-n-butylphtalat	Sigma
Dispase	Roche
dNTPs	PeqLab
Dynalbeads	Invitrogen
EDTA	Sigma
Ethanol	Merck
FCS	Vitromex
FITC	Sigma
G418	PAA
Glycerin	Roth
Glykogen	Sigma
GM-CSF	Kulturüberstand
Heparin	Ratiopharm
Iscove´s Medium	(DMEM) Invitromex
Isopropanol	Merck
Ketamin	Ratiopharm
L-Glutamin	Roth
MicroBeads	Miltenyi
Natrium-Acetat	Roth
NaCl	Roth
NaH ₂ PO ₄	Roth
Natriumpyruvat	Sigma
Oligo-dT-Primer	MBI Fermentas
OVA ₂₅₇₋₂₆₄	Dr. Stefan Stevanovic (Universität Tübingen)
Penicillin / Streptomycin	Serva

Primer	biomers.net GmbH
Propidium-Iodid	Sigma
Puffer 5x	Fermentas
Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
Rompun	Bayer
Salbengrundlage	3M
Saponin	Sigma
SYBR Green	ABgene
Taq-Polymerase	Promega
TRI-Reagent	ABgene
Trypanblau	Merck

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

6-Kavitätenplatte (für EL-4, EG.7)	Greiner
48-Kavitätenplatte	Greiner
96-Kavitätenplatte (U-Form)	Greiner
Abdeckplatten (steril)	Greiner
Cell Strainer	BD
Einweg-Handschuhe	Rotiprotect
Entsorgungsbeutel	Roth
FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon, BD
FACS-Röhrchen 300 µl	Greiner
Kanülen	Braun
Nescofilm	Roth
Plastikröhrchen mit Schraubverschluss	Greiner
Pipettenspitzen	StarLab
Reaktionsgefäße	Greiner
Schiffchen	Corning incorporated
Serologische Glaspipetten	Hirschmann
Skalpelle	Paragon, Dahlhausen
Spritzen	Omnifix

Zählkammer

Neubauer

Zellkulturflaschen

Greiner

2.1.8 Laborgeräte

Analysenwaage

AE100, Mettler

FACSCanto

BD Pharmingen

Feinwaage

PM2000, Mettler

Fluoreszenzmikroskop

Olympus

Gefäßständer

Neolab

Icycler

Biorad

Infrarotlampe

Philips infraphil

Inkubator

incu safe, Cooper Alloy Stainless

Langhaarschneider

Panasonic

Lichtmikroskop

Motic AE 20

LSR II

BD Pharmingen

Mausbestrahlungsanlage OB58-BA

Buchler

Maushalterung

Kent Scientific

Mehrkanal-Pipette

Eppendorf

MIDI MACS

Miltenyi Biotec

Ohrknippser

B.Y.T.CO.

Pipetten

Gilson

Pipetboy

Integra Biosciences

Elektrorasierer

Braun

Schieblehre

Bochem

Sterilbank

Hera safe, Heraeus

Testarm-Messuhr

Mitutoyo

Tischzentrifuge

Multifuge, Hereaus

UV B-Lampe

Peqlab

UV-Radiometer

PCE Group

Vortex

Bender & Hobein AG

Zentrifuge

Hereaus

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

2.2.1.1 Kultur der Zelllinien EL-4 und EG.7

Die Kultur der Zellen erfolgt in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Die EL-4- und EG.7-Zellen werden zunächst in 48-Kavitätenplatten herangezogen. Als Medium dient für die EL-4 Testmedium (5 % FCS), für die EG.7 Selektionsmedium. Zur Expansion der Zellen werden diese in 250 ml Zellkulturflaschen überführt. Jeden zweiten Tag werden die Zellen etwa 1:10 gesplittet. Die EG.7-Zellen werden regelmäßig auf die Expression des OVA-Transgens getestet. Hierfür kann mit einem unmarkierten Antikörper gegen SIINFEKL –H2-K^b und anschließend mit einem APC-markierten α-Maus-IgG1-Antikörper gefärbt werden. Die Analyse erfolgt im FACS.

2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird ein Aliquot der Zellen in physiologischer Trypanblaulösung verdünnt. Dadurch erscheinen tote Zellen im Lichtmikroskop blau. Gezählt werden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mit der Kammertiefe von 0,1 mm (Kammerfaktor 10⁴). Berechnet wird die Zellzahl wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können fluoreszenzmarkierte Zellen (oder Partikel) analysiert werden. Die Zellsuspension wird durch eine Nadel angesaugt und in einzelnen Tropfen, in denen sich jeweils nur eine Zelle befindet, zu den Lasern

geführt. Durch das Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle und die daraus entstehende Abschirmung (Messung im *Forward Scatter*) kann die Größe der Zelle bestimmt werden. Außerdem können durch die Streuung des Laserstrahls (Messung im *Side Scatter*) Informationen über die Granularität der Zelle gewonnen werden. Wurden die Zellen zuvor mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert, werden die Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt und emittieren Licht bestimmter Wellenlängen. Abhängig von der Anzahl der Detektoren können bei der Färbung mit verschiedenen Anregungswellenlängen bis zu 12 verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen werden.

2.2.2.1 Tetramer- und Antikörper-Färbung

Für die Analyse von zytotoxischen T-Zellen kann die Expression des antigenspezifischen TCR dienen. Hierfür werden die Zellen mit einem Tetramer angefärbt. Dieses besteht aus peptidbeladenen MHC-I-Molekülen, die zusätzlich an Phycoeritrin (PE) gekoppelt sind. Durch die Präsentation des Peptids auf den MHC-Molekülen können Antigen-spezifische T-Zellen gebunden und somit angefärbt werden. Zusätzlich können Zelllinienmarker und Antikörper für Oberflächenmarker genutzt werden.

Für die Färbung werden die Zellen in einer 96-Kavitätenplatte mit rundem Boden in FACS-Puffer aufgenommen. Die Oberflächenfärbung (in 50 µl Färbelösung) der Zellen erfolgt für 30 Minuten bei 4 °C. Nach der Inkubationszeit werden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und zur Analyse in 150 µl FACS-Puffer aufgenommen. Zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen kann vor der Messung 1 µl (50 µg/ml) Propidiumiodid-Lösung zugesetzt werden, wodurch die toten Zellen angefärbt werden.

2.2.2.2 Intrazelluläre IFN γ -Analyse

Für die IFN γ -Analyse von Lymphozyten aus dem Blut werden die Zellen ex vivo mit Peptid restimuliert. Die Zellen produzieren daraufhin IFN γ . Dieses muss in der Zelle zurück gehalten werden. Hierfür wird der Golgi-Apparat der Zelle blockiert. Das Zytokin sammelt sich in der Zelle an und kann intrazellulär angefärbt und gemessen werden. Hierfür müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals werden nicht Peptid-restimulierte Zellen ebenfalls gefärbt.

Die Blutproben werden in Blutpuffer 2 aufgenommen. Nach Erythrozyten-Lyse mit ACK-Puffer werden die Proben in einer 96-Kavitätenplatte ausgesät. Benötigt werden zwei Wells pro Probe. Die Proben werden abzentrifugiert und in je 100 μ l TM5 mit 50 U/ml Heparin aufgenommen. Beide Proben werden mit 100 μ l TM5 mit Brefeldin A (1 μ g/ml) und IL-2 aufgefüllt. Die Positivprobe wird zusätzlich mit 1 μ M Peptid versetzt. Anschließend müssen die Proben für 6 Stunden bei 37 °C inkubieren. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer, werden die Zellen auf ihrer Oberfläche gefärbt. Die Färbung erfolgt über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer müssen die Zellen für die Intrazellulär-Färbung mit 200 μ l Cytofix/Cytoperm für 30 Minuten fixiert und permeabilisiert werden. Anschließend werden die Proben zweimal mit Saponinpuffer gewaschen und intrazellulär gefärbt. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgt ebenfalls in Saponinpuffer. Die Färbung erfolgt für 30 Minuten bei 4 °C. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers werden die Proben gewaschen und können durchflusszytometrisch analysiert werden.

2.2.2.3 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Die Grundlage für einen *in vivo* Zytotoxizitätstests ist die Peptid-Beladung und CFSE-Markierung von Milzzellen, die anschließend intravenös in immunisierte Mäuse injiziert werden. Diese Zellen dienen dann als Zielzellen für zytotoxische T-Zellen, die spezifisch für das exprimierte Peptid sind, für welches sie durch die Immunisierung zuvor geprimt wurden. Als Referenz werden Milzzellen benutzt, die nicht Peptid

beladen wurden und somit nicht von zytotoxischen T-Zellen lysiert werden. Außerdem werden diese Zellen mit einer anderen CFSE-Konzentration markiert, wodurch sich bei der Analyse im FACS zunächst zwei Populationen gleicher Größe unterscheiden lassen (Abbildung 5). Kommt es zur Lyse der beladenen Zielzellen verschiebt sich das Verhältnis zwischen beiden Populationen. Durch unterschiedliche Inkubationszeiten in der Maus, lässt sich die Sensitivität des Tests steuern.

Aus Milzen von syngenischen Mäusen wird eine Einzelzell-Suspension hergestellt. Die Erythrozyten werden mit Hilfe von ACK-Puffer lysiert und in PBS auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden je zur Hälfte mit $4 \mu\text{M}$ CFSE (CFSE^{high}-Zellen) beziehungsweise $0,4 \mu\text{M}$ CFSE (CFSE^{low}-Zellen) markiert. Anschließend werden die Zellen für 4 Minuten im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von FCS abgestoppt. Nach einem Waschschrift mit Mem/2 % FCS werden die Zellen in Mem aufgenommen. Die CFSE^{low}-Zellen werden mit $1 \mu\text{M}$ Peptid beladen und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden beide Populationen auf $6,7 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt und im Verhältnis 1:1 gemischt. Injiziert werden jeweils $300 \mu\text{l}$ (2×10^6 Zellen) pro Maus i.v..

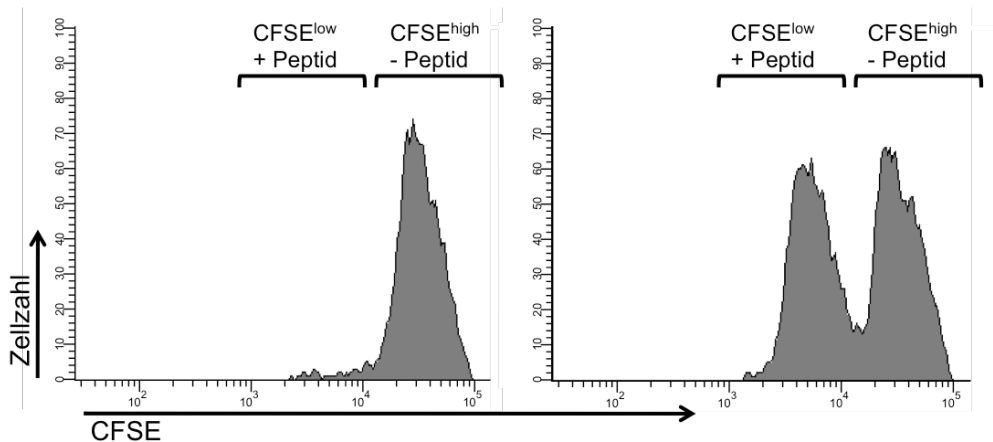


Abbildung 5 Analyse der lytischen Aktivität in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest

Abgebildet ist eine beispielhafte Darstellung zur Analyse der lytischen Aktivität. Die CFSE^{low}-Zielzellen wurden zusätzlich mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid beladen, die CFSE^{high}-Zellen dienen als Kontrolle. In einer nicht-immunisierten Maus stellen sich beide Zellpopulationen gleich dar (rechtes Histogramm). Durch die Ausbildung von aktivierten und peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen in einer immunisierten Maus, werden die Zielzellen lysiert und die Anzahl an CFSE^{low}-Zellen verringert sich (linkes Histogramm).

Zur Analyse können Blutproben oder die Milzen der Tiere entnommen werden. Nach Herstellung von Einzelzellsuspensionen werden die Erythrozyten lysiert und die Zellen können durchflusszytometrisch untersucht werden. Zur Bestimmung des

Verhältnisses zwischen CFSE^{low}-Zellen und CFSE^{high}-Zellen wird eine konstante Zahl an CFSE^{high}-Zellen gemessen. Die spezifische Lyse der CFSE^{low}-Zellen errechnet sich wie folgt:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = 100 \times (1 - (N_{\text{immu}} / N_{\text{neg}}))$$

N_{neg} = Anzahl der CFSE^{low}-Zellen einer nicht-immunisierten Kontrolle

N_{immu} = Anzahl der CFSE^{low}-Zellen einer immunisierten Maus

2.2.3 Ex vivo Präparation von Organen und Zellen

2.2.3.1 Gewinnung von Epidermispräparaten

Zur Präparation der Epidermis werden die Ohren der Mäuse vom Kopf abgetrennt. Nachdem die innere und äußere Hälfte mittels Pinzetten voneinander getrennt wurden, werden die Hälften mit der Epidermis nach oben in einer 0,5 %igen DispaseLösung in Mem/2 % FCS für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Ohrhälften in PBS überführt und die Epidermis abgezogen. Zum Anfärben der Zellen der Epidermis wird zunächst mit einem unmarkierten MHC II-Antikörper, verdünnt in PBS/1 % BSA, für 1 Stunde bei 37 °C gefärbt. Nach zweimaligem Waschen der Epidermis für jeweils 15 Minuten mit PBS/1 % BSA erfolgt die Sekundärfärbung mit einem Ziege anti Ratte Alexa Fluor 594 Antikörper (1 Stunde bei 37 °C). Nach erneutem Waschen, wie zuvor beschrieben, kann die Epidermis auf einem Tropfen AquaPolymount Eindeckmedium aufgespannt und unter einem Deckglas versiegelt werden. Die Präparate wurden mit einem Olympus Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.3.2 Milzentnahme

Die Tiere werden mit CO₂ abgetötet und mit Ethanol abgesprüht. An der linken Flanke der Tiere kann nach dem Durchtrennen der Haut und der Bauchhaut, die Milz entnommen werden. Die Milz wird zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension auf ein Zellsieb gegeben und mit einem Spritzenstempel zerrieben. Das Zellsieb wird mit PBS gespült. Nach anschließender Erythrozytenlyse können die Zellen in FACS-Puffer wenn nötig gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert werden.

2.2.3.3 Präparation und Aufbereitung von Lymphknoten

Präpariert wurden sowohl drainierende als auch nicht-drainierende Lymphknoten. Zu den Haut-drainierenden Lymphknoten zählen die inguinalen und die axilaren, zu den nicht-drainierenden die brachialen und cervicalen Lymphknoten. Die Lymphknoten werden in HBSS aufgenommen und mittels zweier Kanülen zerzupft. Nach Zugabe von Collagenase 2 (50 U/ml) werden die Lymphknoten zum Verdau für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Abstopfung der Reaktion wird 1 ml einer 10 mM EDTA-Lösung zugegeben. Die gesamte Suspension wird über ein 70 µm Zellsieb gegeben und zur Antikörperfärbung in FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.3.4 Präparation von CD4⁺- und regulatorischen T-Zellen

Aus präparierten Milzen (s. Kapitel 2.2.3.2) wird eine Einzelzellsuspension hergestellt, die mit Gey's Lysepuffer lysiert wird. Nach dem Abtrennen von größeren Partikeln über ein 40 µm Zellsieb wird die Suspension auf 1×10^8 Zellen/ml in GM-Puffer eingestellt. Zunächst werden die Milzzellen mit 5 µg/ml des CD25-biotinylierten-Antikörpers (Klon 7D4) für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgt die Inkubation mit Streptavidin-Beads (Verdünnung 1:40) ebenfalls bei 4 °C für 20 Minuten. Die Zellen werden auf die zuvor mit GM-Puffer gespülten und in den Magneten eingespannten Separationssäulen gegeben. Nachdem die

Säulen mit insgesamt 6 ml GM-Puffer gewaschen wurden, werden sie aus der Magnethalterung gelöst und die Zellen mit 5 ml GM-Puffer eluiert. Anschließend werden verunreinigende Zellen (30 % der eluierten Zellen) depletiert, indem anti-B220-Beads (50 % der Verunreinigung, 8 Beads pro Zelle), MAC 1-Beads (0,5 fache Menge der anti-B220-Beads) und anti-CD8-Beads (1,5 fache Menge der MAC 1-Beads) mit den Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Reaktion wird durch Zugabe von PBS/10 % FCS abgestoppt und die Zellsuspension in einen Magneten gestellt. Anschließend können die sauberen CD25⁺-Zellen abgenommen werden. Die verbleibenden Zellen werden nochmals mit PBS/10 % FCS gespült und der Separationsvorgang wiederholt.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

2.2.4.1 Blutabnahme

Zur Blutabnahme werden die Mäuse kurz unter Rotlicht leicht erwärmt um den Blutfluss zu erhöhen. Anschließend werden die Tiere in eine Blutungskammer gezogen. Die Abnahme erfolgt am Schwanz. Mit einem Skalpell wird die Schwanzarterie angeschnitten und 2 bis 3 Blutstropfen in 500 µl Blutpuffer 1 oder 2 aufgenommen.

2.2.4.2 Herstellung von Knochenmarkchimeren

Zur Analyse von verschiedenen Zellpopulationen kann es von Nöten sein Chimere zu generieren. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn zwischen der Funktion von myeloiden (aus dem Knochenmark-stammenden) und lymphoiden Zellen unterschieden werden soll, aber auch, wenn eine Verwendung von transgenen Mäusen aus gesundheitlichen Gründen nicht direkt möglich ist.

Die Empfängertiere werden zur letalen Bestrahlung in einer luftdurchlässigen Box in das Bestrahlungsgerät gestellt. Dieses ist mit einer Cs¹³⁷-Quelle ausgestattet.

Bestrahlt werden die Tiere mit 9,5 Gy. Das Knochenmark der Spendertiere wird nach dem Abtrennen und der Präparation der Hinterbeine aus den Knochen gespült. Die Knochenmarkszellen werden in PBS aufgenommen und den Empfängertieren 5×10^5 Knochenmarkszellen in je 200 µl intravenös injiziert. In den folgenden 3 Wochen werden die Tiere mit einem Antibiotikum behandelt, da sie über kein funktionsfähiges Immunsystem verfügen und somit anfällig für Krankheitserreger sind. Nach 6-8 Wochen besteht eine stabile Zellhomöostase und alle myeloiden Zellen wurden durch Donorzellen ersetzt.

2.2.4.3 Betäubung von Versuchsmäusen

Für verschiedene Behandlungen müssen die Mäuse in Narkose gelegt werden. Dazu werden zu 2 ml Ketamin-Lösung 800 µl Rompun-Lösung gegeben. Dieser Stock muss vor dem Gebrauch 1:5 mit PBS verdünnt werden. Je nach Größe und Gewicht werden den Mäusen zwischen 100 und 250 µl i.p. injiziert.

2.2.4.4 Rasur

Für die Rasur müssen die Mäuse, wie unter Kapitel 2.2.4.3 beschrieben, betäubt werden. Die Vorrasur wird mit einem Langhaarschneider vorgenommen. Die vollständige Entfernung der Haare erfolgt mit einem Elektrorasierer auf einer Fläche von etwa 10 cm² auf dem Rücken.

2.2.4.5 Transkutane Immunisierung (TCI)

Für die transkutane Immunisierung werden die Mäuse betäubt und am Vortag rasiert (s Kapitel 2.2.4.3 und 2.2.4.4). Pro Maus werden 50 mg Aldara-Creme mit 100 µg OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL-Peptid, gelöst in DMSO) gemischt bis eine homogene Masse entsteht. Anschließend wird die gesamte Menge auf den Rücken aufgetragen und

leicht einmassiert. Für Kontrollimmunisierungen ohne Wirkstoff wird Salbengrundlage verwendet, die ebenfalls mit Peptid gemischt und auf die Haut aufgetragen werden kann.

Für die Behandlung während der therapeutischen Tumorexperimente wurde die Immunisierung in wöchentlichen Intervallen wiederholt.

2.2.4.6 UV B-Bestrahlung

Für die UV B-Bestrahlung werden die Mäuse am Vortag rasiert (s Kapitel 2.2.4.3 und 2.2.4.4). Die betäubten Tiere werden in einem Abstand von 30 Zentimetern zur UV-Quelle bestrahlt, wodurch eine Energie von 90 mJ/cm² erzeugt wird. Zur Bestimmung der Bestrahlungszeit wird die Strahlungsintensität mit einem UV-Radiometer bestimmt. Die Bestrahlungsdauer berechnet sich wie folgt:

$$mJ/cm^2 = mW/cm^2 \times sec$$

Zum Schutz der Augen und Ohren vor Verbrennungen wird der gesamte Kopf mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Für die Behandlung während der therapeutischen Tumorexperimente wurde die Bestrahlung in wöchentlichen Intervallen wiederholt.

2.2.4.7 DTH (delayed type hypersensitivity)-Modell

Die Versuchsmäuse werden durch das Auftragen einer DNFB-Lösung auf den rasierten Rücken sensibilisiert. Die Lösung setzt sich zusammen aus einem 4:1 Gemisch von Aceton und Olivenöl und 0,5 % DNFB. Aufgetragen werden 50 µl. Für den Zweitkontakt werden den Tieren vier Tage später 20 µl einer 0,2 %igen DNFB-Lösung auf die Ohren aufgetragen. Die Ohrschwellung wird durch Messung der Ohrdicke vor und 24 Stunden nach dem Zweitkontakt bestimmt.

2.2.4.8 Auftragen einer FITC-Lösung

Zur Markierung von Hautzellen kann eine FITC-Lösung auf den rasierten Rücken von betäubten Tieren aufgetragen werden. Die Lösung setzt sich zusammen aus einem 1:1 Verhältnis von di-n-butylphthalat und Aceton, 5 % DMSO und 5 mg/ml FITC. Aufgetragen werden 400 µl pro Maus.

2.2.4.9 Injektion von Antikörpern

- | | |
|--------|---|
| FKG-45 | Je 100 µg Antikörper werden in 300 µl PBS ab dem Tag der ersten Immunisierung 3-mal im Abstand von 24 Stunden i.v. injiziert. |
| aIL10R | 250 µg Antikörper in 150 µl PBS werden am Tag vor der ersten Immunisierung i.p. injiziert. |
| RB68C5 | Je 150 µg Antikörper in 150 µl PBS werden ab dem Tag vor der ersten Immunisierung 3-mal im Abstand von 24 Stunden i.v. injiziert. |

2.2.4.10 Tumorinokulation und Größenbestimmung

Die Tumorzellen EL-4 oder EG.7 werden in der Log-Phase ihres Wachstums s.c. in die linke Flanke der Mäuse injiziert. Gespritzt werden 4×10^5 Zellen pro Maus in 100 µl PBS. Das Wachstum wird dreimal pro Woche dokumentiert. Hierfür wird der Tumor mit einer Schieblehre in zwei Dimensionen vermessen und die Größe in mm² bestimmt. Erreicht der Tumor eine Größe von 400 mm² werden die Tiere abgetötet.

