

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nanopartikel als Trägersysteme für transepidermale
Vakzinierung – Zielgerichteter Transport von Antigenen über
die Hautbarriere

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Emely Amselgruber

aus Rosenheim

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. U. Blume-Peytavi
 2. Prof. Dr. E. Rühl
 3. Prof. Dr. R. Wagner

Datum der Promotion: 03.06.2012

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Entwicklung und allgemeiner Aufbau der Haut	3
1.2 Die Haut als Immunorgan	7
1.3 Immunaktive Zellen der Haut	7
1.3.1 Keratinozyten	7
1.3.2 Langerhanszellen.....	8
1.3.2.1 LZ-Migration und Verarbeitung von Antigenen.....	10
1.3.3 Dermale Dendritische Zellen (DDZ).....	12
1.4 Haarfollikel	14
1.5 Penetrationswege von Substanzen durch die Haut	19
1.6 Nanopartikel.....	21
1.7 Transepidermale Immunisierung	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material	23
2.1.1 Hautpräparate	23
2.1.2 Untersuchte Partikel	23
2.1.3 Antikörper und MACS-Separations Kit.....	24
2.1.4 Chemikalien und Geräte.....	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Präparation der Hautproben und CSSS	26
2.2.2 Kryoschnitte und Auswertung der Follikelpenetration	27
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	28
2.2.4 Intrazelluläre Partikel Aufnahme und Aktivierung der LZ an exzidiierter Haut	28
2.2.5 Partikel Aufnahme in Zellkulturen.....	30
2.2.6 Durchflusszytometrie	30

2.2.7	Statistik	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Follikuläre Penetration von PS- und PLA-Partikeln.....	33
3.2	Aufnahme von PS-Partikeln in Zellkulturen.....	44
3.3	Aufnahmeuntersuchungen an LZ nach transkutaner Partikelpenetration	46
3.3.1	>200 nm (+/-p24) PS-Partikel.....	46
3.3.2	<200 nm (+/-p24) PS-Partikel.....	48
3.4	Aufnahmeuntersuchungen an KZ nach transkutaner Partikelpenetration	51
3.4.1	>200 nm (+/-p24) PS-Partikel.....	51
3.4.2	<200 nm (+/-p24) PS-Partikel.....	53
3.5	Aktivierungsuntersuchungen an LZ nach transkutaner Partikelpenetration.....	54
4.	Diskussion.....	59
4.1	Follikuläre Partikelpenetration	59
4.2	Partikelaufnahme durch LZ nach transepidermaler Applikation.....	62
4.3	Aktivierung von LZ durch Nanopartikel	66
4.4	Die Rolle der KZ in der Immunantwort.....	68
4.5	Transepidermale Vakzinierung und Ausblick.....	70
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Literaturverzeichnis.....	74
7.	Anhang.....	91
7.1	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	91
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	93
8.	Eidstaatliche Erklärung	
9.	Lebenslauf	
10.	Danksagung	

1. Einleitung und Fragestellung

In den vergangenen Jahrzehnten hat der transepidermale Stofftransport topisch applizierter Substanzen immer mehr an Bedeutung gewonnen und zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen angestoßen. Besonders forciert wurden die Forschungsanstrengungen dabei durch die Nanotechnologie, die neue innovative Trägersysteme zur transkutanen Applikation zur Verfügung stellt. Die Möglichkeit mit Hilfe von Nanopartikeln unterschiedliche Wirkstoffe gezielt und möglichst unverändert an den Ort des Interesses einbringen zu können, hat neben der topischen Applikation diverser Pharmaka auch zu neuen Impfstrategien geführt.

Hierbei wird insbesondere die transepidermale Vakzinierung als eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Impfstoffapplikation mittels Injektion gesehen.

So werden ihr wesentliche Vorteile, z.B. eine bessere Patientencompliance, eine verlängerte Wirkdauer, höhere Bioverfügbarkeit und geringere toxische Effekte sowie kontrollierte Konzentrationen am Wirkungsort zugeschrieben. Gerade in Entwicklungsländern erscheint eine transepidermale Immunisierung durch die Minimierung der Infektionsgefahr sowie den geringen Bedarf an geübtem Personal als besonders attraktiv.

Darüber hinaus ist die Haut, verglichen mit Muskel- und Fettgewebe, von zahlreichen immunkompetenten Antigen-präsentierenden Zellen wie zum Beispiel den Langerhanszellen (LZ) bzw. dermalen dendritischen Zellen (DDZ) bevölkert, deren Stimulation und Immunantwort durch die partikuläre Struktur und spezielle Aufbereitung der Nanopartikel positiv beeinflusst werden kann. So kann gerade durch den Transport bestimmter Antigene mittels Nanopartikeln ein gezieltes Targeting der hauteigenen Immunzellen vorgenommen werden. Effizient sind transepidermale Immunisierungsstrategien auch deshalb, da sie im Gegensatz zur konventionellen Impfstoffapplikation gerade den zellulären Arm des Immunsystems ansprechen und somit zu einer potenteren Immunantwort führen.

Des Weiteren haben umfangreiche Untersuchungen in den letzten Jahren deutlich gemacht, dass im Besonderen dem Penetrationsweg über den Haarfollikel eine entscheidende Bedeutung für die Anwendung topisch applizierter Partikel zukommt, der durch gezielte Forschung weiter verbessert werden kann. Dies betrifft vor allem die systematische Austestung des Penetrationsverhaltens diverser Nanopartikel unterschiedlicher Größe und Antigen-Beladung.

Im Hinblick auf das Targeting der kutanen Immunzellpopulation sind weiterhin Untersuchungen zur Translokation der Partikel durch die Hautbarriere sowie zum Aufnahmeverhalten und Stimulation der Langerhanszellen durch transepidermal applizierte Partikel wesentliche Forschungsschwerpunkte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war demzufolge

1. Follikuläres Targeting: Es wurde das follikuläre Penetrationsverhalten chemisch unterschiedlicher Partikel (PS / PLA) von variabler Größe ($>/< 200$ nm) und Antigen-Beladung (+/-p24) hinsichtlich ihrer Eignung als Trägersysteme für eine transepidermale Vakzinierung untersucht. Dies erfolgte nach Inkubation der Proben auf exzidiierter humaner Haut und Auswertung der Partikelpenetration in den Haarfollikelkanal anhand histologischer Präparate.
2. Antigen-Delivery: Es wurde der Transport unterschiedlicher Partikeltypen mit adsorbiertem p24-Antigen über die Hautbarriere hin zu den epidermalen Langerhanszellen überprüft. Für die Aufnahmeuntersuchungen wurden die Zielzellen, nach transepidermaler Applikation der Partikel, durch magnetische Zellseparation isoliert und die Proben mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.
3. Modulation des hauteigenen Immunsystems: Es wurde überprüft, inwieweit epidermale Langerhanszellen nach transkutaner Applikation durch an PLA- und PS-Partikel adsorbiertes p24-Antigen stimuliert werden können. Hierfür wurde die Expression unterschiedlicher Aktivierungsmarker (CD80 und CD83) in epidermalen Langerhanszellen untersucht.

1.1 Entwicklung und allgemeiner Aufbau der Haut

Entwicklung

Die Epidermis entwickelt sich frühzeitig aus dem embryonalen Oberflächenektoderm und wird sekundär von Pigmentzellen (Melanozyten) und Langerhanszellen (Immunzellen) besiedelt, die der Neuralleiste bzw. dem Knochenmark entstammen [1], [2]. Darüber hinaus enthält die Epidermis Merkelzellen („pressure-sensing cells“), deren Herkunft aus dem Oberflächenektoderm heute als wahrscheinlich gilt [3]. Die unterlagerte Dermis (Kutis u. Subkutis) differenziert sich hauptsächlich aus mesodermalen Zellen der Somatopleura des lateralen Mesoderms. Zudem trägt auch das Dermatome der Somiten zur Bildung der Dermis bei, wodurch sich das segmentale Innervationsmuster der Haut ergibt.

Kurz nach der Neurulation im Alter von 4-5 Wochen proliferiert die zunächst einschichtige Lage ektodermaler Zellen und es entsteht eine zweite äußere Lage, das Periderm.

In der weiteren Entwicklung (11. Woche) entsteht aus der inneren basalen Zellschicht eine dritte mittlere Zellschicht, die sich zwischen die beiden vorgenannten Zellschichten einschleibt und nun als Intermediärschicht bezeichnet wird. Ab der 21. Woche der Entwicklung wird diese schrittweise umgebaut in die endgültigen drei Lagen der äußeren Epidermis, die nunmehr aus dem Stratum germinativum, dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum besteht (s. Abb.1).

Während dieser Entwicklung zur endgültigen reifen Schichtung der Epidermis werden die Zellen des Periderms kontinuierlich abgeschilfert und gelangen in der Regel mit Abschluss der 21. Woche vollständig in die Amnionhöhle [4].

Diese Entwicklung spiegelt einen kontinuierlichen Differenzierungsprozess wider, bei dem durch Proliferation im Stratum germinativum kontinuierlich Zellen zur Stratifikation und horizontalen Ausbreitung bereitgestellt werden, die sich schrittweise zu den spezialisierten Keratinozyten des Stratum granulosum und der besonderen Schutzschicht des Stratum corneum entwickeln. Gesteuert wird diese Entwicklung u.a. durch zahlreiche Wachstumsfaktoren, Retinoidsäure [5] und durch die sequentielle Expression von Transkriptionsfaktoren [6] und Adhäsionsmolekülen [7].

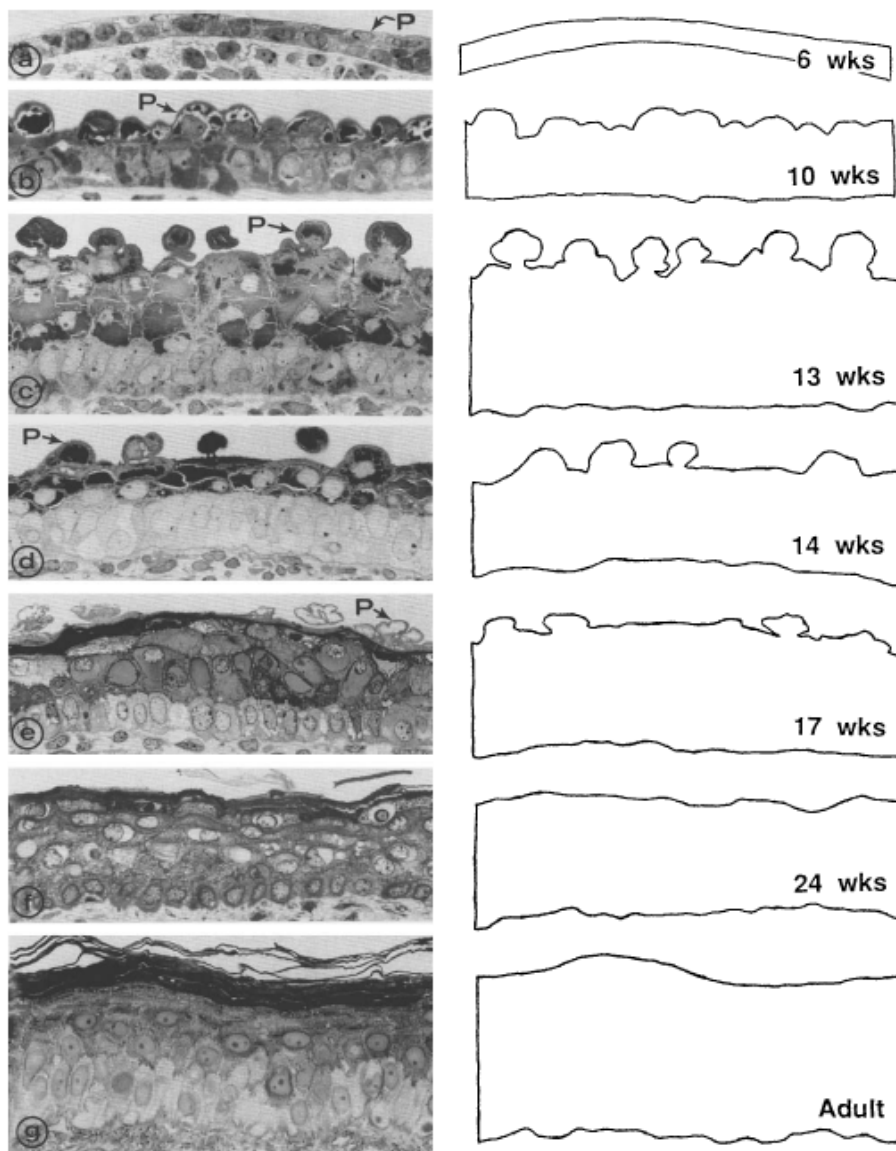


Abb. 1: Embryonale und fetale Entwicklung der Epidermis (aus: [1]). Die Frühentwicklung ist durch Periderm- und primitive Schichtenbildung (a-d) gekennzeichnet, die nachfolgend (d-g) in die endgültigen drei Lagen der Epidermis mit Stratum germinativum, Stratum granulosum und Stratum corneum umgebaut werden.

Die direkt der Epidermis unterlagerten Schichten (Stratum papillare und Stratum reticulare) sowie die Subkutis entwickeln sich während des 3. Monats und bilden sich zur definitiven Form im zweiten und dritten Trimester der Entwicklung aus. Die Ausgestaltung der ersten Papillen und Hautleisten beginnt bereits in der 11. Entwicklungswoche zunächst an den palmaren und plantaren Hautflächen und ist zu Beginn des fünften Monats weitgehend abgeschlossen [8]. In der vierten Woche bilden sich einzelne Lagen von Blutgefäßen im Mesenchym der Dermis aus, die sich weiter aufzweigen und zusammen mit einsprossenden Nerven das Stratum papillare und die sich entwickelnden Haaranlagen versorgen.

Die Gesamtheit der Gefäßarchitektur unterliegt einer kontinuierlichen Remodellierung, die weitgehend mit der Entwicklung der Haarfollikel und der Dickenzunahme der Dermis verknüpft ist und erst in den ersten Wochen nach der Geburt abgeschlossen ist [9].

Allgemeiner Aufbau

Die menschliche Haut ist komplex strukturiert, bedeckt ca. zwei Quadratmeter und bildet einen wirksamen Schutz gegen äußere Einflüsse. Sie besteht aus einer nach außen gerichteten Oberhaut (Epidermis) und einer unterlagerten, nach innen gerichteten bindegewebigen Schicht (Dermis), die in die locker gefügte, fettzellreiche Subkutis übergeht.

Die Epidermis besteht aus mehreren Lagen epithelialer Zellen (Keratinocyten), die sich in verschiedenen Stadien der Differenzierung befinden und als funktionelles Endprodukt die Hornschicht (Stratum corneum) produzieren. Als Basalzellschicht (Stratum basale) wird die unterste, der Basalmembran direkt aufliegende, teilungsaktive Schicht bezeichnet.

Sie ist mit der Basalmembran über Hemidesmosomen und mit benachbarten Zellen über Desmosomen verbunden. An die Basalzellschicht schließt sich die Stachelzellschicht (Stratum spinosum) an, die sich aus zwei bis fünf Zellschichten aufbaut. Da diese Zellen ebenfalls die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen, werden das Stratum basale und das Stratum spinosum folgerichtig als Stratum germinativum bezeichnet.

Bei den Zellen des Stratum spinosum handelt es sich um polyedrische Zellen, deren Fortsätze untereinander ebenfalls über Desmosomen verbunden sind. In den obersten Lagen können bereits Keratinosomen (Odland bodies) auftreten. Es handelt sich dabei um kleine runde Lamellengranula, die eine Reihe hydrolytischer Enzyme und Lipide enthalten, welche später zur Bildung der Lipidmatrix der obersten Hautschichten beitragen [10], [11].

Auf das Stratum spinosum folgt die Körnerzellschicht, Stratum granulosum, deren Zellen basophile Keratohyalin granula enthalten, die zur Namensgebung dieser Schicht beigetragen haben. In den apikalen Schichten der Körnerzellschicht besteht das Zytoplasma aus dicht gepackten Zytokeratinfilamenten, Keratohyalin granula und Matrixproteinen, die zur weiteren Verdichtung des Zytoplasmas beitragen.

An bestimmten Stellen (z.B. Handinnenflächen und Fußsohlen) geht das Stratum granulosum in eine wenig anfärbbare Zwischenschicht, das Stratum lucidum über, an die sich die äußerste verhornte Zellschicht (Stratum corneum) anschließt.

Das Stratum corneum besteht je nach Körperregion und mechanischer Belastung aus zahlreichen bis zu 100 und mehr dicht gepackten plättchenförmigen, kernlosen Zelllagen, die eng miteinander verzahnt und in eine komplexe Lipidmatrix eingebettet sind, die wesentlich zur Barrierefunktion des Stratum corneums beiträgt [12], [13].

Die unterlagerte Dermis besteht aus der Lederhaut (Corium) und der Unterhaut (Subkutis), die die Verbindung der Haut mit ihrer Unterlage herstellt.

Das oberflächliche Stratum papillare setzt sich aus einem locker gefügten Geflecht kollagener Faserbündel (Kollagen Typ I) und gut ausgebildeten elastischen Fasernetzen zusammen, in die zahlreiche Fibroblasten und andere Zellen eingelagert sind [14].

Direkt unterhalb der dermoepithelialen Verbindungszone und um die Hautanhangsgebilde (Haare, Schweißdrüsen und Talgdrüsen) tritt auch Kollagen Typ III auf [15].

Das Stratum reticulare zeichnet sich demgegenüber durch eine reißfeste, fibroelastische Struktur ineinander verflochtener kollagener Fasermatten aus. Eingelagert sind die kollagenen Fasern in eine proteoglykanreiche Grundsubstanz, die zahlreiche Fibroblasten, dendritische Zellen, Mastzellen sowie Mikro- und Makrophagen beherbergt [16].

1.2 Die Haut als Immunorgan

Die Haut fungiert als Barriere gegen thermische, chemische und physikalische Noxen und trägt zur Kontrolle des Wasserhaushalts und der Körpertemperatur bei.

Darüber hinaus übernimmt sie wichtige Aufgaben im Rahmen des Abwehrgeschehens und fungiert mit Hilfe spezieller Zellen als Immunorgan [16], [17], [18], was sich auch durch den Begriff „Skin-associated lymphoid tissue“ (SALT) ausdrückt.

Die Haut spielt dabei eine große Rolle in der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr gegen Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten.

Im Falle einer Gefährdung der Hautbarriere durch Traumata, Infektionen, Allergene, Toxine oder UV- Licht reagiert die Haut mit einer starken Immunantwort. Beteiligt an diesem System sind epidermale Keratinozyten, Langerhanszellen, dermale dendritische Zellen, zahlreiche immigrierte sowie residente Abwehrzellen wie Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und intraepidermal gebildete pro-inflammatorische Mediatoren [19].

1.3 Immunaktive Zellen der Haut

1.3.1 Keratinozyten

Keratinozyten (KZ) machen über 90 % der epidermalen Zellen aus, sorgen für eine komplexe physikalische Barriere und spielen eine wichtige Rolle bei der Initiierung der kutanen Immunabwehr [20], [21]. Sie sind in der Lage zahlreiche immunstimulierende sowie modulierende Cytokine, Chemokine [22] und antimikrobielle Peptide zu produzieren [23], [24], [25], [26] und mit immigrierten Lymphozyten [27] und anderen Abwehrzellen zu interagieren. In den siebziger Jahren sprachen Edelson et al. den Keratinozyten erstmals eine entscheidende Bedeutung für die Aktivierung von T- Zellen zu [28].

Untersuchungen verschiedener Forschungsgruppen [29], [30], [31] zeigten darüber hinaus auf, dass Keratinozyten ETAF (Epidermal T-cell activating factor), heute bekannt als Interleukin 1, produzieren und freisetzen können. Dieser Entzündungsmediator, der sich bei vielen Hauterkrankungen nachweisen lässt, induziert die Produktion weiterer Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle (ICAM), die dann als Locksignal für T-Lymphozyten ins entzündete Gewebe fungieren [19], [32].

Nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren exprimieren KZ zudem MHC-II-Moleküle [33], [34], [35] und modulieren die intraepidermale Wanderung immunkompetenter Zellen durch Ausbildung und Reorganisation spezifischer Adhäsionsmoleküle [36], [37].

Des Weiteren fungieren die von KZ sezernierten pro-inflammatorischen Zytokine (z.B. TNF-alpha, IL 1-beta, IL 6, GM-CSF) als Migrationssignal für epidermale LZ [38], [39].

Darüber hinaus besitzen Keratinozyten zahlreiche Toll-Like Rezeptoren (TLRs), mit deren Hilfe pathogene Mikroorganismen erkannt und entsprechende Abwehrmechanismen eingeleitet werden [40].

1.3.2 Langerhanszellen

Langerhanszellen (LZ) entstammen dem Knochenmark [41], [42] und besiedeln bereits in der siebten Woche der embryonalen Entwicklung die Epidermis, die Haarfollikel sowie das unterlagerte dermale Interstitium [1].

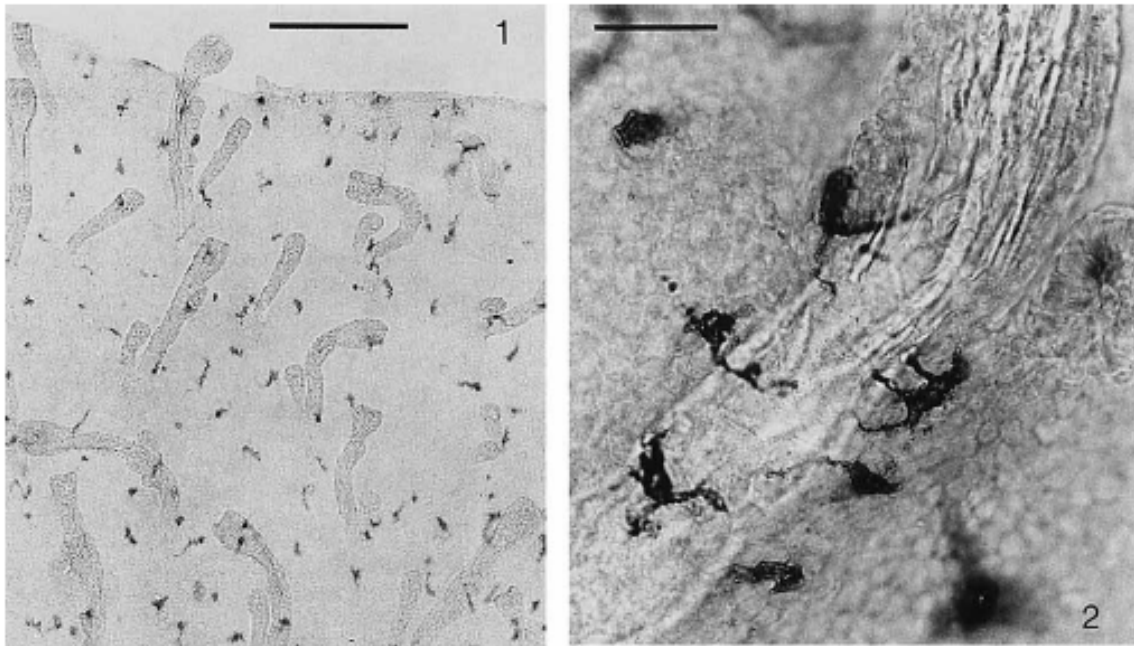


Abb. 2: Selektive Darstellung von Langerhanszellen (LZ) in der Haut eines 17 Wo. alten Fetus (aus [1]).

Bild 1 zeigt die regelmäßige Verteilung der Zellen in der Epidermis und in den sich entwickelnden Haarfollikeln im Flachschnitt.

Bild 2: Stärkere Vergrößerung im Bereich eines Haarfollikels.

Sie sind beim erwachsenen Individuum bevorzugt im basalen Drittel der Epidermis lokalisiert und machen bis zu 3 % der epidermalen Zellpopulation aus [21].

Darüber hinaus lassen sich LZ besonders zahlreich in der distalen epidermalen Wurzelscheide des Haarfollikels nachweisen [43], [44], [45].

Sie sind durch lange, fein verzweigte zytoplasmatische Zellfortsätze charakterisiert [46], die zu einer beträchtlichen Oberflächenzunahme führen, und damit sowohl zur Antigenaufnahme als auch zur Lymphozytenadhäsion dienen [47].

LZ bilden Desmosomen mit Nachbarzellen aus, exprimieren E-Cadherin, MHC-I und II-Moleküle und besitzen einen gelappten Kern [48], [49].

Über das Zytoplasma verteilt finden sich charakteristische, tennisschlägerförmige Granula [50], die wie Untersuchungen zeigen konnten, nicht direkt mit der Zellmembran in Verbindung stehen [51].

Die Entstehung der Birbeck-Granula wird in engem Zusammenhang mit einem zusätzlich exprimierten transmembranen endogenen Lektin mit der Bezeichnung *Langerin* gesehen [52]. Langerin stellt dabei einen spezifischen Antigen-Rezeptor dar, der C-Typ spezifische, zuckerbindende Domänen besitzt [53] und nach Bindung des Antigens als Antigen-Langerin-Komplex endozytotisch aufgenommen und intrazytoplasmatisch recycelt wird. Erst durch die intrazelluläre Akkumulation von Langerin kommt es dann zur Bildung der typischen Birbeck-Granula [51].

Da Langerin bei Mäusen auch an CD8a⁺ dendritischen Zellen lymphatischer Organe und auf einigen DZ in der Lunge und der Haut gefunden wurde [54], wird der Rezeptor als spezifischer Marker für LZ in Frage gestellt.

LZ und interstitielle dendritische Zellen entwickeln sich aus unreifen myeloiden Vorläufern [55] durch differenzielle Expression von Oberflächenmolekülen [47], [56], [57].

Dies führt dazu, dass epidermale Langerhanszellen nach der Differenzierung CD11c⁺CD1a⁺CD207⁺- Oberflächenmarker tragen.

Epidermale LZ werden nicht nur in der Epidermis unterschiedlicher Hautregionen, sondern auch in anderen mehrschichtigen Epithelien gefunden. So z.B. in der Vagina, wo sie wegen ihrer Fähigkeit das HIV-Protein gp120 über Langerin binden und aufnehmen zu können mit der Übertragung der HIV-Infektion in Verbindung gebracht werden [58], [59].

