

Aus dem  
CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Direktorin (komm.): Prof. Dr. med. Ulrike Blume-Peytavi

**Habilitationsschrift**

**Kutane Dendritische Zell-Subpopulationen  
in Pathogenese und Therapie dermatologischer Erkrankungen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Dermatologie und Venerologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Dorothea Terhorst-Molawi

Eingereicht: Dezember 2017  
Dekan: Prof. Dr. med. Axel Radlach Pries  
1.Gutachter: Prof. Dr. Kilian Eyerich  
2.Gutachter: Prof. Dr. Cord Sunderkötter

# Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	3
2. EINLEITUNG.....	4
2.1 Dendritische Zellen .....	4
2.2 Dendritische Zellen der Haut.....	4
2.2.1 Funktion der dendritischen Zellen der Haut .....	6
2.3 Targeting kutaner dendritischer Zellen.....	8
2.3.1 Überwindung der Hautbarriere .....	8
2.3.2 Injektionen in die Haut.....	9
2.3.3 Nadelfreie Methoden.....	11
2.4 Immunologischer Ausblick.....	12
3 ZUSAMMENFASSUNG EIGENER ARBEITEN IM WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT .....	14
3.1 Murine dendritische Zellsubpopulationen in gesunder Haut und im Kontaktekzemmodell 14	
3.2 Murine dendritische Zellsubpopulationen im Psoriasismodell.....	30
3.3 Mikropartikel als mögliche Träger und Adjuvantien in der Allergen-spezifischen Immuntherapie .....	40
3.4 XCR1 auf kreuzpräsentierenden DCs als Zielmolekül zur Induktion einer schützenden CD8 <sup>+</sup> T-Zell Antwort gegen Influenza Virus.....	51
3.5 Spezielles Targeting XCR1 <sup>+</sup> , kreuzpräsentierender, kutaner, dendritischer Zellen .....	65
4 DISKUSSION.....	75
5 ZUSAMMENFASSUNG .....	79
6 LITERATURVERZEICHNIS .....	81
7 DANKSAGUNG.....	85
8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	86

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AF	Autofluoreszenz
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASIT	Allergen-spezifische Immuntherapie
cDCs	konventionelle DCs
DC	Dendritische Zelle
DCs	Dendritische Zellen
DNFB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
IMQ	Imiquimod
moDCs	monocyte-derived DCs; DCs, welche sich aus Monozyten entwickelt haben
OVA	Ovalbumin
pDCs	plasmazytoide DCs
SHAS	Strontium-doped hydroxyapatite porous spheres
SSC	side size scatter
TLR	Toll-like receptor
XCR1	XC-chemokine receptor 1

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Dendritische Zellen

Schon 1868 beschrieb der Berliner Medizinstudent Paul Langerhans eine von ihm neu entdeckte epidermale Zellart, die später nach ihm benannten Langerhans-Zellen. Paul Langerhans hatte allerdings fälschlicherweise vermutet, es würde sich um Nerven der Haut handeln<sup>1</sup>. Ralph Steinman erkannte 1973 die Fähigkeit dieser Zellen zur Antigenpräsentation und prägte den Terminus der Dendritischen Zelle<sup>2</sup>.

Die Dendritische Zelle (DC) stellt als effektivste Antigen-präsentierende Zelle (APC) des Immunsystems eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Als Teil des angeborenen Immunsystems aktiviert sie T-Zellen des erworbenen Immunsystems. DCs können eine spezifische Immunantwort prägen, sind aber auch wesentlich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung zentraler und peripherer Toleranz. Gemeinsam mit Monozyten und Makrophagen gehören DCs zum mononukleären Phagozytensystem. Die Gruppe der DCs beinhaltet konventionelle DCs (cDCs), plasmazytoide DCs (pDCs) und DCs, welche sich aus Monozyten entwickelt haben (monocyte-derived DCs oder moDCs)<sup>3</sup>. pDCs sind in der gesunden Haut nicht nachweisbar und stehen somit nicht im Fokus dieser Arbeit.

### 2.2 Dendritische Zellen der Haut

Die Haut kann in zwei anatomische Einheiten unterteilt werden: Epidermis und Dermis. Die Epidermis ist ein enggepacktes Epithel bestehend aus Keratinozyten, welche das Wasser undurchlässige Stratum corneum bilden. Eine Basalmembran teilt die Epidermis von der darunter liegenden Dermis, welche eine zellarme Schicht ist, bestehend aus Fibroblasten und Kollagen- und Elastinfasern. Langerhans Zellen werden in der Epidermis und dem Haarfollikel epithel gefunden und wurden früher als bedeutendste APCs betrachtet. Neuere Studien zeigen jedoch, dass auch die Dermis ein dichtes Netzwerk von APCs besitzt, welches sowohl DCs als auch Makrophagen umfasst<sup>4,5</sup> (**Abbildung 1**).

cDCs in der Dermis werden aufgrund unterschiedlicher Ontogenese, Abhängigkeiten von Transkriptionsfaktoren, Genexpressionsprofilen und physiologischer Funktionen

in verschiedene Subpopulationen eingeteilt. Um die verschiedenen Subpopulationen zu unterscheiden, hat sich der technisch praktikable Nachweis unterschiedlicher Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie etabliert. Murine cDCs in der Dermis werden in erster Linie aufgrund ihrer Expression von CD11b kategorisiert. Dermale CD11b<sup>+</sup> cDCs sind die häufigsten DCs in der gesunden Dermis. Bis vor kurzem war es nicht möglich, diese CD11b<sup>+</sup> cDCs von CD11b<sup>+</sup> moDCs und Makrophagen zu unterscheiden<sup>4</sup>. In den letzten Jahren konnte nun herausgefunden werden, dass CD64 oder Fc-gamma receptor 1 (FcγRI) ausschließlich auf CD11b<sup>+</sup> moDCs und Makrophagen exprimiert wird und somit eine Unterscheidung von den CD64<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> cDCs ermöglicht<sup>6-8</sup>.

Dermale CD11b<sup>-</sup> cDCs exprimieren das C-type lectin Langerin (auch bekannt als CD207 und CLEC4K) und beinhalten CD103<sup>+</sup> und CD103<sup>-</sup> Zellen. Durch ihre Entwicklung sind diese Zellen mit den CD8α<sup>+</sup> cDCs in sekundären Lymphgeweben verwandt. Dermale CD103<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> cDCs stechen besonders durch ihre Fähigkeit der Kreuzpräsentation hervor<sup>4</sup>. Bei der Kreuzpräsentation werden Antigene aus dem extrazellulären Raum in die Zellen eingegliedert, die daraus herrührenden antigenen Peptide jedoch auf MHC-I Komplexen CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen gezeigt. Insbesondere in der Bekämpfung von Virus-infizierten oder maligne entarteten Zellen ist dieser Mechanismus zur Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten von herausragender Bedeutung. Bis vor kurzem wurde sehr intensiv nach einem spezifischen Oberflächenmarker zur Identifizierung kreuzpräsentierender DCs gesucht. Zur Definition dieses DC-Subtyps wurden Clec9a und CD205 verwandt, welche allerdings nicht exklusiv auf kreuzpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Nun scheint mit dem XC-chemokine receptor 1 (XCR1) ein Marker gefunden zu sein, welcher speziesweit exklusiv von kreuzpräsentierenden DCs aller Organe exprimiert wird<sup>9,10</sup>. DCs und Makrophagen der murinen Haut und die entsprechenden menschlichen Subpopulationen sind mit ihren Hauptoberflächenmarkern in Tabelle 1 aufgelistet.

Maus	Mensch	Ergänzende Marker
<b>Epidermis</b>		
Langerhans Zelle	Langerhans Zelle	CD1a <sup>+</sup> CD207 <sup>+</sup>
<b>Dermis</b>		
XCR1 <sup>+</sup> cDC	CD141 <sup>+</sup> cDC	XCR1 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> CD207 <sup>+</sup> cDC CD11b <sup>-</sup> CD103 <sup>+</sup> cDC
CD11b <sup>+</sup> cDC	CD1c <sup>+</sup> cDC	-
Monocyte-derived DC	Monocyte-derived DC	CD64 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> AF <sup>low</sup> SSC <sup>low</sup>
Doppel-negative DC	Nicht definiert	-
Makrophage	Makrophage	CD64 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> AF <sup>high</sup> SSC <sup>high</sup> FXIIIa <sup>+</sup>

**Tabelle 1:** Dendritische Zellen und Makrophagen der murinen Haut und ihre menschlichen Gegenstücke, adaptiert nach Malissen et al.<sup>3</sup>

*AF: Autofluoreszenz, CD1c: auch bekannt als BDCA1; CD64: auch bekannt als Fc $\gamma$ RI; CD141: auch bekannt als Thrombomodulin und BDCA3; CD207: auch bekannt als Langerin und CLEC4K; FXIIIa: Koagulationsfaktor XIII subunit a, auch bekannt als T13A1; SSC: side size scatter in der Durchflusszytometrie; XCR1: XC-chemokine receptor 1*