2.2.5 Bestimmung der IL-12p35 Menge nach Immunisierung

2.2.5.1 RNA-Präparation

Die Zellen werden in 1 ml TRI-Reagent aufgenommen und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wird die Suspension bei 12500 x g 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 30 ng Glykogen versetzt. Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wird die RNA durch Zentrifugation (10 Minuten, 4 °C, 12500 x g) pelletiert. Das Pellet wird zweimal mit je 1 ml kaltem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wird anschließend luftgetrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

2.2.5.2 Reverse Transkription

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA (komplementär-DNA) wurde folgender Mastermix für jede Probe angesetzt:

5x Puffer	4 µl
dNTPs	2 µl
N6-Primer	1 µl
Oligo-dt-Primer	1 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl
mRNA	300-1000 ng

Aufgefüllt wurde mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl. Anschließend wurden die Proben bei 42 °C für 1 Stunde im Wasserbad inkubiert.

2.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Quantifizierung der Expression von IL-12p35-Gens wird bei der realtime-PCR die generierte cDNA auf die Menge eines „Housekeeping-Gens“ normalisiert. Hierfür wurde die HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet. Die Proben, sowie die HGPRT wurden in Tripplikaten (jeweils 25 µl) aufgetragen und in einem iCycler amplifiziert.

Die verwendeten Primer wurden auf eine Stocklösung von 5 pmol/µl eingestellt.

Primer für die HGPRT:

Forward: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3'

Reverse: 5'-GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG DT-3'

Primer für IL-12p35:

Forward: 5'-GTC AAT CAC GCT ACC TCC TC-3'

Reverse: 5'-CTG CAC AGC TCA TCG ATG GC-3'

Für die PCR wurde folgender Mastermix für Tripplikate angesetzt:

Autoklaviertes Wasser	28,8 µl
Primer	3,2 µl
cDNA	8 µl
SYBR-Green	40 µl

3 Ergebnisse

3.1 Die primäre Immunantwort wird durch Vorbehandlung mit einer UV B-Bestrahlung verstärkt

Ultraviolette Strahlung hat viele Auswirkungen auf die Haut. Die bekanntesten Effekte bei einer hohen Dosis von UV-Licht sind das Auslösen von Hautirritationen und vor allem Sonnenbrand (Cooper et al., 2003). Geringe und chronische Bestrahlung mit ultraviolettem Licht führt dagegen im Allgemeinen zu immunsuppressiven Reaktionen und zur Bildung von Hautkrebs (Halliday and Lyons, 2008). Die immunsuppressive Wirkung von UV-Licht wird durch $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatorische T-Zellen vermittelt, die IL-10 produzieren (Fisher and Kripke, 1982). Untersucht werden, sollte die Wirkung der transkutanen Immunisierung (TCI) mit einem TLR 7-Liganden auf die durch UV-Bestrahlung vermittelte Immunsuppression.

3.1.1 Supprimierende Effekte nach einer UV B-Bestrahlung können durch Behandlung mit einem TLR 7-Liganden aufgehoben werden

Um die Wirkung der transkutanen Immunisierung auf die UV-vermittelte Immunsuppression bei einer geringen Dosis zu untersuchen, wurde ein geeignetes Kontaktallergie-Modell verwendet. Wie in Abbildung 6 und übereinstimmend mit bereits publizierten Ergebnissen gezeigt (Thatcher et al., 2006), wird nach der Sensibilisierung und dem Zweitkontakt von UV-bestrahlten Mäusen keine Ohrschwellung hervorgerufen und somit eine Immunreaktion unterdrückt. Im Gegensatz dazu kann in der Versuchsgruppe, die ausschließlich mit dem Kontaktallergen behandelt wurden, ansonsten aber unbehandelt blieben, eine starke Ohrschwellung erzeugt werden. Werden die Tiere zusätzlich zur UV-Bestrahlung mit der Imiquimod-haltigen Creme Aldara behandelt, folgt auf die Applikation des Kontaktallergens eine Aufhebung der UV-vermittelten Effekte und eine Immunreaktion kann induziert werden. Die erzeugte Ohrschwellung dieser

Versuchsgruppe stellt sich schwächer dar als die der Positivkontrolle. Die Differenz zur alleinigen UV-Bestrahlung ist allerdings signifikant. Die Behandlung mit Aldara führt nach Applikation des Kontaktallergens zu einer starken Ohrschwellung, vergleichbar mit der der Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde auf die Sensibilisierung verzichtet und ausschließlich der Zweitkontakt auf den Ohren der Tiere durchgeführt. Diese Behandlung löste keine Reaktion auf das Kontaktallergen aus und es konnte keine Ohrschwellung gemessen werden.

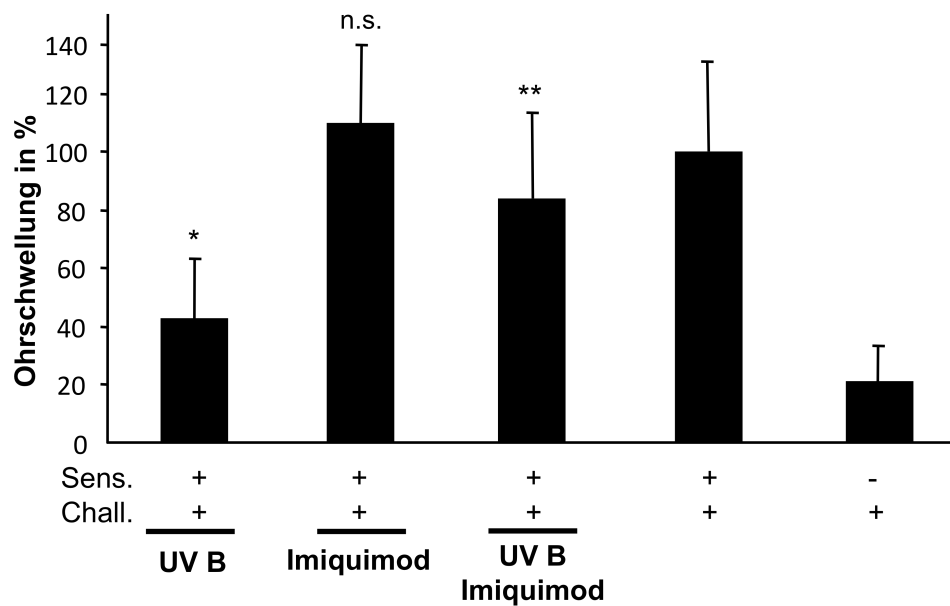


Abbildung 6 Aufhebung der UV-vermittelten Immunsuppression durch Imiquimod

Die UV-induzierte Immunsuppression wurde in einem DTH-Modell untersucht. Die Versuchstiere wurden auf dem rasierten Rücken sensibilisiert (0,5 % DNFB) und vier Tage danach gechallenged (Ohr, 0,2 % DNFB). Vor der DNFB-Behandlung wurden die Tiere, wie angegeben, mit UV B (90 mJ/cm²) bestrahlt und anschließend die Imiquimod-haltige Aldara (50 mg) aufgetragen. Bestimmt wurde die Ohrschwellung 24 Stunden nach dem Zweitkontakt. (*) statistische Signifikanz nach Student's T Test, n.s.= nicht signifikant.

3.1.2 Die Kombination von UV B und TCI führt zu einer verstärkten primären Immunantwort

Nachdem ein Effekt der Aldara-Creme auf die UV-vermittelte Immunsuppression gezeigt werden konnte, sollte die Auswirkung von UV B auf die TCI-induzierte CTL-Antwort untersucht werden. Um eine spezifische CTL-Antwort auslösen zu können, wird der Creme ein Peptid beigemischt. In den Experimenten dieser Arbeit wurde das synthetische Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) benutzt. Bei der Immunisierung werden

die Tiere an zwei aufeinander folgenden Tagen behandelt. Die zusätzliche UV-Bestrahlung findet am Tag vor der ersten Immunisierung statt. Die Tiere werden dabei mit einer geringen Dosis UV B (90 mJ/cm²) bestrahlt.

Im Einklang mit bereits publizierten Daten zeigt auch hier die Zahl der spezifischen T-Zellen nach TCI eine potente Induktion einer Immunantwort (Abbildung 7 a) im Vergleich zur nicht-immunisierten Kontrolle. Eine UV B-Bestrahlung zusätzlich zu TCI führt zu einer erhöhten Anzahl der peptidspezifischen T-Zellen, die dreimal höher ist, als bei der TCI-Versuchsgruppe und somit der Hinweis für eine Verstärkung der Immunantwort ist. Die UV B-Bestrahlung ohne Kombination mit Imiquimod, lediglich mit Salbengrundlage (der Trägersubstanz ohne Wirkstoff) und SIINFEKL, induziert keine Bildung von spezifischen T-Zellen.

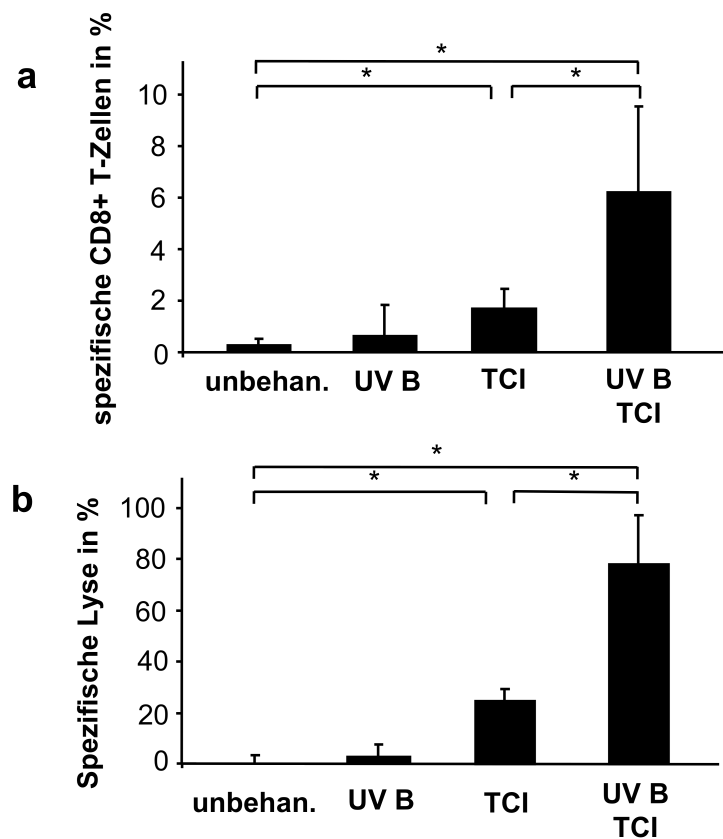


Abbildung 7 Verstärkung der TCI-induzierten Immunantwort durch UV B

C57BL/6 Mäuse wurden transkutan mit Aldara-Creme (50 mg) und SIINFEKL (100 µg) an zwei aufeinander folgenden Tagen immunisiert. Die UV B-Bestrahlung (90 mJ/cm²) erfolgte einen Tag vor der Immunisierung. Analysiert wurden (a) die peptidspezifischen T-Zellen durch Tetramer-Färbung und (b) die Lyse von peptidbeladenen und CFSE-markierten Zielzellen. (*) statistische Signifikanz nach Student's T Test (p < 0,05)

Als weitere Analysemethode wurden den Tieren peptidbeladene und CFSE-markierte Zellen adoptiv transferiert. Diese Zielzellen werden von den induzierten zytotoxischen T-Zellen, die spezifisch für das Peptid sind, erkannt und lysiert. Durch eine starke Immunisierung werden mehr zytotoxische T-Zellen gebildet, wodurch mehr Zielzellen lysiert werden können. Wie bereits bei der Quantifizierung der spezifischen T-Zellen gezeigt werden konnte, wirkt UV B verstärkend auf die Immunisierung, was sich auch in der Lyse der Zielzellen zeigt (Abbildung 7 b). 18 Stunden nach dem Transfer der Zielzellen sind bereits 80 % der Zellen in den UV B und TCI behandelten Mäusen lysiert worden. Die Lyse ist fünfmal so hoch wie in den TCI behandelten Mäusen. Da bei der Kontrollgruppe keine peptidspezifischen T-Zellen detektiert werden konnten, kommt es auch nach der Injektion von Zielzellen zu keiner lytischen Aktivität, ebenso wie in den bestrahlten, mit Salbengrundlage behandelten Tieren.

3.1.3 Etablierung des Immunisierungsprotokolls

Eine UV B-Bestrahlung kann weitreichende Folgen für die betroffene Hautpartie haben. Im Allgemeinen führt eine zu starke Bestrahlung zu Hautirritationen und Rötungen. Die Rötung der Haut, die auch als Erythem bezeichnet wird, entsteht durch eine Verengung der Kapillargefäße, die schließlich zur Überlastung führt. Der Zeitpunkt, wann eine solche Überlastung der Haut eintritt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen ist sie intensitätsabhängig, da eine Bestrahlung mit UV B eine 1000fach höhere Intensität hat als UV A, zum anderen spielen die Eigenschaften der Haut selbst eine wichtige Rolle. Von Bedeutung sind vor allem die Dicke des Stratum corneum, der Pigmentierungsgrad, aber auch wie oft die betroffene Hautstelle bereits Kontakt mit UV-Strahlung hatte (Bech-Thomsen et al., 1991). Alle diese Faktoren bedingen den Schwellenwert, an dem sich ein Erythem nach Bestrahlung bildet. Diesen Schwellenwert bezeichnet man auch als minimale Erythemdosis (MED) (Lock-Andersen and Wulf, 1996).

Um das angewandte Bestrahlungs-Protokoll hinsichtlich seiner Effektivität aber auch seiner Hautschädlichkeit zu überprüfen, wurden die Tiere mit unterschiedlichen UV B-Intensitäten bestrahlt. Zur Bestimmung der MED wurde das Erscheinungsbild der Haut vor, beziehungsweise 24 Stunden nach der Behandlung inspiziert.

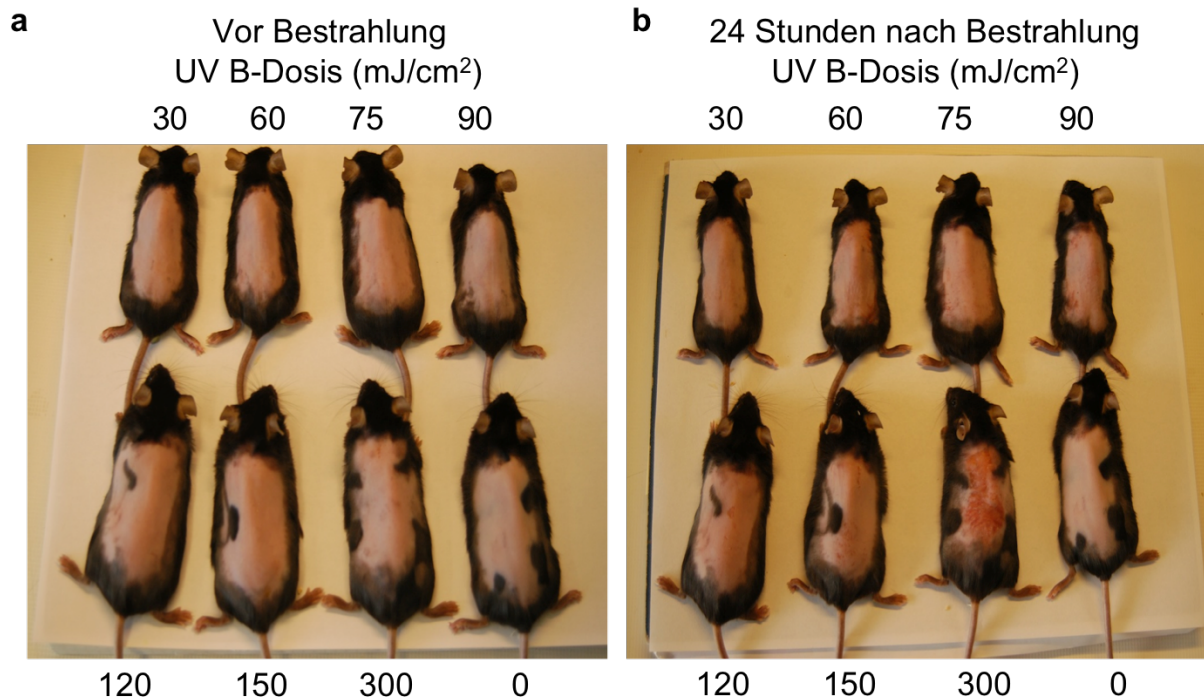


Abbildung 8 Bestimmung der minimalen Erythemdosis (MED)

Zur Bestimmung der minimalen Erythemdosis wurden die Versuchsmäuse am Tag vor der UV B-Bestrahlung rasiert. Die Bestrahlung erfolgte in den Dosierungen von 0 bis 300 mJ/cm². Das Erscheinungsbild der Haut wurde (a) vor und (b) 24 Stunden nach der Behandlung dokumentiert.

Die Haut der am Vortag rasierten Mäuse erscheint vor der Bestrahlung irritationsfrei (Abbildung 8 a). 24 Stunden nach der Behandlung (Abbildung 8 b) mit unterschiedlichen UV B-Intensitäten können bei 150 und 300 mJ/cm² Rötungen und Verbrennungen festgestellt werden. Die höchste Dosis führt dabei zu massiven Verbrennungen. Die restlichen niedrigeren Intensitäten induzieren keine optische Veränderung der Haut und gleichen im Erscheinungsbild der unbestrahlten Kontrolle. Die im Immunisierungsprotokoll angewandte Dosis von 90 mJ/cm² liegt somit unterhalb der MED, die für rasierte Mausrückenhaut bei 300 mJ/cm² liegt.

Zur Etablierung des Immunisierungsprotokolls wurden die Versuchstiere nach unterschiedlicher Bestrahlungslänge immunisiert und die lytische Aktivität bestimmt. Außerdem wurde die optimale Abfolge von UV B und transkutaner Immunisierung erprobt.

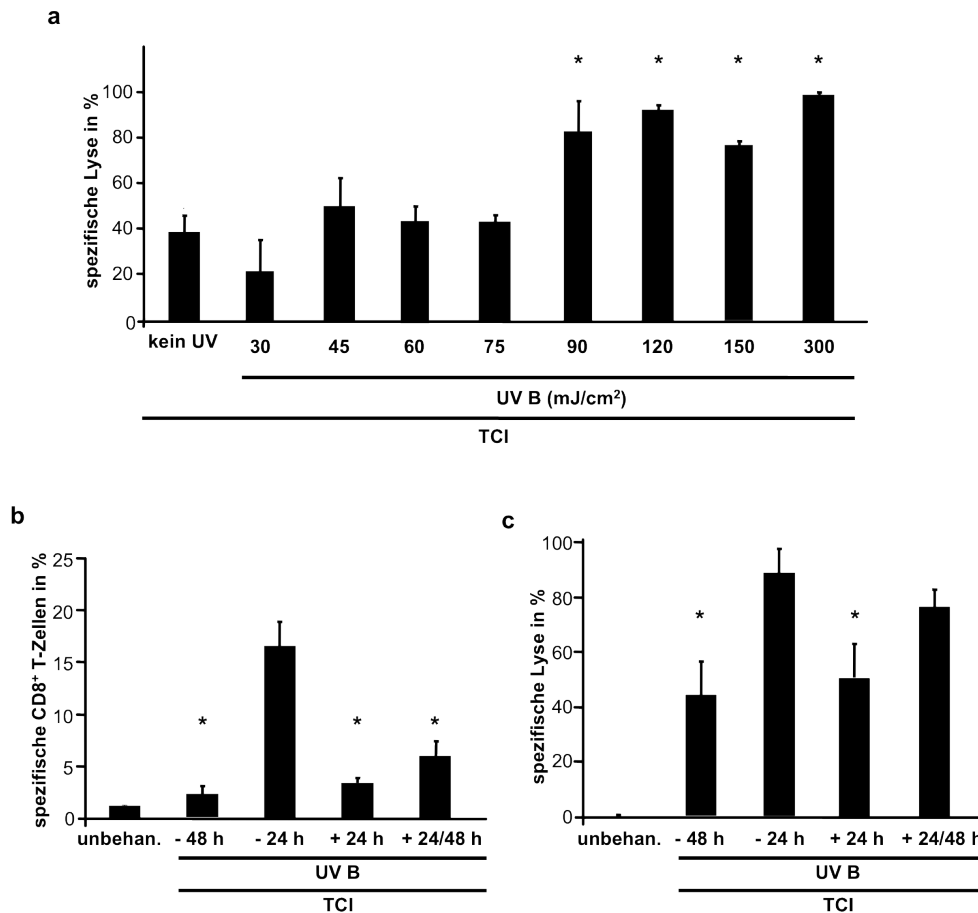


Abbildung 9 Eine geringe Bestrahlung mit UV B vor der transkutanen Immunisierung führt zu einer erhöhten Immunantwort

C57BL/6 Mäuse wurden wie angegeben bestrahlt und immunisiert. (a) Die UV B-Dosis wurde von 0 bis 300 mJ/cm² titriert und anschließend die zytolytische Aktivität bestimmt. Um die optimale Abfolge von Bestrahlung und Immunisierung fest zu legen, wurden die Versuchstiere 48 Stunden beziehungsweise 24 Stunden vor oder 24 Stunden beziehungsweise 24 und 48 Stunden nach TCI bestrahlt. Analysiert wurde (b) die Quantität spezifischer T-Zellen sowie (c) die Zytotoxizität. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit n=3 Mäusen pro Gruppe. (*) statistische Signifikanz nach Student's T Test (p< 0,05) verglichen mit unbestrahlten Gruppe (a) oder der – 24 Stunden Gruppe (b und c). Die gezeigten Daten wurden zur Verfügung gestellt von Gerd Rechtsteiner.

Die in Abbildung 9 a gezeigten Daten zur Zytotoxizität nach Titration der UV B-Dosis weisen auf eine Dosis-Abhängigkeit des verstärkenden UV-Effektes hin. Beobachtet wird eine erhöhte Lyse ab einer Bestrahlung von 90 mJ/cm² und darüber hinaus. Aufgrund der induzierten Hautschädigungen in hohen Intensitätsbereichen von UV B stellt eine Behandlung mit 90 mJ/cm² eine optimale Dosis dar. Der verstärkende Effekt kann erzielt werden, ohne dabei sichtbare Gewebeschäden hervor zu rufen. Zusätzlich wurden verschiedene zeitliche Abfolgen der Immunisierung und Bestrahlung getestet (Abbildung 9 b und c). Dabei zeigte sich, dass es lediglich ein kurzes Zeitfenster gibt, in dem die UV-Behandlung stattfinden sollte. Optimal ist eine

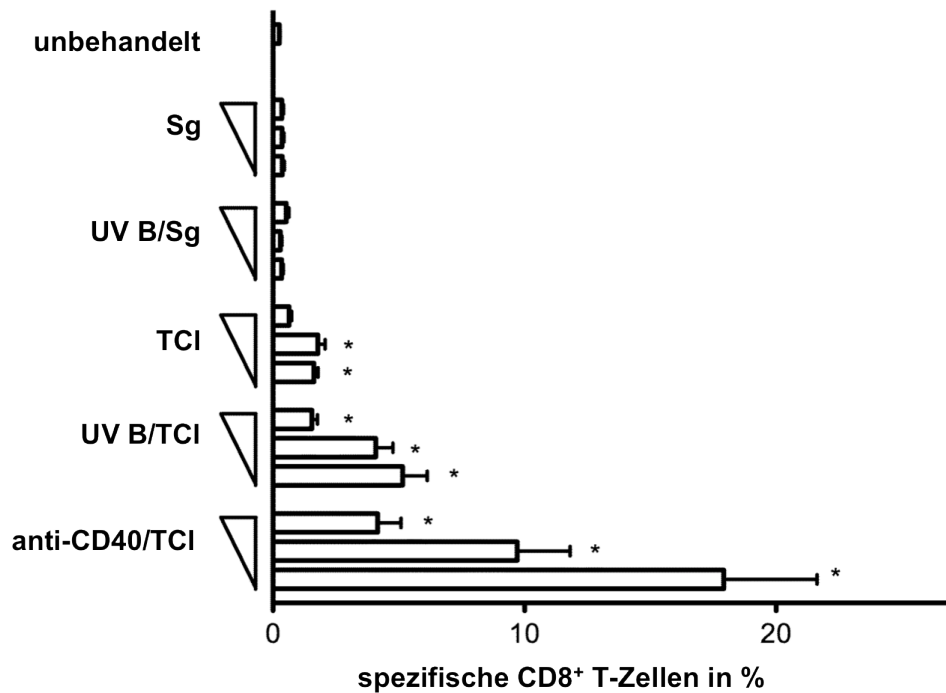
Bestrahlung 24 Stunden vor TCI. UV B 48 Stunden vor und 24 Stunden nach der Immunisierung induzieren schwächere CTL-Antworten, ebenso wie eine zweifache Bestrahlung nach der Immunisierung. Besonders deutlich werden die Unterschiede bei der Quantifizierung der spezifischen T-Zellen im Vergleich zu dem nicht sehr sensitiven Verfahren des *in vivo* Zytotoxizitätstests, bei dem die zweifache Bestrahlung ebenfalls eine verstärkte lytische Aktivität zeigt.