Neuere Untersuchungen [60] schreiben Langerin eher eine protektive Rolle in der HIV-Übertragung zu.

1.3.2.1 LZ-Migration und Verarbeitung von Antigenen

LZ spielen eine wichtige Rolle in der Induktion und Regulation der Immunantwort.

Sie sind in der Lage, selbst im unreifen Zustand zahlreiche Fremdsbstanz, wie gelöste Moleküle, Proteine, opsonierte Antigene sowie Partikel (z. B. Mikro- u. Nanopartikel) aufzunehmen, gegebenenfalls unschädlich zu machen oder im Sinne einer Immunantwort weiter zu prozessieren [61].

Nach Aktivierung durch inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL1-beta oder TNF-alpha, die von Keratinozyten stammen [62], „switchen“ LZ vom ruhenden zum aktivierten Phänotyp und exprimieren vermehrt MHC-II, CD80 und CD86-Moleküle zur Antigen-Präsentation. Sie verlassen nun als „gereifte“ LZ die Epidermis und gelangen durch Hochregulierung von Chemokin-Rezeptoren wie z.B. CCR7 in lokale Lymphgefäße und zu den T-Zellarealen des regionalen Lymphgewebes [47], [63], (s. Abb. 4).

Ein solches Migrationsverhalten von LZ konnte durch neuere Untersuchungen auch experimentell nach transepidermaler Applikation von Influenza-Antigenen nachgewiesen werden [64]. In den T-Zellarealen angekommen, initiieren gereifte LZ über die Aktivierung von T-Lymphozyten eine Immunantwort nach klassischem Muster [61], [65], [66].

Sie präsentieren dabei MHC-II-gebundenes Antigen den T-Helferzellen, die über ihre T-Zell-Rezeptoren (TCR) und über co-stimulatorische CD40 Moleküle aktiviert werden.

Dies führt dazu, dass T-Helferzellen in Zusammenarbeit mit Zytokinen (IL-2, IL-4, IFN-gamma) dafür sorgen, dass B-Zellen sich zu Plasmazellen umdifferenzieren.

Neben dieser klassischen Antigenpräsentation können LZ durch sogenannte „cross-presentation“ [67] auch CD8⁺ T-Zellen über einen bereitgestellten MHC-I-Antigen-TCR Komplex stimulieren, wodurch gleichzeitig zytotoxische T-Zell-Reaktionen gegen exogene Antigene induziert werden (s. Abb. 3).

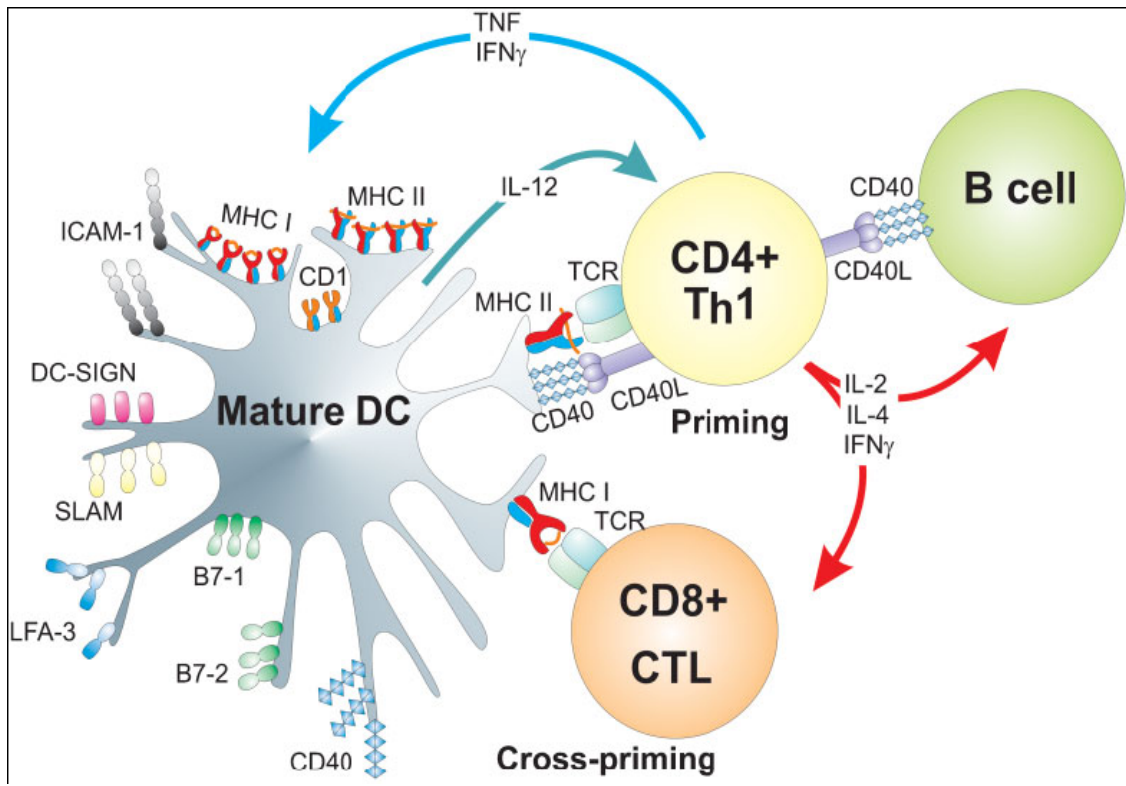


Abb. 3: Antigenpräsentation und Aktivierung von T- und B-Zellen durch reife Dendritische Zellen (DZ). Dargestellt ist die Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen durch Antigenpräsentation mittels MHC-II Molekülen und die Stimulierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch sog. „cross-presentation“ via MHC-I-Moleküle (aus [61]).

1.3.3 Dermale Dendritische Zellen (DDZ)

In der Literatur werden zwei große Gruppen Dendritischer Zellen beschrieben, die als myeloide bzw. plasmazytoide DZ bezeichnet werden [47].

Die Namensgebung der sogenannten plasmazytoide DZ geht auf ihr ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum zurück, das morphologisch an das der Plasmazellen erinnert [68].

Die dendritischen Zellen der Haut entstammen der myeloiden Reihe und werden in epidermale Langerhanszellen (s.o.) und dermale dendritische Zellen (DDZ) unterteilt [69].

Sie lassen sich durch unterschiedliche Expressionsmuster oberflächenassoziierter Moleküle (z.B. CDs, Chemokin- und Zytokinrezeptoren) weiter unterscheiden [70].

In der Literatur werden zwei neue Untergruppen der dermalen dendritischen Zellen beschrieben: Unreife $CD14^+ Cd1a^-$ DDZ, deren Funktion weitestgehend unbekannt ist [71], sowie $CD1a^+ CD14^-$ DDZ, die ähnlich den epidermalen Langerhanszellen befähigt sind eine kutane Immunantwort zu initiieren [71], [72].

DDZ werden wie andere Dendritische Zellen (beispielsweise LZ) auch als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) betrachtet, die im unreifen Zustand in der Lage sind professionell Antigene aufzunehmen und zu prozessieren [73].

Während der Migration zu den zugehörigen Lymphknoten verlieren die Zellen die Fähigkeit zur Antigenaufnahme, differenzieren sich zu reifen Dendritischen Zellen und sind nun in der Lage naive T- und B-Zellen zu stimulieren.

Neuere Studien weisen daraufhin, dass DDZ, anders als LZ bevorzugt in B-Zellarealen der Lymphknoten akkumulieren und B-Zellen zur Antikörperbildung aktivieren können [74].

Für dieses unterschiedliche Migrationsverhalten von DDZ und LZ wird angenommen, dass eine unterschiedlich starke Chemokinexpression (CCR7) der LZ bzw. DDZ eine Rolle spielt [75], [76]. DDZ lassen sich von LZ zudem durch die selektive Expression von CD11b, CD1d, CCR2, IL-2R α , IL-4R, IL-7R, CD64, CD206 und CD209 unterscheiden (Übersicht bei [77]).

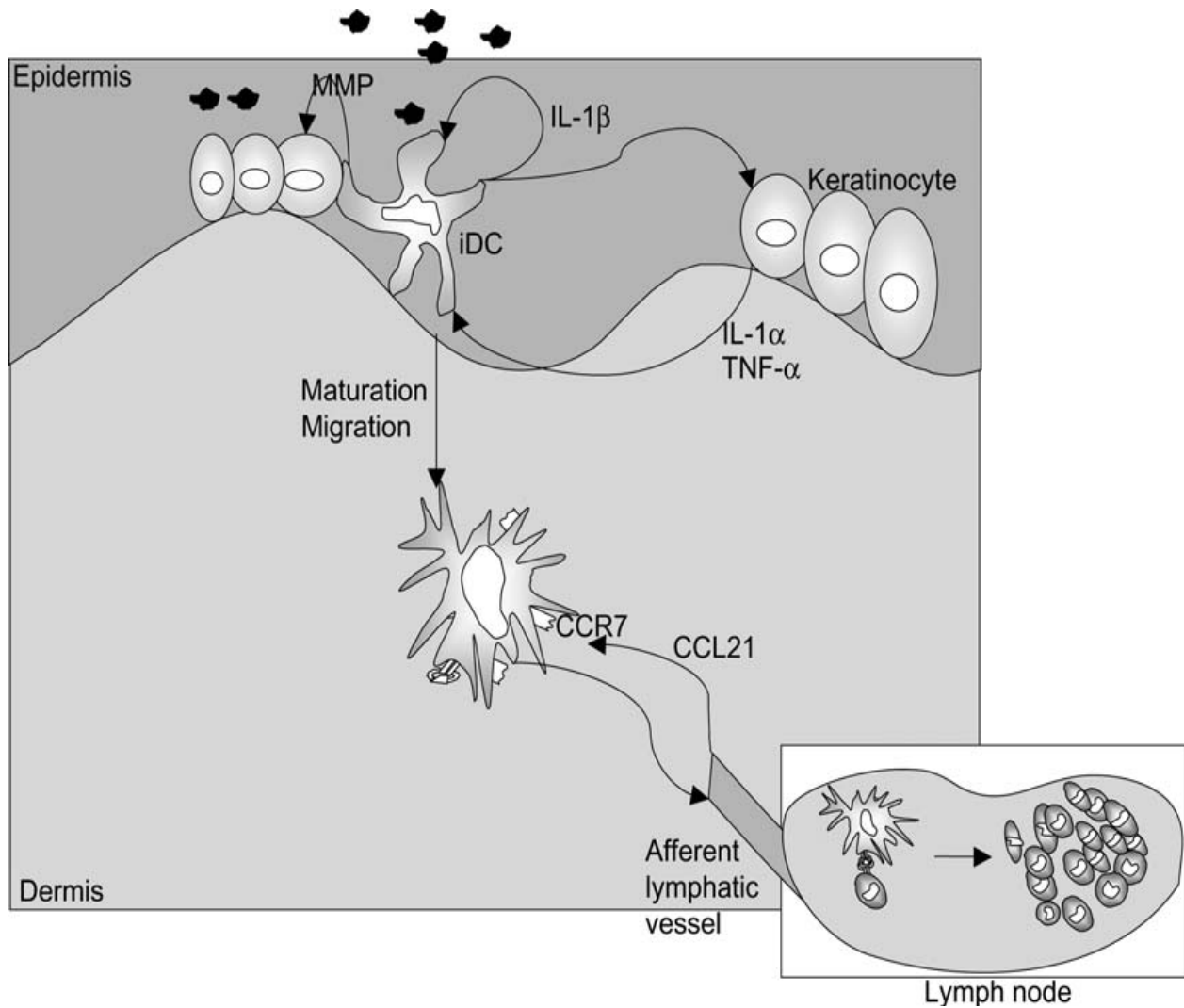


Abb. 4: Dargestellt ist die Migration von intraepidermal lokalisierten dendritischen Zellen (Langerhanszellen) nach Antigenkontakt. Die Produktion von Zytokinen (insbesondere TNF-alpha, IL-1alpha und IL-1beta) trägt dabei zur Migration aus der Epidermis bei, während die Chemokine CCR7, CCL21 eine wichtige Rolle bei der weiteren Wanderung zu den T-Zellarealen der Lymphknoten spielen (aus [77]).

1.4 Haarfollikel

Entwicklung

Die ersten Haarfollikel entwickeln sich bereits mit Beginn des 3. Entwicklungsmonats und betreffen Haare der Augenlider, Augenbrauen, Oberlippe und die Kinnregion.

Erst mit dem Beginn des 4. Monats gelangen auch die Haaranlagen in anderen Hautregionen zur Ausbildung.

Die Entwicklung beginnt mit der Proliferation basaler Epidermiszellen, die sich als Haarknospe in das unterlagerte Stroma absenken und durch Zellzunahme und Elongation zum Haarpapfen werden. In der weiteren Entwicklung kommt es zur Längenzunahme und die Haarzwiebel modelliert sich durch epitheliale/mesenchymale Interaktionen zusammen mit der Haarpapille heraus. Durch weitere Vermehrung der beteiligten Zellen entsteht sukzessive die epitheliale und dermale Wurzelscheide, so dass um die 16. Woche der Entwicklung das Haar in Miniaturform ausgebildet ist. Ähnlich wie für die Entwicklung der Epidermis spielt auch hier das Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Migration und Adhäsion eine bedeutende Rolle. Dies zeigt sich u.a. durch ein charakteristisches zeitliches und räumliches Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen wie z.B. P-Cadherin [78], extrazellulären Matrixproteinen (Tenasin) und Proteoglykanen [79].

Talgdrüsen und apokrine Schweißdrüsen entwickeln sich aus Epithelknospen, die im Bereich des Haarschafts entstehen, während sich ekkrine Schweißdrüsen unabhängig von der Haaranlage entwickeln. Die nachfolgende Abbildung 5 gibt einen Überblick über die frühe Entwicklung des Haares und seiner Anhangsgebilde [80].

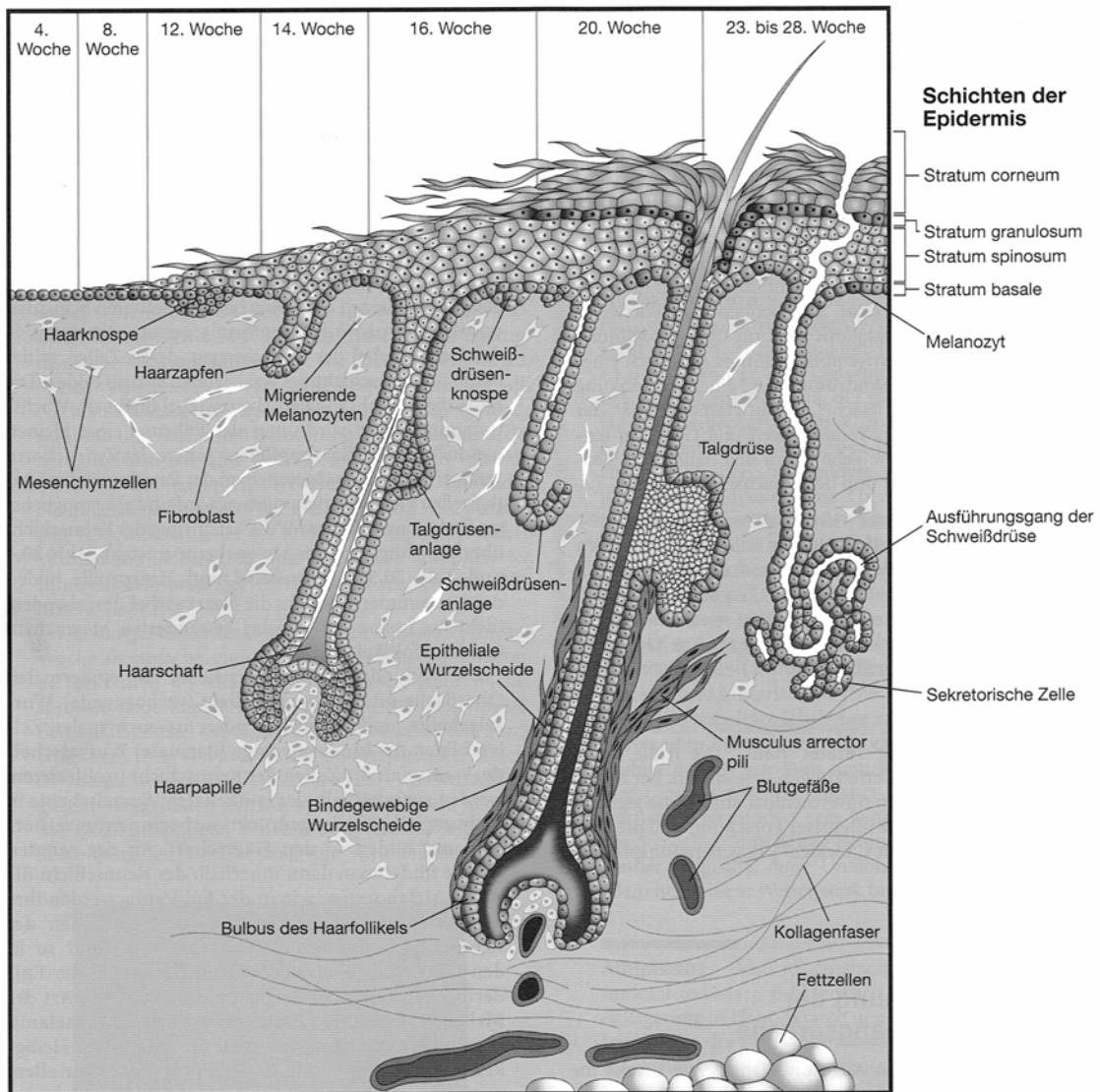


Abb. 5: Zeitliche Abfolge der Entwicklung eines Haarfollikels und der zugehörigen Talgdrüse. Ekkrine Schweißdrüsen entwickeln sich unabhängig von der Haaranlage (aus: [80]).

Allgemeiner Aufbau

Unter anatomischen und funktionellen Gesichtspunkten werden menschliche Haare in Lanugo-Vellus- und Terminalhaare unterteilt. Das Terminalhaar ist zumeist pigmentiert und findet sich als Kopf-, Bart-, Nasen- und Schamhaar. Hinsichtlich der Haardichte lässt sich in aufsteigender Reihenfolge die Wadenregion (14 Follikel/cm²), Kopfhaut und die Stirn mit 423-292 Follikel/cm² benennen [81], [82].

Der Terminalhaarfollikel weist eine Gesamtlänge von etwa 3864±605 µm und einen Durchmesser von durchschnittlich 172±70 µm auf.

Das feine, meist nicht pigmentierte Vellushaar findet sich als Flaumhaar an der gesamten Körperoberfläche außer im Bereich der Hand- und Fußflächen. Der Vellushaarfollikel ist mit einer Gesamtlänge von durchschnittlich 580±84 µm und einem Durchmesser von 68±34 µm [83] deutlich kleiner gegenüber dem Terminalhaar ausgebildet.

Die zelluläre Zusammensetzung der epidermalen Wurzelscheide der genannten Haare entspricht im Wesentlichen der Epidermis. Besonderheiten bestehen in der reduzierten Schichtenbildung, im Verhornungsgrad und im topographischen Verteilungsmuster immunaktiver Zellen (s. Abb. 6), dies beeinflusst insbesondere das Penetrationsverhalten topisch applizierter Substanzen.

Der epitheliale Haarbalg besteht aus einer äußeren und inneren Wurzelscheide und dem Scheidenoberhäutchen, das mit den verhornten Zellen des Haaroberhäutchens, der Epidermicula, eng verzahnt ist und damit wesentlich zur Befestigung des Haares in der Haartasche beiträgt.

Die innere Wurzelscheide setzt sich aus zwei bis drei Lagen Keratinozyten zusammen, die untereinander über feine Fortsätze verbunden sind und sich in eine Huxley'sche und eine Henley'sche Schicht unterteilen lassen. Diese dient dazu, das gebildete Haar aus dem Haarschaft schrittweise an die Oberfläche gleiten zu lassen. Begleitet wird dieser Vorgang durch die Rückbildung der inneren Wurzelscheide im lumennahen Bereich des Haarkanals [84].

Die Zellen der inneren Wurzelscheide enthalten sogenannte Trichohyalin granula, die ein spezielles, argininreiches 190-220-Kilodalton-Protein (Trichohyalin) enthalten, das bei der charakteristischen Verhornung der Zellen der inneren Wurzelscheide eine besondere Rolle spielt [85], [86].

Hierbei unterscheidet sich der Verhornungsprozess des Haares und der übrigen Epidermis [87].

Die äußere Wurzelscheide besteht aus mehreren Zellschichten und entspricht in ihrem Aufbau weitgehend dem Stratum germinativum der äußeren Haut.

Epidermale Stammzellen, die als Ausgangszellen für die Neubildung und Regeneration des Haares dienen, finden sich im Bereich der äußeren Wurzelscheide in der sog. „Wulstregion“ [88], [89], [90], [91], [92]. Getrennt durch eine Basalmembran schließt sich der bindegewebige Haarbalg an, der sich aus inneren zirkulären und äußeren longitudinalen kollagenen Fasermatten zusammensetzt, in die zahlreiche Fibroblasten, freie mobile Zellen, Blutgefäße und immunkompetente Zellen (DDZ, LZ) eingelagert sind. Die Blutversorgung des Haarschafts wird durch ein korbartig ausgebildetes Kapillarsystem gewährleistet, das diesen umscheidet und die bindegewebige Haarpapille versorgt [93]. Es erhält seinen Zufluss aus hypodermalen und dermalen Gefäßplexus, die durch zahlreiche Anastomosen gekennzeichnet sind.

Langerhanszellen wandern frühzeitig in die Haaranlage ein und verteilen sich im Laufe der Entwicklung nach charakteristischem Muster [1].

Beim Erwachsenen lassen sich LZ bevorzugt in distalen, oberflächennahen Arealen der epidermalen Wurzelscheide und nur vereinzelt in zentralen Abschnitten sowie im Bereich der Haarzwiebel nachweisen. Eine vergleichbare Verteilung gilt auch für CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen während sich Mastzellen und MHC-II-positive Makrophagen im distalen bindegewebigen Haarbalg konzentrieren [94].

Diese bevorzugte oberflächennahe Massierung immunkompetenter Zellen im distalen epithelialen wie auch im bindegewebigen Haarbalg bildet die zelluläre Voraussetzung für eine effektive, eintrittspfortennahe Immunabwehr (Übersicht bei [95]).

Der Eingang und der Anfangsabschnitt des Haarfollikels wird heute als wichtiger Invasionspfad für pathogene Mikroorganismen gesehen, so dass es nicht verwundert, wenn lokale Störungen der Immunabwehr in diesem Bereich in einem engen Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen wie z.B. der Alopecia areata gesehen werden (Übersicht bei [96]).

Zusammengefasst bietet die besondere Struktur der Haarfollikel gute Voraussetzungen, um als bevorzugter Applikationsweg für transepidermale Immunisierungsstrategien zu fungieren.

Dies insbesondere deshalb, da einerseits die reduzierte Zelllage des Stratum corneum im Haarbalgbereich (s. Abb.6, [97]) eine bessere Penetration topisch applizierter Substanzen zulässt, und andererseits da durch die Akkumulation zahlreicher immunkompetenter Zellen in diesem Bereich eine erhöhte Immunantwort erwartet werden kann.

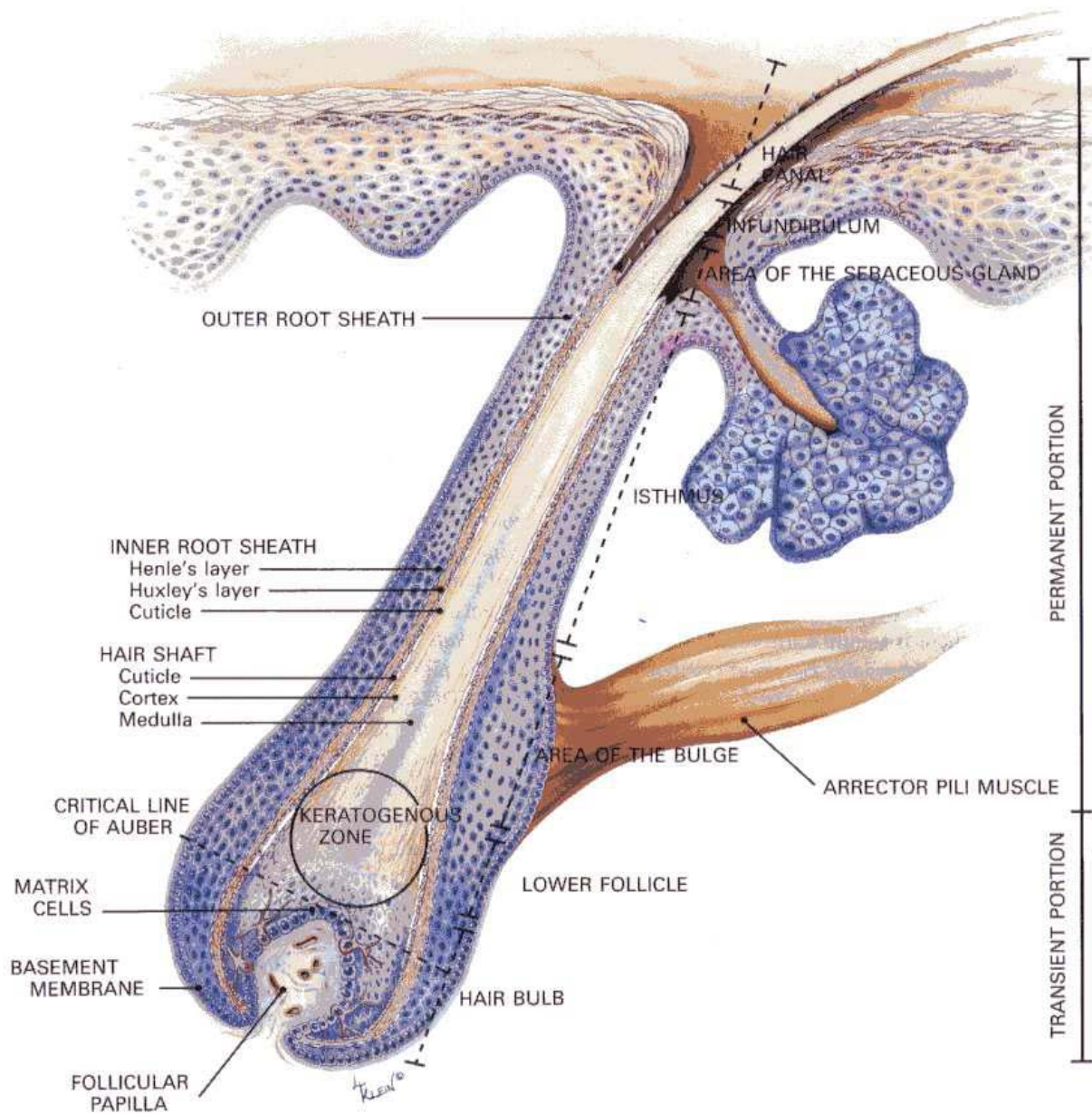


Abb. 6: Schematische Darstellung des anagenen Haarfollikels. Deutlich erkennbar ist die Veränderung der epidermalen Schichtenbildung im Bereich des Infundibulums (aus [97]).