### 2.2.1 Funktion der dendritischen Zellen der Haut

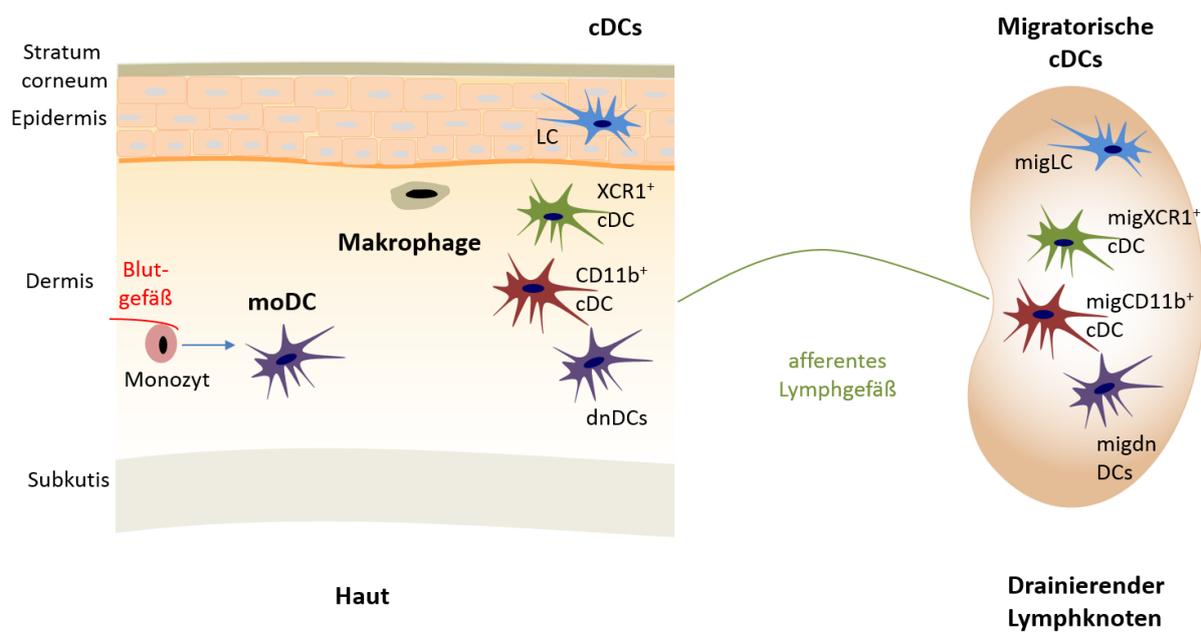
Die gemeinsame Funktion aller Subtypen der cDCs ist die Antigenerkennung und Antigenpräsentation vorher als fremdartig erkannter aufgenommener Strukturen, wie z.B. Mikroorganismen und deren Bestandteile. cDCs können zum Lymphknoten migrieren und dort T-Zellen induzieren. Sie sind somit in der Lage, eine primäre Immunantwort zu indizieren, indem sie naive T-Lymphozyten aktivieren.

cDCs in gesundem, nicht-lymphoiden Gewebe wie der Haut ruhen dort nicht, sondern erfüllen auch eine wichtige Funktion. So migriert ein kleiner Teil der cDCs ständig von der gesunden Haut zu den Lymphknoten, um die Homöostase aufrechtzuhalten. Nach Reifung regulieren diese cDCs MHC-Klasse II (MHC II) Moleküle hoch und transportieren kutane Selbstantigene zu den T-Zellzonen der drainierenden Lymphknoten<sup>11</sup>. Wenn sie auf T-Zellen treffen, welche der zentralen Toleranzkontrolle entkommen sind, triggern diese cDCs ein abortives Programm in autoreaktiven T-Zellen<sup>12,13</sup>. Weiterhin interagieren unter homöostatischen Bedingungen gereifte cDCs

mit nicht-autoreaktiven naiven T-Zellen und tragen so dazu bei, dass diese T-Zellen weiterhin aufmerksam sind und die Antigen sensitivität verstärkt wird<sup>14</sup>.

Werden cDCs in der Haut allerdings durch Pilze, Viren, Bakterien oder Protozoen aktiviert, durchlaufen sie ein anderes terminales Differenzierungsprogramm als das bei der homöostatischen Reifung. Zusätzlich werden hier kostimulatorische Moleküle hochreguliert. Diese Reifung führt zur Migration der cDCs zu den drainierenden Lymphknoten, dort fördern sie die klonale Expansion der naiven antigen-spezifischen T-Zellen und den Erwerb von T-Zell Effektorfunktionen.

Wie die verschiedenen DC Subtypen, welche in gesunder Haut identifiziert wurden, sich in verschiedenen Krankheitsstadien entwickeln und funktionieren, ist ein wichtiger Fokus der aktuellen Forschung.



**Abbildung 1:** Antigenpräsentierende Zellpopulationen der gesunden murinen Haut.

## 2.3 Targeting kutaner dendritischer Zellen

Vakzinierungen stellen eine gut etablierte und gut untersuchte Interventionsmöglichkeit in der Medizin dar. Louis Pasteur entdeckte, dass bestimmte Mikroben Krankheiten verursachen und attenuierte Mikroben einen lebenslangen Schutz gegen eine folgende Infektion durch pathogene, also nicht-attenuierte Formen der Mikrobe bewirken können. Erst das 20. Jahrhundert brachte aber dann ein klareres Verständnis der zellulären und auch der molekularen Mechanismen der Vakzinimmunität und so auch der entscheidenden Rolle der DCs<sup>15,16</sup>. Diese großen Fortschritte initiierten eine neue Ära der Vakzinierungsforschung, basierend auf unserem Verständnis wichtiger immunologischer Grundlagen.

Ein Vakzin kann definiert werden als „formulation that induces specific, non-toxic, and long-lasting immune responses to prevent or treat disease“<sup>15</sup>. Typischerweise waren und sind das Infektionskrankheiten, allerdings wird das Spektrum der Zielantigene erweitert auf Antigene spezifisch für Krebs, Autoimmunität oder Allergien<sup>17</sup>. Demnach werden zukünftige Vakzine nicht nur die Immunität im klassischen Sinne verstärken, sondern auch die Immunität regulieren oder dämpfen oder sogar eine immunologische Toleranz induzieren können. DCs sind die Hauptinduktoren und Regulatoren von Immunität und Toleranz. Sie sind entscheidend in der Entwicklung moderner Vakzine und stehen so immer mehr im Mittelpunkt<sup>18-20</sup>.

Die meisten Vakzine werden aktuell in das subkutane Fettgewebe oder in den Muskel unterhalb der Haut appliziert. Allerdings verfügen das subkutane Fettgewebe und das Muskelgewebe nur über wenige, kaum charakterisierte DCs<sup>6</sup>. Relativ wenige Vakzine wirken kutan<sup>21</sup>, obwohl gerade die Dermis und Epidermis der Haut über ein dichtes, gut untersuchtes Netzwerk an DCs verfügen. Die frühesten erfolgreichen Vakzinierungen gegen Pocken wurden 1796 auch über die Haut verabreicht. In der neuen Ära der modernen, rationalen Vakzinierungsstrategien werden aktuell verschiedene neue Lösungsansätze konzipiert, mit denen das Potenzial dieser kutanen DCs genutzt werden soll.

### 2.3.1 Überwindung der Hautbarriere

Kutane Vakzinierung kann verstärkte Immunantworten hervorrufen und eine einfachere Medikamentenapplikation ermöglichen, allerdings werden aktuell

zuverlässige Methoden zur intradermalen Applikation noch evaluiert. Diese verschiedenen Methoden zur Überwindung des Stratum corneums, der wasserabweisenden Barrierschicht, können in nadelbasierte und nadelfreie Methoden unterschieden werden. Eine andere Einteilung der Möglichkeiten der kutanen Applikation beruht in passiven Methoden, welche keine physische Störung setzen, oder in aktiven Methoden, welche das Stratum corneum verletzen<sup>22-24</sup>. Eine Auswahl an Methoden zur kutanen Medikamentenapplikation ist graphisch in **Abbildung 2** dargestellt.

### 2.3.2 Injektionen in die Haut

#### **Mantoux-Methode**

Die meisten Impfungen werden intramuskulär oder subkutan mit einer Injektionsnadel verabreicht. Um eine intradermale Impfung zu erreichen, können konventionelle Injektionsnadeln mit der Mantoux Methode benutzt werden. Hierbei werden die Nadeln in einem 5-15 Grad Winkel ca. 1 mm tief in die Dermis eingeführt. Diese Methode wurde von Charles Mantoux Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelt und wird zur Tuberkulosedagnostik mittels intradermaler Injektion von Tuberkulin benutzt<sup>25</sup>. Allerdings benötigt die intradermale Injektion durch die Mantoux Technik ein spezielles Training und erzielt dennoch häufig unzuverlässige, inkonsistente Ergebnisse<sup>26</sup>.

#### **Durchstechen der Haut**

Seit mehr als 200 Jahren werden verschiedene scharfe Instrumente für die Impfung eingesetzt. Die Haut wird mit kleinen Löchern durchstoßen, durch die dann Impfstoff in den Körper eindringen kann<sup>24</sup>. Scharfe Werkzeuge wie gegabelte Nadeln wurden historisch für die Pocken<sup>27</sup> und Tuberkulose<sup>28</sup> Impfung verwendet und bleiben bis heute in Gebrauch.