3.1.4 Induktion einer Gedächtnisantwort durch die verbesserte CTL-Antwort nach UV B und TCI

Wie bereits gezeigt werden konnte, wird durch TCI eine potente primäre Immunantwort ausgelöst. Allerdings kann aufgrund ineffizienter Kostimulation keine Gedächtnisantwort induziert werden. Nachdem für die Kombination der transkutanen Immunisierung mit einer UV B-Bestrahlung eine verstärkte primäre Immunantwort induziert werden konnte, wurde im nächsten Schritt die mögliche Induktion einer Gedächtnisantwort untersucht. Hierfür wurde die *in vivo* CTL-Aktivität 40 Tage nach Immunisierung der Mäuse analysiert. Verglichen wurden diese Versuchsgruppen mit unimmunisierten Tieren beziehungsweise Tieren, denen das Peptid nicht in Aldara, sondern in wirkstofffreier Salbengrundlage appliziert wurde.

Keine zytolytische Aktivität konnte erwartungsgemäß bei unimmunisierten, sowie nur mit Salbengrundlage und Peptid behandelten Mäusen induziert werden (Abbildung 10). Die alleinige transkutane Immunisierung führt ebenfalls zu keiner Ausbildung einer Gedächtnisantwort. Im Gegensatz dazu wurde durch die Kombination von UV B und TCI eine starke Gedächtnisantwort ausgelöst, die vergleichbar mit der Positivkontrolle, der Injektion von aCD40 und TCI, war. Für die Injektion von aCD40 und TCI konnte bereits zuvor die Induktion einer funktionellen Gedächtnisantwort in einem Tumormodell gezeigt werden, bei dem diese Behandlung zu einer lang anhaltenden Tumorprotektion führte.

a



b

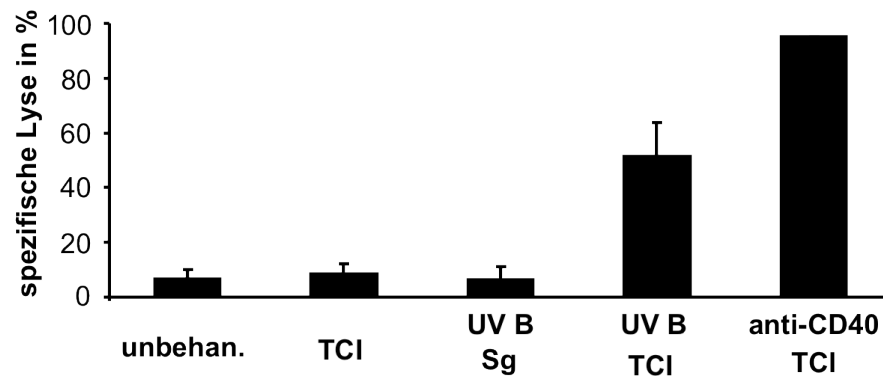


Abbildung 10 Induktion einer Gedächtnisantwort durch UV B-Bestrahlung und transkutane Immunisierung

C57BL/6-Mäuse wurden wie zuvor beschrieben transkutan immunisiert mit und ohne vorherige UV B-Bestrahlung beziehungsweise nach i.v. Injektion eines anti-CD40-Antikörpers (100 µg, Tag -3 bis 0). (a) Die Frequenz der peptidspezifische CD8⁺ T-Zellen wurde 7, 21 und 40 Tage nach der Immunisierung bestimmt. (b) 30 Tage nach der Immunisierung wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest nach Transfer von peptidbeladenen und CFSE-markierten Zielzellen und ohne erneute Restimulation durchgeführt. Die gezeigten Daten sind zusammengefasst aus 3 unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen pro Gruppe. (*) statistische Signifikanz nach Student's T Test ($p < 0,05$)

3.2 TCI und UV B führen zu einer verstärkten Protektion gegen Tumorwachstum

Für die transkutane Immunisierung konnte bereits gezeigt werden, dass sie in einem prophylaktischen Tumormodell, bei dem die Immunisierung vor oder unmittelbar nach der Inokulation stattfindet, eine ausreichende Immunantwort hervorruft, die das Anwachsen des Tumors verhindert. In einem therapeutischen Modell werden zunächst die Tumorzellen inokuliert und mit der Immunisierung erst begonnen, wenn der Tumor tastbar ist. Die durch TCI vermittelte Antwort ist in einem solchen Ansatz allerdings nicht effektiv genug. Wie bereits gezeigt werden konnte, kann durch TCI das Tumorwachstum zwar verlangsamt werden, eine Heilung der Versuchstiere war jedoch nur in seltenen Fällen möglich (Warger et al., 2007).

Da nach UV B und TCI eine verstärkte CTL-Antwort und sogar eine starke Gedächtnisantwort induziert wird, sollte dieses neue Immunisierungsprotokoll in einem therapeutischen Tumormodell getestet werden. Als Tumorzellen wurden EG.7 Zellen verwendet, die das OVA₂₅₇₋₂₆₄ Epitop exprimieren. Appliziert wurden die Zellen subkutan in die linke Flanke. Nachdem der Tumor unter der Haut tastbar war, wurden die Mäuse rasiert und wie zuvor beschrieben immunisiert.

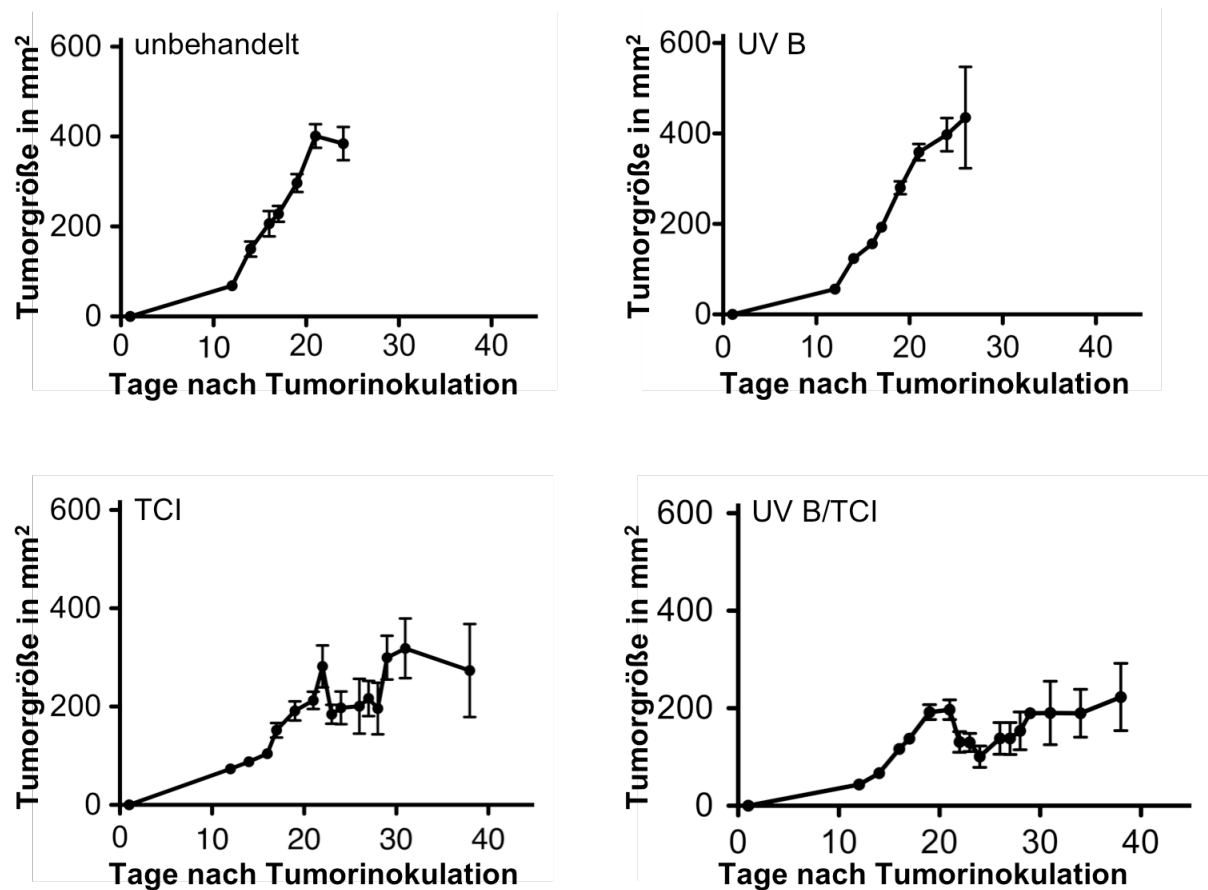


Abbildung 11 Verzögertes Tumorwachstum nach UV B und TCI in einem therapeutischen Tumoransatz

Für den therapeutischen Tumoransatz wurden EG.7 Lymphomzellen (4×10^5) subkutan in die linke Flanke der Versuchsmäuse injiziert. Mit fühlbarem Tumor (10-12 Tage nach Inokulation) setzte die wöchentliche Immunisierung ein. Die Bestimmung der Tumorgröße erfolgte jeden zweiten Tag in zwei Dimensionen. Gezeigt sind die kumulativen Ergebnisse aus 4 Experimenten (unbehandelt n= 30, UV B n= 33, TCI n= 37, UV B/TCI n= 33).

UV B alleine hatte keine Auswirkungen auf die Tumorgröße (Abbildung 11, oben rechts) vergleichbar mit der unbehandelten Gruppe (Abbildung 11, oben links). Beide Kontrollgruppen mussten nach etwa 23 Tagen aufgrund der Tumorgröße abgetötet werden (Abbildung 12). Wie bereits in anderen Experimenten gezeigt, konnte auch in diesem Ansatz eine Verzögerung im Tumorwachstum nach TCI erzeugt werden (Abbildung 11, unten links). Eine andauernde Tumorprotektion konnte allerdings nur in 8 von 37 Mäusen (22 %) induziert werden. Durch die zusätzliche UV B-Bestrahlung konnte das Wachstum des Tumors stark eingeschränkt werden (Abbildung 11, unten rechts). Von 33 Versuchsmäusen stießen 14 den Tumor vollständig ab (42 %) und blieben dauerhaft tumorfrei (Abbildung 12).

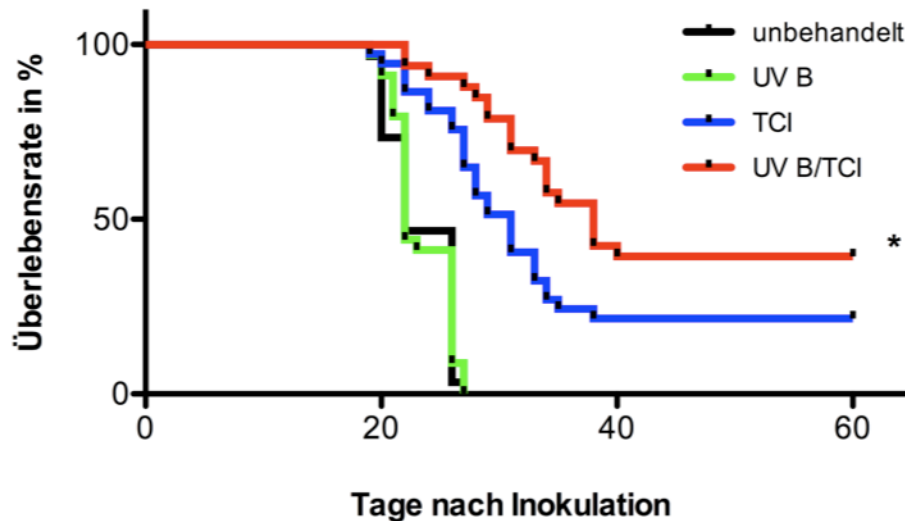


Abbildung 12 Verstärkte Tumorphrotektion induziert durch UV B/TCI

Nach Inokulation der Tumorzellen wurde die Tumorgroße jeden zweiten Tag in zwei Dimensionen vermessen. Ab einer Größe von 2 cm² wurden die Tiere gekeult. Bestimmt wurde die Überlebensrate der einzelnen Versuchsgruppen bis Tag 60 nach Tumordinokulation. (*) gibt einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen TCI und UV B/TCI nach dem Mantel-Cox Test für Überlebensanalyse an.

Im Unterschied zu TCI alleine sprachen bei UV B/TCI zunächst 100 % der Tiere auf die Immunisierung an und reagierten mit einer Verkleinerung des Tumors. Das anschließende Wachstum in einigen Fällen kann nicht auf einen Verlust der Epitop-Expression der Tumorzellen zurückgeführt werden, da eine Antikörperfärbung auf das spezifische Epitop in präparierten Tumorzellen positiv ausfiel (Abbildung 13). Als Kontrolle dienten *in vitro* kultivierte EG.7-Zellen, sowie EL-4-Zellen, die kein SIINFEKL exprimieren. Die EL-4-Zellen lassen sich wie zu erwarten nicht mit dem SIINFEKL-spezifischen 25D1.16-Antikörper anfärben. Im Vergleich dazu zeigen sowohl die *in vitro*, als auch die *ex vivo* analysierten EG.7-Zellen eine deutliche SIINFEKL-Expression.

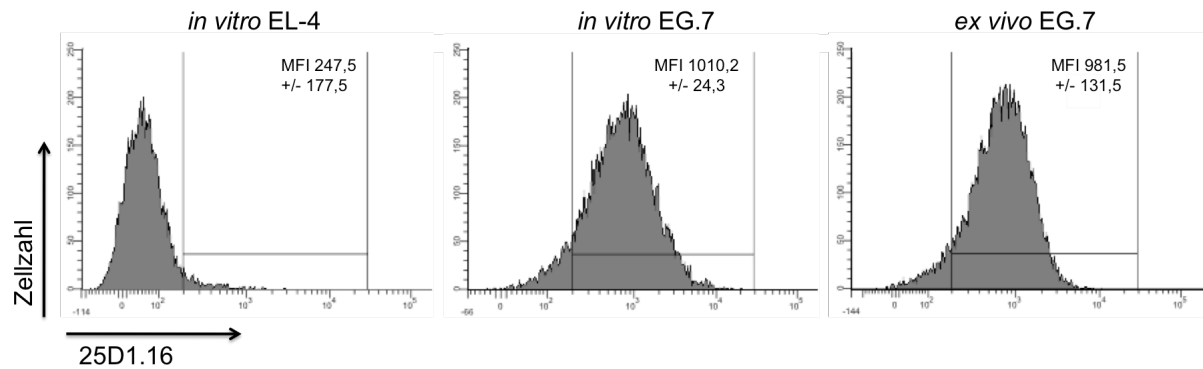


Abbildung 13 Ex vivo Analyse der Epitopexpression

Zur Bestimmung der Epitopexpression von Tumoren, die nach anfänglicher positiver Reaktion auf die Immunisierung schließlich doch an Größe zunahm, wurden Zellsuspensionen aus den präparierten Tumoren hergestellt und mit einem 25D1.16-Antikörper auf die SIINFEKL-Expression überprüft. Als Kontrolle dienten *in vitro* kultivierte EG.7-Zellen und EL-4-Zellen. Letztere exprimieren kein SIINFEKL. MFI= mittlere Fluoreszenzintensität

3.3 Mechanismen der CTL-Aktivierung

3.3.1 Die Signaltransduktion nach TCI bzw. UV B und TCI ist abhängig von TLR 7

Um die Rolle des TLR 7 näher zu untersuchen, wurden transgene Mäuse genutzt, die keinen TLR 7-Rezeptor (TLR7^{-/-}) besitzen. Diese wurden zusammen mit Wildtypkontrollen wie bereits beschrieben immunisiert und anschließend die Population an spezifischen T-Zellen und die Lyse durch zytotoxische T-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde eine Gruppe integriert, die zwar UV B-bestrahlt wurde, anschließend aber nur mit Salbengrundlage und Peptid immunisiert wurde.

Die immunisierten TLR7^{-/-}-Mäuse (Abbildung 14 a, weiße Balken) zeigen eine reduzierte Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (Abbildung 14 a, schwarze Balken). Sowohl in den Wildtypkontrollen als auch in den transgenen Mäusen kommt es zu keiner Immunantwort nach UV-Bestrahlung und Behandlung mit Salbengrundlage und Peptid. Diese Gruppen sind vergleichbar mit den Gruppen der unbehandelten Mäuse. Durch das Fehlen des TLR 7 kommt es in den transgenen Mäusen auch nach UV B und TCI zu keiner Entwicklung einer Immunantwort.

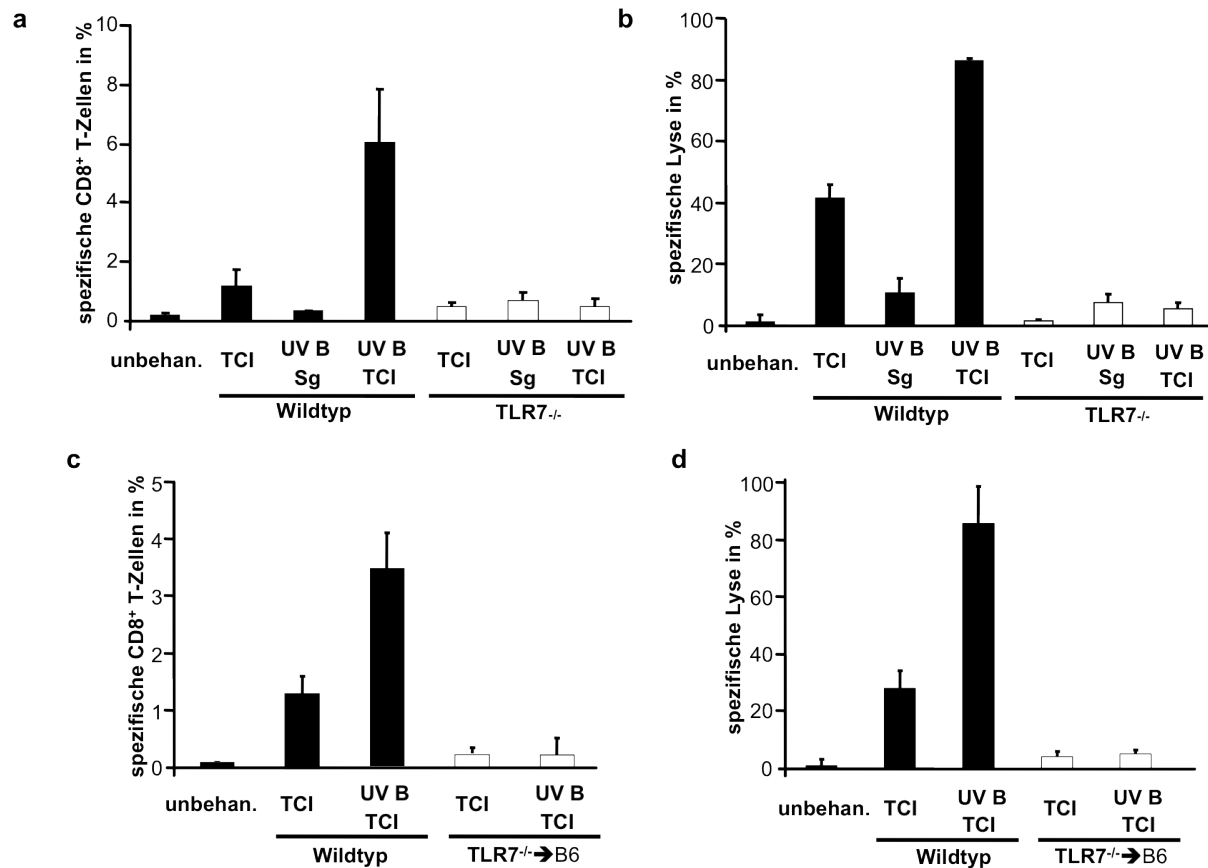


Abbildung 14 Durch das Fehlen des TLR 7-Rezeptors kann keine Immunantwort nach TCI bzw. UV B/TCI erzeugt werden

Wildtyp, TLR7^{-/-}-Mäuse und Chimere aus TLR7^{-/-}-Knochenmark in C57BL/6-Mäuse wurden wie zuvor beschrieben mit TCI beziehungsweise UV B/TCI immunisiert. Wie angegeben wurde eine Gruppe UV-bestrahlt und mit Salbengrundlage (Sg) und Peptid behandelt. Analysiert wurde (a) die Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer-Färbung und (b) die Lyse von injizierten Zielzellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstests zwischen Wildtypen und TLR7^{-/-}-Mäusen beziehungsweise zwischen Wildtypen und Chimeren in (c) und (d).

Wie nach den Ergebnissen der Tetramer-Färbung zu erwarten, ergibt die Auswertung des *in vivo* Zytotoxizitätstests (Abbildung 14 b), dass die injizierten Zielzellen in den TLR7^{-/-}-Mäusen nur zu einem geringen Teil lysiert werden können. Der Prozentsatz liegt dabei nur geringfügig über dem Hintergrund der unbehandelten Kontrolle. Auch nach Behandlung mit UV B und Salbengrundlage kann sowohl bei den Wildtypen, als auch bei den transgenen Versuchstieren keine Lyse der Zielzellen erreicht werden. Um die Rolle des TLR 7 genauer zu bestimmen, wurden Chimere aus Wildtyp-Mäusen als Rezipienten und TLR7^{-/-}-Mäusen als Knochenmarksspende zur Immunisierung verwendet. Die daraus resultierenden Tiere besitzen den TLR 7-Defekt ausschließlich auf Zellen, die aus dem Knochenmark hervorgehen. Auch hier wurde die Anzahl der peptidspezifischen T-Zellen im Blut quantifiziert

(Abbildung 14 c), sowie die zytolytische Aktivität nach Transfer von peptidbeladenen Zielzellen (Abbildung 14 d). Durch die fehlende Expression des TLR 7 auf den hämatopoetischen Zellen kann in den Knochenmarkschimeren ebenfalls keine Immunantwort induziert werden, verifiziert durch eine geringe Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen, sowie eine vernachlässigbare zytolytische Aktivität.