1.5 Penetrationswege von Substanzen durch die Haut

Bei der Penetration topisch applizierter Substanzen durch die Epidermis spielt die äußerste Schicht, das Stratum corneum, eine wichtige Rolle.

Sie besteht aus bis zu 20 (an belasteten Stellen auch bis 100) Zellschichten, eng und kompakt miteinander verzahnter Keratinozyten, die in eine Lipidmatrix eingebettet sind [12], [13].

Diese Matrix ist komplex aufgebaut und setzt sich in der Hauptsache aus Palmitinsäure, Ceramiden, Cholesterol, freien Fettsäuren u. a. zusammen, die wesentlich zur Barrierefunktion des Stratum corneums beitragen [98].

Da sich in diesem Lipidgemisch polare, wässrige Phasen mit lipophilen abwechseln ist diese Schicht nicht gänzlich undurchlässig für lipophile und amphiphile Substanzen und wird deshalb vermehrt für die transepidermale Applikation von Wirkstoffen genutzt [99].

Gegenwärtig wird im Wesentlichen von drei Hauptpenetrationswegen ausgegangen [100], die sich wie folgt einteilen lassen (s. Abb. 7)

- interzelluläre Route durch die Lipidmatrix zwischen den KZ,
- transzellulärer Weg durch die Keratinozyten hindurch und
- follikulärer Weg entlang der Haarfollikel, worauf nachfolgend besonderes Augenmerk gelegt wird.

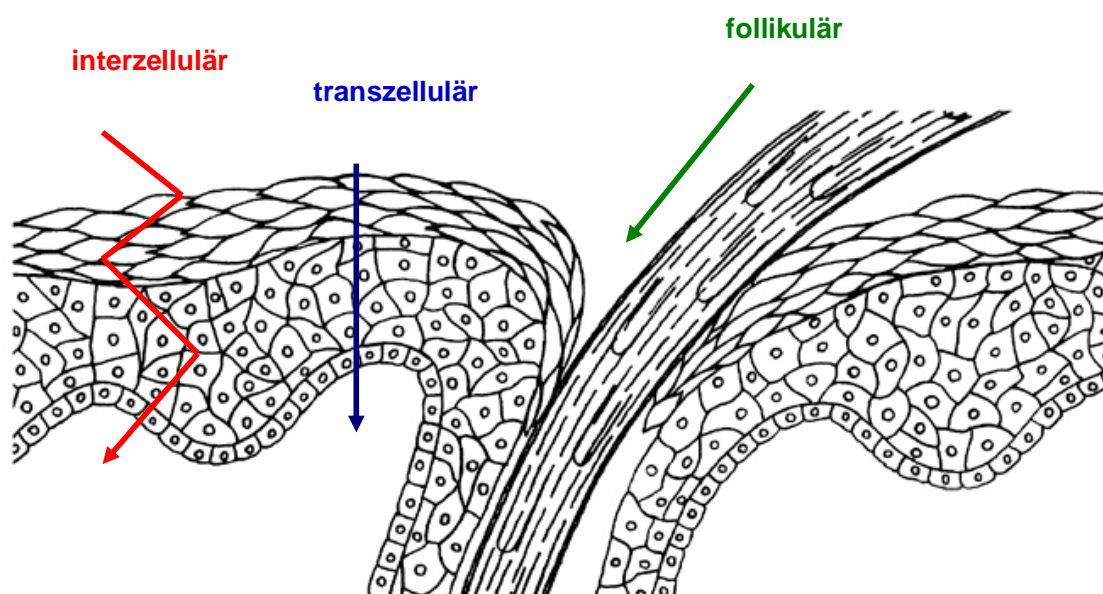


Abb. 7: Hauptpenetrationswege durch die Haut.

Der follikulären Route wurde in der Vergangenheit vor allem aufgrund ihrer geringen Aufnahme­fläche (0,1 %-0,3 % der Hautoberfläche sind mit Haarfollikeln bedeckt) nur eine geringe Bedeutung zugemessen. Einige Publikationen [100], [101] weisen jedoch daraufhin, dass die follikuläre Route einen attraktiven Penetrationsweg für die Applikation von Wirkstoffen darstellt.

Dies vor allem deshalb, da es im distalen Teil des Infundibulums zu einer reduzierten Keratinisierung der epidermalen Zellschichten kommt, die gleichzeitig mit einer erhöhten Permeabilität einhergeht [102], [64].

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass topisch appliziertes Koffein deutlich langsamer in die Blutbahn gelangt, wenn die Haarfollikel vor der Applikation experimentell durch Wachs abdichtet wurden [103]. Eine vergleichbar reduzierte Aufnahme lässt sich auch für Glukokortikoide ermitteln, wenn behaarte mit unbehaarter Haut verglichen wird [104].

Verbesserte Penetrationsergebnisse können dagegen erreicht werden, wenn bei der Applikation das Konzept der „offenen bzw. geschlossenen“ Haarfollikel berücksichtigt wird.

Die Autoren Lademann et al (2008) gehen davon aus, dass geschlossene Haarfollikel durch abgestoßene Korneozyten und Sebum bedeckt sind und bei aktiven Haarfollikeln durch Talgproduktion und Haarwachstum natürlicherweise offengehalten werden [105].

Die geschlossenen Haarfollikel lassen sich durch mechanisches Peeling oder durch sog. Cyanoacrylate-Skin-Surface-Stripping (CSSS) öffnen, so dass die Penetration ungehindert erfolgen und die Penetrationstiefe maximiert werden kann [105], [107].

So ließen sich bei Hautexzidaten, die mit einem CSSS vorbehandelt wurden, Penetrationswerte auf 35,9 % gegenüber 25 % bei unbehandelter Haut steigern [108]. Auch dient der CSSS dazu die feste Hautbarriere des Stratum corneums zu durchbrechen und eine Aktivierung der Zielzellen zu initiieren (unpublizierte Daten der AG Dr. A. Vogt).

1.6 Nanopartikel

Nanopartikel werden in der Literatur unterschiedlich klassifiziert. Sie sind definiert als unter 1µm große kolloidale Polymerpartikel, an denen ein Agens entweder an der Oberfläche adsorbiert oder in die Matrix eingekapselt ist [109].

Das Britische Wirtschaftsministerium hingegen definierte in Kooperation mit der British Standard Institution die Größe eines Nanopartikels auf < 100 nm (PSI 2005) und auch die Internationale Kommission für Normung ISO schlägt eine Definition für Nanopartikel von 1-100 nm vor [178]. Besondere Beachtung findet die Nanotechnologie u.a. in der Pharmakotherapie, da sich durch diese Methodik die Möglichkeit eröffnet, unterschiedliche Wirkstoffe gezielt und möglichst unverändert an den Ort des Interesses einbringen zu können [110]. Klinisch relevante Einsatzgebiete betreffen z. B. das sogenannte Tumortargeting von neuronalen Tumoren durch systemische Applikation, da spezielle Nanopartikel in der Lage sind die Bluthirnschranke zu überwinden und so im Zielgewebe ihre Wirkung entfalten können [111]. Auch die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms [112] und des Mammakarzinoms der Frau mittels enkapsuliertem Tamoxifen [113] stellen wichtige Einsatzgebiete der modernen Nanotechnologie dar.

In der Dermatologie wird die Technologie u.a. bei der Optimierung der Penetration von topisch applizierten Substanzen (z.B. Sonnenschutzcremes) verwendet [49], [114].

Was die transepidermale Pharmakotherapie betrifft, so gehören die gut untersuchten PLA-Partikel zu den wichtigsten Trägermolekülen, die heute regelmäßig Anwendung finden. PLA (Poly lactid acid) ist nicht toxisch, bioabbaubar [115] und biokompatibel, so dass die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen weitgehend ausgeschlossen ist. Dies macht PLA auch attraktiv für Fachgebiete wie die Orthopädie und Zahnmedizin, die diesen bioabbaubaren reabsorbierbaren Polymer als Alternative zu metallischen Implantaten sehen [116].

Bei transkutater Applikation penetrieren PLA-Partikel bevorzugt entlang des follikulären Kanals, konzentrieren sich im Haarfollikel und geben den eingekapselten Inhaltsstoff nach und nach ab [117]. Als nachteilig wird hingegen die Instabilität der Partikel angesehen, wodurch sich die Einstellung stabiler Wirkstoffkonzentration im Zielgebiet schwierig gestaltet [118].

Als weiterer Kritikpunkt wird auch genannt, dass bioabbaubare Polymere wie PLGA und PLA den Inhaltsstoff zu langsam freisetzen, um einen wirksamen Therapieeffekt zu ermöglichen [119].

1.7 Transepidermale Immunisierung

Klassische Methoden der Vakzinierung beinhalten orale, intramuskuläre, subkutane oder intrakutane Applikationsformen, wobei heute bevorzugt die intramuskuläre Injektion Anwendung findet [120]. Diese ist schmerzhaft, setzt geübtes Personal voraus und birgt durch den invasiven Charakter die Gefahr von Verletzungen und Infektionen [121].

Aus diesem Grunde konzentrierte man sich in den letzten Jahren vermehrt auf die Entwicklung von Vakzinierungsstrategien, die die o.g. Nachteile ausschließen bzw. reduzieren [122].

Transepidermalen Applikationsformen werden dabei wesentliche Vorteile durch bessere Patientencompliance, verlängerte Wirkdauer, höhere Bioverfügbarkeit, geringere toxische Effekte sowie kontrollierte Konzentrationen am Wirkungsort zugeschrieben.

Des Weiteren ist die Haut einfach zugänglich und von zahlreichen (s.o.) immunkompetenten Zellen bevölkert [123], [124].

Was die Effektivität dieser neuen Technik anbelangt, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch transepidermale Immunisierung eine besonders starke Antigenaufnahme durch epidermale LZ erfolgt, die in eine antigenspezifische humorale Immunantwort (IgG-Produktion) mündet [120]. Dass darüber hinaus auch eine starke CD 8⁺T-Zellreaktion durch transepidermale Immunisierung mit einem Protein-basierten Influenza-Impfstoff ausgelöst werden kann, wird durch eine neuere Studie von Vogt et al (2008) dokumentiert [64].

Eine potente CD8⁺-Immunantwort ist spezifisch gegen Virus-infizierte Zellen gerichtet und hiermit im Hinblick auf Immunisierungsstrategien gegen HIV von großer Bedeutung.

Besonders interessant sind zudem Hinweise, dass die transkutane Impfstoffapplikation deutlich geringere Antigenkonzentrationen erfordert als die intramuskuläre Applikation [125].

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Hautpräparate

Die exzidierten Hautproben wurden von unterschiedlichen Spendern im Rahmen plastischer Operationen gewonnen und anschließend schnellstmöglich verarbeitet.

Insgesamt wurde die Haut von 22 Spendern untersucht. Sowohl die Patienteninformationen als auch die Einwilligungserklärungen erfolgten nach Vorgaben der Ethikkommission.

Es wurde ausschließlich Brust-, Bauch- und Gesichts- und Oberarmhaut verwendet.

Für die Untersuchungen zur Follikelpenetration wurde Gesichtshaut von zwei (n=2), für die Partikelaufnahme, sowie LZ-Aktivierungs-Experimente wurde Bauch- und Brusthaut von je drei (n=3) bzw. sechs (n=6) Spendern verwendet. Bei den Aufnahme-Experimenten an Zellkulturen wurde die Brusthaut einer Spenderin (n=1) bearbeitet.

2.1.2 Untersuchte Partikel

Die in den nachfolgenden Tabellen 1a und b dargestellten Nanopartikel wurden bei den Penetrations-, Aufnahme- und LZ-Aktivierungsexperimenten eingesetzt.

Tab. 1a: PLA-Partikel

Name	PLA 157	PLA 167_p24	PLA 202	PLA 230_p24	PLA 215_p24
Größe nm	156.5	166.9	202.35	230.25	214.54
Polidispersitäts Index	0.063	0.082	0.042	0.093	0.14
Konzentration	2.5mg/ml oder 9.97×10^{12} Partikel/ml	2.5mg/ml oder 9.97×10^{12} Partikel/ml	2.8mg/ml oder 5.19×10^{11} Partikel/ml	2.8mg/ml oder 5.19×10^{11} Partikel/ml	2.14mg/ml oder 3.34×10^{11} Partikel/ml
Puffer	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Emission nm	505	505	303	505	entfällt
Exzitation nm	458	458	458	458	entfällt
Fluorochrome	Coumarin6 (grün)	Coumarin6 (grün)	Coumarin6 (grün)	Coumarin6 (grün)	entfällt
Konzentration	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2 %	entfällt
Antigen/ Konzentration	entfällt	P24HIV-3/070408/ 40.37mg/ml 1.32 mg/m ²	entfällt	P24HIV-3/070408/ 40.37mg/ml 1.32 mg/m ²	P24HIV-3/20090707/ 46.7mg/ml 2,08mg/m ²

Tab. 1b: PS-Partikel

Name	PS 121	PS 123_p24	PS 222	PS 241_p24	PS 255_p24
Größe nm	120.7	123.3	222	241.4	255.2
Polidispersitäts Index	0.014	0.091	0.014	0.103	0.19
Konzentration	2.5mg/ml oder 2.17x10 ¹² Partikel/ml	2.5mg/ml oder 2.17x10 ¹² Partikel/ml	3.4mg/ml oder 4.75x10 ¹¹ Partikel/ml	3.4mg/ml oder 4.75x10 ¹¹ Partikel/ml	2.51mg/ml oder 3.51x10 ¹² Partikel/ml
Puffer	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Emission nm	505	505	505	505	505
Exzitation nm	515	515	515	515	515
Fluorochrome	Fluospheres ®carboylate- modified microspheres 0.1µm.yellow- green fluorescent F8803)	Fluospheres ®carboylate- modified microspheres 0.1µm. yellow- green fluorescent F8803)	Fluospheres ®carboylate- modified microspheres 0.2µm. yellow- green fluorescent F8811)	Fluospheres ®carboylate- modified microspheres 0.2µm. yellow- green fluorescent F8811)	Fluospheres ®carboylate- modified microspheres 0.2µm. yellow- green fluorescent F8811)
Antigen/ Konzentration	entfällt	P24HIV- 3/070408/ 40.51 mg/g 1.32 mg/m ²	entfällt	P24HIV- 3/070408/ 29.38 mg/g 1.36 mg/m ²	P24 HIV- 3/20090707 40mg/g 1.85 mg/m ²

2.1.3 Antikörper und MACS-Separation Kit

Für die Isolierung von epidermalen Langerhanszellen wurde eine magnetische Zellseparation durchgeführt. Verwendet wurde dabei ein MACS-Separations Kit von Milteniy Biotec, USA (CD1c (BDCA-1)). Für die Durchflusszytometrie wurden folgende Antikörper eingesetzt (s. Tab. 2):

Tab. 2: Antikörper und MACS-Separationskit

Antikörper	anti - CD1a	anti - CD80	anti - CD83
Hersteller	BDPharmingen™	BDPharmingen™	BDPharmingen™
Farbstoff	APC	PE-Cy™5	PE
Katalognummer	559775	559370	556855
Verwendung	Aufnahme	Aktivierung	Aktivierung

2.1.4 Chemikalien und Geräte

Die im Rahmen der Doktorarbeit eingesetzten Chemikalien und Geräte sind nachstehend in Tabelle 3 und 4 aufgelistet.

Tab. 3: Chemikalien

Produktname	Menge/ Konzentration	Hersteller	Katalognr.	Herstellung der Lösungen
Medium RPMI 1640	500 ml	PAA Laboratories	E 15-039	
Foetal Calf Serum (FCS)	500 ml	PAA Clone	A 15-049	
Dulbecco's PBS Ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	500ml	PAA Laboratories	H 15-002	
Hexan	1000ml, >95 %	Merck	110-54-3	
Isopropyl myristat	250ml, >98 %	Fluka	110-27-0	
Dichloromethan	500ml, >99,9 %	Merck	060480500	
CaCl ²	500gr	Sigma	100-30525	1,665 g CaCl ² + 13,3 ml PBS
Paraformaldehyde	500gr	Sigma	30525-89-4	1g PFA 2 % + 49 ml PBS
Dispase® II	5x 1gr, 0,8 U/mg	Roche	04942078001	4 ml Dispase (10mg/ml) + 9,34 ml Medium = 2,4 U/L Gebrauchslösung
MACS Puffer				500 ml PBS, pH=7,2, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ + 0,5 % BSA +10 mM EDTA
Trypsin- Trockensubstanz	1:250	Biochrom Ag	L-2103-20g	5 ml Trypsin (2,5 %=0,125 g Trypsin +4,87 ml PBS) + 45 ml PBS + 75 µl 1M CaCl ²
Albumin bovine Fraktion V (BSA)	100gr	Serva	11939	
EDTA	50gr, >99 %	Sigma	E5134	
Sekunden Alleskleber		UHU, Deutschland		
Tesafilm®		Tesa, Deutschland		
Parafilm		Pechiney Plastic		
Kryo- Spray		Bio optica, Italien		
Einbettmedium Tissue- Tek® O.C.T.Compound		Science Services, Deutschland		
Cell Strainer BD Falcon Cell Strainer 70		BD Biosciences, USA		

Tab. 4: Geräte

Geräteart /Modell	Hersteller
Kryostat HM 560	MICROM
Inverses Mikroskop IX 50	Olympus
Fluoreszenzmikroskop BX 60	Olympus
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Zentrifuge fresco	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Brutschrank HERA cell	Heraeus
Sterile Arbeitsplatte HERA safe	Heraeus
Schüttler MiniRocker MR-I	IKA® Labortechnik
Vortex MSI Minishaker	IKA® Labortechnik
Magnetic Cell Separator MACS Multistand	MILTENYI BIOTEC
Magnetische Säule, Large Cell Separation Columns	MILTENYI BIOTEC

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Hautproben und CSSS (Cyanoacrylate-Skin-Surface-Stripping)

Die Hautstücke wurden unmittelbar nach der Operation gekühlt ins Labor gebracht, im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert und anschließend verarbeitet.

Vor der Präparation wurden die Hautproben auf post-operative Läsionen, Einblutungen oder sonstige Beschädigungen überprüft. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden ausschließlich unveränderte Präparate weiterverarbeitet.

Sowohl für die Kryoschnitte, die Partikel-Aufnahme- und LZ-Aktivierungsversuche an exzidierten Haut als auch für die Untersuchung an Zellkulturen wurde das subkutane Fettgewebe partiell entfernt und die Hautproben auf mit Alufolie umkleidete Styroporstücke gepinnt. Anschließend wurde vor dem Auftragen der Partikelsuspensionen ein Cyanoacrylate Skin Surface Stripping (CSSS) nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe von Frau Dr. A. Vogt durchgeführt (s. Abb. 8).

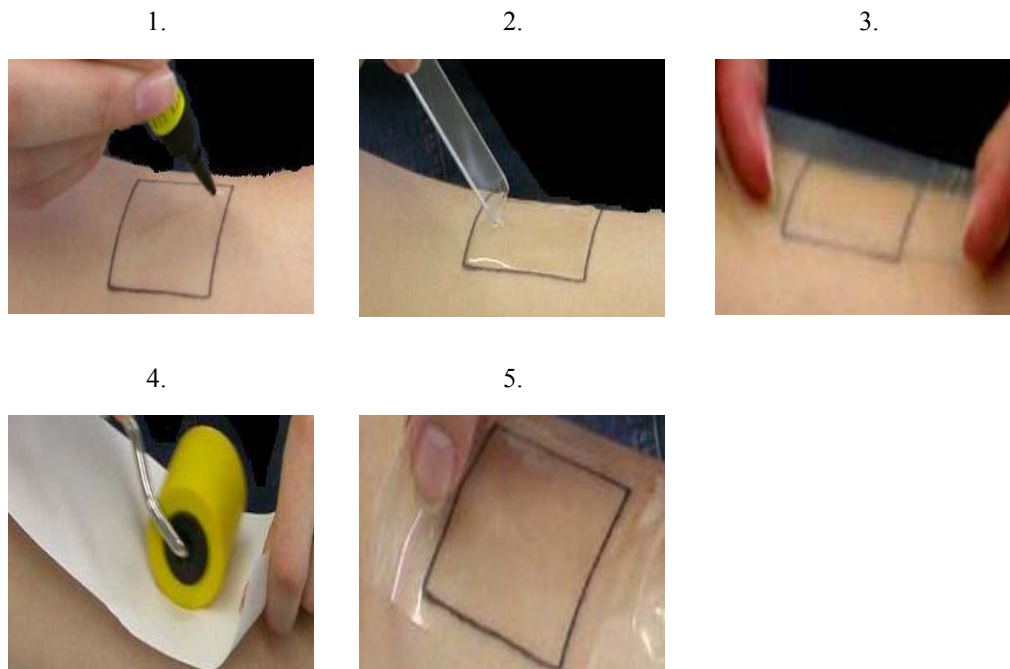


Abb. 8: Auf 1 cm² bzw. 16 cm² präparierter Haut wurden 1 bzw. 9 Tropfen UHU-Sekundenkleber verbracht, dünn verstrichen und mit einem Tesafilmstreifen beklebt, der nach einer Trockenzeit von 20 Minuten vorsichtig entfernt wurde.

2.2.2 Kryoschnitte und Auswertung der Follikelpenetration

Für die Untersuchungen zur Follikelpenetration wurden Gesichtshaut-Präparate bearbeitet.

Nach einem CSSS wurde auf ein Areal von 1 cm² 20 µl einer der unterschiedlichen Partikelsuspensionen (0,1%) aufgetragen und für vier Stunden in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach vierstündiger Inkubationszeit wurden mit einem fünffachen Tape-Stripping die obersten Schichten des Stratum corneums abgelöst. Somit wurden überschüssige, nicht penetrierte Partikelreste entfernt, um eine artifizielle Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen.

Anschließend wurden die Hautexzidate in vier gleichgroße 0,5 cm x 0,5 cm x 0,2 cm Stücke geteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Jeweils eine Probe wurde in Einbettmedium befestigt, im Gefriermikrotom geschnitten und auf Objektträger gebracht. Die Schichtdicke der Schnitte betrug 6 µm, die Temperatur des Messers lag zwischen -19°C u. -22°C und die des Objektes zwischen -22°C u. -25°C.

Die so angefertigten Schnitte (10-15/Objektträger) wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die so erhaltenen Kryoschnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (BX 60, Olympus) untersucht und die genaue Penetrationstiefe der eingesetzten Partikel (s. Tab. 1a u. b) unter Anwendung von Filtern verschiedener Wellenlängen (NATIV=einfache Durchleuchtung, NIBA=515-580 nm, WBV=450-580 nm) bestimmt. Insgesamt wurden pro Hautprobe jeweils 40-60 Längsschnitte von Follikeln und die Haut von zwei unterschiedlichen Spendern ausgewertet (n=2). Die Eindringtiefe der PS- und PLA-Partikel wurde semiquantitativ ermittelt und die Haarfollikel in vier verschiedene Kategorien eingeteilt:

Haarfollikel mit Partikelpenetration bis zur/zum

(-) *Epidermisoberfläche*

(+) *mittlere Epidermis*

(++) *Übergang Epidermis/Dermis*

(+++) *tiefen Infundibulum*

2.2.4 Intrazelluläre Partikelaufnahme und Aktivierung der LZ an exzidierte Haut

Die Untersuchung zur Partikelaufnahme durch Langerhanszellen bzw. Keratinozyten wurde an der Bauchhaut von drei unterschiedlichen Spendern vorgenommen (n=3).

Auf zwei, je 4 cm x 4 cm großen Exzidaten wurde nach einem CSSS ein Volumen von 320 µl der jeweiligen Partikelsuspensionen aufgetragen. Ein mit 320 µl PBS behandeltes Präparat diente als Negativ-Kontrolle für die späteren Auswertungen und Einstellungen am

Durchflusszytometer. Alle drei Exzidate (2 Proben, 1 Kontrolle) wurden über 16 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert.

Für Aktivierungsuntersuchungen an Langerhanszellen und Keratinozyten wurde Bauch- und Brusthaut von sechs unterschiedlichen Spendern verarbeitet. Es wurden zwei unterschiedliche Aktivierungsmarker verwendet (3x anti-CD80 und 3x anti-CD83).

Bei den Aktivierungsversuchen wurden dementsprechend eine Positiv-Kontrolle (TNF-alpha), eine Negativ-Kontrolle (PBS) und eine Partikelprobe gleichermaßen 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Als Positiv-Kontrolle für die FACS-Analyse diente ein 16 cm² großes Hautstück, das mit einer TNF-alpha-Lösung (50mg/ml) behandelt wurde. Dazu wurde nach einem CSSS 320 µl einer TNF-alpha-Lösung aufgetragen und mit einer Pricknadel in die Haut eingebracht.

Nach der Inkubation wurde an allen Proben ein fünfmaliges Tape-Stripping vorgenommen. Die Proben wurden von der Dermis- zur Epidermisseite hin mit einem Skalpell in 3 mm x 3 mm kleine Stückchen geschnitten und anschließend bei 37°C über zwei Stunden in 3 ml Dispase (2,4 U/ml) verdaut. Hierdurch wurde die Epidermis von der Dermis im Bereich der Basalzellschicht abgelöst und die Epidermisplättchen konnten nachfolgend mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig abgezogen werden. Die Epidermisplättchen wurden in PBS gewaschen und in einer 0,25 %-igen Trypsin-Lösung mit 1,5mM CaCl₂ über 15 Minuten bei 37°C verdaut.