#### **Mikronadeln**

Die Mikronadeltechnologie ermöglicht eine nahezu schmerzlose und effiziente Verabreichung von Molekülen durch das Stratum corneum sowohl für die lokale als auch die systemische Absorption. Die Länge der Mikronadeln beträgt in der Regel 200 - 800 µm, so dass sie lang genug sind, um das Stratum corneum (Dicke 15 - 20 µm) zu durchdringen, aber immer noch kurz genug, um keine Nervenenden zu erreichen, wodurch die Schmerzempfindung durch herkömmliche Nadeln verursacht wird.

Unterschiedliche Mikronadelsysteme werden schon vielfältig eingesetzt und erprobt. Häufig wird Influenza Impfstoff als Testmolekül zur Mikronadel-assistierten Impfung eingesetzt. Mittels dieses Systems kann einfach überprüft werden, ob die kutane Vakzinierung zur gewünschten Immunität geführt hat.

### **Hohle Mikronadeln**

Als Weiterentwicklung der Mantoux Methode werden hier die Mikronadeln vertikal auf die Haut aufgesetzt. Hohle Mikronadeln erlauben Injektionen von nur wenigen  $\mu\text{l}$  flüssiger Formulierungen in die Haut. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine intradermale Vakzinierung mit einem niedrig dosierten Influenzavakzin mittels hohler Mikronadeln ebenso immunogen war wie der Goldstandard der intramuskulären Impfung<sup>29</sup>.

### **Solide Mikronadeln**

Auch solide Mikronadeln können verwendet werden, um die Haut zu durchstechen und damit den Impfstoff epidermal oder dermal zu deponieren<sup>24,30</sup>. Impfstoffformulierungen können auf die Haut aufgetragen werden, nachdem diese zuvor mit Mikronadeln penetriert wurde. Alternativ können Mikronadeln mit einer Impfstoffformulierung beschichtet werden und die Impfstoffe werden dann nach der Insertion in die Haut freigesetzt. Feste Mikronadeln werden auch als Patches hergestellt, die leicht auf die Haut aufgetragen werden können. Im Mausmodell riefen mit einer niedrigeren Antigendosis beschichtete Mikronadeln eine mit der intramuskulären Standarddosis vergleichbare Immunität hervor<sup>31</sup>.

### **Auflösende Mikronadeln**

Mikronadeln können aus verschiedenen Polymeren hergestellt werden, die sich nach ihrer Anwendung rasch in der Haut auflösen. Gleichzeitig geben sie ihre Ladung in die Epidermis frei. Ein weiterer Vorteil auflösender Mikronadeln ist die Abwesenheit von scharfen Abfällen, wenn sie für die Impfung verwendet werden. Auflösende Mikronadeln aus einem biokompatiblen Polymer wurden verwendet, um eingekapselten Influenza-Virus-Impfstoff in die Dermis einzuführen. Dieser Ansatz hat robuste Antikörper-vermittelte und zelluläre Immunantworten hervorgerufen<sup>32</sup>.

### 2.3.3 Nadelfreie Methoden

#### **Spritzdüsentchnik**

Nadelfreie Alternativen der intradermalen Impfstoff- und Arzneimittelabgabe sind die Jet-Injektion und Partikel-Injektionsrouten. Mit der Jet-Injektion gibt es bereits jahrzehntelange klinische Erfahrung, neuere Studien werden mit weiteren Innovationen in dieser Technologie durchgeführt. Flüssige Injektoren punktieren die Haut mittels eines Hochgeschwindigkeitsstrahls, welcher das Stratum corneum durchdringen kann. Anschließend können die Arzneimittel in der Haut abgelagert werden. Ähnlich bringen Pulver-Injektoren pulverförmige Medikamente in die Haut mittels komprimierten Gases oder einer elektrischen Energiequelle<sup>22,33</sup>.

#### **Chemische Enhancer/ Patch**

Chemische Stoffe können die Permeabilität von Wirkstoffen durch die Haut beeinflussen. Wasser ist der wichtigste sogenannte chemische enhancer. Unter Okklusion sammelt sich der Schweiß, und im gequollenen Stratum corneum bilden sich Wasserkanäle, in denen auch wasserlösliche Wirkstoffe die Hautbarriere überwinden können. Andere Verbindungen wie Alkohole, organische Lösungsmittel oder Detergenzien können die Lipidmembran des Stratum corneum stören und somit die Permeabilität erhöhen. Im Weiteren kann die Permeabilität durch die Bindung des Wirkstoffs an ein Vehikel, z.B. Nanopartikel oder Liposomen, erhöht werden. Durch Aufkleben von Patches auf der Haut entsteht durch die okklusive Kondensation eine Kammer, in der Allergen durch Haut-Schweiß löslich gemacht wird. Dieses System wurde bereits vielfach im Mausmodell in der spezifischen Immuntherapie von Nahrungsmittelallergien untersucht und zeigte dort eine erfolgreiche Toleranzentwicklung<sup>34</sup>. Neuere Daten im Mausmodell zeigen, dass durch die Applikation von entgiftetem Pertussistoxin mittels Patch auch eine robuste, proinflammatorische Immunantwort induziert werden kann<sup>35</sup>.

#### **Abrasion**

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass die Hautbarriere des Stratum corneums mittels verschiedener Abriebverfahren reduziert werden kann, wodurch die Penetration von Proteinen ermöglicht wird. Mögliche Techniken sind das Abreiben mittels rauer Oberflächen wie Sandpapier<sup>36</sup>, tape-stripping<sup>37</sup> oder Mikrodermabrasion<sup>38</sup>.

#### **Ultraschall, Elektroporation / Iontophorese**

Ultraschall und Elektroporation / Iontophorese stellen weitere physikalische Methoden dar, die Permeabilität des Stratum corneums zu verbessern.

Der niederfrequente Ultraschall (20–120 kHz) wirkt durch zwei Mechanismen: erstens wird die Haut durch die entstehende Wärme permeabler, zweitens bildet sich eine Blase im Stratum corneum, dessen Struktur dann durch den nachfolgenden Kollaps der Blase aufgebrochen wird.

Bei der Elektroporation und Iontophorese werden Moleküle über elektrischen Strom in die Haut eingebracht. Bei der Elektroporation entstehen durch elektrische Impulse (75-100 V) auf der Haut Mikroporen, welche permeabel für nachträglich applizierte Wirkstoffe sind. Die maximale Stromstärke bei der Applikation mittels Iontophorese liegt bei 0,5 mA/cm. Um nichtgeladene Antigene zu transportieren, können diese an ionisierte Moleküle gebunden werden<sup>24</sup>.

### **Thermische Ablation**

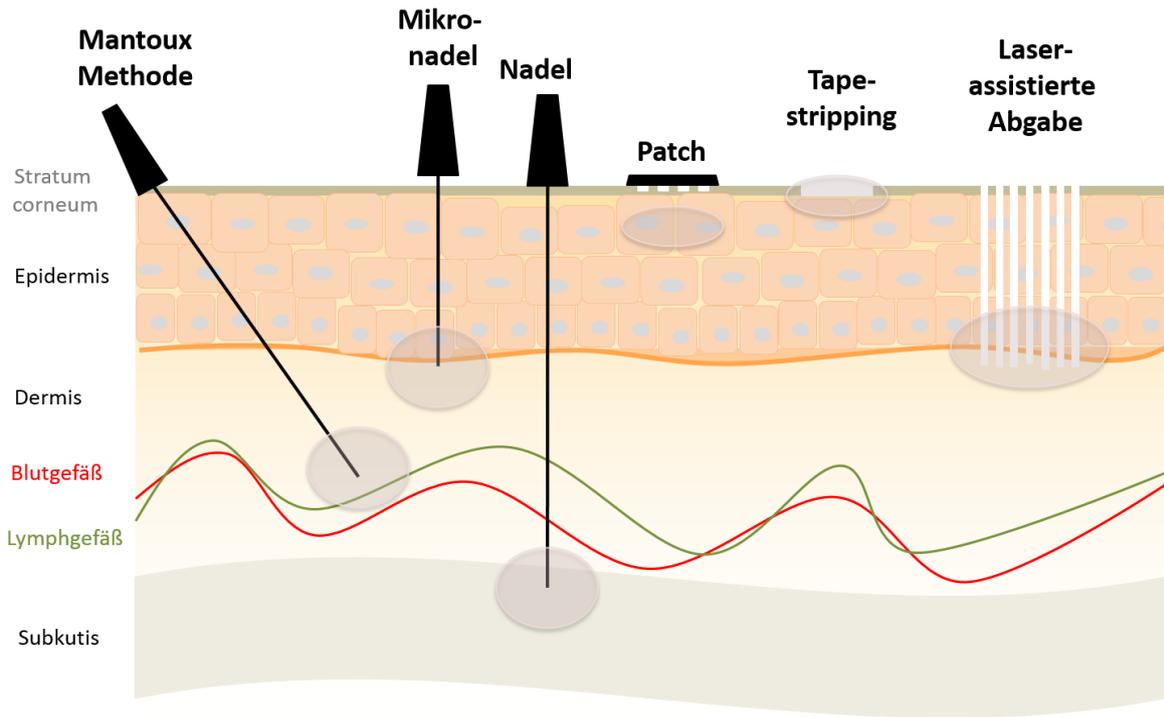
Mikroporen werden in die Haut eingefügt, um Impfstoffe in die Haut zu liefern. Dies ist ein zweistufiger Prozess, bei dem zunächst die Mikroporen generiert werden und dann als nächstes eine Wirkstofflösung aufgetragen wird. Bei dieser Methode wird ein Array von Mikroporen in der Haut erzeugt, verschiedene Hautschichten werden durch die Anwendung von fokussierter Wärmeenergie ablatiert. Diese fokussierte Wärmeenergie entsteht durch Hochfrequenz- oder laserbasierte Ansätze<sup>24</sup>.