3.3.2 Für die Signalweiterleitung in der Zelle wird das Adapter-Molekül MyD88 benötigt

Da es neben der Signaltransduktion über MyD88 auch einen MyD88-unabhängigen Weg gibt, wurde ebenfalls die Rolle des Adapter-Moleküls MyD88 nach TCI und UV B/TCI näher untersucht. Für diese Fragestellung wurde ein transgener Mausstamm benutzt, dem das MyD88-Molekül fehlt (MyD88^{-/-}). Die Immunisierung und Analyse erfolgte wie zuvor beschrieben.

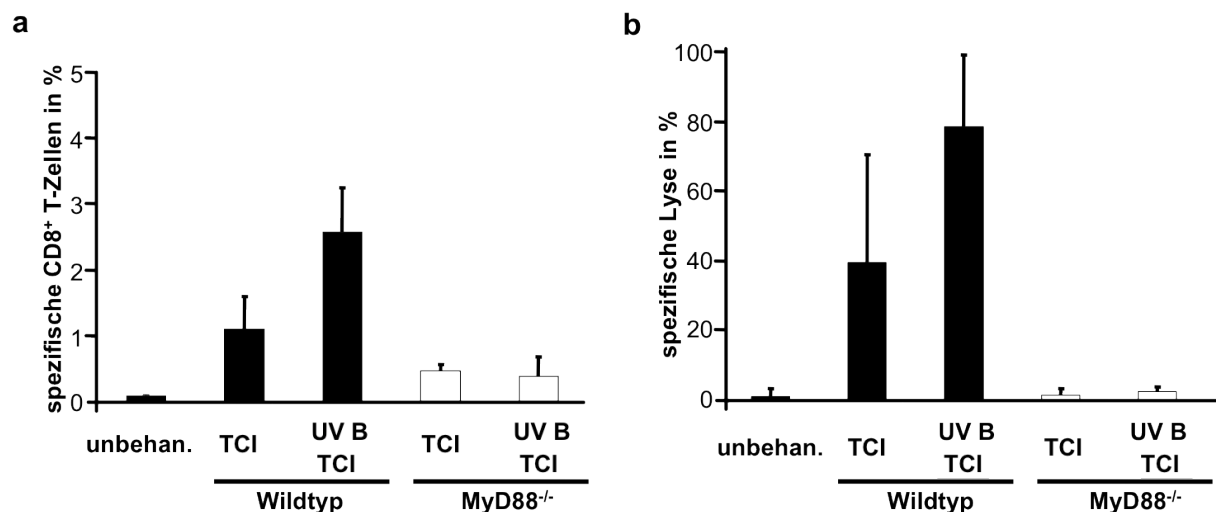


Abbildung 15 Die Signaltransduktion nach TCI und UV B/TCI ist MyD88-abhängig

Die Rolle des Adapter-Moleküls MyD88 wurde mit Hilfe von transgenen MyD88^{-/-}-Mäusen untersucht. Nach Immunisierung der Mäuse wie zuvor beschrieben, wurde die Anzahl der spezifischen T-Zellen mittels Tetramer-Färbung (a) und die spezifische Lyse von Ziel-Zellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest (b) bestimmt.

Durch den Defizit der transgenen Mäuse in der Ausprägung des MyD88-Proteins kann weder die Bildung von peptidspezifischen T-Zellen (Abbildung 15 a) induziert werden, noch ist eine ausreichende Menge an zytotoxischen T-Zellen vorhanden, die

die adoptiv transferierten peptidbeladenen Zellen lysieren können (Abbildung 15 b). Alle Werte sind vergleichbar mit dem Niveau der unbehandelten Kontrolle. Es erfolgt also keine adäquate Immunisierung, die sowohl nach TCI als auch nach UV B/TCI MyD88-abhängig ist.

3.3.3 Die verstärkenden Effekte, induziert durch UV B-Bestrahlung, werden nicht durch die Freisetzung endogener TLR 4 vermittelt

Über die Wirkungsweise von UV B gibt es viele verschiedene Informationen. Der Kontakt mit UV B führt unter anderem zu DNA-Schäden, der Produktion von löslichen Mediatoren, wie IL-10, TNF- α , IL-4 und zur Inhibition von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche. Außerdem gibt es Hinweise, dass die Peptidpräsentation von APCs nach UV-Bestrahlung vermindert wird. Die meisten der generierten Ergebnisse versuchen die immunsuppressiven Effekte zu erklären, die durch UV B induziert werden. Bisher gibt es nur wenige Ansätze, die der UV B-Strahlung einen verstärkenden Effekt zuordnen. Hierzu zählt die vermehrte Auswanderung von Zellen in drainierende Lymphknoten und die Produktion des Vitamins D3, welches vorbeugend gegen Krebs wirken kann.

Im angewandten Immunisierungsprotokoll wird durch die UV B-Bestrahlung eine Verstärkung der Immunantwort nach TCI ausgelöst. Dieser Effekt ist bislang ungeklärt. Ein erster möglicher Hinweis aus der Literatur ist die Tatsache, dass Mäuse mit einem genetischen Defekt in der kodierenden Genomstelle für den TLR 4 keine Immunsuppression nach Bestrahlung mit UV B zeigen (Yoshikawa and Streilein, 1990). Dies könnte bedeuten, dass TLR 4 für die durch UV B-induzierten Reaktionen unerlässlich ist. Zur Erörterung dieser Fragestellung wurden zunächst Tiere verwendet, deren Signalweiterleitung des MyD88-unabhängigen Signalwegs, durch einen Knock-out des Adaptermoleküls TRIF, unterbrochen ist. Dadurch konnte ebenfalls eine mögliche Rolle des TLR 4 untersucht werden. So könnten die Tiere zwar mit ihrem TLR 4 auf die Immunisierung, speziell auf die UV B-Bestrahlung, ansprechen, wären aber nicht in der Lage, eine TRIF-abhängige Signalkaskade auszulösen.

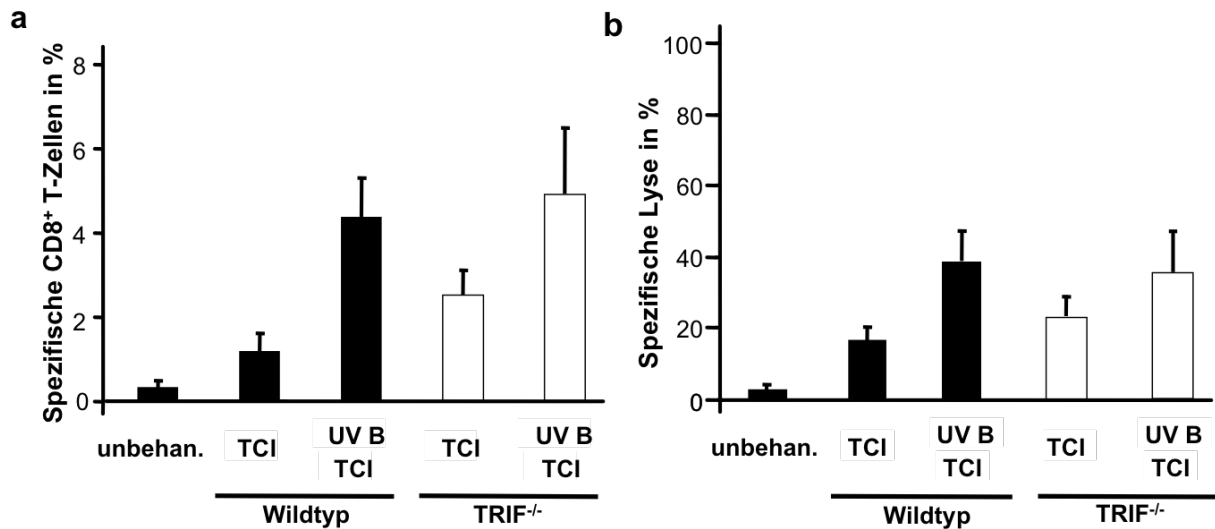


Abbildung 16 TRIF-abhängige Signale können den Verstärkungseffekt nach UV B nicht erklären

Die Anzahl an CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen (a) und die spezifische Lyse von Zielzellen (b) im Blut wurde sieben Tage nach Immunisierung von Wildtyp- und transgenen TRIF^{-/-}-Mäusen analysiert. Die CFSE-markierten Zielzellen wurden 6 Stunden vor der Analyse adoptiv transferiert. Gezeigt sind die gemittelten Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten (n= 9). Die Unterschiede zwischen den Wildtyp- und TRIF^{-/-}-Versuchsgruppen sind nicht signifikant.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, zeigt die Analyse der Tetramer⁺ Zellen (Abbildung 16 a), sowie die spezifische Lyse von Zielzellen in einem Zytotoxizitätstest (Abbildung 16 b) nach UV B/TCI auch in TRIF^{-/-}-Mäusen Werte, ähnlich denen der Wildtyp-Kontrollen. Allerdings lassen sich nach transkutaner Immunisierung der TRIF^{-/-}-Mäuse eine vermehrte Anzahl an peptidspezifischen T-Zellen feststellen im Vergleich zu der korrespondierenden Wildtyp-Versuchsgruppe. Dies schlägt sich auch im *in vivo* Zytotoxizitätstest nieder. Hier werden geringfügig mehr Zielzellen lysiert als nach TCI in C57BL/6-Mäusen. Trotzdem bleibt der UV B-abhängige Verstärkungseffekt auch in TRIF^{-/-}-Mäusen bestehen.

Als nächster Schritt wurden TLR4^{-/-}-Mäuse verwendet und, wie zuvor beschrieben, immunisiert. Wie Abbildung 17 zeigt, wird in den transgenen Tieren durch TCI eine Immunantwort ausgelöst, vergleichbar mit der in Wildtyp-Mäusen. Die Quantifizierung der peptidspezifischen T-Zellen durch Tetramer-FACS-Färbung lässt keinen Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren erkennen.

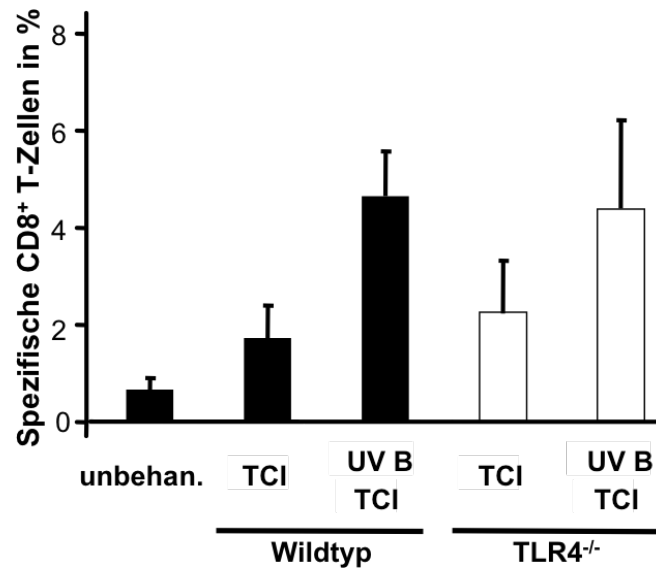


Abbildung 17 Die verstärkte Immunantwort nach UV B/TCI ist nicht TLR 4 abhängig

TLR4^{-/-} und C57BL/6-Tiere wurden transkutan mit und ohne zusätzlicher UV B-Bestrahlung immunisiert. Die Analyse der primären Immunantwort erfolgte mittels Quantifizierung der SIINFEKL-Tetramer⁺-CD8⁺-T-Zellen. Die dargestellten Ergebnisse sind zusammengefasst aus 4 unabhängigen Experimenten mit n=12

Eine zusätzliche Signalkaskade über TLR 4 und das Adaptermolekül TRIF scheint demnach keine Erklärung für den induzierten UV-Effekt darzustellen.

3.4 Beitrag verschiedener Zelltypen zur Induktion einer Immunantwort nach TCI bzw. UV B/TCI

Die transkutane Immunisierung kann verschiedenste Zelltypen beeinflussen, die wiederum zur Induktion einer Immunantwort führen. Der Beitrag und das genaue Zusammenspiel der unterschiedlichen Zellen konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Bereits bekannt ist, dass Mastzellen eine wichtige Rolle spielen. Bei Versuchen mit Mastzell-defizienten Mäusen kam es zu einer stark verminderten Immunantwort nach transkutaner Immunisierung (Heib et al., 2007). Durch das Auftragen der Creme auf die Haut können dort vor allem die in der Epidermis sitzenden Langerhans Zellen und die in der Dermis sitzenden DC-Populationen (dDCs) für die Induktion der Immunantwort von Bedeutung sein. Um die Rolle der

verschiedenen DC-Populationen bei TCI und UV B/TCI näher zu untersuchen, wurden verschiedene transgene Mausstämme benutzt.

Da durch TCI beziehungsweise die UV B-Bestrahlung eine Inflammation von Zellen ausgelöst werden kann, sollte ebenfalls die Beteiligung von Granulozyten untersucht werden.

3.4.1 Vermehrte Immigration von CD11c⁺-DCs in drainierende Lymphknoten

Für das Priming von CD8⁺ T-Zellen kommen verschiedene DC-Subtypen in Frage, vor allem Langerhans Zellen (LC), dermale DCs (dDC) und Langerin⁺ dDC (Bennett et al., 2005; Bursch et al., 2007a; Ginhoux et al., 2007; Poulin et al., 2007). Um den Beitrag verschiedener DC-Populationen zu analysieren, wurde die Anzahl und der Phänotyp der DCs nach TCI beziehungsweise UV B/TCI und vorheriger Behandlung mit einer FITC-Lösung in den Lymphknoten (LN) bestimmt.

Lediglich die Anzahl der FITC⁺CD11c⁺DCs (Abbildung 18 a) in den drainierenden LN, nicht aber die der Langerin⁺DCs (Abbildung 18 b), wird nach der Immunisierung erhöht. Weiter verstärkt wird diese Einwanderung von Zellen durch die zusätzliche UV B-Bestrahlung. Dieser Effekt ist ausschließlich in den drainierenden LN ausgeprägt, in den nicht-drainierenden LN kommt es zu keiner Veränderung DC-Zahlen. Der Phänotyp der FITC⁺DCs ließ sich für einen Großteil der Zellen auf CD11c⁺CD11b⁺Langerin⁻ bestimmen. Diese Zellen exprimieren hohe Level an CD40 und CD86 (Abbildung 18 c), vergleichbar mit dem Phänotyp von aktivierten dermalen DCs (Heath and Carbone, 2009).

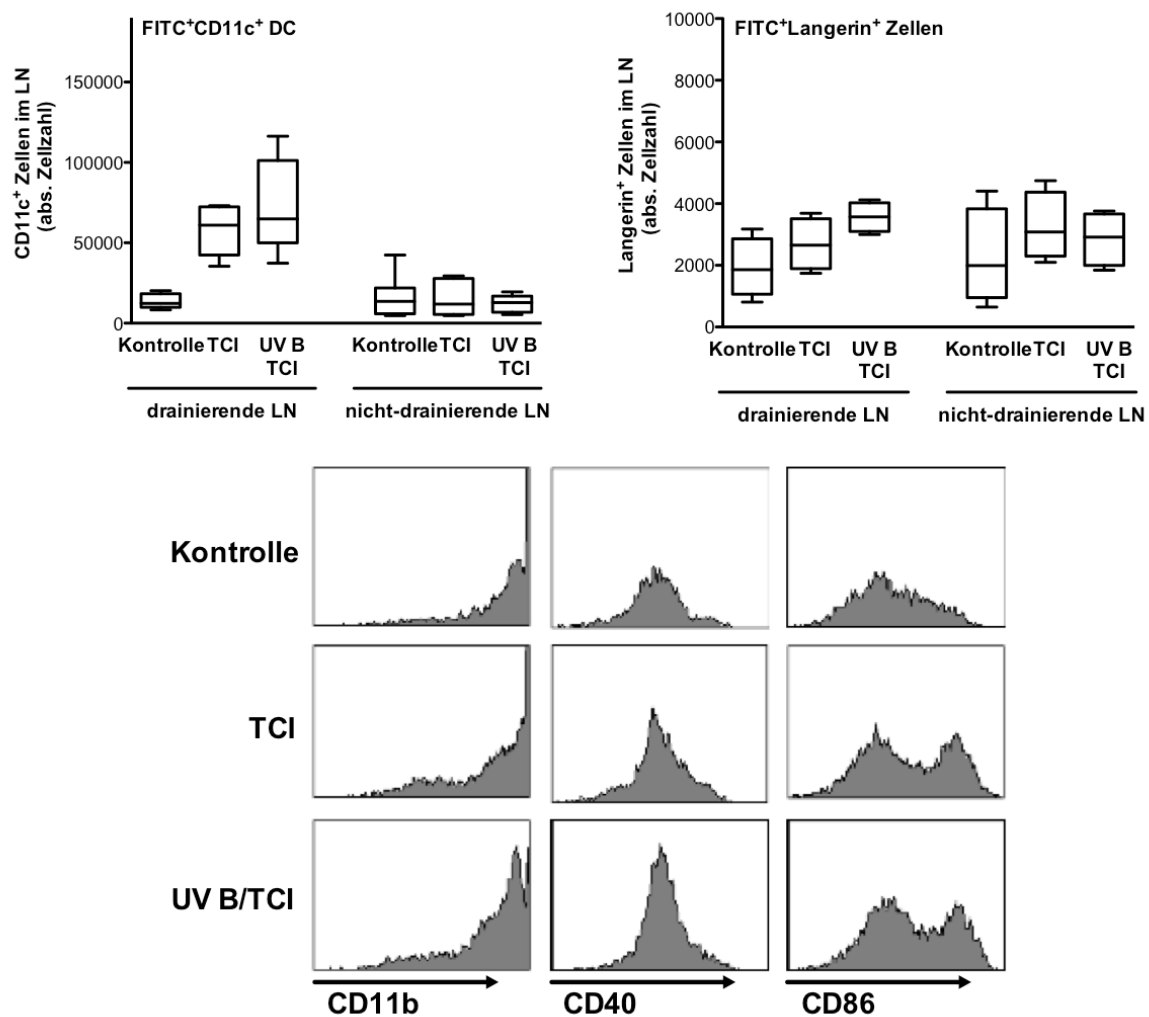


Abbildung 18 Anreicherung von CD11c⁺ DCs nach TCI und UV B/TCI

Wildtyp-Mäusen wurde eine FITC-Lösung auf den rasierten Rücken aufgetragen. Anschließend wurden die Tiere wie zuvor beschrieben mit TCI und UV B/TCI immunisiert. Nach 48 Stunden wurden die drainierenden LN auf die Einwanderung von FITC-markierten (a) CD11c⁺MHC II⁺ DCs und (b) Langerin⁺MHC II⁺ Zellen untersucht (Median, Quartile, Spannweite). (c) Der Phänotyp der FITC⁺CD11c⁺MHC II⁺ Zellen wurde 48 Stunden nach der angegebenen Immunisierung bestimmt. Zur präziseren Analyse wurden zuvor B- und T-Zellen sowie tote Zellen durch gaten auf PI⁺CD19⁻CD90⁻ Zellen ausgeschlossen. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente, durchgeführt mit n=3 Mäusen pro Gruppe. (*) gibt eine Differenz (p< 0,05) bei einem Mann-Whitney U-Test zwischen drainierenden und nicht-drainierenden Lymphknoten an.

3.4.2 Nach Depletion der CD11c⁺ Zellen kann kein Priming mehr erfolgen

Um die Rolle der CD11c⁺ dDCs zu beleuchten, werden CD11c-DTR Mäuse eingesetzt. Diese besitzen einen Diphtherietoxin (DT)-Rezeptor unter dem CD11c-Promotor. Die Tiere werden als Knochenmarkspender für letal bestrahlte C75BL/6

Mäuse genutzt. Die resultierenden Tiere tragen den DT-Rezeptor in allen Zellen, die aus dem Knochenmark repopulieren und $CD11c^+$ sind. Nachdem alle Zellen aus dem Knochenmark neu gebildet wurden (8 Wochen nach Knochenmarkstransfer), wurden die Mäuse mit und ohne Depletion mit TCI, beziehungsweise UV B/TCI immunisiert. Bestimmt wurden wieder die Anzahl der spezifischen T-Zellen mittels Tetramer-Färbung (Abbildung 19 a) und die Lyse von injizierten Zielzellen (Abbildung 19 b). Das Ergebnis stellt sich sehr deutlich dar.

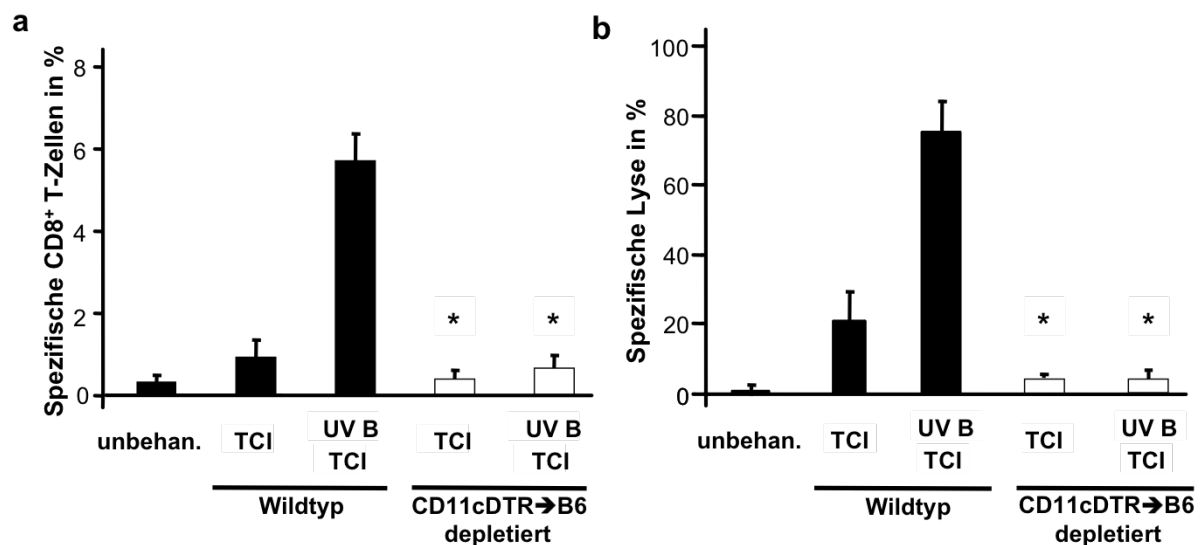


Abbildung 19 Depletion der $CD11c^+$ Zellen verhindert das Priming von T-Zellen

Letal bestrahlte C57BL/6-Mäuse wurden durch Transplantation von CD11cDTRxBL/6-Knochenmark rekonstituiert. Die Spendertiere besitzen einen Diphtherietoxin (DT)-Rezeptor unter dem CD11c-Promotor. Durch Injektion von DT werden $CD11c^+$ Zellen depletiert. Verabreicht wurden 300 ng DT an den Tagen -2, 0, 2 und 4. Analysiert wurde die Anzahl an peptidspezifischen T-Zellen und die zytolytische Aktivität. (*) bezeichnet eine Differenz ($p < 0,05$) eines ungepaarten Student's t test

Nach Depletion der $CD11c^+$ Zellen kann kein Priming von T-Zellen im Lymphknoten erfolgen. Es kann keine Immunantwort ausgelöst werden. Allerdings lässt sich in diesem Ansatz keine genauere Aussage über den Beitrag einzelner $CD11c^+$ Zellpopulationen treffen.