Durch Zugabe von 10 ml RPMI-Zellmedium mit 10 % FCS wurde die enzymatische Spaltung beendet. Nach Filtration der Epidermisplättchen wurde die somit gewonnene Zellsuspension zehn Minuten zentrifugiert (1000 rpm) und in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Im Anschluss daran wurden die Langerhanszellen von den Keratinozyten durch MACS-Separation isoliert. Dazu werden die Langerhanszellen im Rahmen der Separation mit Magnetpartikeln markiert und somit beim Durchfließen einer Säule, die von einem Magnetfeld umgeben ist, zurückgehalten. Zu den gewonnenen Zellsuspensionen wurden jeweils 100 µl des FcR-Blocking Reagens, CD19-Beads und anti-BDCA-1-Biotin Antikörper zugegeben und bei 4°C über 12 Minuten durchmischt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 5 ml PBS sowie eine Zentrifugation (800 rpm, 7 min). Nach Resuspension in 400 µl MACS-Puffer wurden 100 µl anti-Biotin Micro Beads hinzugefügt. Nach 12 Minuten bei 4°C auf dem Schüttler wurden 10 µl APC-gekoppelter anti-Human CD1a addiert und die Zellsuspension 20 Minuten erneut bei 4°C geschüttelt.

Für die Aktivierungsexperimente wurden anstelle von anti-Human CD1a, 10 µl PE-CyTM5 Mouse anti-Human CD80 bzw. 10 µl PE Mouse anti-Human CD83 verwendet.

Es erfolgte ein zweiter Waschschriff mit 5 ml PBS. Nach Zentrifugation (800 rpm, 7min) wurde das gewonnene Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Zur Vorbereitung der Zellseparation wurde die magnetischen Säule drei Mal mit jeweils 1 ml MACS-Puffer gewaschen, bevor die Zellsuspension auf die Säule aufgebracht wurde.

Beim ersten Durchlauf wurden die Langerhanszellen durch das Magnetfeld zurückgehalten. Nachfolgend wurde die Säule erneut dreimal mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen.

Nach Entfernung des Magnetfeldes wurde mit 1 ml MACS-Puffer eluiert und nach Zentrifugation (2000 rpm, 5 min) der gewonnenen Zellsuspension der gleiche Prozess zur weiteren selektiven Anreicherung der Langerhanszellen mit einer zweiten Säule wiederholt.

Diese wurden erneut zentrifugiert (2000 rpm, 5 min), in 300 µl PFA (2 %) resuspendiert und bei 4°C gelagert.

2.2.5 Partikelaufnahme in Zellkulturen

Für diese Untersuchungen wurde die Brusthaut einer Spenderin (n=1) verwendet.

Langerhanszellen wurden nach oben genannter Methode (MACS-Separation) isoliert und anschließend mit den jeweiligen Partikelsuspensionen über zwei Stunden in 10 ml Medium (RPMI 1640) bei 37°C inkubiert.

Verwendet wurden verschiedene Partikelgrößen und -typen (PS 121, PLA 157, PS 222, PS 241_p24, PLA 202, PLA 230_p24). Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml PBS und eine Zentrifugation (2000 rpm, 7 min). Anschließend wurde das Zellpellet in 300 µl PFA (2 %) resuspendiert, bei 4°C aufbewahrt und die Partikelaufnahme am Durchflusszytometer gemessen.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Das Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, Signale von Zellen mittels eines Laserstrahles anzuregen und zu messen und sie hiermit bedingt durch ihre Zellmerkmale in Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften zu unterscheiden. Hierfür werden die Zellen zuerst mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantigene markiert. Da die Zellen bei den Untersuchungen auch mit fluoreszierenden Nanopartikeln inkubiert wurden, kann auch die Fluoreszenzeigenschaft der Zell-assoziierten Partikel selbst gemessen werden.

Sowohl die Größe als auch die Granularität wird anhand des Streulichtes der Zellen bestimmt. Das Vorwärtstreulicht (Forward Scatter-FCS) gibt die Größe, das Seitwärtstreulicht (Side Scatter-SSC) die Granularität der Zelle an. Diese kann man zwei-dimensional in einem DOT-Plot Diagramm darstellen und die entsprechende Zellpopulation markieren und somit mit Hilfe eines sogenannten GATE trennen (s. Abb. 9).

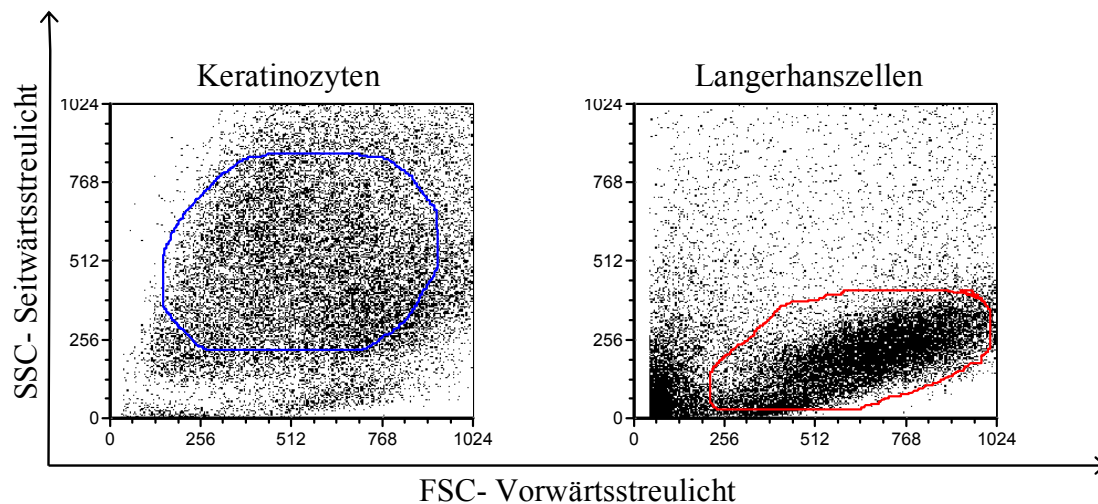


Abb. 9: Zwei Diagramme mit den Achsen FSC=Größe und SSC=Granularität. In der FACS-Analyse lassen sich die für die jeweilige Zellpopulation charakteristischen „Wolken“ darstellen, wodurch sich die Keratinozytenpopulation (links) bzw. Langerhanszellpopulation (rechts) deutlich unterscheiden lassen.

Das verwendete Durchflusszytometer verfügt über einen Argon Laser (488 nm, blau), sowie einen Dioden Laser (635 nm, rot), die die Fluoreszenz von 4 Regionen detektieren

Der Kanal FL1 detektiert Fluoreszenz einer Wellenlänge von 530 ± 30 nm (530 bis 560 nm).

Die anderen Kanäle messen die Wellenlängen wie folgt: FL 2585 \pm 42 nm, FL3 661 \pm 16 nm und FL4 ab 670 nm.

Die verwendeten Partikel sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) gekoppelt. Diese werden über den Kanal FL1 bestimmt. Die Langerhanszellen wurden mit dem fluoreszierenden APC (*Allo-Phyco-Cyanin*) anti-Human CD1a-Antikörper sowie mit den PE-CyTM5 (Phycoerythrin Cyanin) mouse anti-Human CD80 und PE (*Phycoerythrin*) mouse anti-Human CD83-Antikörper gekoppelt und im Kanal FL4 bzw. FL3 gemessen.

Die Ergebnisse wurden entweder im zweidimensionalen Koordinatensystem (Dot-Plot-Diagramm) bzw. in Histogrammen dargestellt.

In den Histogrammen wird die Fluoreszenzintensität in Relation zur Zahl der fluoreszierenden Zellen als Kurve dargestellt. Die Überlappung von Kontroll- und Testkurven ermöglicht hierbei einen direkten Vergleich der Proben (s. Abb. 10 a u. b).

Sowohl die Keratinozyten- als auch die Langerhanszellsuspensionen wurden am Durchflusszytometer gemessen. Insgesamt wurden pro Probe in etwa 20.000 Events im Gate mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

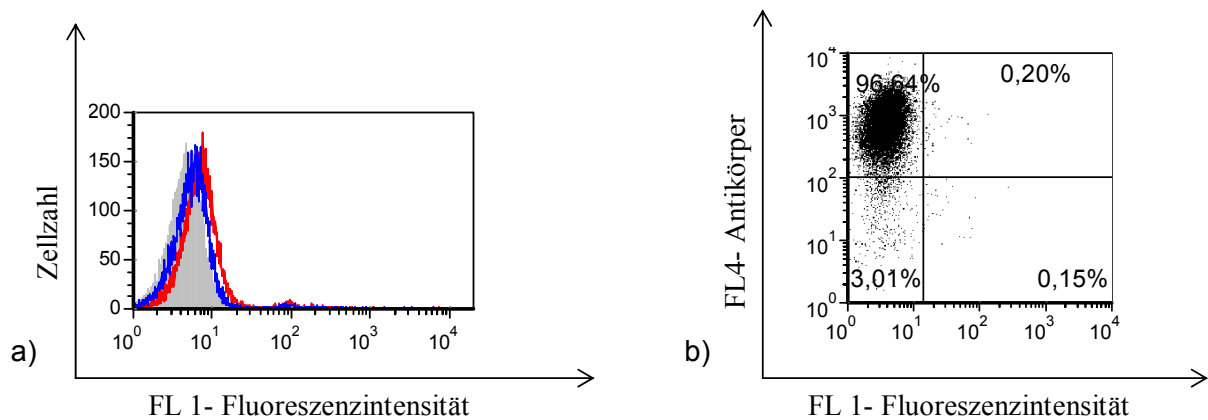


Abb. 10 a) u. b): Darstellungsmöglichkeiten der durchflusszytometrischen Analyse.

In 10 a) abgebildet ist ein Histogramm, welches die Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Zellzahl wiedergibt. Grau stellt die Kontrolle, blau und rot die mit Partikeln inkubierten Zellen dar, deren Kurven im Vergleich zur Kontrolle verschoben sind.

10 b) zeigt ein Dot-Plot-Diagramm mit den Achsen FL1 (Fluoreszenzintensität) und FL4 (jeweilig verwendeter Antikörper). Die positive Wolke im linken oberen Quadranten zeigt eine Zellpopulation, die CD1a-positiv ist.

2.2.7 Statistik

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2003 berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Follikuläre Penetration von PS- und PLA-Partikeln

Polystyrol-Partikel

Nach einem CSSS und vierstündiger Inkubation der exzidierten Haut mit den PS-Partikeln (0,1 %) bei 37°C wurde die Hautoberfläche von überschüssigen Partikelresten durch ein fünffaches Tape-Stripping gereinigt. Anschließend wurden Kryolängsschnitte der Haarfollikel angefertigt und das Penetrationsverhalten von unterschiedlich großen unbeschichteten (121 nm, 222 nm) bzw. mit p24-Antigen beschichteten (123_p24 nm, 241_p24 nm) PS-Partikeln mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Haarfollikel wurden entsprechend der Partikelpenetration klassifiziert:

(-) *Hautoberfläche*

(+) *mittlere Epidermis*

(++) *Übergang Epidermis/Dermis*

(+++) *tiefes Infundibulum*

Zur Auswertung gelangten pro Partikelgröße und Hautprobe (n=2) jeweils 40-60 Follikel von Vellus- und Intermediärhaaren, die nachfolgend vergleichend in Säulendiagrammen dargestellt werden. Zur photographischen Dokumentation wurden Nativaufnahmen (einfache Durchleuchtung) und entsprechende Fluoreszenzaufnahmen von identischen Arealen angefertigt und digital übereinander gelegt (Overlay-Technik).

Bei der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop ließen sich die PS-Partikel gut untersuchen und zeigten ein feingranuläres, homogenes Verteilungsmuster.

Das Penetrationsverhalten unbeschichteter, 121 nm großer PS-Partikel ist dadurch charakterisiert, dass die applizierten Partikel in insgesamt 60 % der Haarfollikel unterschiedlich tief eindringen. So erreichten die Partikel das tiefe Infundibulum bei 9,7 % der Haarfollikel bzw. 12,4 % den Übergang Epidermis/Dermis. In der Ebene der mittleren Epidermis ließen sich bei 32,3 % der Haarfollikel Partikel nachweisen und in 39,6 % fanden sie sich an der Epidermisoberfläche.

Vergleicht man das Penetrationsverhalten mit dem der größeren (222 nm) PS-Partikel, so fällt auf, dass ein deutlich höherer Anteil (25,8%) der Haarfollikel eine Partikelpenetration bis ins tiefe Infundibulum aufweist und nur bei relativ wenigen HF Partikel im Bereich der mittleren Epidermis (10,6 %) bzw. am Übergang Epidermis/Dermis (13,6 %) anzutreffen sind. Zudem weist nach 4 Stunden Inkubation ein deutlich höherer Anteil (50,1 % vs. 39,6 %) der HF keine Penetration auf (s. Abb. 11).

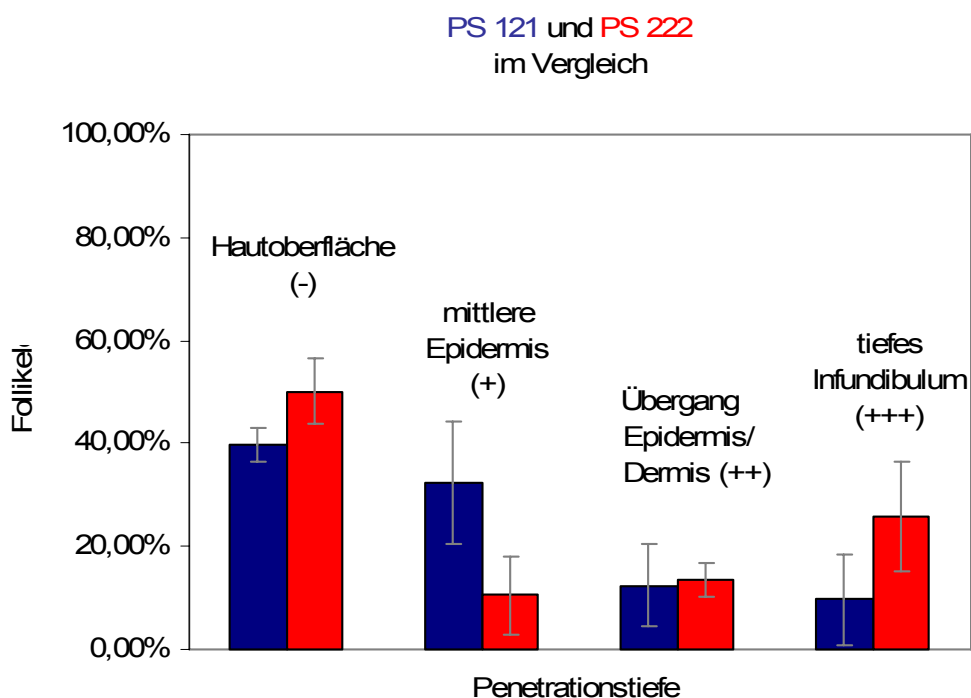


Abb. 11: Penetrationsverhalten der 121 nm und 222 nm PS-Partikel im Vergleich. Es wird deutlich, dass bei 222 nm großen Partikeln (rot) ein weit höherer Anteil der HF eine Penetration bis ins tiefe Infundibulum aufweist u. gleichzeitig ein relativ hoher Anteil der HF mit Partikeln auf der Epidermisoberfläche verbleibt.

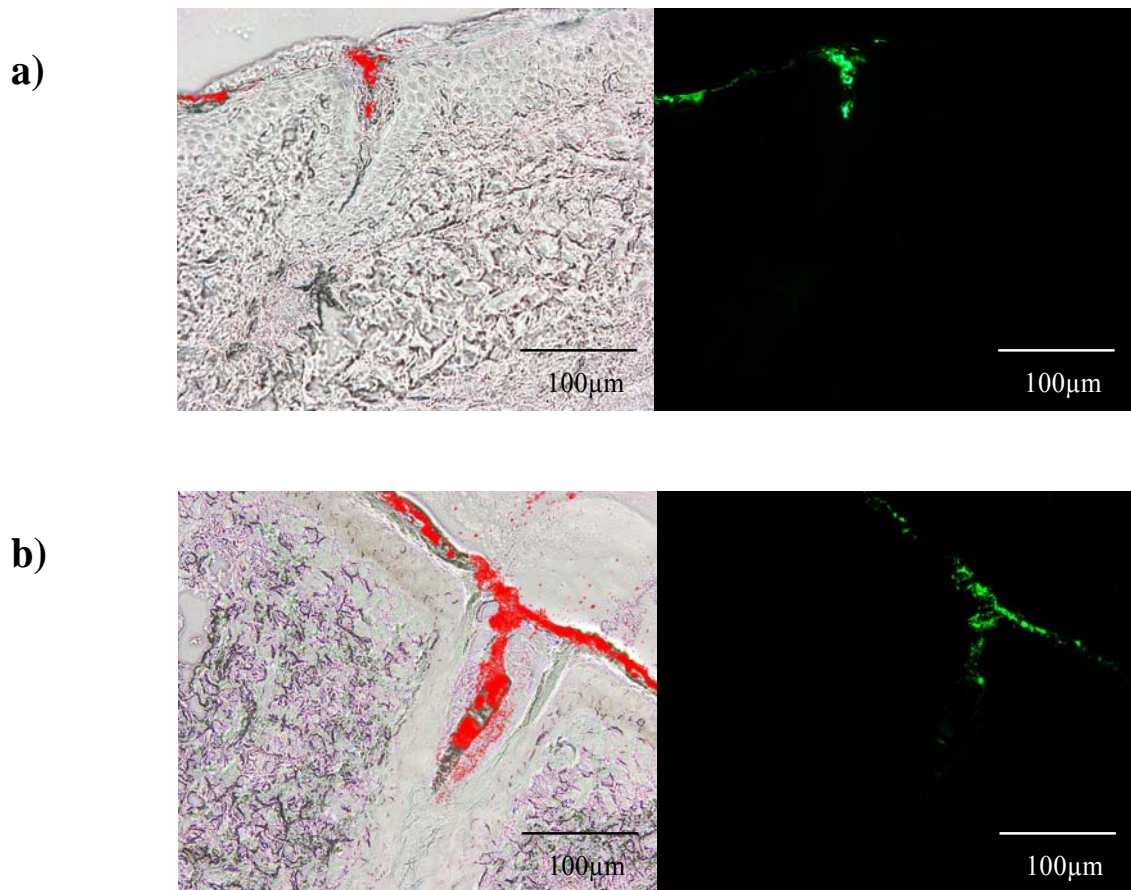


Abb. 12 a u. b zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Haarfollikeln im Längsschnitt. Es wurden Bilder in Overlay-Technik von identischen Arealen angefertigt und übereinander gelegt (links). Fluoreszenz-Bilder, in denen der eingekapselte Fluoreszenzfarbstoff FITC grün leuchtet, sind rechts zu erkennen. Die Abbildungen zeigen beispielhaft das Vordringen der 121 nm (a) und 222 nm (b) PS-Partikel bis in das tiefe Infundibulum.

Vergleicht man das Penetrationsverhalten der beiden an das p24-Antigen gekoppelten PS-Partikel (123_p24 u. 241_p24) untereinander, so zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den unbeschichteten Partikeln (vergl. Abb. 10). In etwa 50 % der untersuchten Follikel ließ sich eine Partikelpenetration nachweisen. Die Prozentzahlen der HF, die eine Partikelpenetration bis in die mittlere Epidermis (+), den Übergang Epidermis/Dermis (++) und bis in das tiefe Infundibulum (+++) aufweisen, schwanken in engen Grenzen zwischen 12,9 % und 19,0 % (s. Abb.13)

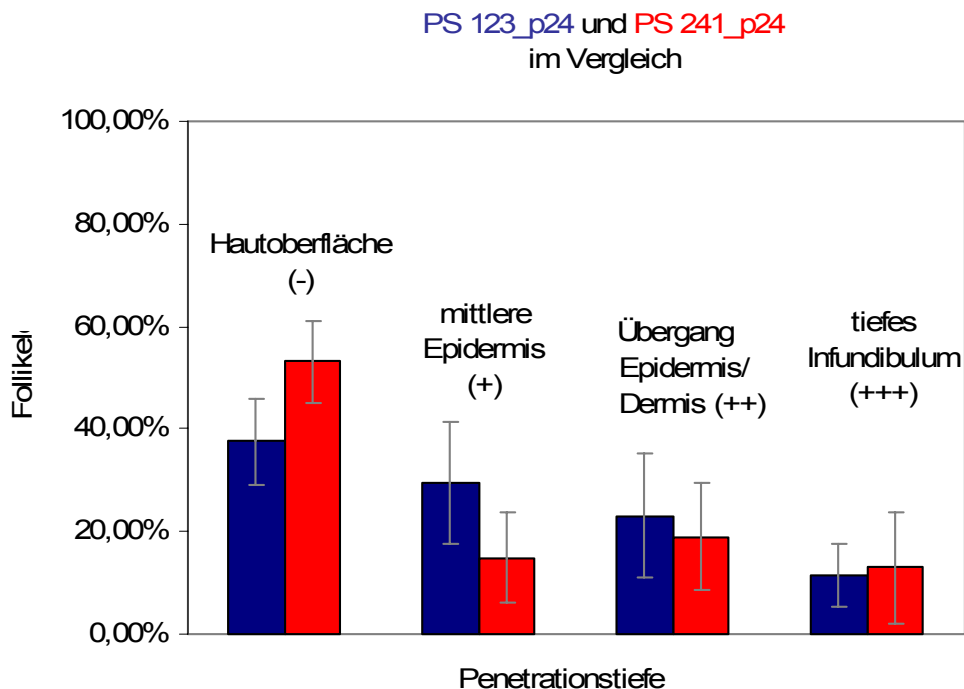
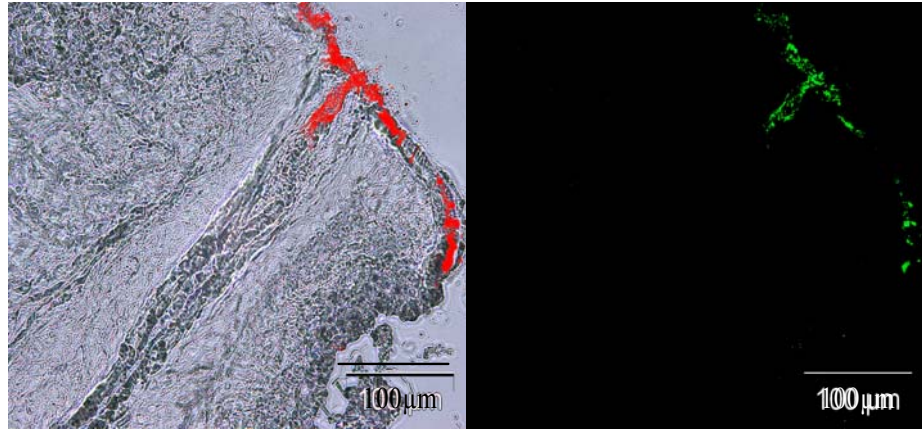


Abb. 13: Penetration von Antigen-gekoppelten PS-Partikeln (123_p24 u. 241_p24) im Vergleich. Die Eindringtiefe der Partikel in HF ist weitgehend identisch mit unbeschichteten PS-Partikeln (vergl. Abb. 11). Bei den >200nm Partikeln weist ein höherer Anteil der HF (53,1 % im Gegensatz zu 37,6 %) keine folliculäre Penetration auf (Partikel verbleiben auf der Oberfläche).

a)



b)

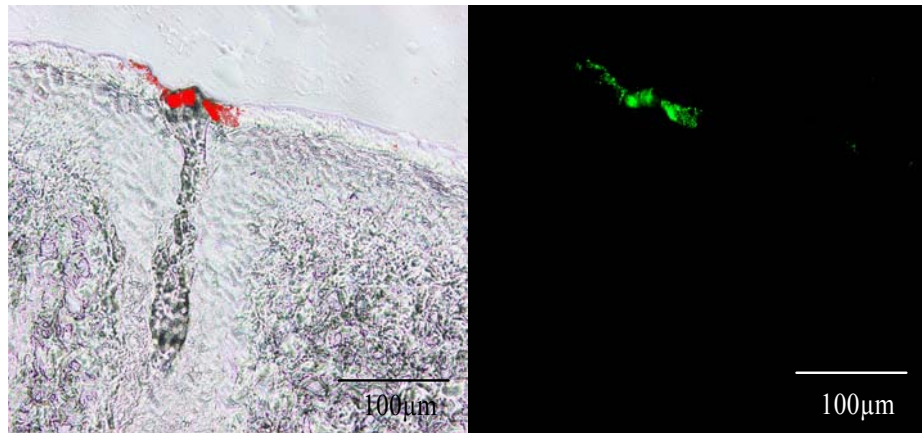


Abb. 14 a und b zeigen Haarfollikel nach 4-stündiger Inkubation mit PS 123_p24 (a) und PS 241_p24 (b). Die Abb. (a) zeigt beispielhaft Partikel, die bis zum Übergang Epidermis/Dermis vordringen und Abb. (b) im Gegensatz dazu Partikel, die auf der Hautoberfläche lokalisiert sind und nicht in den Haarbalg eindringen.

Polylactidacid-Partikel

Es wurden verschiedene Größen unbeschichteter sowie beschichteter, bioabbaubarer PLA-Partikel über vier Stunden inkubiert.

Mit einem 5-fachen Tape-Stripping wurden die überschüssigen Partikelreste entfernt und die Proben für die Kryoschnitte vorbereitet. Nach dem Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Präparate nach derselben Methode, wie für PS-Partikel beschrieben, ausgewertet und in die vier oben genannten Kategorien unterteilt.

Es wurden vier verschiedene Partikeltypen (PLA 157, PLA 167_p24, PLA 202, PLA 230_p24) untersucht und die folliculäre Penetration im Hinblick auf die Kopplung mit dem p24-Antigen graphisch in Säulendiagrammen miteinander verglichen.

Alle Experimente wurden pro Partikeltyp mit zwei unterschiedlichen Gesichtshautproben durchgeführt und es wurden jeweils 40-60 Haarfollikel ausgewertet.