## 2.4 Immunologischer Ausblick

Die Möglichkeit, solche neuartigen Abgabesysteme mit Impfstoffantigenen zu kombinieren, eröffnet der immunologischen Forschung gänzlich neue Perspektiven.

Werden die Impfstoffantigene an Antikörper gekoppelt, welche für Oberflächenmoleküle eines bestimmten Typs kutaner APC spezifisch sind, kann so die funktionelle Spezialisierung dieser APCs erforscht werden.

Beispielsweise aktiviert die Ausrichtung von Impfstoffantigenen auf XCR1<sup>+</sup>-cDCs bei Mäusen ihre robuste Kreuz-Präsentationskapazität und die Fähigkeit, Effektor-CD8<sup>+</sup> - T-Zellen zu induzieren<sup>3,39,40</sup>. Ebenso könnte das Targeting von Retinolsäureproduzierenden dermalen CD11b<sup>+</sup>-DCs zur Induktion von antigenspezifischen TReg-Zellen benutzt werden, um pathologische Zustände wie allergische Kontaktdermatitis zu beeinflussen<sup>41</sup>.



**Abbildung 2:** Auswahl einiger kutaner Abgabemethoden.

### 3 ZUSAMMENFASSUNG EIGENER ARBEITEN IM WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT

#### 3.1 Murine dendritische Zellsubpopulationen in gesunder Haut und im Kontaktekzemmodell

Bis vor kurzem hatten wir keine Oberflächenmarker zur Verfügung, mit denen eine eindeutige Differenzierung von Makrophagen, cDCs und moDCs in der Haut möglich gewesen wäre<sup>4</sup>. Somit konnte die Rolle der einzelnen myeloiden Subpopulationen in der Hautintegrität und Hautimmunität nicht verstanden werden. Durch die Kombinationsfärbung der CD64 und CCR2 Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie ist es uns nun gelungen, die verschiedenen myeloiden Zellsubpopulationen zu identifizieren und zu differenzieren. Von den verschiedenen Subpopulationen haben wir ihre Ontogenese, transkriptomischen Signaturen, ihr Migrationsverhalten sowie ihre T-Zell-stimulierenden Kapazitäten analysiert.

Dermale Makrophagen waren gemischten Ursprungs. Ein Teil scheint bereits pränatal in der Haut angelegt zu sein, während andere Makrophagen kontinuierlich von aus dem Blut einwandernden Monozyten ersetzt werden. Dermale Makrophagen migrierten nicht zu den drainierenden Lymphknoten und konnten keine T-Zellen aktivieren. cDCs haben herausragende Migrationsfähigkeiten und sind die Zellpopulation mit den stärksten T-Zell-Aktivierungsmöglichkeiten. Ly-6C<sup>+</sup> Monozyten wandern kontinuierlich über die Blutgefäße in die gesunde Dermis ein und generieren dort moDCs. Diese moDCs haben eine weniger ausgeprägte T-Zell-Stimulationsfähigkeit verglichen mit cDCs, allerdings scheinen sie besonders geeignet zu sein, hautständige T-Zellen zu aktivieren. Makrophagen, cDCs und Monozyten bestanden in unveränderter Zahl in Mäusen, welche unter keimfreien Bedingungen gehalten wurden. Die Zahl an moDCs war jedoch verringert in keimfreien Mäusen, so dass für die Entwicklung der moDCs das Mikrobiom eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Uns ist es also mit einer kleinen Auswahl an Oberflächenmarkern gelungen, Monozyten, Makrophagen, moDCs und cDC in der Haut voneinander zu differenzieren und ein hohes Maß an funktionaler Spezialisierung dieser mononukleären Phagozyten der Haut festzustellen (**P1**<sup>42</sup>).

Das allergische Kontaktekzem wird durch eine verzögerte Immunreaktion als spezifische Antwort auf ein von außen einwirkendes Kontaktallergen ausgelöst, die

Lebenszeitprävalenz beträgt ca. 15%. Durch Applikation von chemischen Kontaktallergenen wie 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol (DNFB) kann das allergische Kontaktekzem im Mausmodell nachempfunden werden. Durch Transkriptomanalysen konnten wir zeigen, dass die von uns entwickelte durchflusszytometrische Analyse mit Oberflächenmarkern auch in der entzündeten Haut eine erfolgreiche Differenzierung der einzelnen myeloiden Subpopulationen ermöglicht. Allerdings ist das mononukleäre Phagozytennetzwerk erheblich verändert im DNFB-Entzündungsmodell. Leicht erhöhte Zahlen an LCs, XCR1<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> dermale cDCs migrieren zu den hautdrainierenden Lymphknoten und induzieren dort DNFB-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zur gleichen Zeit infiltrieren eine große Anzahl von Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten aus dem Blut in die entzündete Dermis und generieren moDCs. Einige dieser moDCs können in dem inflammatorischen Milieu CCR7-abhängige, cDC-ähnliche Migrationseigenschaften erwerben und erreichen die drainierenden Lymphknoten (**P1**<sup>42</sup>).

**P1:** Tamoutounour S\*, Guilliams M\*, Montanana Sanchis F, Liu H, **Terhorst D**, Malosse C, Pollet E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C, Dalod M, Malissen B\*, Henri S\*. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*. 2013; 39:925-38.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>

### 3.2 Murine dendritische Zellsubpopulationen im Psoriasismodell

Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung unbekannter Ursache. Die kurzfristige, 5-7 Tage andauernde Applikation des TLR7 Agonisten Imiquimod (IMQ), auf den Mausrücken kann eine Psoriasis-ähnliche Entzündung auslösen<sup>43</sup>. Wir modifizierten die Anwendung von IMQ für 14 aufeinander folgende Tage, wählten eine niedrigere Dosis von IMQ und die Mausohren als Auftragungsort. Die Mausohren sind aufgrund der geringeren Anzahl an Haarfollikeln der menschlichen Haut ähnlicher als die restliche Maushaut. Mit dieser modifizierten Applikation konnten wir viele klinische und zelluläre Charakteristika der initialen Phase als auch der stabilen Plaque-Phase der Psoriasis im Mausmodell rekapitulieren. Welche Zellart die Initialzündung der Psoriasis-Kaskade betätigt, ist nicht vollständig geklärt, es werden sowohl Makrophagen als auch DCs diskutiert. Da diese beiden Zelltypen aufgrund ihrer ähnlichen äußerlichen Merkmale bisher nur schlecht auseinandergehalten werden konnten, war eine genaue Differenzierung der initialen Rolle nicht möglich.<sup>44</sup>. Basierend auf der von uns entwickelten Methode, die einzelnen mononukleären Phagozyten in ihren Subpopulationen zu differenzieren, haben wir ihre Dynamik in den beiden Phasen unseres Modells der psoriasiformen Dermatitis untersucht. Während der frühen Phase infiltrierten Neutrophile die Epidermis, Monozyten und moDCs waren in der Dermis vorherrschend. Während der späten Phase, dominierten LCs in der Epidermis und Makrophagen in der Dermis. Die starke Zunahme der Anzahl von LCs in der Epidermis erfolgte vor allem aus lokaler Proliferation der LCs. Neben den durchgeführten Proliferationsassays unterstützen auch die Daten unserer globalen Transkriptionsanalyse unser Fazit. Depletion der LCs zeigte, dass die Abwesenheit der LCs in der späteren Entzündungsphase mit einer vermehrten Neutrophileninfiltration assoziiert war. In der stabilen Plaquephase einer psoriasiformen Dermatitis scheinen LCs unseren Daten nach also eine entzündungshemmende Rolle einzunehmen (**P2**<sup>45</sup>).