3.4.3 Die Induktion einer Immunantwort wird nur teilweise durch Langerin⁺ Zellen vermittelt

Die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen nach transkutaner Immunisierung benötigt den Kontakt mit professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Da bei TCI der Wirkstoff und das Antigen direkt auf die Haut aufgetragen werden, spielen bei der Peptidpräsentation, beziehungsweise dem Peptidtransport zu den drainierenden Lymphknoten, die APCs der Haut eine entscheidende Rolle. Neben den Langerin-exprimierenden Langerhans Zellen (LCs), die sich in der Epidermis befinden, scheinen noch andere Subpopulationen von DCs von Bedeutung zu sein. Zu nennen sind dabei CD11c⁺ dermale DCs (dDCs) und andere Langerin⁺ Zellen, die sich in der Dermis und als residente Zellen in den Lymphknoten befinden. Langerin⁺ Zellen können in Langerin-DTREGFP Mäusen durch intra peritoneale (i.p.) Injektion des Diphtherietoxins (DT) spezifisch depletiert werden (Abbildung 20), da die Tiere einen Diphtherietoxin Rezeptor unter dem Langerin-Promotor besitzen.

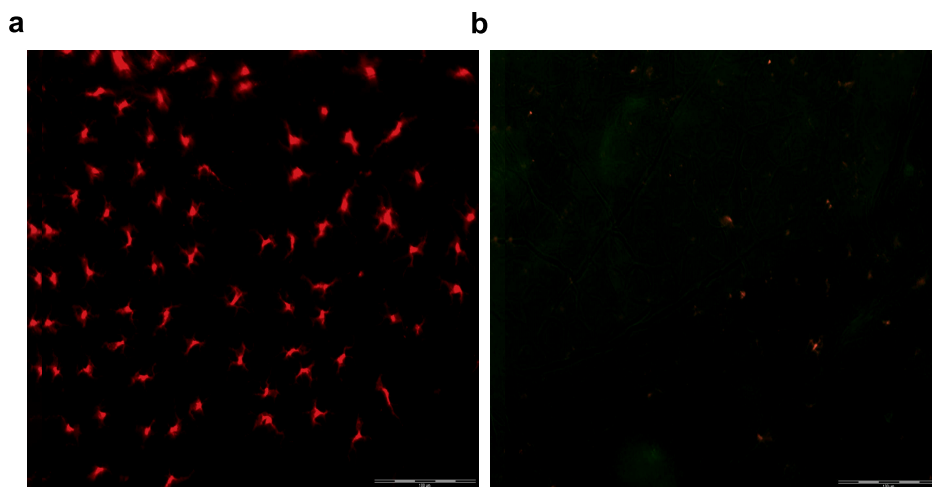


Abbildung 20 Depletion der LCs in Lang-DTREGFP-Mäusen

Lang-DTREGFP-Mäuse besitzen einen Diphtherietoxin (DT)-Rezeptor unter dem Langerin-Promotor. Durch Injektion von 300 ng DT i.p. können die Langerin⁺ Zellen depletiert werden. Nach der Präparation von Epidermis der Ohren, können LCs durch Färbung von MHC II sichtbar gemacht werden. Dies sind die einzigen MHC II⁺-Zellen der Epidermis. a) Vor der Depletion lassen sich viele LCs in der Epidermis detektieren. b) Nach der Depletion ist die Epidermis frei von LCs.

Zunächst wurden die Mäuse mit TCI oder UV B/TCI behandelt beziehungsweise unbehandelt gelassen. Die Mäuse besaßen entweder die gesamte Vielfalt an Zellen oder wurden mit Hilfe der DT-Injektion von allen Langerin⁺ Zellen befreit. Die Analyse

der Immunantwort sieben Tage nach Beginn der Immunisierung zeigt, dass die Depletion aller Langerin⁺ Zellen zu einer Reduktion der Immunantwort führt. Die Anzahl der peptidspezifischen T-Zellen (Daten nicht gezeigt) und die Lyse der injizierten Zielzellen (Abbildung 21 a) wurde durch das Fehlen von Langerin⁺ Zellen um 50 % reduziert im Vergleich zu den Kontrollmäusen.

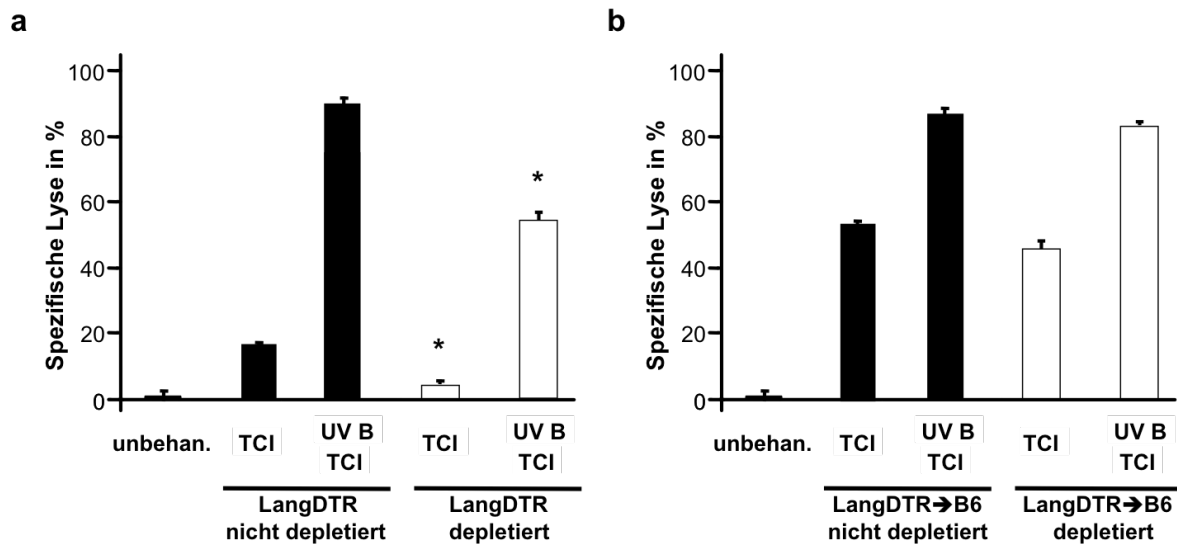


Abbildung 21 Aus dem Knochenmark stammende Langerin⁺-Zellen sind für TCI nicht essentiell

Die zytotoxische Aktivität von Lang-DTREGFP-Mäusen und von Knochenmarkchimären aus letal bestrahlten C57BL/6-Mäuse und Lang-DTREGFP-Mäuse wurde 7 Tage nach der angegebenen Immunisierung analysiert. Die Immunisierung erfolgte mit und ohne vorherige DT Applikation (300 ng/Maus, Lang-DTREGFP-Mäuse Tag -2, Chimere Tag -3 bis 4). Die gemittelten Ergebnisse stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit n= 9. (*) bezeichnet eine Differenz (p< 0,05) eines ungepaarten Student's t test.

Da in Langerin-DTREGFP-Mäusen nach DT-Injektion alle Langerin⁺ Zellen depletiert werden, lässt sich die Rolle der verschiedenen Langerin-exprimierenden Zellen in diesem Ansatz nicht klären. Hierfür wurden Knochenmarkchimere hergestellt. Als Rezipienten dienten C57BL/6 Mäuse. Diese wurden letal bestrahlt und mit Knochenmark aus Langerin-DTREGFP-Mäusen rekonstituiert. Es resultieren Mäuse, deren aus dem Knochenmark stammende Langerin⁺ Zellen den DT-Rezeptor tragen, und somit depletiert werden können. Davon ausgenommen sind die in der Epidermis sitzenden LCs. Diese sind strahlenresistent und haben einen Wildtyp-Phänotyp. An diesen Chimären wurde das Immunisierungsprotokoll wie bereits beschrieben angewandt. Dabei erhielt eine Gruppe der Mäuse eine DT-Injektion. Wie in Abbildung 21 b gezeigt, hat die Depletion der aus dem Knochenmark stammenden Langerin⁺ Zellen keine Auswirkung auf die Ausprägung der Immunantwort. Es können gleiche

Mengen an spezifischen T-Zellen in depletierten und nicht-depletierten Mäusen detektiert werden. Die Lyse der peptidbeladenen Zielzellen stellt sich in beiden Gruppen ebenfalls gleich dar. Daraus lässt sich im Bezug auf Langerin⁺ Zellen auf eine ausschließliche Rolle der LCs in der Epidermis schließen, nicht aber auf eine Rolle der dermalen Langerin⁺ Zellen.

3.4.4 Erhöhte Produktion von IL-12 in drainierenden Lymphknoten

Zur Klärung der Mechanismen der verstärkten CTL-Antwort nach UV B/TCI wurde zusätzlich zu der Anzahl der verschiedenen DC-Populationen die Produktion von IL-12 in den drainierenden beziehungsweise nicht-drainierenden Lymphknoten immunisierter gegenüber unbehandelter Mäuse untersucht. Erste Hinweise für einen Zusammenhang zwischen UV B/TCI und einer IL-12-Induktion publizierten Thatcher und Kollegen (Thatcher et al., 2006), die eine vermehrte Produktion von IL12p70 durch CD11c⁺DCs beobachten konnten.

Abbildung 22 zeigt eine geringe, aber signifikante Induktion von IL-12 nach TCI, vor allem aber nach UV B/TCI in den drainierenden Lymphknoten. In den nicht-drainierenden Lymphknoten der immunisierten Mäuse bleibt die IL-12-Rate auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle.

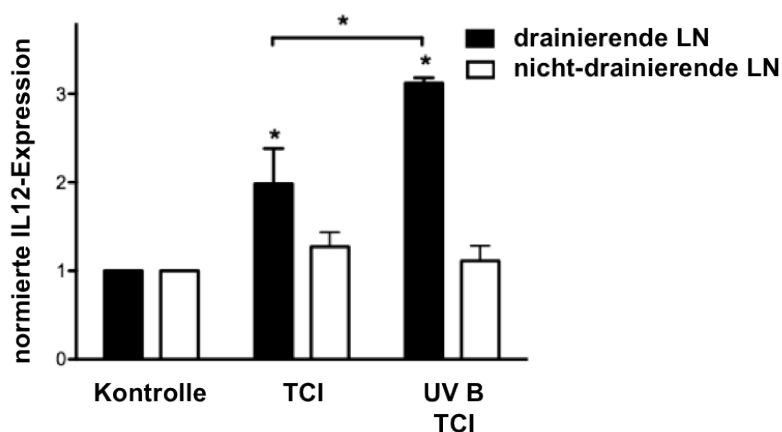


Abbildung 22 Induktion von IL-12 nach TCI und UV B/TCI

48 Stunden nach der angegebenen Immunisierung wurden die drainierenden (schwarze Balken) und nicht-drainierenden (weiße Balken) Lymphknoten präpariert und die Induktion von IL-12p35 mRNA mittels qRT-PCR bestimmt. (*) Signifikante Differenz ($p < 0,05$) bei einem Mann-Whitney U Test zwischen drainierenden und nicht-drainierenden Lymphknoten.

Zur weiteren Betrachtung von IL-12 in diesem Immunisierungssystem wurden transgene Mäuse benutzt, die einen Defekt in ihrem IL-12 tragen (IL-12^{-/-}). Durch einen in vivo Zytotoxizitätstest konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von IL-12 keinen beeinträchtigenden Einfluss auf die Induktion einer Immunantwort nach TCI und UV B/TCI hat. Die zytolytische Aktivität ist in den transgenen Tieren (weiße Balken) und in den Wildtypen (schwarze Balken) gleich ausgeprägt (Abbildung 23).

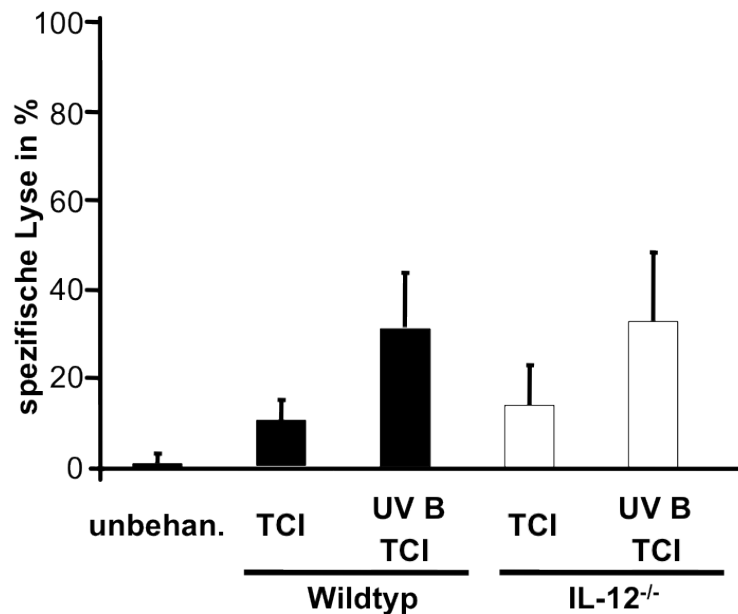


Abbildung 23 Immunisierung transgener IL12^{-/-}-Mäuse zeigt keine Abweichung zu Wildtypen

C57BL/6- (schwarze Balken) und IL-12^{-/-}-Mäuse (weiße Balken) wurden wie angegeben immunisiert. 7 Tage nach der Immunisierung erfolgte der Transfer von peptidbeladenen und CFSE-markierten Zielzellen. Die Analyse der zytolytischen Aktivität erfolgte 6 Stunden nach Injektion der Zellen.

3.4.5 UV B/TCI ist abhängig von Typ I Interferonen

Kamath und Kollegen konnten eine bedeutende Rolle für Typ I Interferone nach TLR-Stimulation zeigen (Kamath et al., 2005). IFN α/β wird von DCs ausgeschüttet, die dadurch eine T-Zell-Aktivierung induzieren können. Die Experimente wurden in einem Mausmodell durchgeführt, bei dem Wildtyp- und IFN α/β R^{-/-}-Mäuse systemisch (i.v. Injektion) mit verschiedenen TLR-Liganden immunisiert wurden. Für die Applikation des TLR 7-Liganden R848 konnte eine Abhängigkeit der Immunisierung von Typ I Interferonen gezeigt werden.

Auch im angewandten Immunisierungsmodell könnten Typ I Interferone eine zentrale Rolle spielen. Hierfür wurden Wildtyp- und $\text{IFN}\alpha/\beta\text{R}^{-/-}$ -Mäuse wie zuvor beschrieben immunisiert.

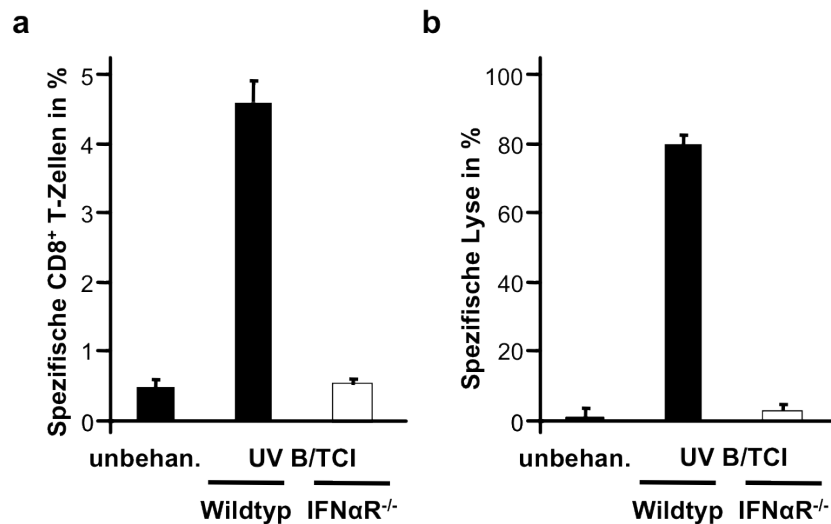


Abbildung 24 Die Induktion der CTL-Antwort ist Typ I Interferon abhängig

C57BL/6- (schwarze Balken) und $\text{IFN}\alpha\text{R}^{-/-}$ -Mäuse (weiße Balken) wurden wie angegeben immunisiert. 7 Tage nach der Immunisierung erfolgte (a) die Analyse von peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer-Färbung sowie (b) der Transfer von peptidbeladenen und CFSE-markierten Zielzellen für einen *in vivo* Zytotoxizitätstest. Die Analyse der zytolytischen Aktivität erfolgte 20 Stunden nach Injektion der Zellen.

Wie durch die Quantifizierung von peptidspezifischen T-Zellen (Abbildung 24 a) und die Analyse der zytolytischen Aktivität (Abbildung 24 b) deutlich gezeigt werden konnte, ist die Induktion einer CTL-Antwort im angewandten Immunisierungsmodell abhängig von Typ I Interferonen. In den transgenen Tieren konnten keine induzierten CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, vergleichbar mit der unbehandelten Wildtyp-Kontrolle. Im Einklang dazu steht das Ergebnis des *in vivo* Zytotoxizitätstest, in dem lediglich die immunisierte Wildtyp-Gruppe eine starke zytolytische Aktivität aufweist. Wohingegen sich nach Immunisierung der transgenen Tiere keine Lyse der Zielzellen einstellt.

3.4.6 Die Depletion von GR-1⁺ Zellen führt zu einem vollständigen Ausbleiben einer Immunantwort

Bereits im Jahr 2004 konnte durch Palamara und Kollegen gezeigt werden, dass eine tägliche Behandlung mit Imiquimod auf den Ohren zu einer lokalen Einwanderung von Zellen und somit zu einer messbaren Ohrschwellung führt (Palamara et al., 2004b). Identifiziert werden konnten verschiedene Leukozyten wie dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten. Für Granulozyten ist in diesem Zusammenhang kaum mehr bekannt, außer, dass sie ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung von Mastzellen nach Imiquimod-Applikation spielen können.

Um die Rolle der Granulozyten im angewandten Immunisierungsprotokoll näher zu beleuchten, wurde ein depletierender Antikörper (RB68C5) eingesetzt, welcher GR1⁺-Zellen erkennt (Abbildung 25). Die Antikörper-Behandlung erfolgte über drei aufeinanderfolgende Tage, beginnend einen Tag vor der UV B-Bestrahlung. Innerhalb von 24 Stunden kann keine GR1⁺-Zellpopulation im Blut beziehungsweise der Milz mehr detektiert werden.

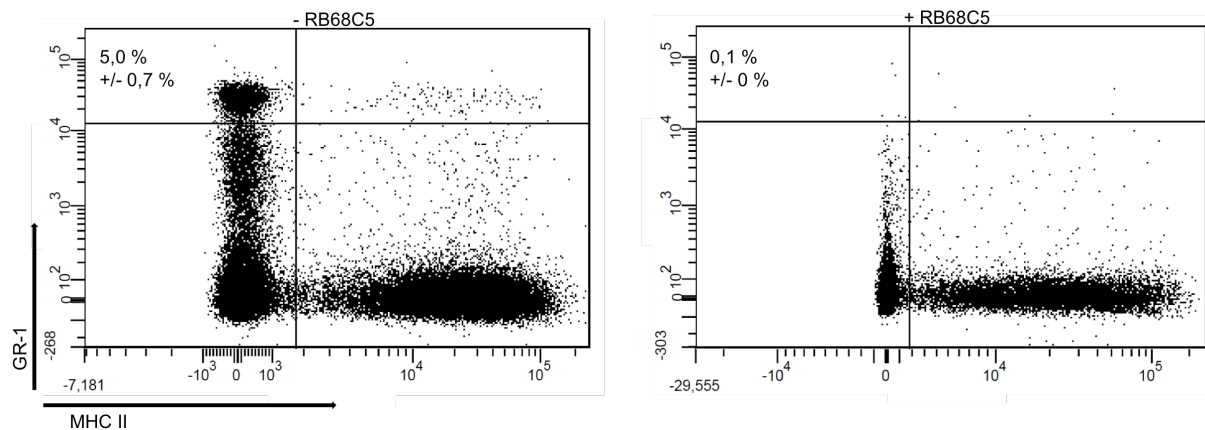


Abbildung 25 Depletion der Granulozyten mittels RB68C5

Zur FACS-Analyse von Milzzellen wurden die lebenden Zellen auf die Expression von GR-1 und MHC II hin untersucht. Intra peritoneale Injektion des GR-1-spezifischen RB68C5-Antikörpers (150 µg/Maus) führt nach 24 Stunden zur vollständigen Depletion der Granulozyten (GR1⁺MHC II⁺).

Da von einem schnellen Transport des Peptids und einem raschen Priming der T-Zellen im Lymphknoten ausgegangen wird, können die zu untersuchenden Zellen direkt nach der Immunisierung wieder vorhanden sein. Eine weiterführende Depletion über den Zeitpunkt der Immunisierung hinaus ist nicht von Nöten.

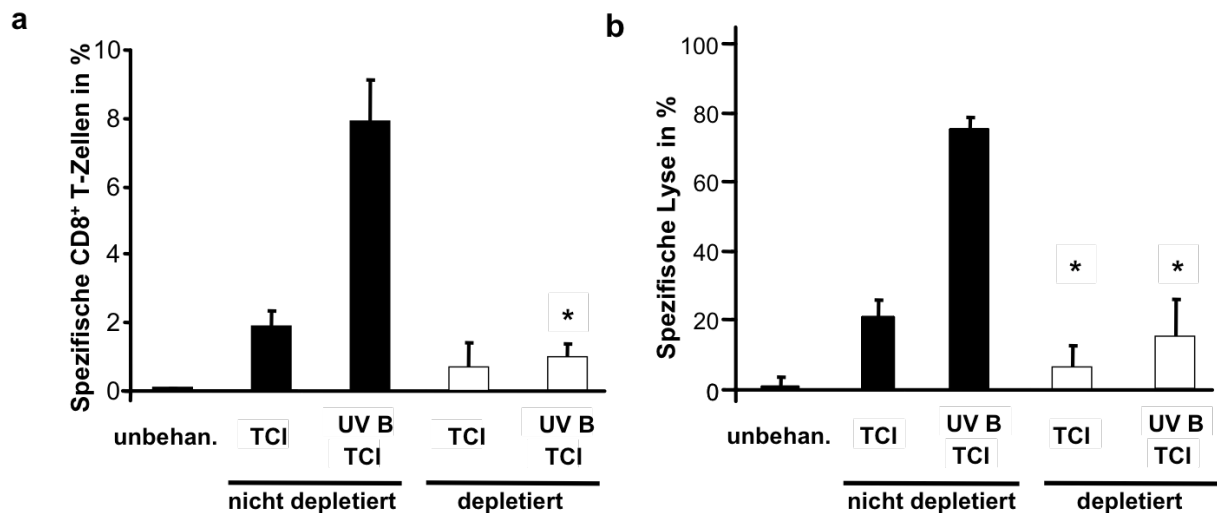


Abbildung 26 Depletion der GR1⁺-Zellen verhindert die Immunreaktion

Zur Depletion GR1⁺-Zellen wurde an den Tagen -2 bis 0 der spezifische RB68C5-Antikörper i.p. injiziert (150 µg/Maus/Injektion). Anschließend erfolgte die Immunisierung wie beschrieben. Bestimmt wurde (a) die Anzahl an peptidspezifischen T-Zellen durch Tetramer-Färbung, sowie (b) die spezifische Lyse durch zytotoxische T-Zellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest 7 Tage nach der Immunisierung. Gezeigt sind gemittelte Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten. Mit n= 9. (*) bezeichnet eine Differenz ($p < 0,05$) eines ungepaarten Student's t test

In Abbildung 26 ist die Analyse der induzierten Immunantwort nach Depletion der GR1⁺-Zellen dargestellt im Vergleich zu immunisierten Mäusen mit normalem Zellspektrum. Diagramm 26 a zeigt die Anzahl an Tetramer⁺-T-Zellen. Es kann deutlich gezeigt werden, dass durch die Depletion der GR1⁺-Zellen nahezu keine spezifischen T-Zellen induziert werden können, unabhängig von der Immunisierungsmethode (weiße Balken). Im Einklang dazu stehen die Ergebnisse des *in vivo* Zytotoxizitätstests (Abbildung 26 b). In den nicht depletierten Versuchsgruppen kann, wie bereits gezeigt, sowohl nach TCI als auch nach UV B/TCI eine Lyse der injizierten Zielzellen erfolgen. Im Vergleich dazu kommt es nach zusätzlicher Depletion der GR1⁺-Zellen lediglich zu einer geringfügigen Lyse nach TCI. Nach UV B/TCI kann die Lyse zwar erhöht werden, sie liegt trotzdem weit unter den erzielten Ergebnissen der nicht depletierten Kontrollen. Dieses spricht für eine zentrale Rolle der Granulozyten in diesem Immunisierungsprotokoll.