Bei der Auswertung der < 200 nm PLA-Partikel (PLA 157 und 167_p24) fiel ein inhomogeneres Verteilungsmuster und eine Tendenz zur Agglomeration der Partikel auf. Dies war besonders auf der Hautoberfläche zu beobachten, was die Auswertung dieses Partikeltyps in diesem Areal erschwerte und zu einer höheren Standardabweichung führte.

Die vergleichende Bewertung des Penetrationsverhaltens macht deutlich, dass PLA 157 und PLA 167_p24-Partikel in etwa 50-60 % der folliculären Kanäle penetrieren.

Im Bereich der Übergangszone Epidermis/Dermis erwies sich die Penetrationstiefe der beiden Partikeltypen mit 20,6 % bzw. 17,1 % der HF als weitgehend vergleichbar.

Gleiches trifft auch für das tiefe Infundibulum zu, wo sich für beide Partikeltypen ein nahezu identisches Penetrations- und Verteilungsmuster mit 19,3 % bzw. 19,9 % der HF nachweisen lässt. Einzig beim Vergleich der mittleren Penetration war die Differenz von 9,4 % (PLA 157) im Gegensatz zu 24,8 % (PLA 167_p24) deutlich unterschiedlich ausgeprägt (s. Abb.15).

PLA 157 und PLA 167_p24
im Vergleich

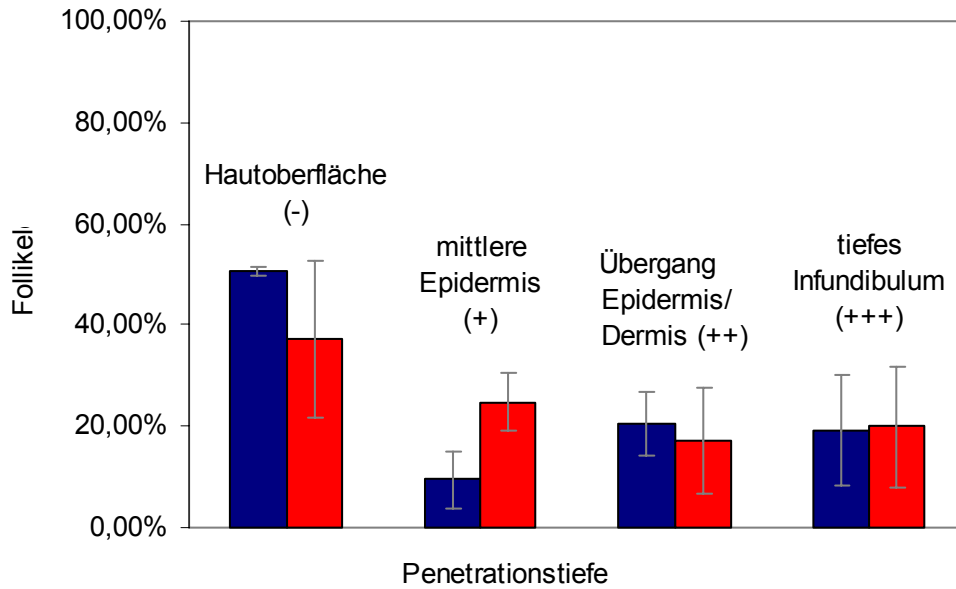


Abb. 15: Unterschiedliches Verteilungsmuster applizierter PLA-Partikel im Vergleich. Im Gegensatz zu PLA 157 weisen beschichtete Partikel (PLA 167_p24) insbesondere im Bereich der mittleren Epidermis eine hohe Penetrationsrate auf. Bei beiden Partikeltypen lässt sich eine prozentual hohe tiefe Penetration in etwa 20 % der HF finden.

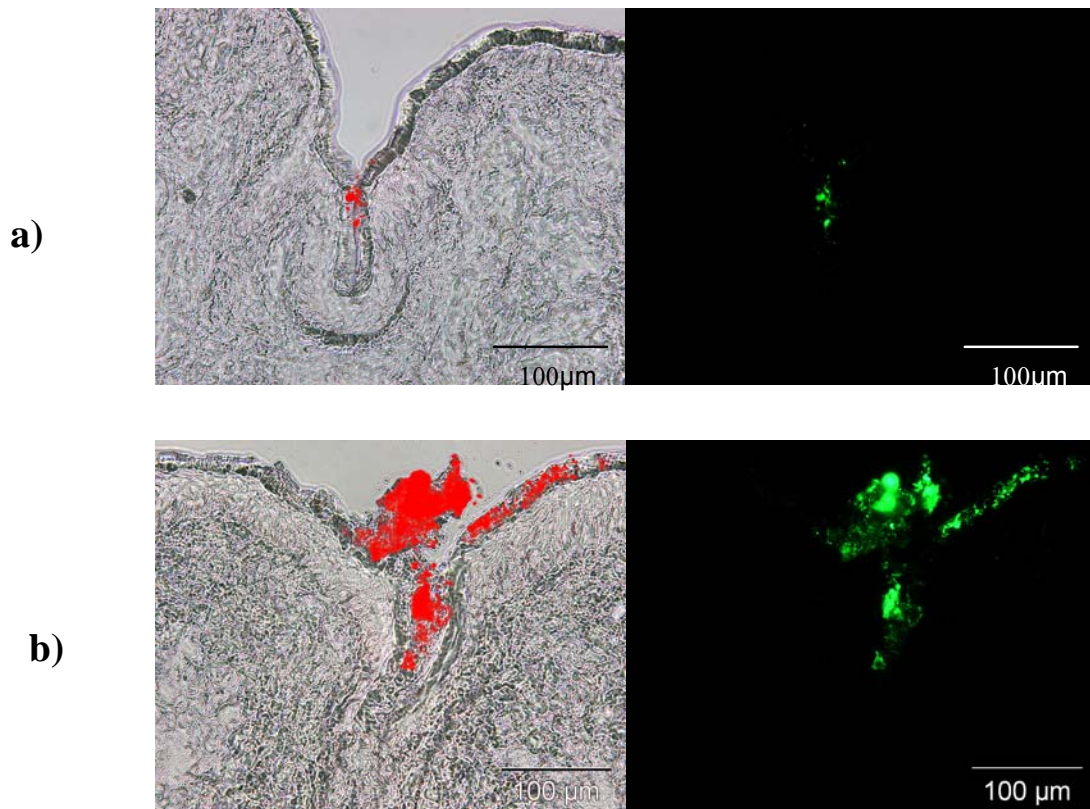


Abb. 16 a u. b: Overlay- und Fluoreszenz-Bilder von identischen Haarfollikeln. Dargestellt ist eine a) mittlere (+) bzw. b) tiefe (+++) Penetration. a) Man erkennt eine deutliche Aggregatbildung bei unbeschichteten Partikeln (PLA 157).

Die Auswertung des Penetrationsverhaltens von > 200 nm PLA-Partikel mit und ohne Protein (PLA 202, PLA 230_p24) führte zu folgenden Ergebnissen:

Eine tiefe Penetration erfolgte bei den unbeladenen PLA-Partikeln der Größe 202 nm in ca. 20,9 % der Haarfollikel. Ähnliche Werte mit 25,5 % ergeben sich für die etwas größeren, mit p24-Antigen gekoppelten (PLA 230_p24) Partikel.

Was die Penetration der Partikel in die mittlere Epidermis und den Übergang Epidermis/Dermis angeht, so weisen die ausgewerteten Daten auch hier geringe Penetrationsunterschiede auf und bewegen sich zwischen 11,8 % bzw. 16,6 % sowie zwischen 10,0 % bzw. 9,5 %.

Der prozentuale Anteil an Haarfollikeln, bei denen keine Penetration erfolgte, liegt hingegen im Bereich von 56,4 % bzw. 48,4 %.

Eine Aggregatbildung der PLA-Partikel konnte bei diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Die nachfolgende Abbildung 17 gibt einen Überblick über die >200 nm großen beschichteten und unbeschichteten PLA-Partikel.

PLA 202 und PLA 230_p24
im Vergleich

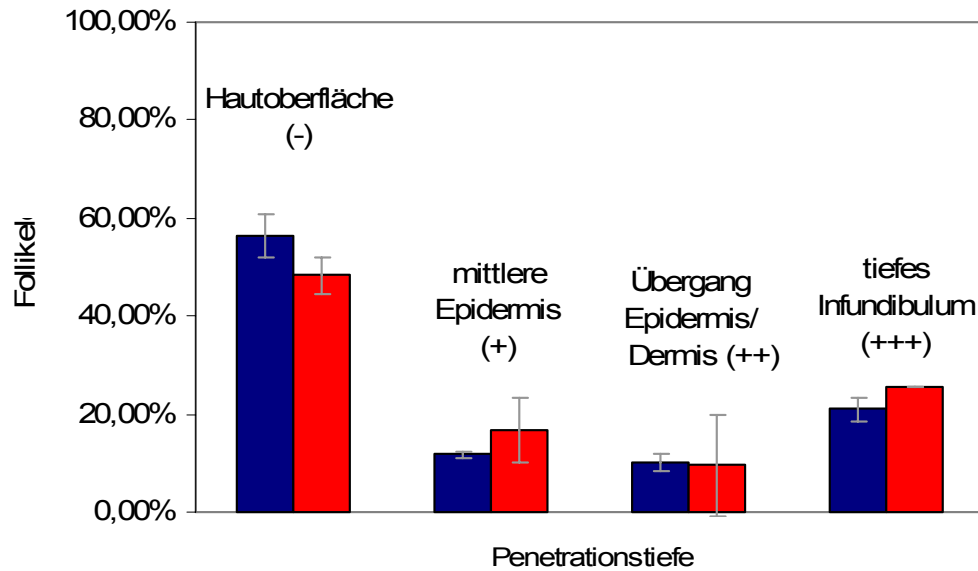


Abb. 17: Das Diagramm der größeren PLA-Partikel ist weitgehend mit dem der PS-Partikel identisch (Abb. 11,13). Auch hier zeigt sich, dass in etwa ein Viertel der HF positiv für eine tiefe Penetration ist und ein größerer Anteil der Haarfollikel (50-60 %) keine Penetration vorweist. Die Partikel, die das p24-Antigen auf der Oberfläche tragen (PLA 230_p24), unterscheiden sich in ihrem Penetrationsverhalten nur geringfügig von den unbeschichteten Partikeln (PLA 202).

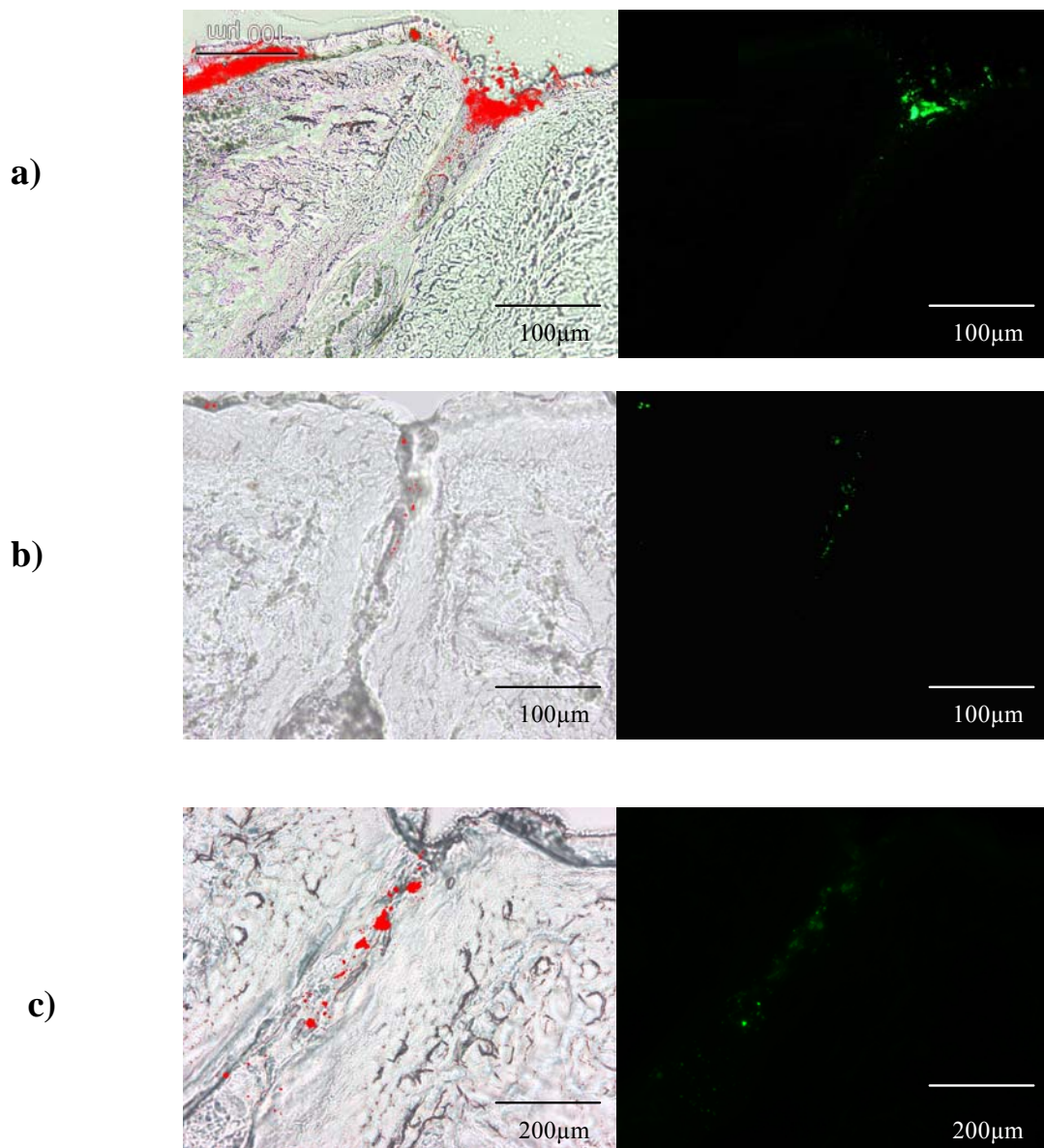


Abb. 18 a, b, c: Beispiele für das Penetrationsverhalten von PLA-Partikel. $>200\text{nm}$
 Man erkennt deutlich die charakteristische tiefe Penetration der PLA-Partikel sowohl in
 der Overlay, wie auch in der Fluoreszenz-Technik.

Nachfolgend (s. Abb.19) findet sich ein zusammenfassender Überblick über die folliculäre Penetration aller transepidermal applizierten Partikeltypen. Es fällt auf, dass sowohl PS- als auch PLA-Partikel nach 4-stündiger Inkubation auf exzidierter Haut in etwa 50-70 % der untersuchten Haarfollikel eindringen. Die PS- und PLA-Partikel mit Größen > 200 nm weisen die tiefste folliculäre Penetration auf (20-25 %), während die Partikel < 200nm vermehrt in der mittleren Epidermis bzw. am Übergang Epidermis/Dermis sichtbar sind.

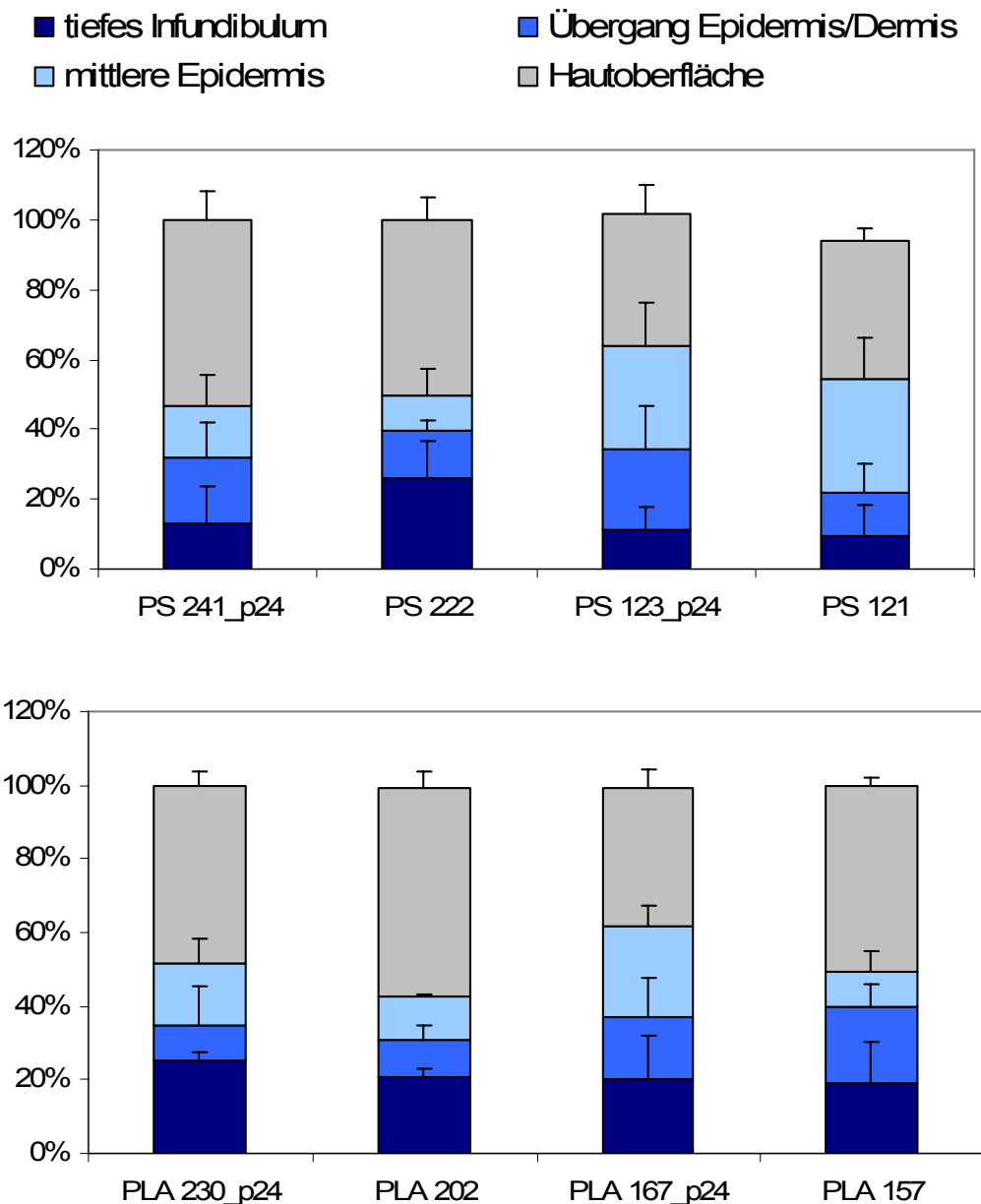


Abb. 19: Zusammenfassende Diagramme der Partikelpenetration von PS- und PLA-Partikeln. Bei allen Partikeltypen lässt sich eine folliculäre Penetration nachweisen. Besonders bei den Partikeln > 200 nm fällt eine besonders tiefe Penetration auf.

3.2 Aufnahme von PS-Partikeln in Zellkulturen

Für die später durchgeführten Aufnahmeuntersuchungen an exzidiierter humaner Haut nach transkutaner Applikation von Partikeln (s. 3.3), wurden zunächst „in-vitro“-Vorversuche mit frisch isolierten (MACS-Separation) Langerhanszellen und Keratinozyten durchgeführt.

Folgende Partikelproben (PS 121, PLA 157, PS 222, PS 241_p24, PLA 202, PLA 230_p24) wurden dabei zusammen mit einer Negativkontrolle (0,1 % PBS) zu den frisch isolierten Zellen gegeben und je zwei Stunden bei 37°C „in-vitro“ inkubiert.

Dieser, dem eigentlichen Test vorgeschaltete Versuchsschritt diente als Positiv-Kontrolle für die nachfolgenden Versuche mit topisch applizierten Partikeln auf exzidiierter Haut und zeigte erwartungsgemäß eine deutliche Partikelaufnahme durch die isolierten LZ und KZ.

Die anschließende Analyse am Durchflusszytometer ergab die zu erwartende starke Verschiebung der Partikelproben im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 20 a u. b).

Die unterschiedlichen Zelltypen wurden nachfolgend mit Hilfe des Fluoreszenz und Nativ-Filters mikroskopiert.

Dabei ließ sich eine starke Akkumulation der Partikel im intrazellulären Bereich der Zellen sichtbar machen und bestätigte somit die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse.

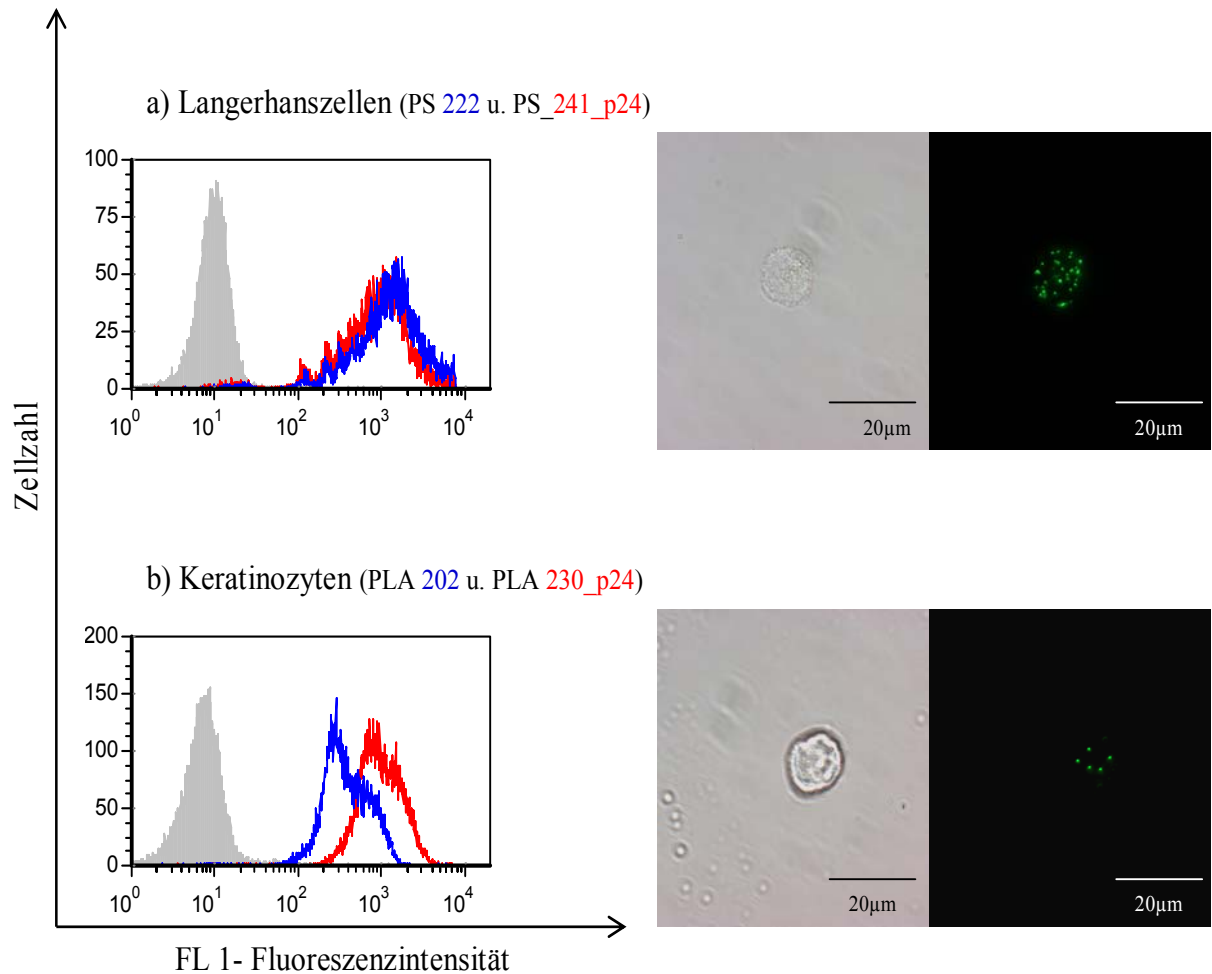


Abb. 20 a u. b: Beispielhafte Histogramme von LZ (a) u. KZ (b) nach zweistündiger „in-vitro“-Inkubation mit unterschiedlichen Partikeltypen. Gegenüber der Kontrollprobe (grau) zeigen die jeweiligen Proben (blau u. rot) eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität, was eine Partikelaufnahme durch die Zellen ausdrückt. Die Nativ-Aufnahmen zeigen frisch isolierte LZ (a) und KZ (b), in deren Zytoplasma sich in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (NIBA-Filter) zahlreiche Partikel finden.

3.3 Aufnahmeuntersuchungen an LZ nach transkutaner Partikelpenetration

Für Untersuchungen zur Partikelaufnahme durch LZ nach topischer Applikation, wurde Bauchhaut verwendet, die im Rahmen plastischer Operationen gewonnen wurde.

Vor der 16-stündigen Inkubation der Haut mit den jeweiligen Proben wurden mittels eines CSSS die Haarfollikel geöffnet, Zelldebris entfernt und das Stratum corneum partiell entfernt.

Nach der Inkubationszeit wurde ein 5-faches Tape-Stripping durchgeführt, um eine artifizielle Verschleppung der Partikel während der Bearbeitung der Hautexzidate zu vermeiden.

Anschließend wurden die Zellen nach dem Prinzip der MACS-Separation isoliert, mit CD1a-APC markiert und die Partikelaufnahme anhand des Durchflusszytometers gemessen.

Alle Versuche wurden dreimal an der Haut unterschiedlicher Spender wiederholt (n=3) und der prozentuale Anteil der LZ die Partikel internalisiert hatten durch die positiven Wolken in Dot-Plot-Diagrammen (s. Abb. 20 und 21) dokumentiert.

Folgende Partikeltypen und Konzentrationen wurden dabei für die Aufnahmeexperimente an LZ und KZ verwendet (s. Tab. 5).