**P2:** Terhorst D, Chelbi R\*, Wohn C\*, Malosse C, Tamoutounour S, Jorquera A, Bajenoff M, Dalod M, Malissen B\*, Henri S\*. Dynamics and Transcriptomics of Skin Dendritic Cells and Macrophages in an Imiquimod-Induced, Biphasic Mouse Model of Psoriasis. *J Immunol.* 2015; 195:4953-61.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500551>

### 3.3 Mikropartikel als mögliche Träger und Adjuvanzien in der Allergen-spezifischen Immuntherapie

Die Allergen-spezifische Immuntherapie (ASIT) stellt die bisher einzige kausale Behandlungsmethode für Typ-I-Allergien dar<sup>46,47</sup>. Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, mindestens zwei Mechanismen scheinen essentiell zu sein<sup>48</sup>. Zum einen werden allergen-spezifische IgG<sub>4</sub> und IgG<sub>1</sub> Antikörper gebildet, wohingegen die allergen-spezifischen IgE Antikörper im Laufe einer ASIT abnehmen. Weiterhin führt die ASIT zur Induktion von allergen-spezifischen regulatorischen T-Zellen. Treg-Zellen scheinen Th2-Zellen direkt zu supprimieren und auch wiederum einen relevanten Einfluss auf die Produktion von IgG Antikörper-Isotypen anstelle von IgE zu haben. Die DCs mit ihren Funktionen der Antigenerkennung, Antigenpräsentation und folgenden Immuninduktion nehmen natürlich eine wichtige Schlüsselrolle für das Gelingen einer ASIT ein<sup>49</sup>.

Obwohl die ASIT die einzige langanhaltende und krankheitsmodifizierende Therapie darstellt und die symptomatische Therapie häufig insuffizient ist, unterziehen sich nur 5% der Patienten mit Rhinoconjunctivitis allergica einer ASIT. Nebenwirkungen, eine lange Therapiedauer und häufige Medikamentenapplikationen sind weiterhin Gründe für eine niedrige Compliance während der Therapie. Lediglich ca. 20% der Patienten beenden die Mindestdauer der Therapie von 3 Jahren<sup>50,51</sup>. Weiterhin zeigen aktuelle Metaanalysen lediglich einen moderaten Behandlungserfolg einer ASIT<sup>52</sup>. Patientenfreundlichere, schnellere und wirksamere ASIT Regime sollten also entwickelt werden, um die Compliance zu fördern und mehr Patienten den benötigten Therapien zuführen zu können.

Ein möglicher Lösungsansatz ist die Zugabe von Adjuvanzien wie Mikro- oder Nanopartikeln zu den Allergenlösungen, um die Immunantwort zu steigern. Bereits als Adjuvanzien eingesetzt in ASIT Protokollen bei Atopikern werden Toll-like Rezeptor (TLR) Agonisten. In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, dass TLR-Liganden bei hochatopischen Probanden zu einer Reifung der DCs und anschließender Induktion der gewünschten Th1-Antwort führen. Bereits etablierte Adjuvanzien sind die TLR 4- und 9- Agonisten MPLA und CPG. Aber auch die weiteren TLR-Agonisten p-Poly IC, PGN und Flagellin kommen als mögliche Th1-Induktoren im Rahmen von ASIT-Protokollen in Frage<sup>53</sup>.

Strontium-doped hydroxyapatite porous spheres (SHAS) sind neuartige und preiswert hergestellte Mikropartikel. Besondere Syntheseverfahren führen zu einer hochgradig homogenen Population von SHAS-Sphären. Ihre mögliche Verwendung als Adjuvans und Träger in der ASIT haben wir untersucht. Proteine wie Ovalbumin (OVA) oder das Hauptkatzenallergen Fel d 1 wurden an SHAS gebunden und auch wieder ausgelöst. Die von SHAS wieder freigesetzten Proteine wurden von humanen moDCs und murinen DCs aufgenommen. Auf verschiedene Zellen *in vitro* hatte SHAS-OVA keine nekrotischen oder apoptotischen Effekte, auch in hohen Konzentrationen.

Wir wählten ein murines ASIT-Modell für allergische, asthmatische Entzündungen, um die immunogenen Eigenschaften von SHAS näher zu untersuchen. SHAS-OVA wurde subkutan injiziert und OVA wurde daraus gelöst. OVA wurde aus SHAS-OVA kontinuierlich und über mehrere Tage freigegeben. OVA aus subkutan injiziertem SHAS-OVA führte zu einer mindestens eine Woche nach Injektion anhaltenden Stimulation sowohl der CD4<sup>+</sup>- als auch der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Dieser Depoteffekt bestand nicht bei der Injektion von löslichem OVA. ASIT mit SHAS-OVA als auch mit löslichem OVA führte allerdings zu vergleichbaren Antikörperproduktionen. Die Auswertung von Symptom-Scores nach durchgeführter ASIT mit SHAS-OVA im Vergleich zu löslichem OVA schien allerdings auf eine verstärkte Wirksamkeit der ASIT mit SHAS-OVA hinzudeuten.

Die besonderen Protein-Bindungseigenschaften von SHAS führen zu dem gewünschten Depoteffekt und machen es somit attraktiv als möglichen Träger und Adjuvans für eine ASIT (**P3**<sup>54</sup>).

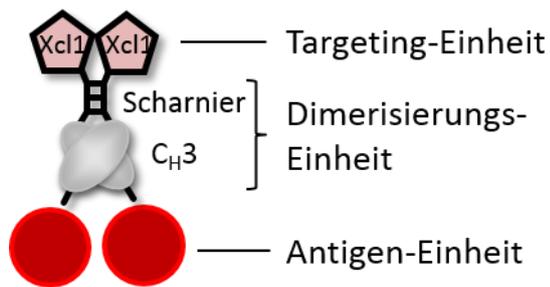
**P3:** Garbani M, Xia W, Rhyner C, Prati M, Scheynius A, Malissen B, Engqvist H, Maurer M, Cramer R, **Terhorst D**. Allergen-loaded strontium-doped hydroxyapatite spheres improve allergen-specific immunotherapy in mice. *Allergy*. 2016 Sep 3.

<https://doi.org/10.1111/all.13041>

### 3.4 XCR1 auf kreuzpräsentierenden DCs als Zielmolekül zur Induktion einer schützenden CD8<sup>+</sup> T-Zell Antwort gegen Influenza Virus

Die wirksame Abgabe von Antigenen an APCs und insbesondere an DCs, ihre anschließende Aktivierung, sowie die Induktion einer potenten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort stellen eine erhebliche Herausforderung bei der Entwicklung guter Impfstoffe dar. Insbesondere bei der Bekämpfung von neoplastischen Zellen oder auch virusinfizierten Zellen sind CD8<sup>+</sup> zytotoxische Zellen essentiell. Für deren Aktivierung ist der Mechanismus der Kreuzpräsentation durch DCs von zentraler Bedeutung. Bei der Kreuzpräsentation nehmen DCs Antigene aus dem extrazellulären Raum auf, präsentieren die daraus hervorgehenden antigenen Peptide jedoch auf MHC-I Komplexen an CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen. Antigene direkt gezielt an kreuzpräsentierende DCs abzugeben ist ein vielversprechendes Verfahren zur Verbesserung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellreaktionen. Jüngere Studien haben gezeigt, dass der Chemokin-Rezeptor XCR1 selektiv auf kreuzpräsentierenden CD8 $\alpha^+$  Typ-DCs der Maus exprimiert wird<sup>9,10</sup>. Der Chemokin-Rezeptor XCR1 bindet XCL1, auch bekannt als Lymphotactin1. Die XCR1-Expression wurde im Laufe der Evolution auf homologen DC-Untergruppen konserviert und so exprimieren auch die kreuzpräsentierenden DCs des Menschen (CD141<sup>+</sup> DCs), der Schafe (CD26<sup>+</sup> DCs) und Makaken (CADM1<sup>+</sup> DCs) XCR1<sup>10</sup>.

Unsere Hypothese war nun, dass mit XCL1 verschmolzenes Antigen eine verstärkte Immunantwort hervorrufen könnte. Dafür produzierten wir in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe um Bjarne Bogen in Oslo, Norwegen, sogenannte „Vaccibodies“, bei denen bivalentes XCL1 mit Modelantigenen verbunden ist (**Abbildung 3**). Bivalentes XCL1, gebunden an Modelantigene, wurde spezifisch von kreuzpräsentierenden DCs aufgenommen und führte zur verstärkten Proliferation von Antigen-spezifischen T-Zellen. DNA Vakzine für dimere XCL1-Hämagglutinin Fusionsproteine haben eine potente humorale und adaptive Immunantwort hervorgerufen. Mit dieser Vakzine geimpfte Mäuse waren komplett geschützt gegen eine tödliche Dosis mit Influenza A Virus. Wir konnten also zeigen, dass das direkte Targeting von Impfstoff-Molekülen auf kreuzpräsentierende DCs mittels XCL1 eine neuartige und vielversprechende Methode zur Induktion von protektiven CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten darstellt (**P4**<sup>55</sup>).



**Abbildung 3:** Schematische Struktur der „Vaccibodies“: homodimere Proteine bestehend aus einer Targeting-Einheit (Xcl1), einer Dimerisierungseinheit (humanes Immunglobulin Scharnier und C<sub>H</sub>3) sowie einer Antigen-Einheit (Abbildung entspricht Fig.1A aus **P4**<sup>55</sup>).

**P4:** Fossum E, Grødeland G\*, **Terhorst D\***, Tveita AA, Vikse E, Mjaaland S, Henri S, Malissen B, Bogen B. Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8+ T-cell responses against influenza virus. Eur J Immunol. 2015 Feb;45(2):624-35.