3.5 Die supprimierende Wirkung von regulatorischen T-Zellen auf die induzierte CTL-Antwort

Wie bereits anfangs beschrieben, kann eine geringe UV-Bestrahlung zur Induktion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) führen. Diese Zellen wirken immunsuppressiv unter anderem durch die Freisetzung von IL-10. Bindet IL-10 an seinen Rezeptor wird eine Signalkaskade über STAT3 ausgelöst, wodurch eine Suppression der Transkription von verschiedenen Genen vermittelt wird. IL-10 supprimiert dadurch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch DCs und Makrophagen. Außerdem wird die Differenzierung von TH1-Zellen durch APCs verhindert.

3.5.1 T regulatorische Zellen supprimieren die durch TCI vermittelten Effekte

Um die Auswirkung der Tregs im angewandten Immunisierungsprotokoll näher zu untersuchen, wurde ein transgener Mausstamm (DEREG) verwendet, bei welchem Tregs durch die Injektion von Diphtherietoxin depletiert werden können. Der Rezeptor für das Diphtherietoxin liegt dabei unter dem Promotor für FoxP3. Anschließend wurden die Mäuse wie bereits beschrieben mit TCI oder UV B/TCI immunisiert. Als Kontrolle dienten Tiere des C57BL/6 Wildtypstammes. Gemessen wurde die Anzahl der spezifischen T-Zellen durch Tetramer-Färbung und FACS-Analyse (Abbildung 27 a). Deutlich wird, dass die Depletion der Tregs zu einem drastischen Anstieg der Tetramer⁺CD8⁺ T-Zellen führt und das nicht nur in den UV B/TCI behandelten Mäusen, sondern auch in denen, die nur transkutan immunisiert wurden. Dabei ist der Anteil der peptidspezifischen T-Zellen in beiden Fällen gleich hoch. Es kann also kein zusätzlicher verstärkender Effekt durch die UV B-Bestrahlung festgestellt werden. Zusätzlich wurde den Tieren auch hier ein adoptiver Transfer von peptidbeladenen und CFSE-markierten Zellen injiziert und nach Lyse der Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen analysiert. Wie Abbildung 27 b zeigt, ist die spezifische Lyse in den Wildtypmäusen wie bereits beschrieben. Immunisiert man die Tiere nur mit TCI, werden etwa 20 % der Zielzellen nach 18 Stunden lysiert, wohingegen die Lyse bei UV B/TCI fünfmal so hoch ist. In den depletierten DEREG-Mäusen ist die

Lyse bei TCI drastisch verstärkt, übertrifft sogar das Ergebnis der Wildtypen, die mit UV B/TCI behandelt wurden. Wie bereits bei der Analyse der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden konnte, erzielen auch hier beide depletierten Gruppen gleiche Ergebnisse. Es kann, nach Depletion der Tregs, kein Unterschied zwischen TCI und UV B/TCI mehr festgestellt werden.

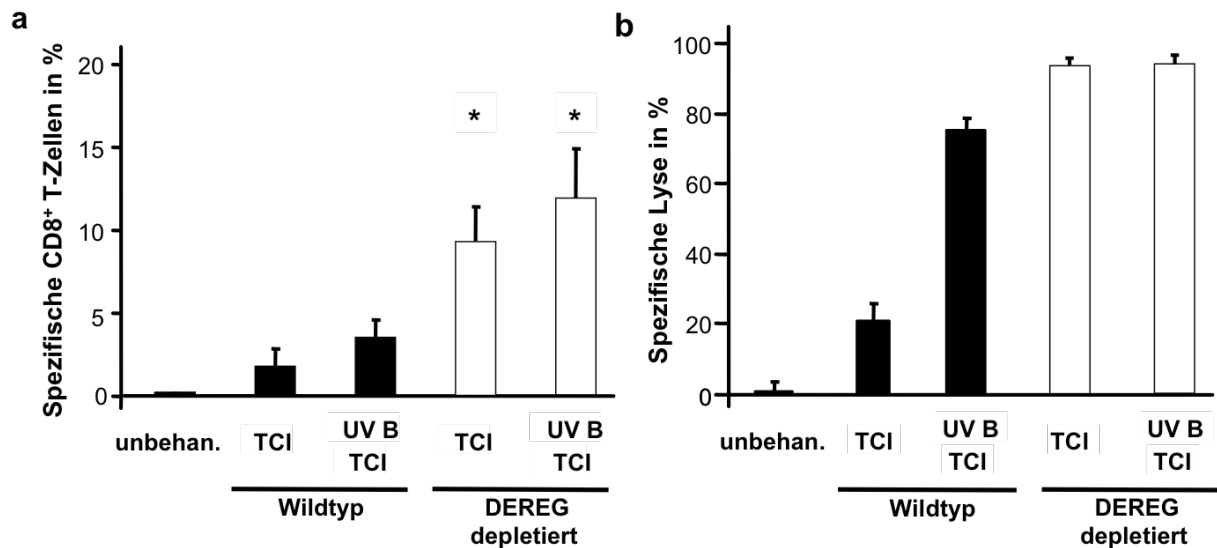


Abbildung 17 Verstärkte Effekte bei TCI und UV B/TCI nach Treg-Depletion

Wildtyp- und DEREK-Mäuse wurden wie zuvor beschrieben immunisiert. Durch Injektion von 1 µg Diphtherietoxin (Tag -1, 1 und 3) wurden T regulatorische Zellen in den DEREK-Mäusen depletiert. Bestimmt wurde die Anzahl der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer-Färbung (a) und die Lyse von peptidbeladenen T-Zellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest sieben Tage nach Immunisierung. Gezeigt sind gemittelte Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten mit n= 9. (*) bezeichnet eine Differenz (p< 0,05) eines ungepaarten Student's t test

Die hier gezeigten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass regulatorische T-Zellen die Steuerung der CTL-Antwort mit beeinflussen, die durch die transkutane Immunisierung induziert wird.

3.5.2 Die supprimierende Wirkung der Tregs wird durch die Freisetzung von IL-10 vermittelt

Nachdem die supprimierende Wirkung der Treg-Zellen auf die Immunisierung gezeigt werden konnte, sollte die Wirkungsweise der Zellen näher untersucht werden. Bei der UV-induzierten Immunsuppression wurde bereits eine bedeutende Rolle für IL-10 beschrieben. Um die Wirkung von IL-10 auf das Immunisierungsprotokoll von TCI und UV B/TCI zu untersuchen, wurden transgene IL-10^{-/-}-Mäuse verwendet. Dieser Stamm hat den C57BL/6-Hintergrund und besitzt das natürliche Repertoire an Zellpopulationen, allerdings kann das Zytokin IL-10 weder produziert, noch freigesetzt werden. Falls die Immunsuppression auf die Wirkung von IL-10 zurück zu führen sein, sollte in IL-10^{-/-}-Mäusen ebenfalls eine Verstärkung der Immunantwort messbar sein, vergleichbar mit der in den Treg-depletierten DEREK-Mäusen. Abbildung 28 a zeigt, dass die induzierte CTL-Antwort in IL-10^{-/-}-Mäusen bereits nach TCI um ein Vielfaches verstärkt ist, im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Die Anzahl der spezifischen CD8⁺ T-Zellen kann sogar nach zusätzlicher UV-Bestrahlung noch auf 15 % spezifischer CTL-Antwort erhöht werden. Die Analyse der zytotoxischen Aktivität (Abbildung 28 b) wurde hier bereits 6 Stunden nach Injektion der Zielzellen durchgeführt, da aufgrund der hohen Anzahl an spezifischen T-Zellen eine schnelle Lyse zu erwarten war. In der Tat konnten nach dieser kurzen Inkubation bereits 69,5 % (+/- 11,1 %) der Zielzellen nach UV B/TCI in der transgenen Versuchsgruppe lysiert werden. Die lediglich mit TCI behandelte Gruppe der IL-10^{-/-}-Mäuse zeigt ebenfalls eine hohe Lyserate (60,5 %, +/- 16,4 %). Die UV B/TCI-Gruppe der Wildtypkontrollen liegt mit 55,5 % (+/- 13,6 %) unter der transgenen TCI-Gruppe. Nach 6 Stunden Inkubationszeit kann TCI alleine in den Wildtypkontrollen aufgrund der niedrigen Anzahl an spezifischen T-Zellen lediglich 21,9 % (+/- 18,1 %) der Zielzellen lysieren.

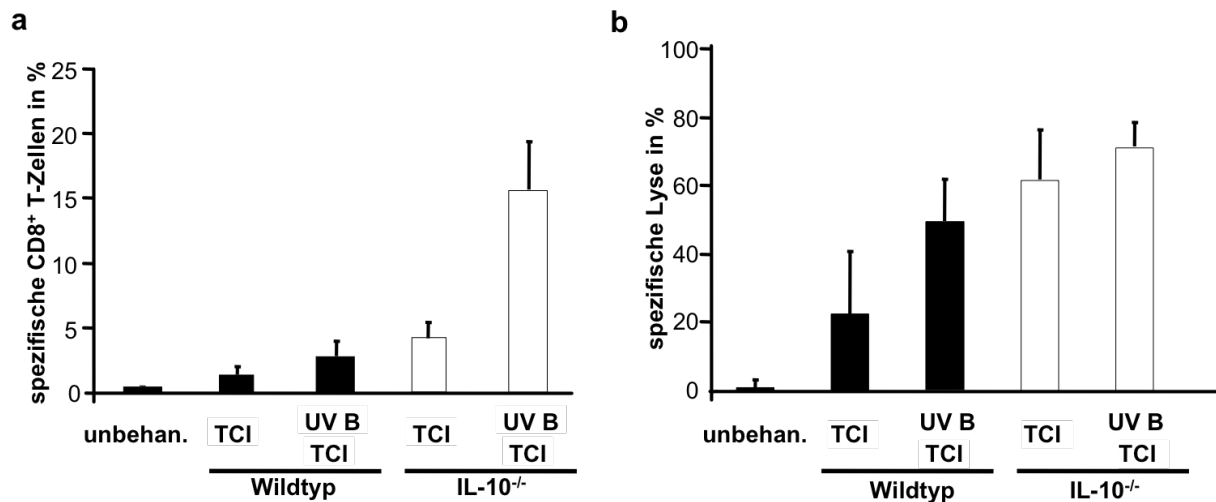


Abbildung 28 Verstärktes CTL-Priming in IL-10^{-/-}-Mäusen

IL-10^{-/-}-Mäuse wurden zusammen mit C57BL/6-Mäusen transkutan immunisiert und wie angegeben UV B-bestrahlt. (a) zeigt eine Tetramer-Färbung aus Vollblut, (b) die Lyse von Zielzellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest, welcher bereits 6 Stunden nach Injektion der Donorzellen analysiert wurde. Gezeigt sind die gemittelten Ergebnisse aus 5 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Versuchsgruppe.

3.5.3 Applikation eines IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörpers führt zu einer verstärkten CTL-Antwort in Wildtypen

Die zuvor gezeigte inhibitorische Wirkung von IL-10 sollte ebenfalls in einer Wildtypsituation getestet werden. Hier wurden C57BL/6-Mäuse mit einem IL-10-Rezeptor blockierenden Antikörper vor der Immunisierung behandelt. Durch Injektion des Antikörpers wird zwar noch IL-10 produziert und freigesetzt, die supprimierende Signalkaskade über STAT3 kann allerdings nicht angeschaltet werden.

Die Experimente zeigten die zu erwartenden Ergebnisse. Durch das Verabreichen des blockierenden Antikörpers wurde die Immunantwort um ein Vielfaches verstärkt im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Abbildung 29 a zeigt die Anzahl spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut. Diese ist nach Injektion des Antikörpers um das 5-fache höher als nach der transkutanen Immunisierung alleine. Daraus resultiert eine fast vollständige Lyse der peptidbeladenen Zielzellen (Abbildung 29 b). In Abbildung 29 c ist die IFN γ -Produktion nach 24 stündiger *in vitro* Peptidrestimulation dargestellt. Auch dieses Ergebnis zeigt eine klare Verstärkung der IFN γ -Produktion nach Blockade des IL-10-Rezeptors im Vergleich zu den Ergebnissen der TCI-

Versuchsgruppe. Die unbehandelten Kontrollen zeigen bei keiner Analysenmethode Anzeichen einer Immunisierung.

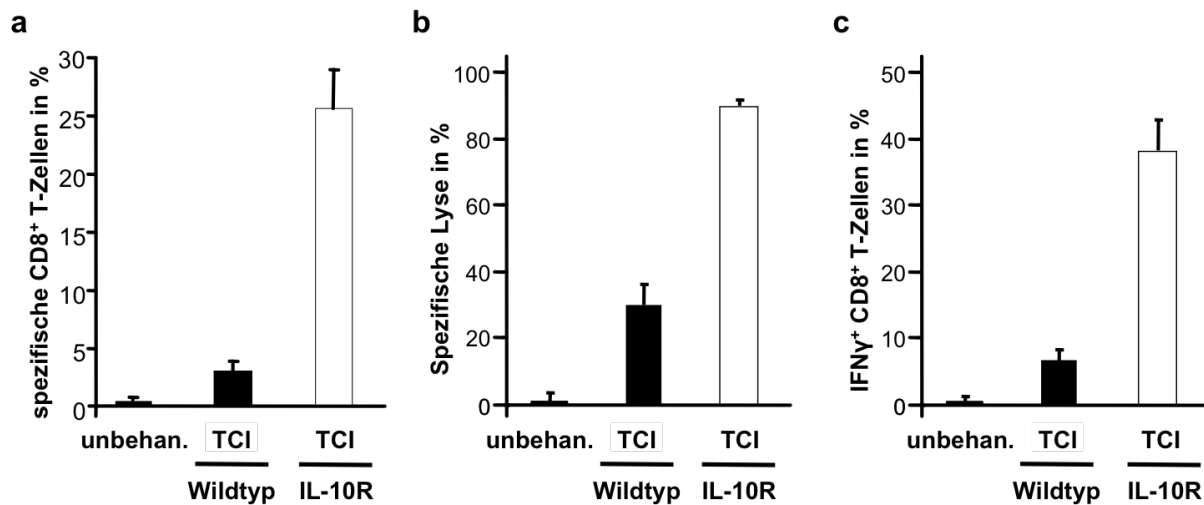


Abbildung 29 Blockade des IL-10-Signalwegs führt zu einer verstärkten Immunantwort

C57BL/6-Mäuse wurden wie zuvor beschrieben transkutan immunisiert. Zur Blockade des IL-10-Signalwegs wurde ein blockierender IL-10-Rezeptor-(IL-10R) Antikörper (250 μ g/Maus) i.p. am Tag vor der ersten Immunisierung injiziert. Analysiert wurden (a) die Anzahl peptidspezifischer T-Zellen mittels Tetramer-Färbung, (b) die Lyse von Targetzellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest und (c) die IFN γ -Produktion nach 24 stündiger *in vitro* Peptidrestimulation.

3.5.4 Regulatorische T-Zellen supprimieren UV B/TCI teilweise in Abhängigkeit von IL-10

Für Treg-depletierte DEREK-Mäuse und für IL-10^{-/-}-Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Immunreaktion nach Immunisierung mit TCI und UV B/TCI im Vergleich zu den Wildtypkontrollen verstärkt ist. Allerdings geben diese Experimente keinen Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Tregs und IL-10. Gezeigt werden sollte als nächster Schritt, ob Tregs als IL-10 Quelle fungieren und dieses die durch die Immunisierung induzierte Immunantwort supprimiert. Hierfür wurden erneut IL10^{-/-}-Mäuse und Wildtypen immunisiert. Eine zusätzliche Gruppe der transgenen Mäuse bekam vor der Immunisierung aufgereinigte Treg-Zellen aus Wildtyp-Mäusen intravenös injiziert. Durch den Transfer dieser Zellen sind hier nur die Wildtyp-Treg-Zellen in der Lage IL-10 zu produzieren und die Antwort einzudämmen. Als Kontrolle wurden den transgenen Tieren aufgereinigte CD4⁺-T-Zellen aus Wildtypen injiziert.

Wie die Auswertung der Tetramer-Färbung auf spezifische CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 30) zeigt, kann die starke Immunantwort in IL-10^{-/-}-Mäusen durch den Transfer von regulatorischen T-Zellen mit Wildtyp-Hintergrund nach UV B/TCI nur teilweise (nicht signifikant) supprimiert werden. Die Anzahl an spezifischen T-Zellen liegt aber noch über der immunisierten Wildtyp-Kontrolle. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse nach dem Transfer von CD4⁺-T-Zellen aus Wildtypen. Hier lässt sich nur ein geringer Unterschied zu den IL-10^{-/-}-Mäusen erkennen, die keine T-Zellen injiziert bekamen. Der Treg-Transfer hat auf die Induktion spezifischer T-Zellen nach TCI keinen Einfluss. Daraus ergibt sich, dass anders als in Wildtyp-, IL-10^{-/-}- beziehungsweise IL-10^{-/-}-Mäusen mit CD4-T-Zelltransfer nach Injektion von regulatorischen T-Zellen aus C57BL/6 kein signifikanter Unterschied zwischen UV B/TCI und TCI festgestellt werden kann.

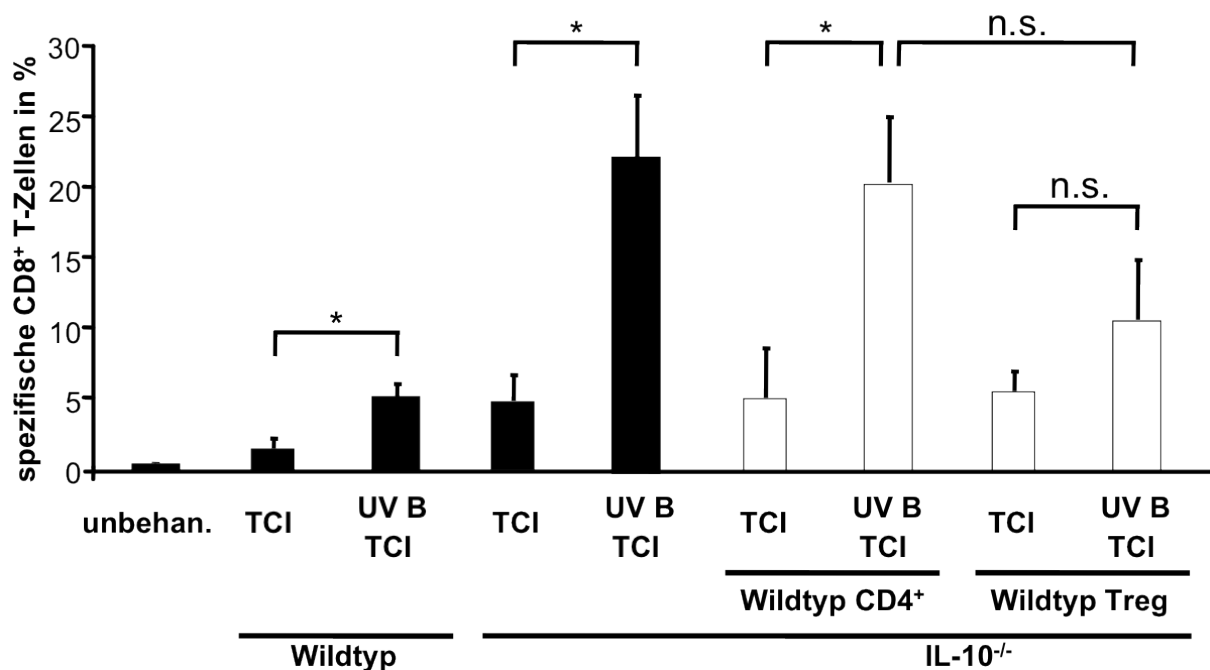


Abbildung 30 Transfer von regulatorischen T-Zellen in IL-10^{-/-}-Mäuse erzielt keinen supprimierenden Effekt

Immunisiert wurden C57BL/6- und IL-10^{-/-}-Mäuse mit TCI oder UV B/TCI. Wie angegeben wurden den IL-10^{-/-}-Mäusen 1 x 10⁶ regulatorische T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen beziehungsweise gleiche Anzahl an CD4⁺-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen i.v. injiziert. Der Zelltransfer erfolgte ein Tag vor der UV B-Bestrahlung. Die Präparation der T-Zellen erfolgte aus einer Milzzellsuspension mittels MACS-Aufreinigung. Gezeigt sind gemittelte Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten mit n= 6. (*) bezeichnet eine Differenz (p< 0,05) eines ungepaarten Student's t test, n.s.= nicht signifikant

4 Diskussion

Zur Bekämpfung von Infektions- und Tumorerkrankungen steht die Entwicklung neuer und effektiverer Impfmethoden im Fokus der medizinischen Forschung. Neue Ansätze sollten dabei verschiedene Kriterien erfüllen, die zum Beispiel die Effizienz der Impfmethode erhöhen, aber auch eine einfache Anwendung ermöglichen. Letzteres erfordert vor allem einen Verzicht auf Spritzen und Kanülen bei der Applikation, um Krankheitsverschleppungen durch Mehrfachverwendung beziehungsweise Verletzungen durch unsachgemäße Anwendung zu vermeiden.

Die transkutane Immunisierung mit der Imiquimod-haltigen Aldara stellt eine einfache Methode zur Induktion einer potenten Immunantwort dar. In ersten Mausmodellen konnten verschiedene Zytokine bereits 2 bis 4 Stunden nach Applikation von Aldara detektiert werden (Slade, 1998). Bereits bekannt ist außerdem, dass eine Immunität gegen mucosale Toxine (Glenn et al., 1998b; Glenn et al., 1999) oder Viren (Godefroy et al., 2003) induziert werden kann. Rechtsteiner und Kollegen konnten zeigen, dass nach der Kombination eines TLR-Agonisten mit einem CTL-Epitop eine primäre Immunantwort ausgelöst werden kann (Rechtsteiner et al., 2005). Allerdings ist ebenfalls bekannt, dass nach TCI lediglich eine potente Primär-, nicht aber eine Gedächtnisantwort gebildet wird, was zu einer schwachen Tumorprotektion führt (Itoh and Celis, 2005; Stoitzner et al., 2008; Warger et al., 2007).