Tab. 5:

Partikeltyp	Konzentration	Versuche	CSSS
PS 121	0,1 %	n=3	1 CSSS
PS 123_p24	0,1 %	n=3	1 CSSS
PS 222	0,1 %	n=3	1 CSSS
PS 241_p24	0,1%	N=3	1 CSSS

3.3.1 > 200 nm (+/-p24) PS-Partikel

Die Analyse am Durchflusszytometer zeigte eine deutliche LZ-Population, die einer positiven Partikelaufnahme entspricht. Die jeweiligen Mittelwerte aus den drei Aufnahmeexperimenten ergaben für die unbeschichteten (PS 222) Proben eine prozentuale Aufnahme bei

1,2 % (+/- 0,5 %) der LZ, die sich nicht wesentlich von den Aufnahmewerten der beschichteten Partikel (PS 241_p24) unterscheidet (1,1 % (+/- 0,2 %)), (s. Abb. 21).

Die dargestellten Dot-Plot-Diagramme dokumentieren die drei Aufnahmeuntersuchungen an Langerhanszellen. Die Wolke im linken oberen Quadranten stellt die LZ-Population dar (CD1a-positiv), die keine Fluoreszenzintensität aufweist (FL1-negativ) und somit auch keine Partikel internalisiert hat. Die Wolke im rechten oberen Quadranten stellt eine doppelt-positive LZ-Population dar, die Partikel aufgenommen hat (FL1-positiv und FL4-positiv).

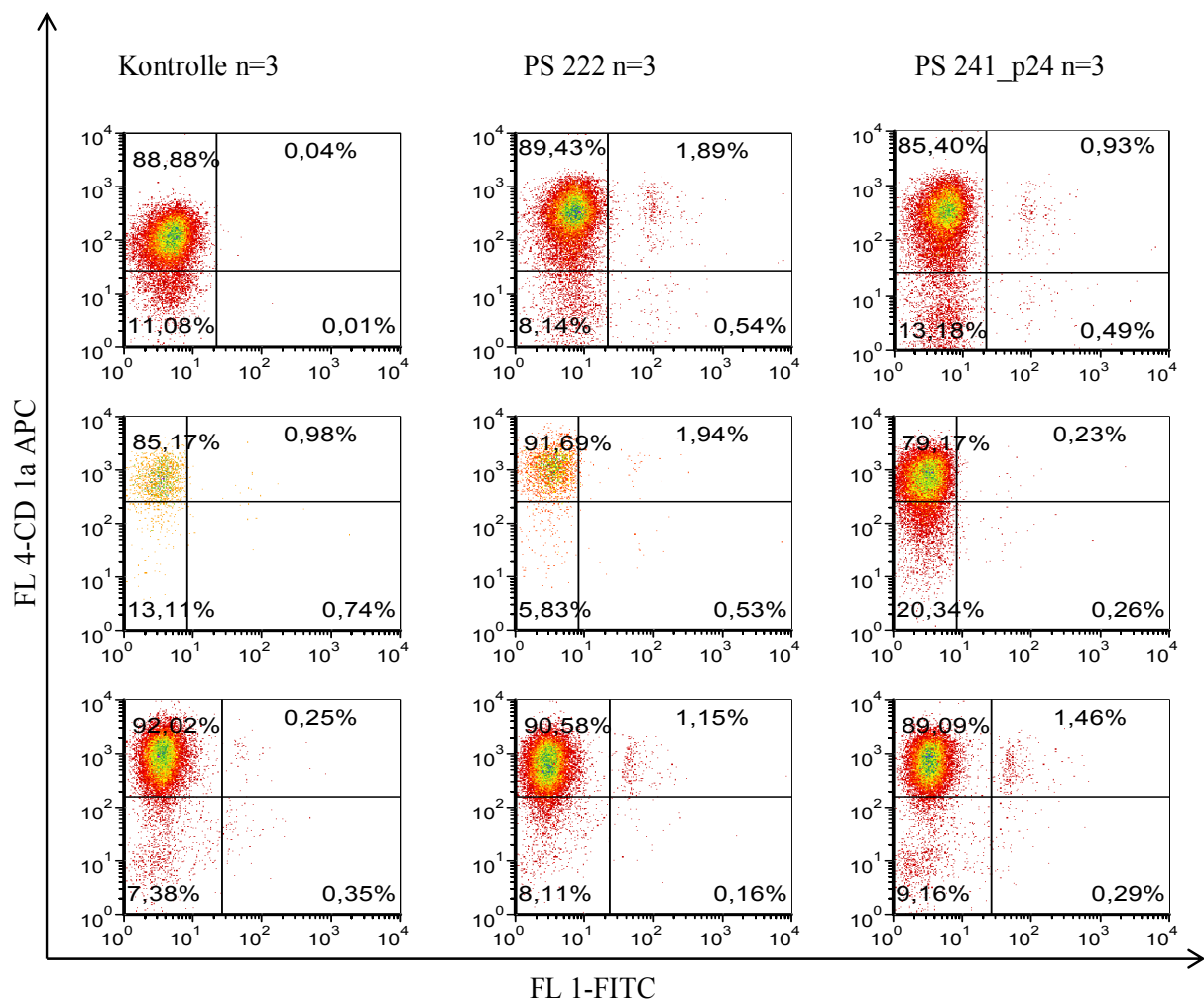


Abb. 21: Dargestellt sind drei durchgeführte Experimente als Dot-Plot Diagramme mit den Achsen FL1 (FITC=Partikel) und FL4 (APC=CD1a). Die Wolke im rechten oberen Quadranten entspricht dabei dem jeweiligen Prozentsatz der LZ, der transepidermal applizierte Partikel, aufgenommen hat. Die Mittelwerte aus drei Aufnahmeexperimenten liegen zwischen 1,2 % (PS 222) und 1,1 % (PS 241_p24).

3.3.2 < 200 nm (+/-p24) PS-Partikel

Bei den <200 nm Polystyrol-Partikeln kam es zu einer deutlich höheren prozentualen Zellzahl, die eine Partikelinternalisation aufwies. Der aus den drei Aufnahmeuntersuchungen (n=3) resultierende statistische Mittelwert der positiven Zellen fällt bei den unbeschichteten PS 121 nm Partikeln mit 3,4 % (+/-0,6 %) gegenüber den Antigen-beschichteten (PS 123_p24) mit 1,9 % (+/-0,5 %) besonders deutlich aus (s. Abb. 22).

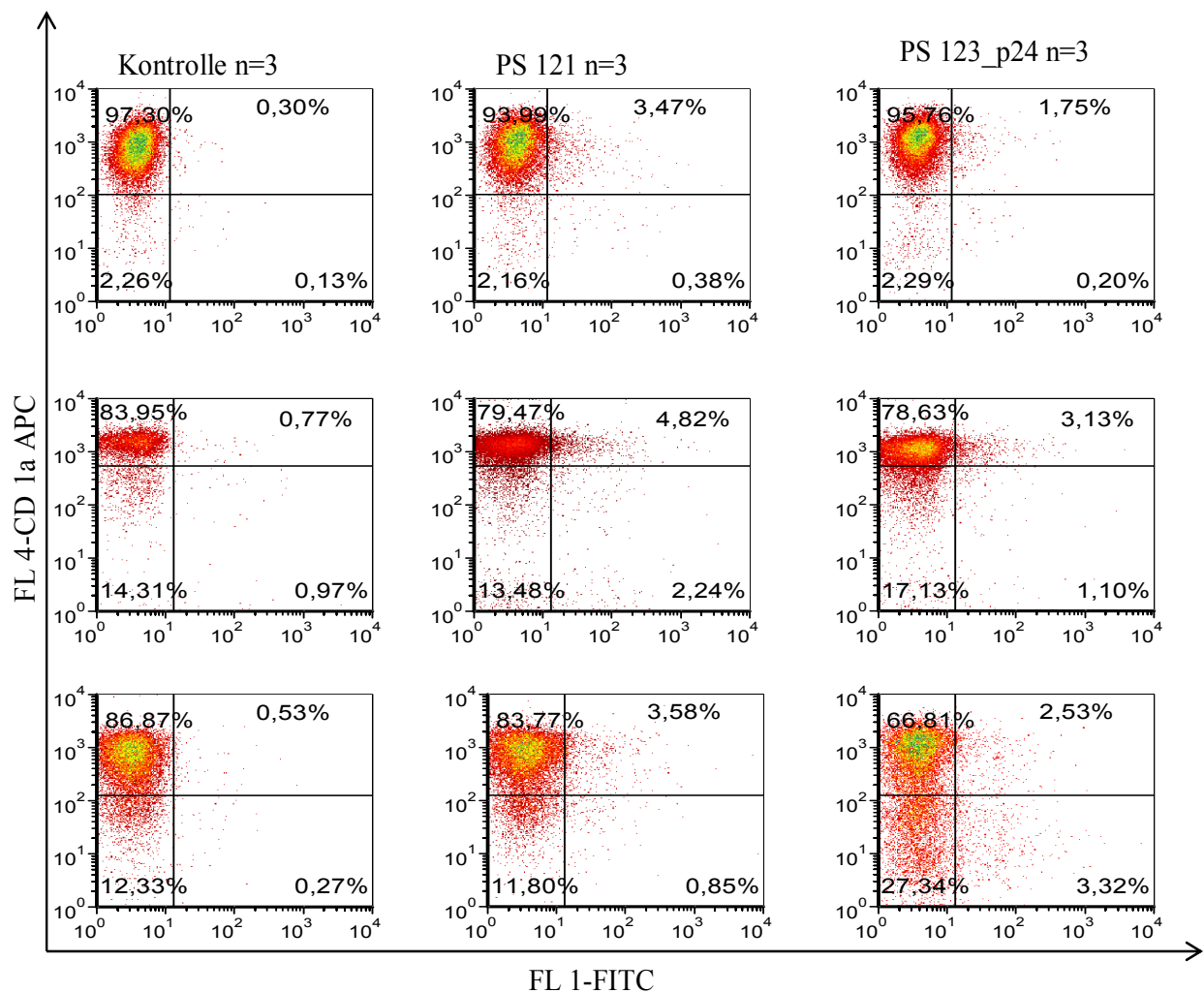


Abb. 22: Die Abbildung zeigt drei an Bauchhaut durchgeführte Experimente als Dot-Plot-Diagramme. Die doppelt positive Wolke im rechten oberen Quadranten stellt die Partikelpositiven LZ dar. Die höchsten prozentualen Aufnahmewerte der LZ ergaben sich dabei für die unbeschichteten Partikel (PS 121) mit 3,4 % (Mittelwert aus n=3).

Abbildung 23 gibt einen vergleichenden Überblick über die Partikelaufnahme durch LZ an exzidiierter humaner Haut.

Es fällt auf, dass eine Größenabhängigkeit bezüglich des Aufnahmeverhaltens besteht. Nanopartikel <200 nm werden von einer nahezu doppelt so hohen Prozentzahl der LZ aufgenommen wie >200 nm große Partikel.

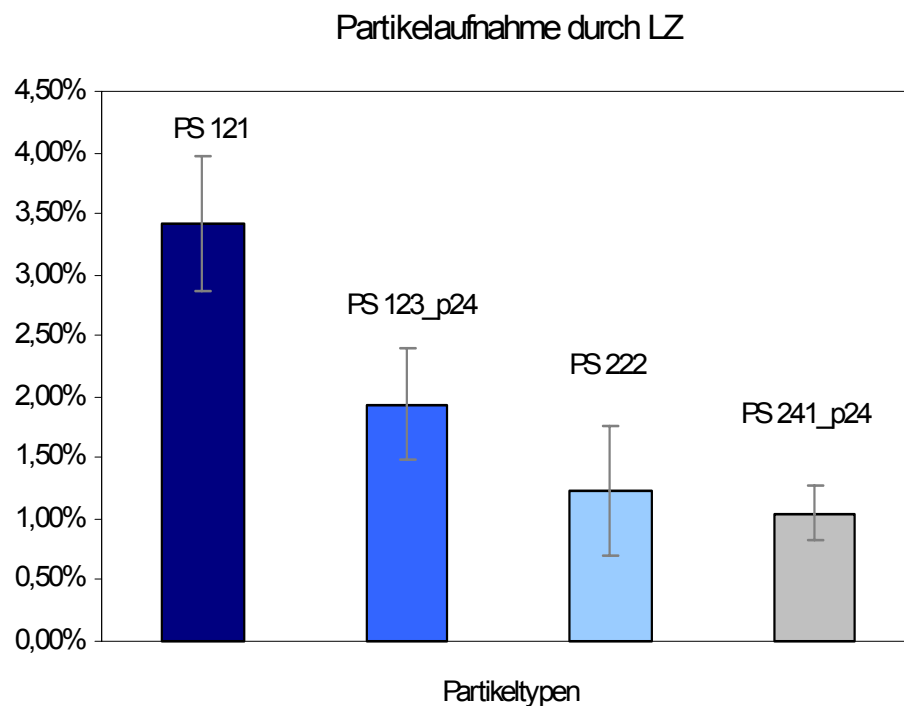


Abb. 23: PS-Partikel <200 nm (PS 121 u. PS 123_p24) werden von deutlich mehr LZ aufgenommen als >200 nm große (PS 222 u. PS 241_p24), unabhängig davon ob es sich um unbeschichtete oder beschichtete (p24-Antigen) Nanopartikel handelt.

Zum Vergleich verschiedener Partikeltypen und Vervollständigung der Untersuchungen wurden auch Aufnahmeuntersuchungen an LZ nach transkutaner Applikation von PLA-Partikeln an exzidiierter Haut durchgeführt. Dabei handelt es sich um beschichtete, wie auch unbeschichtete, < 200 nm bzw. > 200 nm großen PLA-Partikeltypen (PLA 157, PLA 167_p24, PLA 230_p24). Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie in 3.3 beschrieben (Inkubationszeit 16h, n=1) Im Vergleich zu den Versuchen mit PS-Partikeln (s. 3.3.1, 3.3.2) finden sich in den dargestellten Dot-Plot-Diagrammen keine signifikanten positiven Wolken.

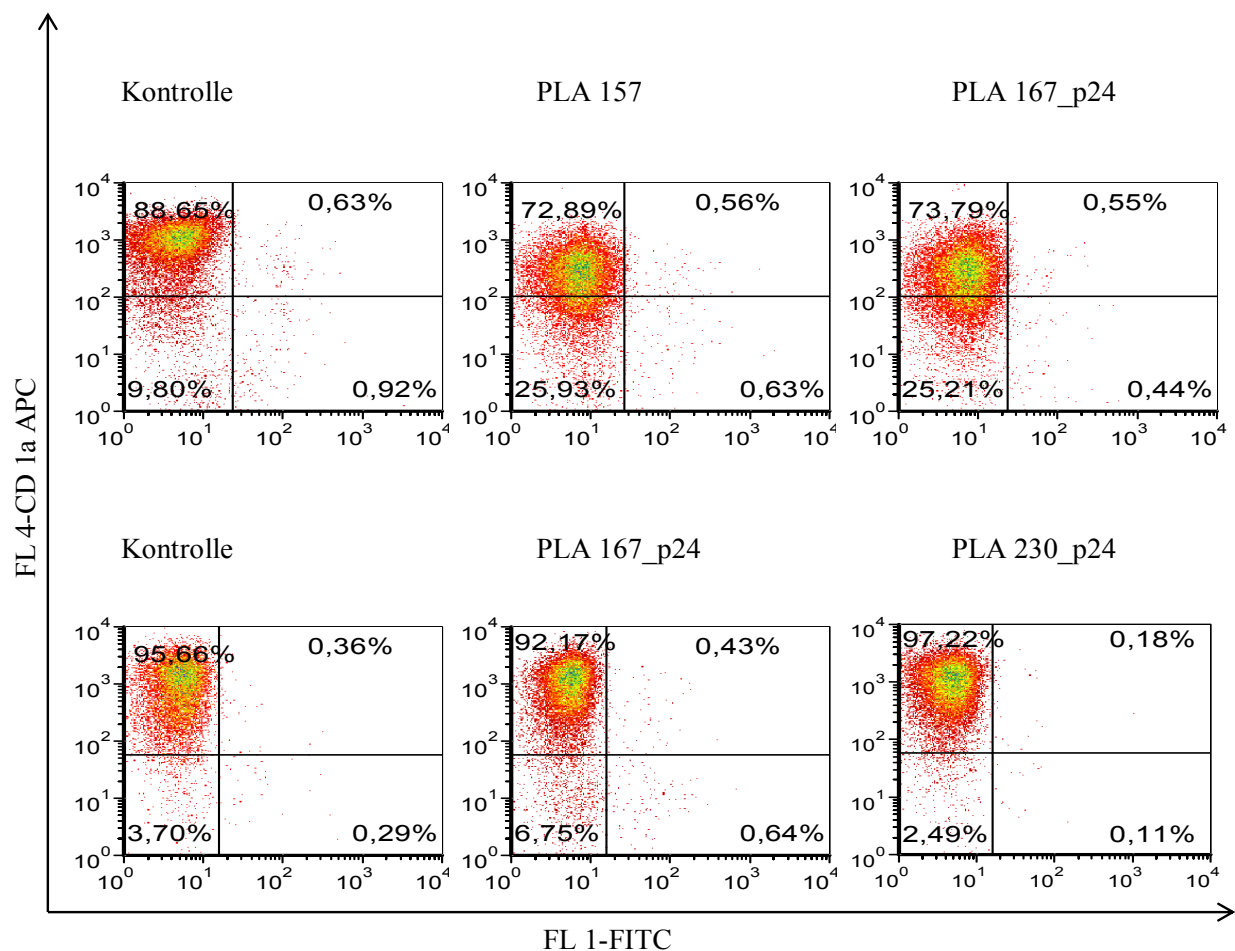


Abb. 24: Zusammenfassend zeigte sich nach Inkubation der Haut mit unterschiedlichen PLA-Partikeltypen keine signifikante Internalisation der PLA-Partikel durch epidermale LZ. Im Gegensatz dazu wurden die > 200 nm bzw. < 200 nm PS-Partikel von den LZ deutlich aufgenommen (s. Abb. 21, 22).

3.4 Aufnahmeuntersuchungen an KZ nach transkutane Partikelpenetration

Für diese Untersuchungen wurden Keratinozyten aus der Bauchhaut unterschiedlicher Spender (n=3) nach topischer Applikation der Partikel isoliert. Die Hautexzidate wurden 16 Stunden mit unterschiedlichen Partikelsuspensionen (s. Tab. 5) inkubiert und anschließend separiert.

Um das Aufnahmeverhalten der Keratinozyten mit dem der Langerhanszellen zu vergleichen wurden identische Partikeltypen verwendet. Die Aufnahme der Partikel wurde mittels der FACS-Analyse gemessen und anhand von zweidimensionalen Dot-Plot-Diagrammen dokumentiert.

3.4.1 > 200 nm (+/-p24) PS-Partikel

Die Mittelwerte aller drei Experimente ergeben bei den PS 222 nm Partikeln eine geringe prozentuale Aufnahme in 0,8 % (+/- 0,4 %) der KZ und bei den Antigen-beladenen PS-Partikeln in 0,9 % (+/- 0,3 %) der KZ. Daraus ergibt sich auch hier, ähnlich wie bei LZ eine bevorzugte Aufnahme der Partikel <200 nm (s. Abb. 25).

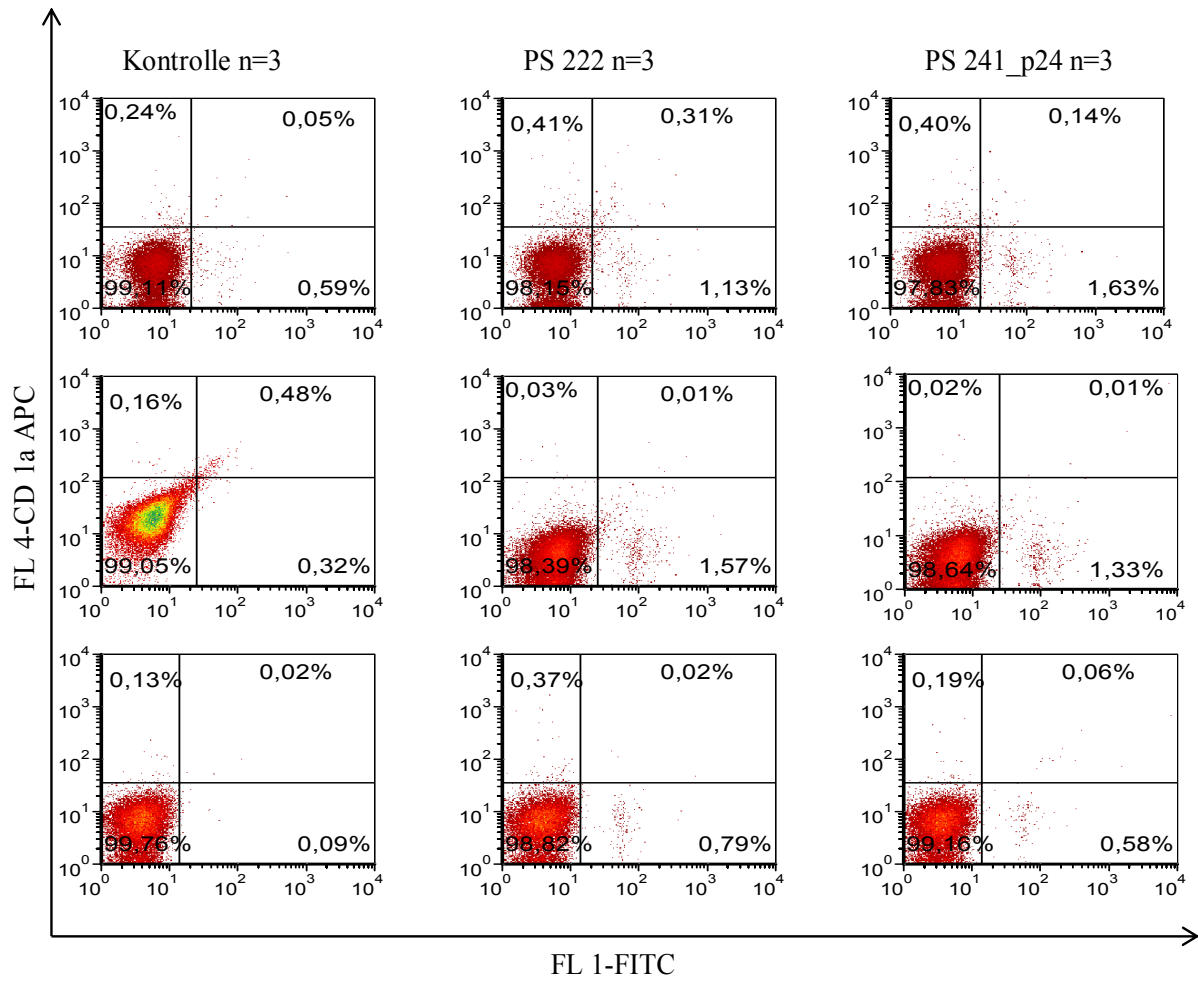


Abb. 25 zeigt die durchgeführten Versuche zum Aufnahmeverhalten von Keratinozyten an exzidiierter Bauchhaut nach Applikation Antigen-beladener und unbeladener Partikel. Die Wolke im rechten unteren Quadranten entspricht dabei dem jeweiligen Prozentsatz der KZ, die Partikel aufgenommen haben.

3.4.2 < 200 nm (+/-p24) PS-Partikel

Die prozentuale Aufnahme der Partikel mit einer Größe <200 nm durch Keratinozyten fällt im Vergleich zu den zuvor untersuchten >200 nm Partikeln (s.o.) deutlich höher aus.

Die Mittelwerte aus allen Versuchen liegen bei 2,3% (+/- 1,0 %) der „Partikel-positiven“ KZ bei unbeladenen bzw. 2,1 % (+/- 1,6 %) der KZ bei Antigen-beladenen Partikeln.

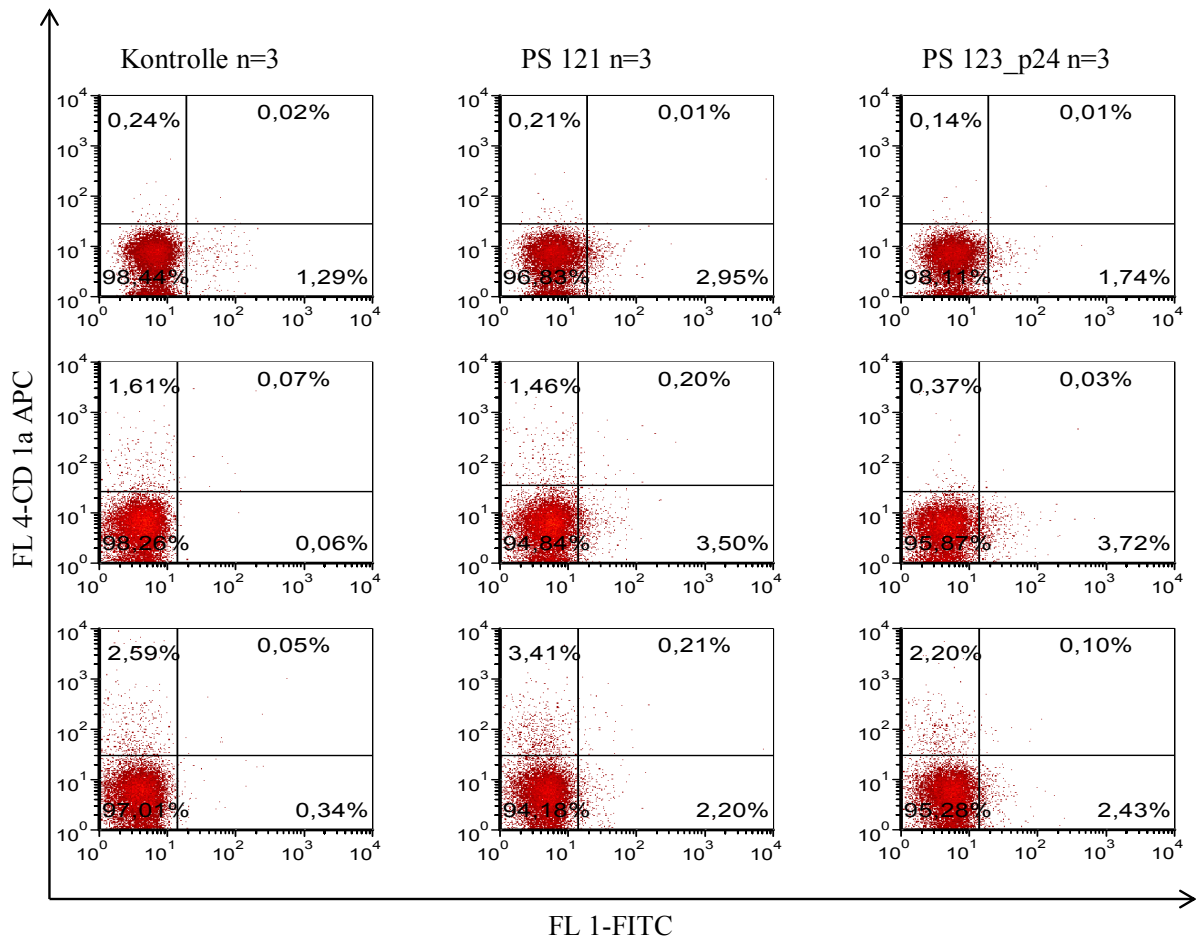


Abb. 26: FACS-Analyse dreier Aufnahmeexperimente an Keratinozyten nach 16-stündiger Partikelinkubation auf exzidierter Haut. Ähnlich wie bei Langerhanszellen werden auch von Keratinozyten <200 nm Partikel vermehrt aufgenommen, die prozentualen Aufnahmewerte sind jedoch im Vergleich zu LZ deutlich geringer (vergl. Abb. 22).