<https://doi.org/10.1002/eji.20144508>

### 3.5 Spezielles Targeting XCR1<sup>+</sup>, kreuzpräsentierender, kutaner, dendritischer Zellen

Die Haut als leicht zugängliches Organ bietet sich generell an als Zielorgan für Immunisierungen. Durch eine Vermeidung des first-pass Effektes und die hohe Immunogenität in der Haut können niedrige Antigenkonzentrationen zu einer ausreichenden Immunantwort führen. In einer ersten Studie haben wir auflösende Mikronadeln zur kutanen Applikation untersucht. Diese auflösenden Mikronadeln haben wir mit nanoverkapseltem Antigen beladen und dieses so dermal appliziert. In Mäusen konnte mittels dieser Applikation eine robuste Immunantwort gegen das Antigen induziert werden. Mäuse, welche mithilfe von mit nanoverkapseltem Antigen beladenen, auflösenden Mikronadeln, geimpft wurden, entwickelten einen kompletten Schutz sowohl gegen die Entwicklung von Antigen-exprimierenden B16 Melanomen und in einem murinen Model von Para-Influenza<sup>56</sup>.

Als nächsten Schritt wollten wir diese neuartigen, kutanen Abgabesysteme mit der Möglichkeit, Impfstoffe gezielt an XCR1<sup>+</sup> DCs zu richten, kombinieren. Aufgrund der theoretisch denkbaren Nachteile einer DNA-Vakzinierung wie verstärkte Tumorbildung und Induktion von Autoimmunerkrankungen durch zufällige Insertion der DNA in das Genom, haben wir uns für eine Vakzinierung mit Proteinimpfstoff entschieden. Bei der Laser-assistierten Medikamentenapplikation hat man die Möglichkeit, Mikroporen einer bestimmten Tiefe bis zu einer gewählten Hautschicht je nach Energieeinstellung zu ablatieren und anschließend eine Proteinlösung aufzutragen. Wir haben Mikroporen bis zur oberen Dermis generiert, um dann die XCR1-gerichteten Vakzine aufzutragen. So konnten wir die XCR1<sup>+</sup> DCs erreichen, die sich im dichten, kutanen Netzwerk an APCs in der Dermis befinden. Die effiziente Immunisierung erforderte die kontrollierte, CCR7-abhängige Migration der dermalen DCs zu drainierenden Lymphknoten, es gab also keinen freien Fluss des Antigens durch die Mikroporen in die Lymphgefäße. Die effiziente Immunisierung trat unabhängig von TLR-medierten Signalwegen auf. Eine einzige intradermale Immunisierung ohne exogenes Adjuvanz schützte Mäuse gegen Wachstum eines eingesetzten Melanoms sowohl in prophylaktischen, als auch in therapeutischen Einstellungen.

Die Existenz funktionell äquivalenter XCR1<sup>+</sup> dermalen DCs beim Menschen sollte die Translation der laser-assistierten intradermalen Applikation von Tumor-spezifischen

Vakzinen ermöglichen. Die Mikroporation der Haut bewirkte ein mildes, entzündliches Milieu in der Dermis, welches wohl die Entwicklung der robusten T-Zell-Reaktionen in Abwesenheit von exogenen Adjuvanzen begünstigt hat. Da die Anwendung von exogenen Adjuvanzen in Impfstoffen häufig mit Sicherheitsproblemen verbunden ist, stellt die adjuvanzfreie laser-assistierte Vakzinapplikation eine interessante Alternative in der Entwicklung sicherer Impfstoffe dar (**P5**<sup>57</sup>).

**P5:** **Terhorst D\***, Fossum E\*, Baranska A, Tamoutounour S, Malosse C, Garbani M, Braun R, Lechat E, Crameri R, Bogen B, Henri S\*, Malissen B\*. Laser-assisted intradermal delivery of adjuvant-free vaccines targeting XCR1<sup>+</sup> dendritic cells induces potent antitumoral responses. *J Immunol.* 2015 194:5895-902.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500564>

## 4 DISKUSSION

DCs gelten als die am effektivsten arbeitenden Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems und können zu zentraler und peripherer Toleranz oder zur Induktion einer spezifischen Immunantwort beitragen<sup>58,59</sup>. Die Haut ist als Grenzfläche des Organismus mit einem dichten Netzwerk an verschiedenen Subtypen von DCs ausgestattet. Diese DCs spielen nicht nur eine fundamentale Rolle in der Pathogenese kutaner Erkrankungen, auch ihre mögliche therapeutische Manipulation wird immer mehr beforscht. Dabei scheinen die einzelnen DC-Subpopulationen wichtige, eigenständige Funktionen zu übernehmen. Deshalb gilt es, diese DC-Subpopulationen vollständig zu entschlüsseln und zu charakterisieren, um sie dann in Zukunft gezielt therapeutisch ansprechen zu können.

In unseren Arbeiten konnten wir zur Entschlüsselung des mononukleären Phagozytensystems der Haut beitragen. So können nun die verschiedenen DC-Subpopulationen und auch Makrophagen und Monozyten der Haut mittels Durchflußzytometrie eindeutig von einander abgegrenzt werden. Diese neuen Möglichkeiten haben wir dann genutzt, um die Rolle der DCs in entzündlichen Erkrankungen wie dem Kontaktekzem und der Psoriasis zu untersuchen. Dementsprechend konnten wir Informationen über die verschiedenen Funktionen der DC-Subpopulationen gewinnen. Anschließend folgte die therapeutische Manipulation verschiedener DC-Subtypen. Für die Krebsimmuntherapie besonders interessant sind die kreuzpräsentierenden XCR1<sup>+</sup> DCs, welche exogen aufgenommene Antigene auf MHC-I präsentieren können und somit eine stärkere zytolytische CD8<sup>+</sup>-T-Zellaktivität provozieren können. Diese XCR1<sup>+</sup> DCs haben wir mittels eines Laser-basierten Verfahrens direkt in situ in der Dermis manipuliert.

DC-Vakzinierungsstrategien wurden bereits in über 200 klinischen Studien gegen verschiedene Krebsentitäten angewandt<sup>60</sup>. Die meisten eingeschlossenen Patienten (>1000 Patienten) litten an einem malignen Melanom, gefolgt vom Prostatakarzinom (>750 Patienten), Glioblastom (>500 Patienten) und Nierenzellkarzinom (>250 Patienten). Objektive Ansprechraten zu DC-Vakzinierungen in Krebspatienten waren selten höher als 15%<sup>61</sup>.

DC-Vakzinierungen der ersten Generation bestanden entweder aus direkt vom Patienten isolierten DCs oder aber aus unreifen moDCs. Das Grundprinzip hinter der

moDC Vakzinierung beinhaltet die Isolierung autologer DCs eines Patienten. Autologe CD14<sup>+</sup> Monozyten werden via Leukapherese aus dem peripheren Blut von Krebspatienten gewonnen und mittels GM-CSF und IL-4 zu unreifen moDCs kultiviert. Diese unreifen moDCs werden dann *in vitro* mit Antigenen beladen und anschließend in den Patienten zurückinjiziert<sup>62</sup>.

Im Gegensatz zu diesen unreifen moDCs wurden in DC-Vakzinierungen der zweiten Generation reife moDCs benutzt, welche zuvor *in vitro* mittels eines Reifungscocktails behandelt wurden.

Die verbesserten klinischen Ergebnisse der Zweite-Generation DC-Vakzinierung führten zu einem verstärkten Interesse an der Weiterentwicklung und Optimierung dieser immuntherapeutischen Methode. Viele Komponenten spielen für eine erfolgreiche Therapie eine Rolle: Tumormikroumgebung, immunologische Fitness der Patienten und Art des gewählten Tumorantigens, wie z.B. synthetische Antigenpeptide, Antigen-verschlüsselnde RNA/DNA, Lysate des Gesamttumors. Besonders wichtig scheinen die DC-abhängigen Variablen wie Art der gewählten DCs und möglicher Adjuvantien, Route der DC-Vakzin Verabreichung, Dosierung und zeitliche Terminierung der DC Impfungen.

Ein Hauptansatzpunkt fokussiert sich auf die Art und Quelle der verwendeten DCs. So werden nun spezifische Subpopulationen von natürlicherweise vorkommenden DCs bevorzugt, da sie deutliche Vorteile gegenüber moDCs haben. An Vorteilen zu nennen sind u.a. eine bessere Funktionalität und Reduktion von Kosten durch Wegfall der Kultivierungszeit. Insbesondere kreuzpräsentierende XCR1<sup>+</sup> cDCs scheinen den moDCs in der Induktion einer zytolytischen CD8-T-Zell-Immunantwort deutlich überlegen zu sein.

Unsere Ergebnisse im Mausmodell zeigen, dass das Laser-assistierte, direkte Targeting dieser natürlich vorkommenden DCs im Gewebe eine verstärkte immunogene Wirkung hat. Das Targeting dieser „nativen“, *in situ* natürlich vorkommenden DCs mittels Laser Mikroporation scheint eine vielversprechende Alternative zu den zuvor isolierten und kultivierten DCs zu sein. Die bei den zuvor isolierten DCs notwendige Manipulation *in vitro* sowie die Auswahl der weniger potenten DC-Subpopulation könnten für den Funktionsverlust verantwortlich sein.