4.1 UV B verstärkt die transkutane Immunisierung hin zu einer Gedächtnis-Antwort

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation der Imiquimod-haltigen Creme die immunsuppressiven Eigenschaften einer geringen UV B-Bestrahlung in einem DTH-Modell aufgehoben werden. Dies geht einher mit bereits publizierten Ergebnissen von Thatcher et al. (Thatcher et al., 2006). Allerdings lassen sich die Ergebnisse von Thatcher und die hier gezeigten nur bedingt miteinander vergleichen, da sich die angewandten Behandlungs-Modelle voneinander unterscheiden. Das Kontaktallergen-Modell von Thatcher sieht eine Imiquimod-Behandlung vor einer

4maligen UV-Bestrahlung vor. Bei der Etablierung des Immunisierungsprotokolls in dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass eine vorangestellte UV B-Bestrahlung zu synergistischen Effekten von UV B/TCI führt, die über den Ausgleich der von UV B-induzierten Immunsuppression hinaus geht. Im Bezug auf die Induktion einer Immunantwort nach TCI ist bekannt, dass eine potente primäre Antwort ausgelöst werden kann (Rechtsteiner et al., 2005), die allerdings nicht von langer Dauer ist, also keine Gedächtnisantwort auslöst und in einem Tumormodell nur ansatzweise protektive Effekte zeigt (Itoh and Celis, 2005; Stoitzner et al., 2008; Warger et al., 2007). Ein synergistischer, dosisabhängiger Effekt konnte bereits für die Bestrahlung mit UV A gezeigt werden, wonach bereits über eine Anwendung von UV A bei der Tumorprotektion nachgedacht wurde (Byrne et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigte die Bestrahlung mit UV B in der Arbeit von Byrne keine verstärkenden Effekte. Auch hier weicht das Bestrahlungsprotokoll von dem in dieser Arbeit angewandten ab. Bei Byrne erfolgte eine mehrfache Bestrahlung. Zusammengefasst zeigen die bereits publizierten Ergebnisse, sowie die hier beschriebenen, dass die Etablierung eines Immunisierungsprotokolls mit UV-Bestrahlung von sensiblen Faktoren abhängig ist, die verstärkende oder supprimierende Effekte induzieren.

4.2 Durch UV B/TCI kann eine effizientere Tumorprotektion erzeugt werden

Bereits in älteren Publikationen wurde eine Tumorprotektion gegen eine B16-Linie und gegen EG.7-Zellen in einem prophylaktischen Ansatz für TCI gezeigt. Dabei wurden die Versuchsmäuse zuerst immunisiert und anschließend die Tumorzellen inokuliert. Die Versuche mit der B16-Linie zeigten eine teilweise Protektion (Itoh and Celis, 2005), wohingegen eine vollständige Abstoßung des EG.7-Tumors induziert werden konnte (Warger et al., 2007). In der weitaus diffizileren therapeutischen Situation wird die Immunisierung erst nach Anwachsen des Tumors eingesetzt. Die Immunzellen müssen sich mit einem ausgeprägten Tumormilieu auseinandersetzen. Bereits durchgeführte Studien konnten Erfolge für die Applikation der Aldara-Creme in Phase I und Phase II bei der Behandlung von Basalzell-Carzinomen verzeichnen

(Beutner et al., 1999), die bekanntlich auf eine Behandlung mit Interferonen ansprechen. Im hier angewandten Tumormodell zeigt sich allerdings eine nicht ausreichende Kompetenz der TCI zur Tumorprotektion. Durch die Kombination der TCI mit der UV B-Bestrahlung und die Induktion einer verstärkten Immunantwort ließ sich die vollständige Abstoßung des Tumors bei 42 % der Versuchstiere erreichen, im Vergleich zu 22 % nach ausschließlicher TCI. Allerdings ist auch diese Methode, in einem solchen Ansatz, nicht potent genug. Zwar sprechen zunächst alle Versuchstiere auf die Immunisierung an, trotzdem kommt es in über 50 % der Fälle zu einem Auswachsen des Tumors. Da ein spontaner Verlust des zu exprimierenden Epitops nach FACS-Analyse ausgeschlossen werden kann, ist nicht geklärt, warum die Immunzellen in diesen Fällen nicht in der Lage sind den Tumor abzustößen. Möglich ist, dass zwar noch spezifische Zellen zu finden sind, diese aber durch das Tumormilieu beeinträchtigt werden und somit keine lytische Funktion mehr erfüllen können. Diese Möglichkeit gehört zu verschiedenen Eigenschaften, die Tumore ausbilden, um einer Bekämpfung zu entgehen und werden als TDFs (*tumor-derived factors*) bezeichnet, die in ihrer Gesamtheit zu einem „*tumor escape*“ führen. TDFs sorgen für eine Erleichterung des autokrinen Wachstums, sie rekrutieren Stromazellen wie Fibroblasten und Tumor-assoziierte Makrophagen, die tumor-abhängige Prozesse fördern und sorgen für eine Verminderung der lokalen beziehungsweise systemischen Immunantwort. Zu diesen supprimierenden TDFs gehören TGF- β (Li et al., 2006; Thomas and Massague, 2005), VEGF (*vascular endothelial factor*), IL-10 und Prostaglandine (Harizi et al., 2001; Reckamp et al., 2006). Diese können direkt auf Lymphozyten einwirken oder bedienen sich APCs um diese zu tolerisieren. Außerdem können auch tumoreigene myeloide Zellen ausgebildet werden, die als MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) bezeichnet werden, die sowohl auf eine CD4⁺ als auch auf eine CD8⁺ T-Zell-Antwort inhibitorisch wirken und die Marker CD11b und GR-1 tragen (Kusmartsev and Gabrilovich, 2006; Nagaraj and Gabrilovich, 2007). Da diese Zellen das Tumorgewebe infiltrieren und letztlich etwa 5 % der Gesamtmasse ausmachen (Yang et al., 2004), könnten Methoden zur Depletion beziehungsweise zur Suppression dieser MDSCs eine Alternative und Ergänzung zu bisherigen Therapieansätzen bieten (Fricke et al., 2007; Rodriguez et al., 2005; Suzuki et al., 2005; Terabe et al., 2003). Andererseits kann durch die Induktion einer potenten Antitumor-Antwort der selektive Druck auf Tumorzellen erhöht werden, wodurch die Ausbildung aggressiverer „*tumor escape*“-

Varianten begünstigt wird. Die Terminologie hierfür ist „*cancer immunoediting*“ (Bui and Schreiber, 2007; Dunn et al., 2006; Smyth et al., 2006). Diese Faktoren erschweren in ihrer Gesamtheit das Generieren einer produktiven Immunantwort gegen Tumorzellen.

4.3 Mechanismen der Verstärkung nach UV B/TCI

Bereits im Jahr 2002 konnten Hemmi und Kollegen die Abhängigkeit des synthetischen Imiquimod und seines Derivates Resiquimod von der Expression des TLR 7 und des Adaptermoleküls MyD88 zeigen (Hemmi et al., 2002). TLR 7-beziehungsweise MyD88-defiziente Mäuse produzierten nach Behandlung mit Imiquimod oder Resiquimod keine inflammatorischen Zytokine, vor allem kein IFN, wodurch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und Jnk ausblieb. In der vorgelegten Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass in den bereits erwähnten transgenen Tieren keine Antigen-spezifischen T-Zellen nach TCI induziert werden können und ebenfalls keine lytische Aktivität von zytotoxischen Zellen dokumentiert werden kann. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch die Kombination von UV B-Bestrahlung und TCI abhängig von der Signaltransduktion über den TLR 7 und MyD88 ist. Genauer konnte bewiesen werden, dass die Expression des Rezeptors auf hämatopoetischen Zellen unerlässlich ist.

Auf der Ebene der Signalkaskade ließ sich nach einer Veröffentlichung von Yoshikawa und Streilein vermuten, dass die Expression des TLR 4 bei den durch UV B-vermittelten Effekten eine Rolle zu spielen scheint (Yoshikawa and Streilein, 1990). Dazu wurden Kontakthypersensitivitäts-Experimente mit Tieren durchgeführt, die eine Mutation im Genlokus für den TLR 4 tragen. In diesen Tieren zeigte eine UV B-Bestrahlung keine immunsuppressiven Auswirkungen. Um eine mögliche Rolle des TLR 4 im angewandten Immunisierungsmodell näher zu untersuchen, wurden hier Mäuse verwendet, die einen vollständigen Knock-out für den TLR 4 besitzen. Zusätzlich wurden transgene Tiere verwendet, denen das TLR 4-Adaptermolekül TRIF fehlt. In beiden Stämmen konnte keine Reduktion der UV B-vermittelten verstärkten Immunantwort dokumentiert werden, was die Involvierung eines zum Beispiel endogenen TLR 4 ausschließt. Das von Yoshikawa und Streilein verwendete

Bestrahlungsprotokoll weicht erheblich von dem hier etablierten ab. Im Vergleich zu der hier eingesetzten reinen UV B-Lampe verwendeten Yoshikawa und Streilein eine Quelle mit einer Bandbreite von 250 bis 400 nm, was der Wellenlänge von UV A und UV B entspricht, mit einer höheren Intensität von UV B. Für den Kontakt mit UV A sind ebenfalls Publikationen zur Immunsuppression erschienen (Damian et al., 1999; Halliday et al., 1998). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass UV A keine Veränderung der Immunität vermittelt (Dittmar et al., 1999; Skov et al., 1997). Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Wirkungsweisen von UV A und UV B gegenseitig beeinflussen (Reeve et al., 1998) und deshalb nicht von einem UV B-abhängigen Effekt in der Arbeit von Yoshikawa und Streilein gesprochen werden kann. Außerdem wurde die Bestrahlung an vier aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Wie die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente zur Etablierung des Immunisierungsprotokolls deutlich machen, ist die Abfolge und die Häufigkeit ein entscheidender Faktor für die Ausprägung der UV-Effekte. Dies könnte die Diskrepanz für die Rolle des TLR 4 in beiden Ansätzen erklären.

4.4 Dermale DCs übernehmen das Priming der T-Zellen nach TCI

In der Vergangenheit wurden bereits einige Publikationen zur Wirkungsweise von Imiquimod auf zellulärer und Zytokinebene veröffentlicht. Bezogen auf die Rolle dendritischer Zellen in Immunisierungsexperimenten zählten Langerhans Zellen zu den wichtigsten APCs der Haut, die sowohl virale als auch Tumorantigene präsentieren können (Grabbe et al., 1991; Knight and Macatonia, 1988). Bereits im Jahr 2000 konnte für Langerhans Zellen der Epidermis ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der Morphologie, Migration und Verstärkung der Kontakthypersensitivität und der Applikation von Imiquimod hergestellt werden (Suzuki et al., 2000). Allerdings wurde zu diesem Zeitpunkt nicht zwischen verschiedenen Langerin⁺ DCs differenziert, da ein Vorhandensein unterschiedlicher Populationen erst später beschrieben werden konnte (Bursch et al., 2007b). Aktuell ist die Bedeutung von LCs umstritten und reicht von einer zentralen Rolle bei der epikutanen Immunisierung in der Tumorthherapie bis zu einer untergeordneten Rolle bei der Induktion einer Immunantwort (Fukunaga et al., 2008; Stoitzner et al., 2008).

Zur Aufklärung der zellulären Mechanismen, welche die Immunantwort nach TCI und die Verstärkung nach UV B-Bestrahlung vermitteln, wurde sich verschiedener transgener Mausmodelle bedient. Nach Depletion von CD11c⁺- beziehungsweise Langerin⁺-Zellen ließ sich dermalen CD11c⁺-Zellen eine bedeutende Rolle zuweisen, während aus dem Knochenmark stammende Langerin⁺-Zellen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen (Bursch et al., 2007a; Ginhoux et al., 2007) und lediglich bei einer TCI mit Cholera Toxin unerlässlich sind (Chang et al., 2008). Langerhans Zellen der Epidermis können nicht direkt auf die Imiquimod-haltige Creme reagieren, da diese Zellpopulation keinen TLR 7 besitzt (Flacher et al., 2006; Mitsui et al., 2004). Trotzdem ist eine verstärkte Auswanderung und Aktivierung von LCs nach Imiquimod-Behandlung dokumentiert (Suzuki et al., 2000), was zumindest teilweise auf die Interaktion mit dermalen Mastzellen zurück zu führen ist (Heib et al., 2007). Carbone et al. schreiben LCs eine indirekte Rolle beim Priming von T-Zellen zu, indem sie Antigene zwar zu den Lymphknoten transportieren, diese dann aber auf residente DCs zur Präsentation übertragen (Carbone et al., 2004). Die untergeordnete Rolle von LCs bei diesem Immunisierungsprotokoll wird auch durch die Migrationsgeschwindigkeit von LCs bekräftigt. Bekannt ist, dass nach TCI bereits nach kürzester Zeit ein Priming der T-Zellen im Lymphknoten stattfindet. Der Antigentransport scheint also von schneller migrierenden dermalen DCs abhängig zu sein im Vergleich zu langsamer migrierenden LCs (Kissenpfennig et al., 2005). Zusätzlich bekräftigt werden konnte die Bedeutung von CD11c⁺-Zellen durch Analyse von absoluten Zellzahlen in drainierenden Lymphknoten immunisierter Mäuse. Im Gegensatz zur nahezu gleich bleibenden Zahl an Langerin⁺-Zellen, konnte für CD11c⁺-Zellen ein massiver Anstieg vor allem nach UV B/TCI, aber auch nach TCI festgestellt werden. Diese Zellen müssen vom Inflammationsherd der Haut stammen. Zusätzlich zu der Beobachtung, dass nach UV- und Imiquimod-Behandlung die Produktion von IL12p70 durch CD11c⁺-Zellen erhöht wird (Thatcher et al., 2006), konnten hier erhöhte mRNA-Level für IL12p40 gezeigt werden. Durch die Aktivierung des TLR 7 werden Transkriptionsfaktoren induziert, die die Produktion von IL-12, IFN α und TNF α begünstigen. IL-12 spielt eine maßgebliche Rolle bei der Protektion gegen eine UV-induzierte Immunsuppression (Schmitt et al., 1995; Schwarz et al., 1996; Schwarz et al., 1998). Allerdings wurde die Bedeutung der erhöhten IL-12-Produktion durch die Immunisierung von IL-12^{-/-}-Mäusen relativiert, da dort eine mit der Wildtyp-Kontrolle vergleichbare Immunantwort ausgelöst wurde. Ältere

Publikationen zeigen, dass inhibierende Antikörper für IL-12 und IFN α , die durch Imiquimod-induzierte IFN γ -Produktion hemmen (Rogge et al., 1997; Szabo et al., 1997). Mit IFN α R^{-/-}-Mäusen konnte hier eine eindeutige Abhängigkeit der Immunisierungsstrategie von Typ I Interferonen gezeigt werden.

Kritisch betrachtet werden müssen hier die Ergebnisse aus den Depletionsexperimenten der GR1⁺-Zellen. Insbesondere sollte dabei die Rolle der Granulozyten angesprochen werden (Palamara et al., 2004b). Wie von Palamara gezeigt werden konnte, finden sich nach Applikation von Aldara auch vermehrt plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) beziehungsweise pDC-ähnliche Zellen in der Haut und in der Milz. Diese Zellen, die MHC II exprimieren und zusätzlich auch GR1⁺ sind, werden durch die Injektion des RB68C5-Antiköpers ebenfalls depletiert. Dies könnte eine Erklärung für das vollständige Ausbleiben der Immunantwort nach GR1-Depletion sein, da hauptsächlich pDCs den TLR 7 in Mäusen exprimieren (Hemmi et al., 2002). Außerdem produzieren pDCs nach Aktivierung über den TLR 7 große Mengen an Typ I Interferonen (Akira et al., 2001; Gibson et al., 2002). Um die Rolle der Granulozyten genauer zu bestimmen, wurde bereits ein vermeintlich spezieller Antikörper (1A8) im Mausmodell getestet. Allerdings ließen sich nach Applikation dauerhaft Granulozyten im Blut der Tiere nachweisen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Verwendung von LysMCre-DTA-Mäusen, deren Granulozyten von Geburt an fehlen.

4.5 Die induzierte Immunantwort wird durch IL-10 supprimiert

Der Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf die transkutane Immunisierung wurde in dieser Arbeitsgruppe zunächst durch Injektion des PC61-Antiköpers (α -CD25) untersucht. Hier konnte eine inhibitorische Funktion der Tregs auf die induzierte CTL-Antwort beobachtet werden. Allerdings zeigte sich, dass nach Applikation des Antiköpers lediglich die CD25-Expression der Zellen reduziert ist, die Anzahl der Tregs bei gleichzeitiger Inaktivierung jedoch konstant bleibt (Kohm et al., 2006). Eine eindeutigere Situation ergibt sich aus der Immunisierung von DEREK-Mäusen. Hier konnten die regulatorischen T-Zellen durch die Gabe von Diphtherietoxin depletiert werden. Das Ergebnis zeigte, wie nach Injektion des PC61-Antiköpers, eine

verstärkte Immunantwort induziert nach transkutaner Immunisierung. Eine Wirkungsweise von Tregs ist durch die Induktion der Produktion von IL-10 (Schwarz et al., 2004). Für ein Colitis Modell konnte bereits eine suppressive Wirkung von IL-10, produziert von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen, gezeigt werden (Maloy et al., 2003). Die Immunisierung von IL-10^{-/-}-Tieren resultierte dazu passend in der Ausprägung einer verstärkten Antwort, verglichen mit den Ergebnissen in Wildtyp-Kontrollen. Transferieren ließ sich dieser Effekt in die Wildtyp-Situation durch Injektion eines blockierenden anti-IL-10-Rezeptor-Antikörpers. Auch hier konnte die Immunantwort verstärkt werden. Der Transfer von Tregs aus Wildtyp-Tieren in IL-10^{-/-}-Tiere zeigte nach Immunisierung keine eindeutige Suppression der Immunantwort. Dieses Ergebnis spricht für eine weitere Treg-unabhängige IL-10-Quelle. Die Arbeitsgruppe um Clare Lloyd konnte erstmals zeigen, dass eine Suppression durch Tregs in einem Allergie-Modell nicht von IL-10 abhängt, welches von selbigen produziert wurde, da die Tregs aus IL-10^{-/-}-Tieren isoliert wurden und die Suppression trotzdem vermittelt werden konnte (Kearley et al., 2005). Vermutet wurde, dass Tregs eine Immunsuppression auslösen, indem sie die IL-10-Produktion in CD4⁺ T-Zellen induzieren. Diese Hypothese kann hier nicht aufgegriffen werden. Der Transfer von CD4⁺ Zellen aus Wildtypen in IL-10^{-/-}-Tiere führte zu keiner Suppression der Immunantwort, obwohl hier die transferierten T-Zellen in der Lage wären IL-10 zu produzieren. Eine weitere IL-10-Quelle könnten regulatorische B-Zellen darstellen, von denen mindestens eine Population (B10-Zellen) IL-10 produziert (Yanaba et al., 2008). Durch die Applikation eines depletierenden Antikörpers konnte für diese Zellpopulation gezeigt werden, dass sie die Proliferation von T-Zellen sowie die T-Zell-abhängige Immunantwort *in vivo* supprimiert. In Experimenten mit adoptivem Transfer von regulatorischen B-Zellen in B-Zell-depletierte Tiere konnte gezeigt werden, dass der Transfer von B10-Zellen aus Wildtyp-Tieren im Vergleich zu Zellen aus IL-10^{-/-}-Tieren zu einer Regulation einer T-Zell-abhängigen CHS-Antwort führt (Bouaziz et al., 2008).

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein etabliertes Immunisierungsmodell auf der Basis eines synthetischen TLR 7-Liganden zur Aufhebung der suppressiven Eigenschaften von UV B-Strahlung verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass nach Ermittlung eines geeigneten Immunisierungsprotokolls mit UV B die durch TCI vermittelte ausschließlich primäre Immunantwort verstärkt werden konnte, so dass eine Gedächtnisantwort induziert werden konnte. Durch die Immunisierung verschiedenster knockout sowie transgener Stämme konnte bewiesen werden, dass die Reaktion auch nach zusätzlicher UV B-Bestrahlung abhängig von TLR 7 und dem Adaptormolekül MyD88 ist. Bei der Aufklärung der zellulären Mechanismen, die dieser Immunisierungsmethode zu Grunde liegen, konnten dermale DCs, sowie GR1⁺-Zellen als wichtige Mediatoren identifiziert werden. Eine wesentliche Funktion von epidermalen Langerhans Zellen konnte in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auf Zytokinebene Typ I Interferone eine tragende Rolle spielen und die Produktion von IL-12p35 in den Haut-drainierenden Lymphknoten angeregt wird. Supprimiert wird die Immunantwort durch regulatorische T-Zellen, sowie durch die Freisetzung von IL-10, welches nicht ausschließlich von regulatorischen T-Zellen produziert wird. Die Applikation eines blockierenden IL-10-Rezeptor Antikörpers verhinderte die IL-10-vermittelte Suppression und führte zu einer weiteren Verstärkung der Immunantwort. Durch die induzierte Gedächtnisantwort nach UV B/TCI konnte das Immunisierungs-Modell in einem therapeutischen Tumormodell angewandt werden und führt hier zu einer verstärkten Abstoßung von Tumoren, verglichen mit TCI alleine, was eine Grundlage für zukünftige nadelfreie Vakzinierungen darstellen könnte. In diesem Zusammenhang sollte in folgenden Experimenten der Ursprung inhibitorischer Faktoren, wie die Produktion von IL-10, näher beleuchtet werden. Durch gezielte Blockierung oder Umgehung der suppressiven Mediatoren beziehungsweise der produzierenden Zellen ließe sich die Anwendung womöglich weiter verbessern. Aber auch eine Kombination des bestehenden Immunisierungsprotokolls mit anderen unterstützenden Faktoren ist denkbar. Hierzu zählen zum Beispiel Peptide, für die eine immunstimulatorische Wirkung beschrieben werden konnte. Des Weiteren könnten synthetisch hergestellte Nanopartikel eingesetzt werden, deren Oberfläche

mit aktivierenden Fragmenten, wie TLR-Liganden oder auch Antikörpern gekoppelt sind. Dadurch ließe sich eine gezieltere und effektivere Aktivierung von APCs induzieren, die letztlich zu einer verstärkten Immunantwort führt.

6 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	konventionelle DC
CFSE	<i>5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CLIP	<i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CTL	zytotoxischer Lymphozyt
DC	Dendritische Zelle
dDC	dermale DC
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenzol
DNS	Desoxyribunocleinsäure
DT	Diphtherietoxin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GMCSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-Wachstumsfaktor
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	<i>IL1-receptor associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factors</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
i.v.	intravenös
LAT	<i>linker of activation in T-cells</i>
LC	Langerhans Zelle
MED	minimale Erythemdosis

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MTOC	<i>microtubule organizing centre</i>
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
n.s.	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
RAG	<i>recombination activation genes</i>
SALT	<i>skin associated lymphoid tissue</i>
s.c.	subcutan
Sg	Salbengrundlage
SM	Selektionsmedium
SMAC	supramolekulerer Aktivierungscluster
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCI	transkutane Immunisierung
TCR	T-Zellrezeptor
TICAM-1	<i>TIR-containing-adaptor-molecule-1</i>
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Testmedium
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF-6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN-β</i>
UCA	urocanische Säure
ZAP	ζ -Ketten-assoziiertes-Protein

7 Literatur

(1999). From the Centers for Disease Control and Prevention. Impact of vaccines universally recommended for children--United States, 1900-1998. *JAMA* 281, 1482-1483.