3.5 Aktivierungsuntersuchungen an LZ nach transkutaner Partikelpenetration

Für Aktivierungsuntersuchungen an Langerhanszellen wurde Bauch- und Brusthaut von sechs unterschiedlichen Spendern verarbeitet. Als Positivkontrolle für die FACS-Analyse diente ein 16 cm² großes Hautstück, das mit einer TNF-alpha-Lösung behandelt wurde. Dazu wurden nach einem CSSS 320 µl einer TNF-alpha-Lösung aufgetragen und mit einer Pricknadel in die Haut eingebracht. Auf die anderen Exzidate wurde die jeweilige Partikelsuspension (s. Tab. 6) bzw. PBS (Negativkontrolle) aufgetragen.

Bei den Aktivierungsversuchen wurden dementsprechend eine Positivkontrolle (TNF-alpha), eine Negativkontrolle (PBS) und eine Partikelprobe gleichermaßen 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Langerhanszellen durch die MACS-Separation weiter aufgereinigt und mit anti-Human CD80 bzw. anti-Human CD83 markiert, um nachfolgend die Aktivierung messen zu können.

Folgende Partikeltypen und Konzentrationen wurden für die Aktivierungsexperimente an LZ und KZ verwendet. Beide Partikeltypen tragen das p24-Antigen. Bei allen Proben wurde der Mittelwert, die Mean Fluorescence Intensity (MFI), aus drei bzw. vier Experimenten berechnet.

Tab. 6: Partikeltypen für die Aktivierungsuntersuchungen

Partikeltyp	Konzentration	Versuche	CSSS
PS 255_p24	0,1 %	n=3 (CD83), n=4 (CD80)	1 CSSS
PLA 215_p24	0,1 %	n=3 (CD83), n=3 (CD80)	1 CSSS
TNF-alpha	50mg/ml	n=3 (CD83), n=4 (CD80)	1 CSSS

Die Aktivierungsuntersuchungen, die mit Hilfe des Markers CD80 ausgewertet wurden, führten zu folgenden Ergebnissen:

Mit PLA 215_p24 inkubierte Proben zeigten die höchste Aktivierung mit einem Mittelwert-MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität) von 6,4 (+/-1,8) im Vergleich zur Kontrollprobe, die einen MFI von 4,9 (+/-1,1) aufweist.

Daraufhin folgen die mit TNF-alpha behandelten LZ, bei denen sich eine mittlere Fluoreszenzintensität von 6,1 (+/- 0,6) ergibt, die sich aus den vier durchgeführten Versuchsreihen errechnet.

Die geringste Aktivierung, gemessen durch den Marker CD80 wurde durch die Applikation von p24-beschichteten PS-Partikeln (MFI von 5,5 (+/-1,5)) erreicht.

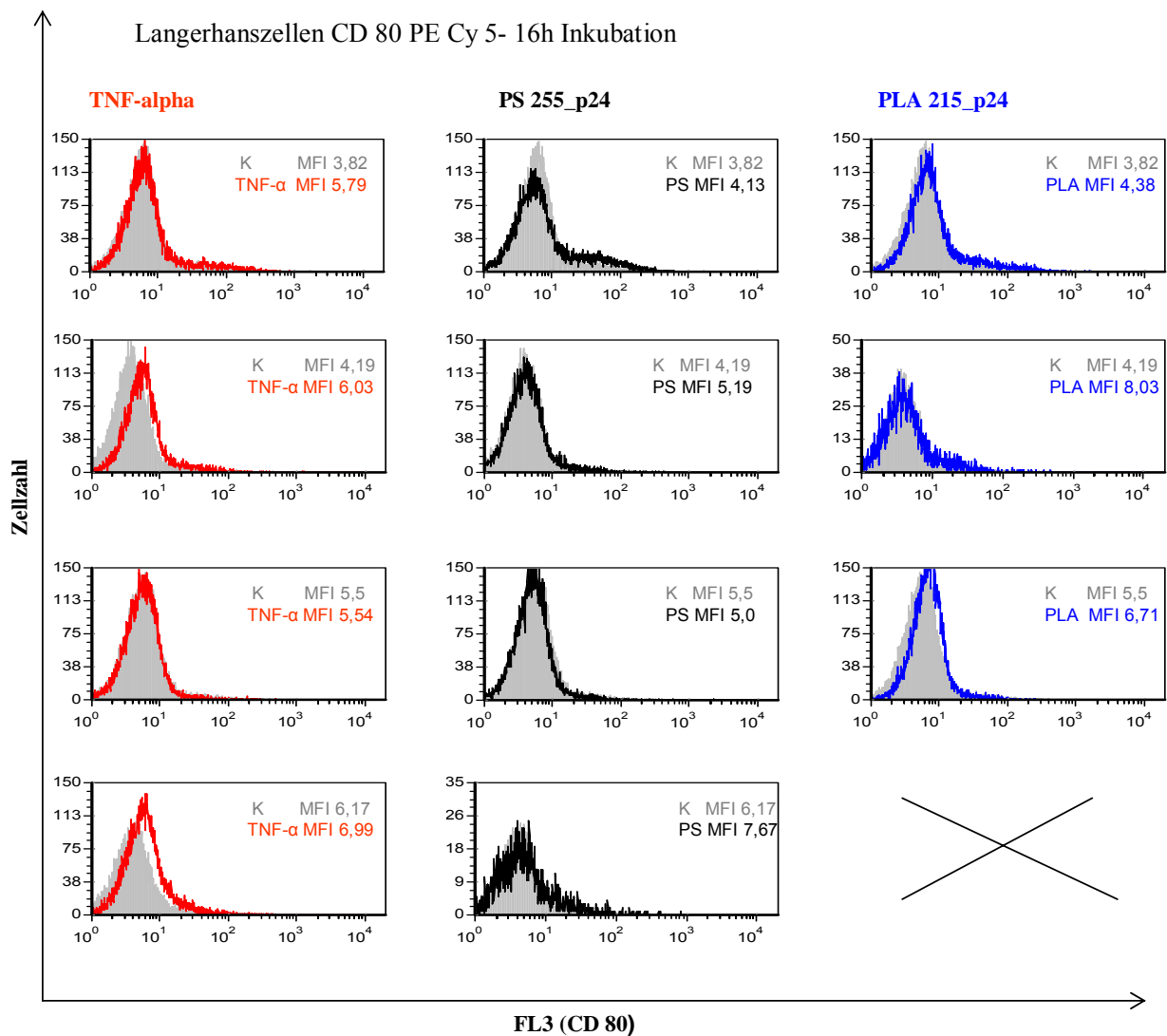


Abb. 27: Die Abbildung zeigt drei durchgeführte Versuche in Histogrammen. Auf der Ordinate ist die Zellzahl und auf der Abszisse der CD80-Antikörper dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollprobe (K, grau) lässt sich die stärkste Aktivierung der Langerhanszellen durch die MFI der PLA 215_p24 (blau) und TNF-alpha-Proben (rot) erkennen.

Zur Bestätigung der mit CD80 erhaltenen Ergebnisse wurde zusätzlich noch eine Versuchsreihe mit einem zweiten Aktivierungsmarker (CD83) durchgeführt. Auch hier wurden für jeden Versuch die MFI errechnet und mit der jeweiligen Kontrollprobe verglichen (s. Abb. 28). Die stärkste Aktivierung der Langerhanszellen ergab sich durch das Pricken mit der TNF-alpha-Lösung sowie durch die p24-beschichteten PLA-Partikel. Die Polystyrol-Partikel (255_p24) lassen, wie auch mit dem CD80-Antikörper gezeigt, eine Aktivierung im Vergleich zur Kontrollprobe (s. MFI) erkennen, in einem Experiment wurde keine LZ-Antwort induziert.

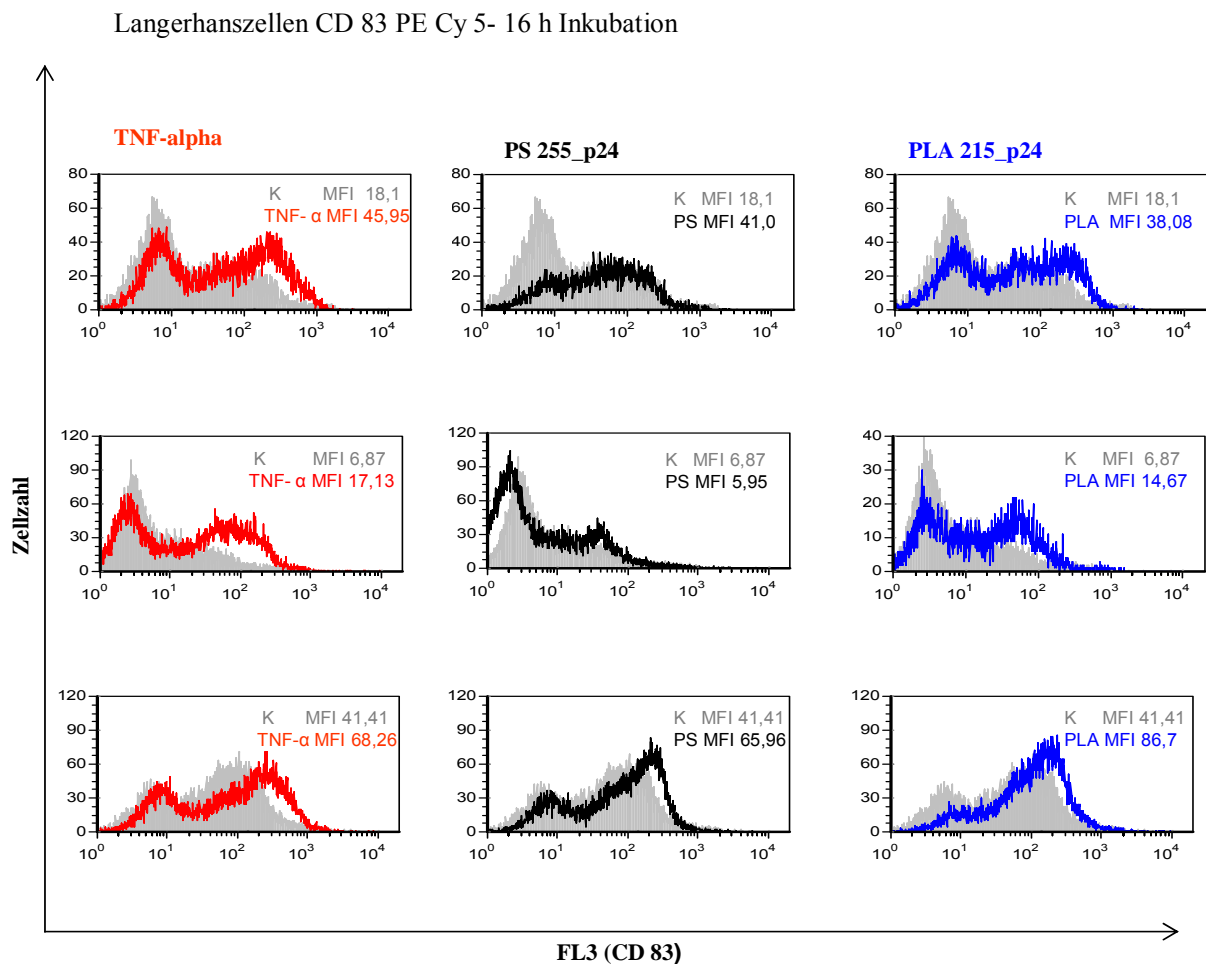


Abb. 28: Im Vergleich zur Kontrollprobe (grau) lässt sich auch hier eine deutliche Aktivierung der Langerhanszellen durch die beschichteten PLA-Partikel wie auch durch TNF-alpha erkennen.

Um die Aktivierung der Langerhanszellen durch den CD83-Antikörper deutlicher zu veranschaulichen wurde die Aktivierung der Langerhanszellen auch in prozentualer Abhängigkeit am Durchflusszytometer gemessen. Hier zeigt sich eine erwartungsgemäß deutliche Grundaktivierung der Kontrollprobe (1 CSSS), die zwischen 19,7 % - 61,3 % schwankt. Aus den Hautexzidaten, die mit TNF-alpha gepriekt wurden (Positiv-Kontrolle), wurden Langerhanszellen isoliert, die eine zur Kontrollprobe stark erhöhte Aktivität aufwiesen. Beispielsweise wurde bei den ersten beiden Versuchen eine fast doppelt so hohe Anzahl aktivierter Zellen erfasst.

Auch die mit PLA 215_p24 behandelten Proben zeigen eine erhöhte Aktivität der LZ im Vergleich zur Kontrollprobe. Dies steht im Einklang sowohl mit den in Abb. 28 gezeigten Histogrammen sowie den Ergebnissen, die mit dem CD80-Antikörper gemessen wurden (s. Abb. 27). Dort zeigt sich eine erhöhte Aktivierung der LZ sowohl durch TNF-alpha als auch PLA 215_p24. Ähnlich sind auch die Ergebnisse mit den p24-beschichteten Polystyrol-Partikeln. Diese zeigen hingegen nur eine sehr leichte Aktivierung, wenn man alle Experimente und die Kontrollprobe in Betracht zieht (s. Tab. 7).

CD 83	Kontrolle PBS (0,1%) Grundaktivierung%	PLA 215_p24 Aktivierung %	PS 255_p24 Aktivierung %	TNF-alpha Aktivierung %
n1	34,77%	58,19%	55,74%	58,88%
n2	19,65%	24,15%	45,04%	50,58%
n3	61,31%	80,30 %	70,18 %	66,67%

Tab. 7: Prozentuale Darstellung der Aktivierungsmessung an LZ (CD83): Die höchste prozentuale Aktivität der LZ ergab sich durch die Applikation von TNF-alpha (Positiv-Kontrolle). Vergleichbare Werte ließen sich mit PLA 215_p24 erreichen (bezogen auf Mittelwerte aus drei Experimenten).

Die nachfolgenden Abbildungen 29 a) und b) zeigen eine Zusammenfassung der Aktivitätsmessungen an LZ mit beiden Aktivierungsmarkern (CD80 und CD83). Es ergibt sich wie oben beschrieben eine deutliche Stimulation der LZ vor allem durch PLA 215_p24 und TNF alpha.

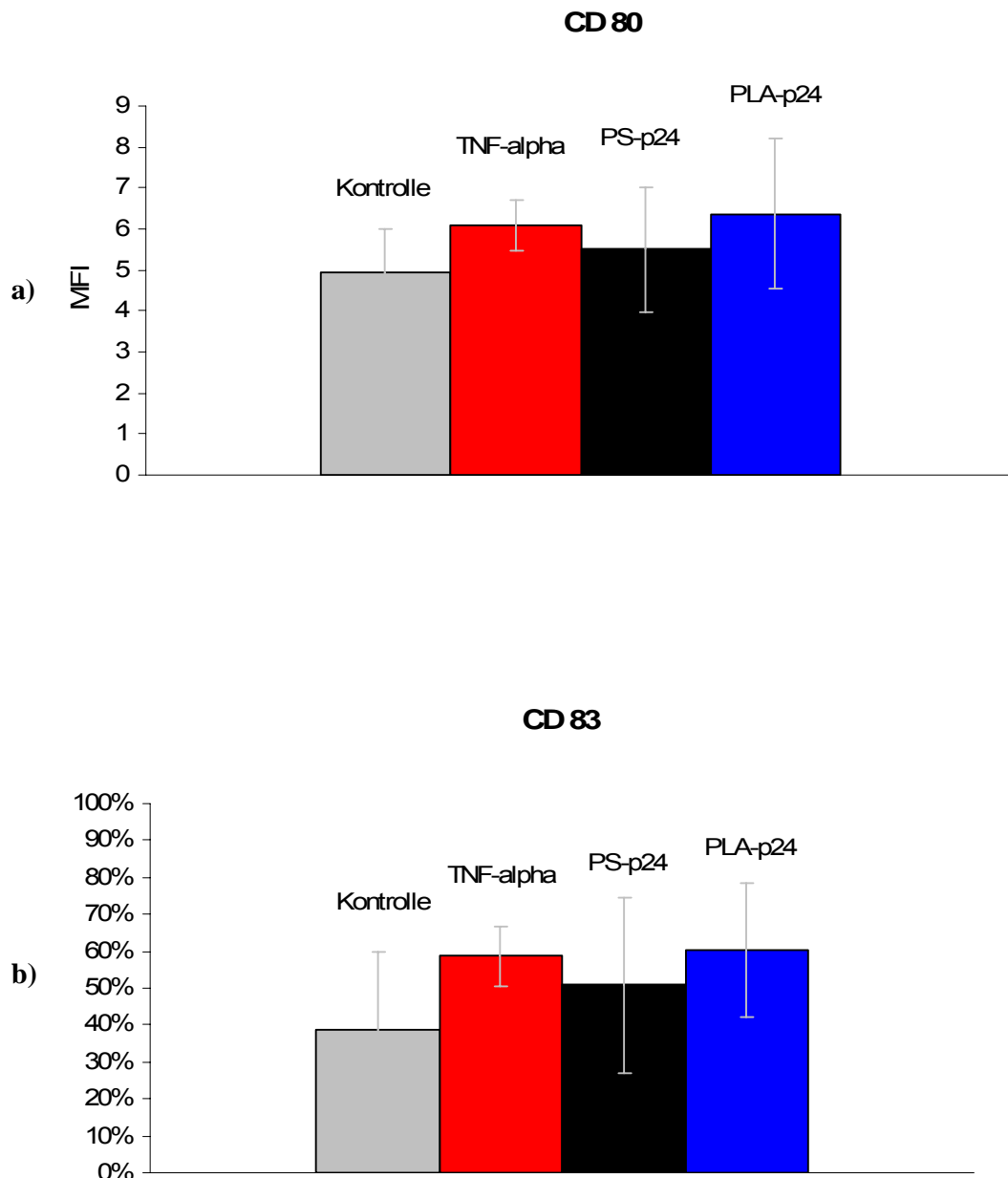


Abb. 29 a) u. b): Dargestellt sind Aktivierungsmessungen an LZ nach transepidermaler Applikation verschiedener Partikeltypen auf exzidierter humaner Haut (Inkubationszeit 16h, 1 CSSS). Es zeigt sich, dass die Proben die mit PLA-p24 sowie TNF-alpha behandelt wurden die höchste Aktivierung zeigen, sowohl bei Markierung mit CD80 (a) als auch mit CD83 (b).

4. Diskussion

Dank intensiver Forschungsaktivitäten der zurückliegenden Jahre besteht heute weitgehend Konsens darüber, dass Nanopartikel geeignete Trägersysteme für den transepidermalen Wirkstofftransport darstellen. Da hierbei u.a. deutlich wurde, dass Nanopartikel den Penetrationsweg entlang des Haarfollikels präferieren und dort gezielt akkumulieren, [117], [126], [127], [128] wurde im ersten Teil der vorliegenden Studie zunächst das Penetrationsverhalten unterschiedlich großer PLA- und PS-Partikel in Haarfollikeln untersucht. Im zweiten Teil der Dissertation steht die Aufnahme von PS-Partikeln durch Langerhanszellen im Vordergrund, da ihnen als residente Immunzellpopulation auch im Haarfollikel eine besondere Bedeutung im Rahmen der Immunantwort zukommt [44], [126]. Ergänzend dazu wurden im dritten Teil der Untersuchungen Aktivierungsexperimente an LZ nach transepidermaler Applikation von p24-Antigen beschichteten PLA- und PS-Partikeln durchgeführt.

4.1 Follikuläre Partikelpenetration

Die Haut stellt auf Grund des wenig durchlässigen Stratum corneums eine schwierig zu überwindende Barriere für die topische Applikation von Substanzen in Form von Nanopartikeln dar. Mehrere Untersuchungen, die mit Zinkoxid- und Titanium-Partikeln durchgeführt wurden, ergaben, dass diese nur den oberen Teil des Stratum corneums erreichten und nicht durch die Hautbarriere penetrieren konnten [129], [130], [131]. Anatomische Besonderheiten, wie z.B. eine verminderte Schichtenzahl des Stratum corneums, unterschiedliche Keratinisierung [132], sowie eine locker gefügte Matrix lassen eine Penetration entlang des Haarfollikels als vielversprechende Route erscheinen [102]. Diese Überlegung wird auch durch Studien von Mahe et al (2009) unterstützt, die den Haarfollikel als Hauptpenetrationsweg für Nanopartikel mit Durchmesser von 40 nm und 200 nm beschreiben [133]. Gleiches gilt für in vivo-Untersuchungen am Mausmodell von Mattheolabakies et al (2010), die mit 150 nm PLA-Partikeln durchgeführt wurden und eine deutliche follikuläre Penetration nachweisen konnten [134]. Tatsächlich zeigen weitere Untersuchungen, dass topisch applizierte Substanzen in behaarter Haut schneller penetrieren und höhere Konzentrationen erreichen, als in Haut mit reduzierter Follikelzahl oder künstlich abgedichteten Follikeln [103], [135].

Ziel dieser Arbeit war es daher u.a. das folliculäre Penetrationsverhalten zweier chemisch unterschiedlicher Partikeltypen (PS- und PLA-Partikel) zu untersuchen.

PS-Partikel, die als sehr stabile, lipophile Polymere mit einer carboxylierten hydrophilen Oberfläche gelten, dienten bei den vorliegenden Modelluntersuchungen an exzidierter humaner Haut („ex-vivo“) als geeignete Referenzpartikel, um das Penetrationsverhalten entlang der Haarfollikel zu studieren und zu dokumentieren.

PLA-Partikel unterscheiden sich demgegenüber als bioabbaubare Partikel und zählen daher zu den besser geeigneten Impfstoffträgern in vivo [123].

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit lassen bei beiden Partikelarten eine Penetration im Mittel in ca. 50 % aller Haarfollikel erkennen. Die maximale Penetrationstiefe reichte in bis zu 25 % der HF sogar bis in die Tiefe des Infundibulums.

PS-Partikel der Größen 121 nm und 123 nm wiesen die beste folliculäre Penetration aller Partikeltypen auf. Sie drangen in mehr als 60 % aller Follikel ein, während die größeren PS-Partikel (222 nm, 241 nm) in weniger als 50 % intrafollikulär nachweisbar waren. Dies spricht für eine deutliche Größenabhängigkeit der Penetration und steht im Einklang mit Ergebnissen von Vogt et al (2006), die ebenfalls eine höhere Penetrationsrate für 40 nm PS-Partikel im Vergleich zu 750 nm und 1500 nm in Haarfollikeln nachweisen konnten [126].

Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch Toll et al (2004), deren Untersuchungen auf Partikelgrößen zwischen 750 nm und 1500 nm basieren [136].

Die unterschiedlich großen (157 nm bis 240 nm) lipophilen PLA-Partikel akkumulierten vorzugsweise in den Haarfollikeln (45 - 58 %) und zeigten ein ähnliches intrafollikuläres Verteilungsmuster wie PS-Partikel mit einer tiefen infundibulären Penetration in 19 - 25 % der Haarfollikel. Dies steht im Einklang mit früheren Penetrationsstudien, bei denen 228 nm und 365 nm große PLA-Partikel in über 50 % der Haarfollikel penetrierten und in 10 - 22 % der Fälle eine tiefe Penetration bis zur Talgdrüse aufwiesen [117].

Was die prozentuale folliculäre Penetration betrifft, stellt sich die Frage, durch welche strukturellen Besonderheiten sie beeinflusst bzw. verbessert werden kann.

So wird heute vom Konzept der „offenen“ und „geschlossenen“ Haarfollikel ausgegangen [128].

Dies besagt, dass ein Teil der Follikel durch einen Pfropf aus abgestorbenen Korneozyten, Sebum und abgeschilferten Zelldetritus abgedichtet ist,

so dass eine Penetration von topisch applizierten Substanzen nur schwer möglich ist.

Nach kürzlich erhobenen Befunden [103] und nach noch unpublizierten Daten der Arbeitsgruppe Dr. A. Vogt kann davon ausgegangen werden, dass im günstigsten Fall bis zu

74 % aller Follikel „offen“ sind und für eine Penetration von topisch applizierten Substanzen zur Verfügung stehen. Natürlicherweise werden die Haarfollikel durch die Talgproduktion oder das Haarwachstum geöffnet, sie können aber auch artifiziell durch ein Peeling oder mittels eines CSSS aufgebrochen werden [128].

Um die Hautbarriere des Stratum corneums zu unterbrechen und die Penetration über die HF zu verbessern, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die Haut mittels eines CSSS vorbehandelt. Entscheidend ist dabei die Effektivität dieser Maßnahme, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass das abdichtende Material nicht immer gänzlich herausgelöst werden konnte, so dass einzelne Follikel geschlossen blieben.

Hinzu kommt, dass bei Hautexzidaten das Aufnahmevolumen der Haarfollikel durch die fehlende Hautspannung reduziert sein kann [137].