Die verschiedenen Vorteile der dermalen Impfung gegenüber den subkutanen oder intramuskulären Impfungen wurden in vielen Studien belegt<sup>21,30,63</sup>. So werden bei intradermalen Impfungen in der Regel geringere Dosierungen bei gleicher oder sogar

gestiegener Effektivität im Vergleich zu anderen Applikationswegen benötigt. Weiterhin werden bei der intradermalen Applikation vermehrt T-Zellen mit sog. Skin-homing Rezeptoren angesprochen und weniger T-Zellen, die in andere Organe wandern.

Kürzlich wurde herausgefunden, dass der Chemokinrezeptor XCR1 ausschließlich auf einer Untergruppe von dendritischen Zellen (DC) exprimiert wird, von denen bekannt ist, dass sie an der Antigen-Kreuzpräsentation beteiligt sind<sup>64</sup>. Aber XCR1 wird nicht nur exklusiv in murinen kreuzpräsentierenden DCs exprimiert, sondern wurde auch über verschiedene Species konserviert, wie es unter anderem in humanen BDCA3<sup>+</sup>- und Schaf-CD26<sup>+</sup> DCs gezeigt wurde<sup>9,10</sup>. Diese Selektivität für die kreuzpräsentierenden DCs macht XCR1 zu einem interessanten Kandidaten für Impfstoffe, die eine selektive zytotoxische Immunität im Menschen induzieren sollen. Arbeiten im Mausmodell von anderen Arbeitsgruppen und uns bilden dabei die Grundlage für die Manipulation der den murinen DCs entsprechenden menschlichen Gegenstücke zur Behandlung von humanen Erkrankungen.

Die Verwendung von Mausmodellen zur Untersuchung der Rolle von DCs und ihren Subpopulationen hat einige entscheidende Vorteile. So hat die Entwicklung von speziellen Mausmodellen unter anderem im Labor von Bernard Malissen entscheidend zu neuen Erkenntnissen über den Beitrag einzelner DC-Subpopulationen zur schützenden Immunität *in vivo* beigetragen. Durch die Entwicklung eines neuartigen Systems ist die selektive Depletion von einzelnen Zellen aus der Maus zu einem oder mehreren definierten Zeitpunkten möglich. Bei diesem LangerinDTR genannten Mausmodell wurde der menschliche Diphtherie Toxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Langerin-Promotors in das Genom eingeführt. Da die sonstigen Mauszellen unempfindlich gegenüber Diphtherietoxin sind, führt die Gabe von Diphtherietoxin zur alleinigen Elimination aller Langerin-tragenden Zellen<sup>65,66</sup>. Durch die Generierung von Knochenmarks-Chimären aus Langerin-DTR Tieren mit Wildtyp-Mäusen lassen sich Mäuse herstellen, in denen sich entweder nur die strahlensensiblen Langerin<sup>+</sup> dermalen DCs depletieren lassen, oder aber ausschließlich die strahlenresistenten Langerhans-Zellen. So konnte unter anderem die tolerogene Rolle der Langerhans-Zellen im Gegensatz zur schützenden Rolle der dermalen Langerin<sup>+</sup> DCs im Leishmaniasis-Modell gezeigt werden<sup>67</sup>. Allerdings lassen sich die verschiedenen murinen Subpopulationen nicht komplett im menschlichen Organismus abbilden. Weitere Untersuchungen in den nächsten Jahren werden daher die Übertragbarkeit

der bisherigen Erkenntnisse aus den Mausmodellen auf den Menschen im Detail nachweisen müssen.

Durch die hier beschriebenen Forschungsergebnisse ergeben sich nicht nur wichtige Erkenntnisse über physiologische und pathophysiologische Prozess, sondern auch neuartige Ansätze für innovative Therapien. Ein Ziel der zukünftigen Forschung wird es sein, auch für die anderen DC-Subpopulationen entsprechende selektive und idealerweise auch konservierte Oberflächenmarker zu identifizieren, wie es für die kreuzpräsentierenden DCs mit XCR1 gelungen ist. Interessant ist das insbesondere für die murine CD11b+ DC-Subpopulation, welche in unseren Studien tolerogene Funktionen zeigte<sup>41,54</sup>. Dann wird auch diese Zellart noch besser verstanden werden und langfristig werden auch Impfstoffe entwickelt werden können, die eine selektive tolerogene Immunität im Menschen induzieren sollen.

Die Entwirrung des komplexen Netzwerkes der verschiedenen DC-Subpopulationen hat also eine spannende Entwicklung zu einer sehr differenzierten Betrachtung der einzelnen Funktionen und Unterschiede der Subpopulationen ermöglicht. In den nächsten Jahren werden ohne Zweifel zahlreiche weitere neue Erkenntnisse über diese faszinierenden Zellen erforscht werden, welche hoffentlich auch zu innovativen und effektiven Therapien verschiedener Erkrankungen führen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Dendritische Zellen (DCs) sind die wichtigsten antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie stellen die Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar und entscheiden über die Art der Immunantwort, über Toleranz oder Immunität. Inzwischen ist bekannt, dass es zahlreiche unterschiedliche DC Subtypen gibt. Bis vor kurzem war eine eindeutige Differenzierung von Makrophagen, cDCs und moDCs in der Haut unmöglich. Somit blieb der Beitrag der einzelnen myeloiden Subpopulationen in der Hautintegrität und Hautimmunität ungeklärt.

Mit unseren hier beschriebenen Arbeiten konnten wir dazu beitragen, die verschiedenen myeloiden Zellsubpopulationen der Haut zu identifizieren und zu differenzieren. Durch eine Kombination verschiedener Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie ist es uns nun gelungen, bislang unbekannte Funktionen der verschiedenen myeloiden Subpopulationen in der Mauhaut zu charakterisieren. Im Kontaktekzemmodell infiltrieren eine große Anzahl von Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten aus dem Blut in die entzündete Dermis und generieren moDCs. Während der frühen Phase eines Psoriasismodells infiltrierten Neutrophile die Epidermis, Monozyten und moDCs waren in der Dermis vorherrschend. Während der späten Phase dominierten lokal proliferierende Langerhans Zellen in der Epidermis und Makrophagen in der Dermis. Weiterhin untersuchten wir die Rolle der einzelnen DC-Subpopulationen im therapeutischen Kontext im Mausmodell. In der Allergen-spezifischen Immuntherapie (ASIT) haben Mikropartikel-Adjuvanzen, nämlich Strontium-doped hydroxyapatite porous spheres (SHAS), nicht nur Adjuvanseigenschaften, sondern sie sind auch vielversprechende Vakzinierungsträger infolge ihrer einmaligen Proteinbindungseigenschaften.

Im Mausmodell konnten wir weiterhin zeigen, dass das direkte Targeting von Impfstoff-Molekülen auf kreuzpräsentierende DCs mittels XCR1 eine neuartige und vielversprechende Methode zur Induktion von protektiven CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten darstellt. Mittels Laser-generierten Mikroporen konnten wir die XCR1<sup>+</sup> DCs in der oberen Dermis direkt erreichen und so ohne den Zusatz von exogenen Adjuvanzen eine starke protektive Immunantwort im Tumormodell hervorrufen.

Die Existenz funktionell äquivalenter XCR1<sup>+</sup> dermalen DCs beim Menschen sollte die Translation der laser-assistierten intradermalen Applikation von Tumor-spezifischen Vakzinen ermöglichen. In den nächsten Jahren werden sicherlich zahlreiche weitere

neue Erkenntnisse über diese faszinierenden Zellen erforscht werden. Dies wird hoffentlich auch zu innovativen und effektiven Therapien verschiedener Erkrankungen führen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* 1868; **44**: 325-37.
- 2 Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 1973; **137**: 1142-62.
- 3 Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature reviews. Immunology* 2014; **14**: 417-28.
- 4 Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S *et al.* CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* 2010; **207**: 189-206.
- 5 Poulin LF, Henri S, de Bovis B *et al.* The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* 2007; **204**: 3119-31.
- 6 Langlet C, Tamoutounour S, Henri S *et al.* CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *Journal of immunology* 2012; **188**: 1751-60.
- 7 Tamoutounour S, Henri S, Lelouard H *et al.* CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *European journal of immunology* 2012; **42**: 3150-66.
- 8 Wu X, Briseno CG, Durai V *et al.* Mafb lineage tracing to distinguish macrophages from other immune lineages reveals dual identity of Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* 2016; **213**: 2553-65.
- 9 Crozat K, Tamoutounour S, Vu Manh TP *et al.* Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8alpha+ type. *Journal of immunology* 2011; **187**: 4411-5.
- 10 Crozat K, Guiton R, Contreras V *et al.* The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2010; **207**: 1283-92.
- 11 Hemmi H, Yoshino M, Yamazaki H *et al.* Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *International immunology* 2001; **13**: 695-704.
- 12 Probst HC, Lagnel J, Kollias G *et al.* Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* 2003; **18**: 713-20.
- 13 Waithman J, Allan RS, Kosaka H *et al.* Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *Journal of immunology* 2007; **179**: 4535-41.
- 14 Hochweller K, Wabnitz GH, Samstag Y *et al.* Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 5931-6.
- 15 Steinman RM. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 2008; **29**: 319-24.
- 16 Romani N, Flacher V, Tripp CH *et al.* Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. *Current topics in microbiology and immunology* 2012; **351**: 113-38.
- 17 Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; **124**: 849-63.
- 18 Banchereau J, Klechevsky E, Schmitt N *et al.* Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; **1174**: 24-32.
- 19 Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; **449**: 419-26.
- 20 Steinman RM. Dendritic cells and vaccines. *Proceedings* 2008; **21**: 3-8.
- 21 Nicolas JF, Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert review of vaccines* 2008; **7**: 1201-14.