Aberer, W., Schuler, G., Stingl, G., Honigsmann, H., and Wolff, K. (1981). Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 76, 202-210.

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.

Almand, B., Resser, J.R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J.I., Kwon, E.D., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1755-1766.

Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bech-Thomsen, N., Wulf, H.C., and Ullman, S. (1991). Xeroderma pigmentosum lesions related to ultraviolet transmittance by clothes. *J Am Acad Dermatol* 24, 365-368.

Beissert, S., Mohammad, T., Torri, H., Lonati, A., Yan, Z., Morrison, H., and Granstein, R.D. (1997). Regulation of tumor antigen presentation by urocanic acid. *J Immunol* 159, 92-96.

Beissert, S., Ruhlemann, D., Mohammad, T., Grabbe, S., El-Ghorr, A., Norval, M., Morrison, H., Granstein, R.D., and Schwarz, T. (2001). IL-12 prevents the inhibitory effects of cis-urocanic acid on tumor antigen presentation by Langerhans cells: implications for photocarcinogenesis. *J Immunol* 167, 6232-6238.

Belyakov, I.M., Hammond, S.A., Ahlers, J.D., Glenn, G.M., and Berzofsky, J.A. (2004). Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J Clin Invest* 113, 998-1007.

Bennett, C.L., van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R.M., Kapsenberg, M.L., and Clausen, B.E. (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169, 569-576.

Beutner, K.R., Geisse, J.K., Helman, D., Fox, T.L., Ginkel, A., and Owens, M.L. (1999). Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream. *JAmAcadDermatol* 41, 1002-1007.

Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (1997). B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 6, 303-313.

Bos, J.D., and Meinardi, M.M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 9, 165-169.

Bouaziz, J.D., Yanaba, K., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev* 224, 201-214.

Bui, J.D., and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* 19, 203-208.

Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007a). Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *JExpMed* 204, 3147-3156.

Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007b). Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 204, 3147-3156.

Byrne, S.N., Spinks, N., and Halliday, G.M. (2002). Ultraviolet A irradiation of C57BL/6 mice suppresses systemic contact hypersensitivity or enhances secondary immunity depending on dose. *J Invest Dermatol* 119, 858-864.

Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D.V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.

Carbone, F.R., Belz, G.T., and Heath, W.R. (2004). Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trends Immunol* 25, 655-658.

Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.

Chang, S.Y., Cha, H.R., Igarashi, O., Rennert, P.D., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Nanno, M., Kiyono, H., and Kweon, M.N. (2008). Cutting edge: Langerin⁺ dendritic cells in the

mesenteric lymph node set the stage for skin and gut immune system cross-talk. *J Immunol* 180, 4361-4365.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219-1226.

Cooper, K.D., Baron, E.D., and Matsui, M.S. (2003). Implications of UV-induced inflammation and immunomodulation. *Cutis* 72, 11-15.

Courtois, G. (2005). NF-kappaB in skin homeostasis. *Exp Dermatol* 14, 781-782.

Croft, M., and Swain, S.L. (1991). B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J Immunol* 146, 4055-4064.

Damian, D.L., Barnetson, R.S., and Halliday, G.M. (1999). Low-dose UVA and UVB have different time courses for suppression of contact hypersensitivity to a recall antigen in humans. *J Invest Dermatol* 112, 939-944.

Davila, E., and Celis, E. (2000). Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 165, 539-547.

Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634.

Dittmar, H.C., Weiss, J.M., Termeer, C.C., Denfeld, R.W., Wanner, M.B., Skov, L., Barker, J.N., Schopf, E., Baadsgaard, O., and Simon, J.C. (1999). In vivo UVA-1 and UVB irradiation differentially perturbs the antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 112, 322-325.

Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6, 836-848.

Egerton, M., Shortman, K., and Scollay, R. (1990). The kinetics of immature murine thymocyte development in vivo. *Int Immunol* 2, 501-507.

Falk, K., Rotzschke, O., and Rammensee, H.G. (1990). Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348, 248-251.

Fayolle, C., Deriaud, E., and Leclerc, C. (1991). In vivo induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4+ T cell help. *J Immunol* 147, 4069-4073.

Figdor, C.G., de Vries, I.J., Lesterhuis, W.J., and Melief, C.J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *NatMed* 10, 475-480.

Fisher, M.S., and Kripke, M.L. (1982). Suppressor T lymphocytes control the development of primary skin cancers in ultraviolet-irradiated mice. *Science* 216, 1133-1134.

Flacher, V., Bouschbacher, M., Verronese, E., Massacrier, C., Sisirak, V., Berthier-Vergnes, O., de Saint-Vis, B., Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Lebecque, S., *et al.* (2006). Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol* 177, 7959-7967.

Fowlkes, B.J., and Pardoll, D.M. (1989). Molecular and cellular events of T cell development. *Adv Immunol* 44, 207-264.

Fricke, I., Mirza, N., Dupont, J., Lockhart, C., Jackson, A., Lee, J.H., Sosman, J.A., and Gabrilovich, D.I. (2007). Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clin Cancer Res* 13, 4840-4848.

Fukunaga, A., Khaskhely, N.M., Sreevidya, C.S., Byrne, S.N., and Ullrich, S.E. (2008). Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol* 180, 3057-3064.

Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E., and Wiley, D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.

Gibson, S.J., Imbertson, L.M., Wagner, T.L., Testerman, T.L., Reiter, M.J., Miller, R.L., and Tomai, M.A. (1995). Cellular requirements for cytokine production in response to the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Interferon Cytokine Res* 15, 537-545.

Gibson, S.J., Lindh, J.M., Riter, T.R., Gleason, R.M., Rogers, L.M., Fuller, A.E., Oesterich, J.L., Gorden, K.B., Qiu, X., McKane, S.W., *et al.* (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 218, 74-86.

Ginhoux, F., Collin, M.P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., *et al.* (2007). Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *JExpMed* 204, 3133-3146.

Glenn, G.M., Rao, M., Matyas, G.R., and Alving, C.R. (1998a). Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 391, 851.

Glenn, G.M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Mallett, C.P., Hale, T.L., and Alving, C.R. (1998b). Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol* 161, 3211-3214.

Glenn, G.M., Scharton-Kersten, T., Vassell, R., Matyas, G.R., and Alving, C.R. (1999). Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants. *Infect Immun* 67, 1100-1106.

- Glenn, G.M., Taylor, D.N., Li, X., Frankel, S., Montemarano, A., and Alving, C.R. (2000). Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *NatMed* 6, 1403-1406.
- Godefroy, S., Goestch, L., Plotnicky-Gilquin, H., Nguyen, T.N., Schmitt, D., Staquet, M.J., and Corvaia, N. (2003). Immunization onto shaved skin with a bacterial enterotoxin adjuvant protects mice against respiratory syncytial virus (RSV). *Vaccine* 21, 1665-1671.
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.
- Grabbe, S., Bruvers, S., Gallo, R.L., Knisely, T.L., Nazareno, R., and Granstein, R.D. (1991). Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol* 146, 3656-3661.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Halliday, G.M., Bestak, R., Yuen, K.S., Cavanagh, L.L., and Barnetson, R.S. (1998). UVA-induced immunosuppression. *Mutat Res* 422, 139-145.
- Halliday, G.M., and Lyons, J.G. (2008). Inflammatory doses of UV may not be necessary for skin carcinogenesis. *PhotochemPhotobiol* 84, 272-283.
- Harizi, H., Juzan, M., Grosset, C., Rashedi, M., and Gualde, N. (2001). Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 209, 19-28.
- Hayday, A.C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18, 975-1026.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 10, 1237-1244.
- Heib, V., Becker, M., Warger, T., Rechtsteiner, G., Tertilt, C., Klein, M., Bopp, T., Taube, C., Schild, H., Schmitt, E., *et al.* (2007). Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* 110, 946-953.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., *et al.* (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33, 2987-2997.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200.

Hiranuma, K., Tamaki, S., Nishimura, Y., Kusuki, S., Isogawa, M., Kim, G., Kaito, M., Kuribayashi, K., Adachi, Y., and Yasutomi, Y. (1999). Helper T cell determinant peptide contributes to induction of cellular immune responses by peptide vaccines against hepatitis C virus. *J Gen Virol* 80 (Pt 1), 187-193.

Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., *et al.* (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743-748.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.

Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R.N., Mellman, I., and Steinman, R.M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 191, 927-936.

Itoh, T., and Celis, E. (2005). Transcutaneous immunization with cytotoxic T-cell peptide epitopes provides effective antitumor immunity in mice. *J Immunother* 28, 430-437.

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195, 1289-1302.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.

Kahlon, R., Hu, Y., Orteu, C.H., Kifayet, A., Trudeau, J.D., Tan, R., and Dutz, J.P. (2003). Optimization of epicutaneous immunization for the induction of CTL. *Vaccine* 21, 2890-2899.

Kaisho, T., and Akira, S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* 22, 78-83.

Kamath, A.T., Sheasby, C.E., and Tough, D.F. (2005). Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN-alpha beta and IFN-gamma. *J Immunol* 174, 767-776.

Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 202, 1539-1547.

Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., *et al.* (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22, 643-654.

Klimuk, S.K., Najar, H.M., Semple, S.C., Aslanian, S., and Dutz, J.P. (2004). Epicutaneous application of CpG oligodeoxynucleotides with peptide or protein antigen promotes the generation of CTL. *J Invest Dermatol* 122, 1042-1049.

Kloetzel, P.M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 5, 661-669.

Knight, S.C., and Macatonia, S.E. (1988). Dendritic cells and viruses. *Immunol Lett* 19, 177-181.

Kohm, A.P., McMahon, J.S., Podojil, J.R., Begolka, W.S., Degutes, M., Kasprovicz, D.J., Ziegler, S.F., and Miller, S.D. (2006). Cutting Edge: Anti-CD25 Monoclonal Antibody Injection Results in the Functional Inactivation, Not Depletion, of CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *J Immunol* 176, 3301-3305.

Krummel, M.F., and Davis, M.M. (2002). Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* 14, 66-74.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.

Kurimoto, I., and Streilein, J.W. (1992). Deleterious effects of cis-urocanic acid and UVB radiation on Langerhans cells and on induction of contact hypersensitivity are mediated by tumor necrosis factor- α . *J Invest Dermatol* 99, 69S-70S.

Kusmartsev, S., and Gabrilovich, D.I. (2006). Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55, 237-245.

Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 204, 57-63.

Lamb, C.A., and Cresswell, P. (1992). Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J Immunol* 148, 3478-3482.

Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.

Lennon-Dumenil, A.M., Bakker, A.H., Maehr, R., Fiebiger, E., Overkleeft, H.S., Roseblatt, M., Ploegh, H.L., and Lagaudriere-Gesbert, C. (2002). Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med* 196, 529-540.

Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24, 99-146.

Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* 8, 578-583.

Lock-Andersen, J., and Wulf, H.C. (1996). Threshold level for measurement of UV sensitivity: reproducibility of phototest. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 12, 154-161.

Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J., Griffiths, S., and Fryer, P. (1987). Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *Journal of Experimental Medicine* 166, 1654-1667.

Magram, J., Sfarra, J., Connaughton, S., Faherty, D., Warriar, R., Carvajal, D., Wu, C.Y., Stewart, C., Sarmiento, U., and Gately, M.K. (1996). IL-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. *Ann N Y Acad Sci* 795, 60-70.

Maloy, K.J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N.J., and Powrie, F. (2003). CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197, 111-119.

Maric, M., Arunachalam, B., Phan, U.T., Dong, C., Garrett, W.S., Cannon, K.S., Alfonso, C., Karlsson, L., Flavell, R.A., and Cresswell, P. (2001). Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science* 294, 1361-1365.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258.

Mitsui, H., Watanabe, T., Saeki, H., Mori, K., Fujita, H., Tada, Y., Asahina, A., Nakamura, K., and Tamaki, K. (2004). Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol* 122, 95-102.

Momburg, F., Neefjes, J.J., and Hammerling, G.J. (1994). Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr Opin Immunol* 6, 32-37.

Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.

- Moodycliffe, A.M., Kimber, I., and Norval, M. (1994). Role of tumour necrosis factor-alpha in ultraviolet B light-induced dendritic cell migration and suppression of contact hypersensitivity. *Immunology* 81, 79-84.
- Moser, B., and Brandes, M. (2006). Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol* 27, 112-118.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.
- Munoz-Fernandez, M.A., Fernandez, M.A., and Fresno, M. (1992). Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 22, 301-307.
- Nagaraj, S., and Gabrilovich, D.I. (2007). Myeloid-derived suppressor cells. *Adv Exp Med Biol* 601, 213-223.
- Nakayama, T., Singer, A., Hsi, E.D., and Samelson, L.E. (1989). Intrathymic signalling in immature CD4+CD8+ thymocytes results in tyrosine phosphorylation of the T-cell receptor zeta chain. *Nature* 341, 651-654.
- Noguchi, Y., Chen, Y.T., and Old, L.J. (1994). A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3171-3175.
- Norval, M., Gibbs, N.K., and Gilmour, J. (1995). The role of urocanic acid in UV-induced immunosuppression: recent advances (1992-1994). *Photochem Photobiol* 62, 209-217.
- O'Neill, L.A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 18, 3-9.
- Palamara, F., Meindl, S., Holcman, M., Luhrs, P., Stingl, G., and Sibilio, M. (2004a). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *Journal of Immunology* 173, 3051-3061.
- Palamara, F., Meindl, S., Holcman, M., Lührs, P., Stingl, G., and Sibilio, M. (2004b). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J Immunol* 173, 3051-3061.
- Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.
- Partidos, C.D., Beignon, A.S., Briand, J.P., and Muller, S. (2004). Modulation of immune responses with transcutaneously deliverable adjuvants. *Vaccine* 22, 2385-2390.
- Pittet, M.J., and Mempel, T.R. (2008). Regulation of T-cell migration and effector functions: insights from in vivo imaging studies. *Immunol Rev* 221, 107-129.

Poulin, L.F., Henri, S., de Bovis, B., Devilard, E., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2007). The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *JExpMed* 204, 3119-3131.

Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P., Schild, H., and Radsak, M.P. (2005). Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *Journal of Immunology* 174, 2476-2480.

Reckamp, K.L., Krysan, K., Morrow, J.D., Milne, G.L., Newman, R.A., Tucker, C., Elashoff, R.M., Dubinett, S.M., and Figlin, R.A. (2006). A phase I trial to determine the optimal biological dose of celecoxib when combined with erlotinib in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 3381-3388.

Reeve, V.E., Bosnic, M., Boehm-Wilcox, C., Nishimura, N., and Ley, R.D. (1998). Ultraviolet A radiation (320-400 nm) protects hairless mice from immunosuppression induced by ultraviolet B radiation (280-320 nm) or cis-urocanic acid. *Int Arch Allergy Immunol* 115, 316-322.

Reiter, M.J., Testerman, T.L., Miller, R.L., Weeks, C.E., and Tomai, M.A. (1994). Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *J Leukoc Biol* 55, 234-240.

Riese, R.J., and Chapman, H.A. (2000). Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 12, 107-113.

Ritter, U., Meissner, A., Scheidig, C., and Korner, H. (2004). CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* 34, 1542-1550.

Rivas, J.M., and Ullrich, S.E. (1992). Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 149, 3865-3871.

Roche, P.A., Marks, M.S., and Cresswell, P. (1991). Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354, 392-394.

Rodriguez, P.C., Hernandez, C.P., Quiceno, D., Dubinett, S.M., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., Gilbert, J., and Ochoa, A.C. (2005). Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 202, 931-939.

Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D.H., Gubler, U., and Sinigaglia, F. (1997). Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 185, 825-831.

Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C.H., Koch, F., and Stoitzner, P. (2003). Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 111, 725-740.

Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1997). Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* 7, 123-134.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *NatMed* 10, 909-915.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177, 134-140.

Sasawatari, S., Tadaki, T., Isogai, M., Takahara, M., Nieda, M., and Kakimi, K. (2006). Efficient priming and expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells by a novel cell-based artificial APC. *Immunol Cell Biol* 84, 512-521.

Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Dumenil, A.M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-218.

Schmitt, D.A., Owen-Schaub, L., and Ullrich, S.E. (1995). Effect of IL-12 on immune suppression and suppressor cell induction by ultraviolet radiation. *J Immunol* 154, 5114-5120.

Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Schwarz, A., Grabbe, S., Aragane, Y., Sandkuhl, K., Riemann, H., Luger, T.A., Kubin, M., Trinchieri, G., and Schwarz, T. (1996). Interleukin-12 prevents ultraviolet B-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J Invest Dermatol* 106, 1187-1191.

Schwarz, A., Grabbe, S., Mahnke, K., Riemann, H., Luger, T.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., and Schwarz, T. (1998). Interleukin 12 breaks ultraviolet light induced immunosuppression by affecting CD8⁺ rather than CD4⁺ T cells. *J Invest Dermatol* 110, 272-276.

Schwarz, A., Maeda, A., Wild, M.K., Kernebeck, K., Gross, N., Aragane, Y., Beissert, S., Vestweber, D., and Schwarz, T. (2004). Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. *J Immunol* 172, 1036-1043.

Seo, N., Tokura, Y., Nishijima, T., Hashizume, H., Furukawa, F., and Takigawa, M. (2000). Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 371-376.

Shirai, M., Pendleton, C.D., Ahlers, J., Takeshita, T., Newman, M., and Berzofsky, J.A. (1994). Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8+ CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J Immunol* 152, 549-556.

Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 19-30.

Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V.W., and Ullrich, S.E. (1998). A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* 160, 3783-3789.

Sidky, Y.A., Borden, E.C., Weeks, C.E., Reiter, M.J., Hatcher, J.F., and Bryan, G.T. (1992). Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. *Cancer Res* 52, 3528-3533.

Skov, L., Hansen, H., Barker, J.N., Simon, J.C., and Baadsgaard, O. (1997). Contrasting effects of ultraviolet-A and ultraviolet-B exposure on induction of contact sensitivity in human skin. *Clin Exp Immunol* 107, 585-588.

Slade, H.B. (1998). Cytokine induction and modifying the immune response to human papilloma virus with imiquimod. *Eur J Dermatol* 8, 13-16; discussion 20-12.

Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90, 1-50.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.

Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.

Steinman, R.M., Witmer, M.D., Nussenzweig, M.C., Chen, L.L., Schlesinger, S., and Cohn, Z.A. (1980). Dendritic cells of the mouse: identification and characterization. *J Invest Dermatol* 75, 14-16.

Stingl, L.A., Sauder, D.N., Iijima, M., Wolff, K., Pehamberger, H., and Stingl, G. (1983). Mechanism of UV-B-induced impairment of the antigen-presenting capacity of murine epidermal cells. *J Immunol* 130, 1586-1591.

Stoitzner, P., Green, L.K., Jung, J.Y., Price, K.M., Tripp, C.H., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Hermans, I.F., and Ronchese, F. (2008). Tumor immunotherapy by epicutaneous immunization requires langerhans cells. *J Immunol* 180, 1991-1998.

Stout, R.D., and Bottomly, K. (1989). Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol* 142, 760-765.

Streilein, J.W. (1983). Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol* 80 Suppl, 12s-16s.

Sung, S.S., Fu, S.M., Rose, C.E., Jr., Gaskin, F., Ju, S.T., and Beaty, S.R. (2006). A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 176, 2161-2172.

Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 11, 6713-6721.

Suzuki, H., Wang, B., Shivji, G.M., Toto, P., Amerio, P., Tomai, M.A., Miller, R.L., and Sauder, D.N. (2000). Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 114, 135-141.

Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., and Murphy, K.M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185, 817-824.

Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H., and Shimizu, T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5, 217-228.

Tato, C.M., and O'Shea, J.J. (2006). Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 441, 166-168.

Terabe, M., Matsui, S., Park, J.M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Chen, W., Wahl, S.M., Ledbetter, S., Pratt, B., *et al.* (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198, 1741-1752.

Testerman, T.L., Gerster, J.F., Imbertson, L.M., Reiter, M.J., Miller, R.L., Gibson, S.J., Wagner, T.L., and Tomai, M.A. (1995). Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leukoc Biol* 58, 365-372.

Thatcher, T.H., Luzina, I., Fischelevich, R., Tomai, M.A., Miller, R.L., and Gaspari, A.A. (2006). Topical imiquimod treatment prevents UV-light induced loss of contact hypersensitivity and immune tolerance. *J Invest Dermatol* 126, 821-831.

Thomas, D.A., and Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369-380.

Toews, G.B., Bergstresser, P.R., and Streilein, J.W. (1980). Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 124, 445-453.

Uebel, S., and Tampe, R. (1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 11, 203-208.

Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 684-693.

van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2002). A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev* 186, 47-56.

van Kooyk, Y., van de Wiele-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T.W., and Figdor, C.G. (1989). Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342, 811-813.

Villadangos, J.A., Bryant, R.A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Dumenil, A.M., Riese, R.J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G.P., Chapman, H.A., *et al.* (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172, 109-120.

Vink, A.A., Shreedhar, V., Roza, L., Krutmann, J., and Kripke, M.L. (1998). Cellular target of UVB-induced DNA damage resulting in local suppression of contact hypersensitivity. *J Photochem Photobiol B* 44, 107-111.

von Boehmer, H., Teh, H.S., and Kisielow, P. (1989). The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today* 10, 57-61.

Warger, T., Rechtsteiner, G., Schmid, B., Osterloh, P., Schild, H., and Radsak, M.P. (2007). Transcutaneous Immunization With Imiquimod Is Amplified by CD40 Ligation and Results in Sustained Cytotoxic T-Lymphocyte Activation and Tumor Protection. *ClinRevAllergy Immunol* 32, 57-66.

Watts, C. (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 13, 26-31.

Weiss, J.M., Renkl, A.C., Denfeld, R.W., de Roche, R., Spitzlei, M., Schopf, E., and Simon, J.C. (1995). Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. *Eur J Immunol* 25, 2858-2862.

Witt, P.L., Ritch, P.S., Reding, D., McAuliffe, T.L., Westrick, L., Grossberg, S.E., and Borden, E.C. (1993). Phase I trial of an oral immunomodulator and interferon inducer in cancer patients. *Cancer Res* 53, 5176-5180.

Yagi, H., Hashizume, H., Horibe, T., Yoshinari, Y., Hata, M., Ohshima, A., Ito, T., Takigawa, M., Shibaki, A., Shimizu, H., *et al.* (2006). Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization. *Cancer Res* 66, 10136-10144.

Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28, 639-650.

Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L.M., Carbone, D.P., and Lin, P.C. (2004). Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 409-421.

Yewdell, J. (2002). To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Mol Immunol* 39, 139-146.

Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2001). Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 13, 13-18.

Yoshikawa, T., and Streilein, J.W. (1990). Genetic basis of the effects of ultraviolet light B on cutaneous immunity. Evidence that polymorphism at the *Tnfa* and *Lps* loci governs susceptibility. *Immunogenetics* 32, 398-405.

Zamoyska, R. (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol* 10, 82-87.

Zwaveling, S., Ferreira Mota, S.C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G.B., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169, 350-358.

8 Publikation

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation:

Stein, P., Rechtsteiner, G., Warger, T., Bopp, T., Fuhr, T., Prufer, S., Probst, H.C., Stassen, M., Langguth, P., Schild, H., *et al.* UV Exposure Boosts Transcutaneous Immunization and Improves Tumor Immunity: Cytotoxic T-Cell Priming through the Skin. *J Invest Dermatol.*