- 22 Watkinson AC, Kearney MC, Quinn HL *et al.* Future of the transdermal drug delivery market--  
have we barely touched the surface? *Expert opinion on drug delivery* 2016; **13**: 523-32.
- 23 Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nature biotechnology* 2008; **26**: 1261-8.
- 24 Kim YC, Jarrahian C, Zehring D *et al.* Delivery systems for intradermal vaccination. *Current  
topics in microbiology and immunology* 2012; **351**: 77-112.
- 25 Mantoux C. Tuberculin intradermo reactions in the treatment of tuberculosis:  
intradermituberculisation. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1909; **148**: 996-8.
- 26 Lambert PH, Laurent PE. Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform  
vaccine administration? *Vaccine* 2008; **26**: 3197-208.
- 27 Frey SE, Couch RB, Tacket CO *et al.* Clinical responses to undiluted and diluted smallpox  
vaccine. *The New England journal of medicine* 2002; **346**: 1265-74.
- 28 Darmanger AM, Nekzad SM, Kuis M *et al.* BCG vaccination by bifurcated needle in a pilot  
vaccination programme. *Bulletin of the World Health Organization* 1977; **55**: 49-61.
- 29 Leroux-Roels I, Vets E, Freese R *et al.* Seasonal influenza vaccine delivered by intradermal  
microinjection: A randomised controlled safety and immunogenicity trial in adults. *Vaccine*  
2008; **26**: 6614-9.
- 30 Prausnitz MR, Mikszta JA, Cormier M *et al.* Microneedle-based vaccines. *Current topics in  
microbiology and immunology* 2009; **333**: 369-93.
- 31 Kim YC, Quan FS, Yoo DG *et al.* Enhanced memory responses to seasonal H1N1 influenza  
vaccination of the skin with the use of vaccine-coated microneedles. *The Journal of infectious  
diseases* 2010; **201**: 190-8.
- 32 Sullivan SP, Koutsonanos DG, Del Pilar Martin M *et al.* Dissolving polymer microneedle  
patches for influenza vaccination. *Nature medicine* 2010; **16**: 915-20.
- 33 Arora A, Prausnitz MR, Mitragotri S. Micro-scale devices for transdermal drug delivery.  
*International journal of pharmaceutics* 2008; **364**: 227-36.
- 34 Mondoulet L, Dioszeghy V, Ligouis M *et al.* Epicutaneous immunotherapy on intact skin using  
a new delivery system in a murine model of allergy. *Clinical and experimental allergy : journal  
of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2010; **40**: 659-67.
- 35 Gavillet BM, Mondoulet L, Dhelft V *et al.* Needle-free and adjuvant-free epicutaneous  
boosting of pertussis immunity: Preclinical proof of concept. *Vaccine* 2015; **33**: 3450-5.
- 36 Frerichs DM, Ellingsworth LR, Frech SA *et al.* Controlled, single-step, stratum corneum  
disruption as a pretreatment for immunization via a patch. *Vaccine* 2008; **26**: 2782-7.
- 37 Takigawa M, Tokura Y, Hashizume H *et al.* Percutaneous peptide immunization via corneum  
barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *Annals of the New  
York Academy of Sciences* 2001; **941**: 139-46.
- 38 Gill HS, Andrews SN, Sakthivel SK *et al.* Selective removal of stratum corneum by  
microdermabrasion to increase skin permeability. *European journal of pharmaceutical  
sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2009; **38**:  
95-103.
- 39 Caminschi I, Proietto AI, Ahmet F *et al.* The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin  
Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 2008; **112**: 3264-73.
- 40 Sancho D, Mourao-Sa D, Joffre OP *et al.* Tumor therapy in mice via antigen targeting to a  
novel, DC-restricted C-type lectin. *The Journal of clinical investigation* 2008; **118**: 2098-110.
- 41 Guilliams M, Crozat K, Henri S *et al.* Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived  
CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+)  
regulatory T cells. *Blood* 2010; **115**: 1958-68.
- 42 Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F *et al.* Origins and functional  
specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in  
mouse skin. *Immunity* 2013; **39**: 925-38.
- 43 van der Fits L, Mourits S, Voerman JS *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin  
inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *Journal of immunology* 2009; **182**:  
5836-45.

- 44 Wohn C, Ober-Blobaum JL, Haak S *et al.* Langerin(neg) conventional dendritic cells produce IL-23 to drive psoriatic plaque formation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; **110**: 10723-8.
- 45 Terhorst D, Chelbi R, Wohn C *et al.* Dynamics and Transcriptomics of Skin Dendritic Cells and Macrophages in an Imiquimod-Induced, Biphasic Mouse Model of Psoriasis. *Journal of immunology* 2015; **195**: 4953-61.
- 46 Freeman EJ. Vaccination against hay fever. *Lancet* 1914; **1**: 1178.
- 47 Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. . *Lancet* 1911; **11**: 1572.
- 48 Ring J. [Every tenth person has hay fever complaints. To whom do you advise hyposensitization?]. *MMW Fortschritte der Medizin* 2004; **146**: 12.
- 49 Bachmann MF, Kundig TM. Allergen-specific immunotherapy: is it vaccination against toxins after all? *Allergy* 2017; **72**: 13-23.
- 50 Kiel MA, Roder E, Gerth van Wijk R *et al.* Real-life compliance and persistence among users of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; **132**: 353-60 e2.
- 51 Senna G, Lombardi C, Canonica GW *et al.* How adherent to sublingual immunotherapy prescriptions are patients? The manufacturers' viewpoint. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010; **126**: 668-9.
- 52 Di Bona D, Plaia A, Leto-Barone MS *et al.* Efficacy of Grass Pollen Allergen Sublingual Immunotherapy Tablets for Seasonal Allergic Rhinoconjunctivitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA internal medicine* 2015; **175**: 1301-9.
- 53 Terhorst D, Kalali BN, Weidinger S *et al.* Monocyte-derived dendritic cells from highly atopic individuals are not impaired in their pro-inflammatory response to toll-like receptor ligands. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2007; **37**: 381-90.
- 54 Garbani M, Xia W, Rhyner C *et al.* Allergen-loaded strontium-doped hydroxyapatite spheres improve allergen-specific immunotherapy in mice. *Allergy* 2017; **72**: 570-8.
- 55 Fossum E, Grodeland G, Terhorst D *et al.* Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8+ T-cell responses against influenza virus. *European journal of immunology* 2015; **45**: 624-35.
- 56 Zaric M, Lyubomska O, Touzelet O *et al.* Skin dendritic cell targeting via microneedle arrays laden with antigen-encapsulated poly-D,L-lactide-co-glycolide nanoparticles induces efficient antitumor and antiviral immune responses. *ACS nano* 2013; **7**: 2042-55.
- 57 Terhorst D, Fossum E, Baranska A *et al.* Laser-assisted intradermal delivery of adjuvant-free vaccines targeting XCR1+ dendritic cells induces potent antitumoral responses. *Journal of immunology* 2015; **194**: 5895-902.
- 58 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245-52.
- 59 Liu K, Nussenzweig MC. Development and homeostasis of dendritic cells. *European journal of immunology* 2010; **40**: 2099-102.
- 60 Ahmed MS, Bae YS. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: past, present and future. *Clinical and experimental vaccine research* 2014; **3**: 113-6.
- 61 Anguille S, Smits EL, Lion E *et al.* Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet. Oncology* 2014; **15**: e257-67.
- 62 Garg AD, Coulie PG, Van den Eynde BJ *et al.* Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends in immunology* 2017; **38**: 577-93.
- 63 Vankerckhoven V, Van Damme P. Clinical studies assessing immunogenicity and safety of intradermally administered influenza vaccines. *Expert opinion on drug delivery* 2010; **7**: 1109-25.
- 64 Kroczek RA, Henn V. The Role of XCR1 and its Ligand XCL1 in Antigen Cross-Presentation by Murine and Human Dendritic Cells. *Frontiers in immunology* 2012; **3**: 14.

- 65 Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B *et al.* Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005; **22**: 643-54.
- 66 Kaplan DH, Kissenpfennig A, Clausen BE. Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. *European journal of immunology* 2008; **38**: 2369-76.
- 67 Kautz-Neu K, Meyer RG, Clausen BE *et al.* Leishmaniasis, contact hypersensitivity and graft-versus-host disease: understanding the role of dendritic cell subsets in balancing skin immunity and tolerance. *Experimental dermatology* 2010; **19**: 760-71.

## 7 DANKSAGUNG

## 8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

### **Erklärung**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

---

Datum

---

Unterschrift