Als weiterer Einflussparameter für die Penetration ist die Zeitabhängigkeit der Penetration zu sehen. Darauf deuten unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. A. Vogt hin, die deutlich machen, dass nach prolongierter 16-stündiger Inkubation weit über 70 % der <200 nm (121 u. 123 nm) wie auch der >200 nm PS-Partikel (222 nm u. 241 nm) eine Penetration aufwiesen. Befunde hierzu wurden auch von Alvarez-Roman et al (2004) publiziert, die für 200 nm große PS-Partikel ein zeitabhängiges Penetrationsverhalten nachweisen konnten [127].

Neben der Inkubationsdauer gilt es bei der Bewertung des Penetrationsverhaltens auch mögliche anatomische Unterschiede bei der eingesetzten Spenderhaut mit einzubeziehen, wodurch sich individuell unterschiedliche Messwerte ergeben können. Hierzu gehören insbesondere Unterschiede in Alter, Geschlecht und in der Hautbeschaffenheit, sowie unterschiedliche Haarfollikeltypen, Verteilungsmuster und Haarfollikeldichte.

Ein wichtiger Aspekt des Penetrationsverhaltens der Partikel lässt sich auf den jeweiligen Haartyp zurückführen. Da Vellushaare einen kleineren Durchmesser im Vergleich zu Intermediärhaaren haben [83] wurde bei Hautpräparaten mit vermehrter Intermediärhaarpräsenz eine deutlich höhere Penetration vor allem zu Gunsten der >200nm großen Partikel sichtbar. Unter diesem Aspekt lässt sich der, im Rahmen dieser Arbeit gefundene deutlich höhere Prozentsatz (19-25 %) für die tiefe Penetration der großen PLA- und PS-Partikel erklären.

4.2 Partikelaufnahme durch LZ nach transepidermaler Applikation

Langerhanszellen der Haut stellen eine spezielle Zellpopulation unreifer Antigen-präsentierender dendritischer Zellen dar, die bis zu 2 % aller epidermalen Zellen ausmachen [21]. Sie sind bevorzugt in den basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis lokalisiert und bei Haarfollikeln in der Ebene des distalen Infundibulums anzutreffen [43].

Weiterhin spielen sie eine Schlüsselrolle in der kutanen Immunantwort, indem sie fremde Antigene aufnehmen, prozessieren, zu den regionalen Lymphknoten migrieren und eine spezielle Immunantwort durch Lymphozytenaktivierung initiieren [65], [138]. Aus diesem Grunde stellen LZ eine attraktive Zielpopulation für die transepidermale Immunisierung mittels Nanopartikeln dar [139]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme transepidermal applizierter Nanopartikel verschiedener Größen und Peptidadsorption (+/-p24) durch Langerhanszellen untersucht. Die Adsorption des p24-Antigens an der Oberfläche der Partikel dient in diesem Falle nicht der methodischen Stabilisierung der Partikel sondern als Wirkstoff.

Die Experimente wurden am etablierten Ex-vivo-Modell, an frisch exzidierte humaner Haut vorgenommen und die Aufnahme nach Isolation und MACS-Separation der LZ mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

In den durchgeführten Versuchsreihen konnte nach 16-stündiger Inkubation der PS-Partikel auf exzidierte Haut erstmals eine Internalisierung aller PS-Partikeltypen (+/-p24, >/< 200nm) durch LZ nachgewiesen werden. Die Aufnahme unterliegt Variationen und zeigt eine deutliche größenabhängige Präferenz. Vorrangig wurden dabei unbeschichtete 121 nm PS-Partikel aufgenommen. Es folgen in absteigender Reihenfolge Partikel mit den Größen 123 nm, 222 nm und 241 nm.

Eine Internalisierung der PLA- Partikel durch LZ konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen von Rancan et al aus dem Jahre 2009 bestätigen diese Ergebnisse.

Es wird davon ausgegangen, dass die PLA-Partikel zwar über den HF penetrieren, durch die Hautbarriere translozieren, aber ihren Farbstoff vor Erreichen der LZ verlieren und aus diesem Grunde nicht mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst werden können. Auch erklärt die Bildung von Konglomeraten möglicherweise warum die PLA-Partikel nach transepidermaler Applikation auf exzidierte Haut nicht internalisiert wurden [117].

Unpublizierte Daten der AG Dr. A. Vogt erhärten diese Theorie mit dem Nachweis des an PLA-Partikel adsorbierten p24-Antigens in den LZ nach transepidermaler Applikation.

Bei den PS- Partikeln hingegen war auffällig, dass Partikel mit Durchmessern von 121 nm-123 nm in nahezu doppelt so hoher Prozentzahl von LZ inkorporiert wurden als die deutlich größeren Partikel (222 nm - 241 nm). Diese größenabhängige Partikelaufnahme steht im Einklang mit den Studien von Vogt et al (2006), die an exzidierte Haut erhoben wurden und mit Ergebnissen von Sahoo et al. (2002), die nachwies, dass die intrazelluläre Aufnahme von Nanopartikeln auch „in-vitro“ größenabhängig erfolgt [126], [140].

Mehrere Forschungsergebnisse, die sich auf einen Vergleich zwischen Mikro- und Nanopartikeln beziehen, kommen ebenfalls zu vergleichbaren Ergebnissen [109], [141], [142]. Diese Studien beruhen allerdings auf systemischer Partikelapplikation, sprechen aber dennoch für eine bevorzugte Aufnahme von Partikel einer Größe <200 nm durch LZ, wie auch in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden konnte.

Als mögliche Gründe für eine reduzierte Aufnahme größerer Partikel wird u.a. angenommen, dass kritische Partikelgrößen („cutoff size“) eine effektive Internalisation negativ beeinflussen können [143], [144].

Des Weiteren wird in Erwägung gezogen, dass physikochemische Partikeleigenschaften sowohl für das Aufnahmeverhalten als auch für die Aufnahmekapazität der Zellen wichtig sind.

So wird in der Literatur beschrieben, dass die Inkorporation von Partikeln durch dendritische Zellen mit zunehmender Hydrophilität der Partikel absinkt [145], was die relativ geringe Aufnahme hydrophiler PS-Partikel erklärlich macht.

Als weitere Einflussparameter sind Variationen in Alter, Geschlecht und Immunstatus der Hautspender zu sehen, da sich daraus u.a. eine erhöhte oder verminderte Anzahl aufnahmebereiter Langerhanszellen ergeben kann.

Hierdurch lassen sich die vor allem an >200 nm PS-Partikeln gemessenen Schwankungsbreiten (0,8 % - 2,5 %) der vorliegenden Untersuchungen erklären.

Als weiterer wichtiger Einflussparameter für die Aufnahme der Partikel durch LZ kann die Follikeldichte der verwendeten Hautexzidate gesehen werden.

Es ist bekannt, dass sich im Bereich des Follikeltrichters die Keratinisierung der auskleidenden Epidermiszellen ändert („epidermal“ zu „tricholemmal“), was mit einer verringerten Schichtung und unterschiedlichen Verhornung einhergeht [146]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Strukturveränderungen im Haarfollikelinfundibulum mit einer verkürzten Penetrationsstrecke und erhöhten Permeabilität einhergehen.

Hierdurch wird erklärbar, warum in Haut mit höherer Follikelanzahl erhöhte Aufnahmezeiten gefunden werden [104]. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei der hier vorliegenden Arbeit (s. Abb. 30 u. 24) durch eine deutlich erhöhte Aufnahmezeit bei der Verwendung von Oberarmhaut (3,5 %) im Vergleich zu Bauchhaut (1,2 %).

Dies steht auch im Einklang mit erhobenen Daten zur Haarfollikeldichte in unterschiedlichen Körperregionen, die für Oberarmhaut eine Dichte von $32/\text{cm}^2$ gegenüber $6/\text{cm}^2$ für Bauchhaut bestimmen konnten [106], [147].

Um die Frage beantworten zu können, ob Langerhanszellen Partikel auch nach der Inkubationszeit, d.h. während der nachfolgenden Bearbeitung aufnehmen, wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten (4 bzw. 16 Stunden) miteinander verglichen.

Da die präparative Aufbereitung der Versuche identisch durchgeführt wird, macht die nachfolgende Abb. 30 deutlich, dass die deutlich vermehrte Partikelaufnahme nicht durch einen präparativen, methodischen Fehler, sondern ausschließlich auf die prolongierte Inkubation zurückgeführt werden kann.

Langerhanszellen

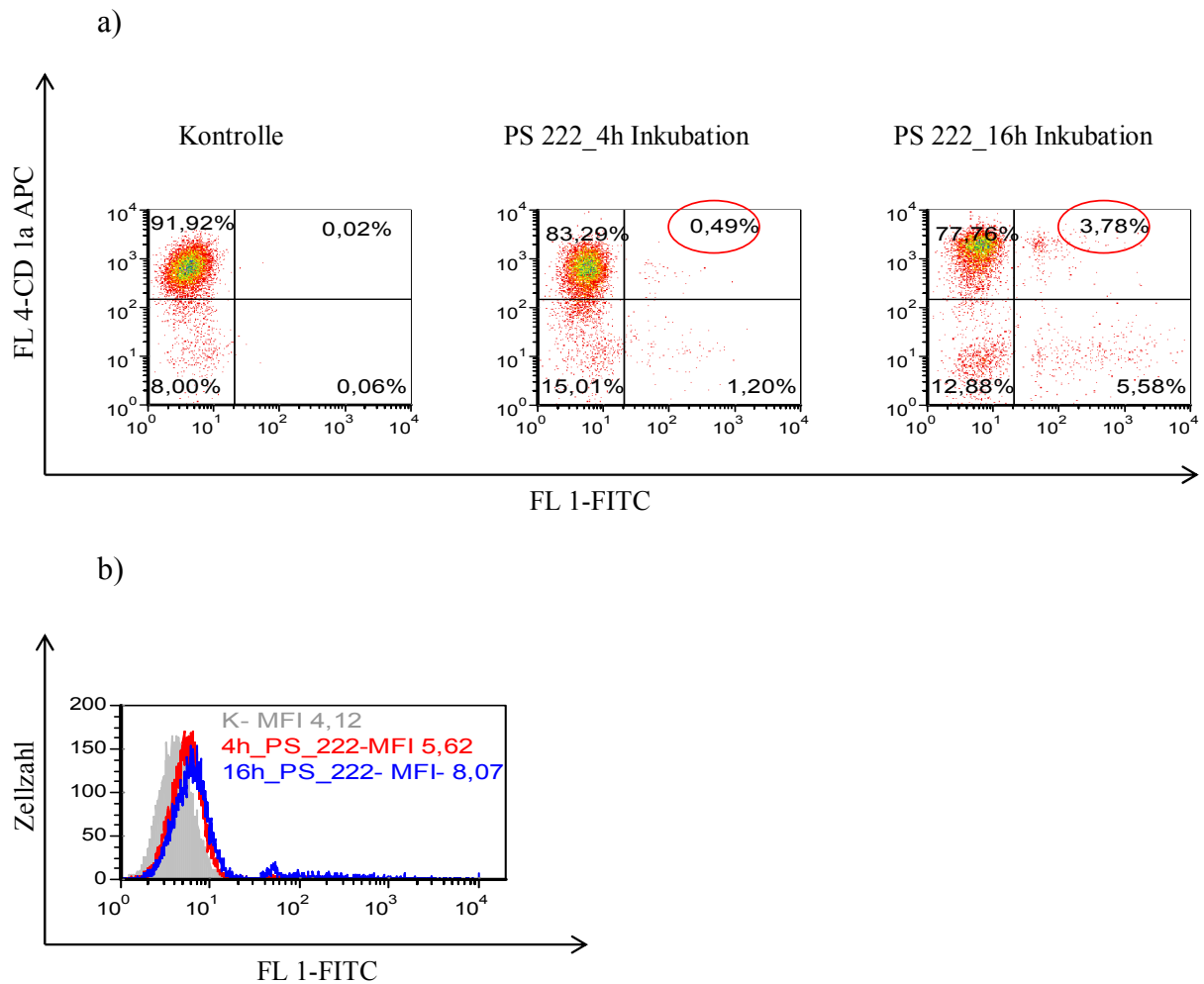


Abb. 30: Abgebildet in Graphik a) sind drei Dot-Plot-Diagramme eines Experimentes an exzidiertem Oberarmhaut mit verschiedenen Inkubationszeiten. Erkennbar ist eine deutliche Aufnahme der PS-Partikel durch LZ nach 16 h Inkubation im Vergleich zu einer Inkubationszeit von nur 4 h. Das zugehörige Histogramm b) stellt eine deutliche Verschiebung der Kurven im Vergleich zur Kontrollprobe dar. Die stärkste MFI und Verschiebung zeigt sich auch hier bei der 16h-Probe.

4.3 Aktivierung von LZ durch Nanopartikel

Nanopartikel werden nicht nur als ein viel versprechendes und wirkungsvolles Antigen-trägersystem gesehen, sondern stellen auch ein effektives Adjuvanz für die nachfolgende Immunantwort dar. Zahlreiche Untersuchungen hierzu belegen, dass Antigene, die an Partikel gebunden sind, im Gegensatz zu freiem Antigen, dendritische Zellen vermehrt aktivieren, deren Antigen-Präsentationskapazität steigern und eine Verstärkung der zytotoxischen T-Zell-Antwort auslösen [148], [149] [150], [151].

Wang et al (2005) konnten darüber hinaus dokumentieren, dass p24-Antigen beschichtete PGA-Partikel zudem eine wichtige Rolle bei der Verstärkung der HIV-spezifischen zellulären Immunantwort spielen [152]. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Lamalle-Bernard et al (2006), die ebenfalls eine erhöhte Immunantwort durch p24-Antigen beladene Nanopartikel auslösen konnten [153]. Diese in der Literatur beschriebenen Aktivierungsexperimente basieren allerdings auf „in-vitro“ bzw. Maus-Modellen.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren bzw. zu ergänzen wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals Aktivierungsversuche an exzidiert humaner Haut (*ex-vivo*) vorgenommen und zwei weitere Partikel eingesetzt, die mit dem p24-Antigen beschichtet sind.

Gerade PLA-Nanopartikel sind aufgrund ihrer guten Eigenschaften als Antigen-träger und Adjuvanz in der Lage, eine hochpotente sowohl zelluläre als auch humorale Immunantwort auszulösen [151].

Zusätzlich zur Antigen-Beladung wurden gezielt große 255 nm PS- und 215 nm PLA-Partikel gewählt, da die Immunantwort bei größerem Durchmesser der Partikel verstärkt abläuft [154], [155] und mit einem erhöhten Antikörper-Titer einhergeht [156].

Die Stimulation der LZ durch die verwendeten Partikel wurde durch den Einsatz zweier Oberflächenmarker (CD80 u. CD83) evaluiert.

Die vermehrte Expression von CD80 weist dabei auf den Grad der Aktivierung hin, während CD83 einen Marker für die Reifung der LZ darstellt [157].

Die erhaltenen Resultate zeigten eine moderate Aktivierung der LZ durch die Partikel, wobei die Aktivierung sowohl bei der Messung mit dem CD80- wie auch dem CD83-Antikörper bei den p24-Antigen-beschichteten PLA-Partikel am deutlichsten ausfällt.

Dies steht im Einklang mit neuen Forschungsergebnissen von Aline et al (2009), die eine Hochexpression von co-stimulatorischen Molekülen, wie z. B. CD40 oder CD80 in dendritischen Zellen nach Immunisierung mit ähnlichen PLA-Partikeln am Mausmodell nachweisen konnten.

Die Immunisierung mit Nanopartikeln oder dem p24-Antigen allein veränderte hingegen kaum die Expression der Aktivierungs- bzw. Oberflächenmarker [151]. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch die Studien von O'Hagan und Singh im Jahre 2003 [158].

Warum die Immunantwort nicht stärker ausfiel, könnte an der niedrigen Penetrationsrate, der Partikel Aufnahme sowie an der applizierten Partikelgröße liegen, da es für eine effektive Immunantwort der LZ den Einsatz von Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 1 μm und 10 μm bedarf [159].

Welche Art der Immunantwort (zellulär vs. humoral) sich letztlich durch die Partikel-induzierte Aktivierung der LZ auslösen lässt ist schwierig zu beantworten. Bekannt ist jedoch, dass Nanopartikel bevorzugt eine zelluläre Immunantwort auslösen, während Mikropartikel ($>1\mu\text{m}$) eher zu einer humoralen Antwort führen [156], [160].

Für die Rekrutierung einer zellulären Immunantwort gilt es zudem als essentiell, dass LZ Antigene internalisieren, prozessieren und den CD8^+ T-Zellen über den MHC-I-Komplex präsentieren [161]. Dadurch eröffnet sich eventuell zukünftig die Möglichkeit durch Variation der Partikelgrößen die Immunantwort in eine bestimmte Richtung zu lenken.

Weitere Untersuchungen hierzu sind in der AG Dr. A. Vogt geplant.

4.4 Die Rolle der KZ in der Immunantwort

Keratinocyten, die in etwa 90 % der epidermalen Zellen ausmachen, erfüllen nicht nur eine Barrierefunktion, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Initiierung der kutanen Immunabwehr [21], [162], indem sie eine Reihe von Zytokinen freisetzen [163], verschiedene Oberflächenmoleküle exprimieren und mit immigrierten Lymphocyten [164] und LZ interagieren [19].

Nach Stimulation exprimieren KZ zudem MHC-II-Moleküle [33], [34], [35] und modulieren die intraepidermale Wanderung immunkompetenter Zellen durch Ausbildung und Reorganisation spezifischer Adhäsionsmoleküle [36], [37].

Aus diesen Gründen wurden bei den hier vorliegenden Untersuchungen auch die Keratinocyten mit einbezogen. Die durchgeführten Experimente machen deutlich, dass Keratinocyten PS-Partikel aufnehmen können. Auch hier besteht ein bevorzugtes Aufnahmeverhalten zu Gunsten der <200 nm Partikel. Eine 2 %ige Aufnahme lässt sich für die 121 nm u. 123 nm PS-Partikel nachweisen, wohingegen die prozentuale Aufnahme der großen (222 nm und 241 nm) Partikel die 1 % - Grenze nicht überschreitet.

Im Vergleich zu KZ nehmen LZ zwar deutlich mehr transepidermal applizierte Partikel auf, das größenabhängige Aufnahmeverhalten verhält sich bei beiden Zellpopulationen jedoch annähernd gleich. Keratinocyten gelten als akzessorische Helferzellen des kutanen Immunsystems und stellen im Hinblick auf ein gezieltes „Targeting“ der epidermalen LZ eine interessante Zielpopulation dar. Es gibt Hinweise darauf, dass Keratinocyten über den MHC-I-Komplex zur Kreuzpräsentation befähigt sind, die den bevorzugten Weg zur Auslösung einer zellulären CD8⁺ T-Zellantwort darstellt [165].

Weiterhin sind Keratinocyten entscheidend an der Aktivierung, Reifung und Migration der LZ beteiligt [19]. Hierauf weisen auch Studien hin, die besagen, dass konventionelles Tape-Stripping die Keratinocyten anregt immunstimulatorische Zytokine (z.B. TNF-alpha) zu produzieren, die wiederum LZ aktivieren [166], [167] um eine potente Immunantwort auszulösen.

Nach Veränderungen der Hautbarriere durch Verletzungen oder Entzündungen setzen KZ zahlreiche immunstimulatorische Zytokine frei, die die LZ-Migration in die Epidermis initiieren können [38], [39].

In der Tat können Keratinozyten nach der Bindung von Antigenen PAF (Platelet-activating-factor) produzieren, der über einen autokrinen Mechanismus KZ zur TNF-alpha Produktion anregt, was wiederum die LZ-Migration forciert [168].

Darüberhinaus weisen Studien daraufhin, dass die funktionelle Reifung von Langerhanszellen in entscheidender Weise von Keratinozyten durch die Produktion von GM-CSF und IL1 beeinflusst wird [169]. Auf einen ähnlichen Zusammenhang deuten Untersuchungen von Araki et al (1999) hin, die das komplizierte immunologische Zusammenspiel zwischen KZ und LZ im Rahmen der Kontaktallergie aufzeigen [170].

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass KZ neben der phagozytotischen Aufnahme diverser Antigene und DNA-Vakzine [171] auch in der Lage sind PS-Partikel zu internalisieren [133], (eigene Untersuchungen) wodurch sich die Möglichkeit eröffnet KZ zukünftig in das gezielte „Immunotargeting“ mit einzubeziehen.

4.5 Transepidermale Vakzinierung und Ausblick

Es besteht gegenwärtig Konsens darüber, dass es vermehrter Anstrengungen bedarf, gezielt globale Impfstrategien zu verbessern und einfache, sicherere, wirtschaftlichere und schmerzlose Alternativen zu invasiven Impfmethoden anzubieten.

Die Möglichkeit, mit Hilfe der modernen Nanotechnologie solchen Forderungen zu entsprechen, eröffnet sich vor allen Dingen durch die Chance vielfältige Modifikationen der Partikelgrößen vorzunehmen und ihre Oberflächenbeschaffenheit zu variieren. Des Weiteren bieten sich Nanopartikel aufgrund ihrer Penetrationseigenschaften für die transkutane Applikation an und stellen somit eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Impfstoffapplikation dar [133], [172]. Was die Verwendung von Nanopartikeln als geeignete Trägermaterialien für eine transepidermale Vakzinierung angeht, so ist bekannt, dass PLA-Nanopartikel mit adsorbierten Antigenen an der Oberfläche aufgrund ihrer Bioabbaubarkeit präferiert werden [153]. Zudem zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen, dass PLA-Nanopartikel über den Haarfollikel tief in das Infundibulum penetrieren und LZ in ihrer Aktivität beeinflussen können. Nanopartikel haben den Vorteil, dass sie das Antigen sicher über die Haut- oder Schleimhautbarriere transportieren können, ohne dass dies vor dem Erreichen des Zielortes schon von katalytischen Enzymen oder Umweltbedingungen zerstört wird.

Des Weiteren stellen Nanopartikel mit Oberflächen-Antigen nicht nur geeignete Trägersysteme dar, sondern können auch als Adjuvantien eingesetzt werden [151].

Dass sich transkutane Immunisierungsstrategien bereits als attraktiv und wirkungsvoll erwiesen haben, wird durch zahlreiche Untersuchungen belegt. So zeigte sich zum Beispiel, dass eine intradermale Applikation vergleichbare Immunreaktionen auslösen kann [125], selbst wenn die Impfdosis auf ein Fünftel der Dosis einer intramuskulären Influenza-Injektion reduziert wurde. Fan et al (1999) erreichten durch topische Applikation von DNA-Vektoren sowohl eine starke humorale als auch zelluläre Immunantwort und konnten eine spezifische Immunreaktion auf virale Antigene (Hbs-AG) auslösen. Im Falle des Hepatitis B-Oberflächenantigens ergab sich eine vergleichbar starke Immunantwort, wie sie durch i.m. Injektion erreicht werden kann und es stellte sich zudem eine IgG1 und TH-2 dominante Immunreaktion ein [173].

Ishii et al (2008) gelang es mit einem Antigen-beladenen Hydrogelpflaster eine durch LZ induzierte humorale Immunantwort auszulösen [120], und Vogt et al wiesen in ihrer 2008 durchgeführten klinischen Studie nach, dass eine transkutane im Gegensatz zur konventionellen Influenza-Impfung stärkere T-Zell-Immunantwort, sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellen betreffend, bewirkt [64].

Darüber hinaus wird die transkutane Immunisierung nicht nur mit viralen, sondern auch mit bakteriellen Antigenen erfolgversprechend eingesetzt.

So konnten Glenn et al (2000) nachweisen, dass durch ein Enterotoxin-beschichtetes Hautpflaster eine verbesserte Immunantwort ausgelöst wird [121].

Ähnliches berichten Shi et al (2001) indem sie nachwiesen, dass ein epikutan verwendetes Tetanustoxin-Pflaster im Mausmodell einen hohen Infektionsschutz bewirkt [174].

Eine transepidermale Immunisierung bietet auch die Vorteile einer verlängerten Wirkdauer, erhöhter Patientencompliance, vorhersehbarer Blutplasmaspiegel, einer höheren Bioverfügbarkeit des Impfstoffes und weniger toxische Effekte [122].

Die genannten Beispiele machen deutlich, dass der Einsatz der Nanotechnologie kombiniert mit der transkutanen Applikation einen vielversprechenden und innovativen Weg zur Verbesserung transepidermaler Immunisierungsverfahren eröffnet.

Dies umso mehr, da über die Haut zahlreiche immunkompetente Zielzellen erreicht und stimuliert werden können. Hierzu zählen insbesondere LZ und dermale DZ, die in der Lage sind Antigene zu prozessieren und sowohl über MHC-I als auch MHC-II beide Arme der Immunantwort (zellulär und humoral) in Gang zu setzen [61], [175]. Da heute gebräuchliche intramuskuläre Impfmethode bevorzugt den humoralen Arm der Immunantwort ansprechen, bietet sich die gezielte transepidermale Applikation insbesondere auch zur HIV-1-Immunisierung an, da über LZ und dermale DZ sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunabwehr vermehrt stimulierbar ist [151].

Es bietet sich insbesondere die transepidermale Immunisierung über den folliculären Penetrationsweg an, da im Bereich des proximalen Haarfollikelinfundulums die Penetrationstrecke reduziert und gleichzeitig die Permeabilität erhöht ist.

Zudem sind hier die relevanten CD1a⁺ Zielzellen massiert lokalisiert [176], [177] wodurch intensive Partikel-LZ-Interaktionen ermöglicht werden.

Da die folliculäre Penetrationsroute aus o.g. Gründen als besonders attraktiv angesehen werden kann, sind weitere detaillierte morphologische Untersuchungen zur Penetrationsbarriere und zur LZ-Migration im Bereich des Follikelinfundibulums sinnvoll.

Gleiches gilt für die Entwicklung neuer immunogener Partikelpräparationen, z.B. Partikel als Trägersysteme für Antigene und Adjuvantien wie DNA, sowie innovative Maßnahmen zur transkutanen Permeabilitätssteigerung.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser experimentellen Arbeit waren Untersuchungen zum Targeting epidermaler Langerhanszellen sowie dem Antigentransport mittels Nanopartikel gekoppeltem p24-Antigen im Hinblick auf eine transepidermale Immunisierung. Zu diesem Zweck wurden die folliculäre Penetration von Partikeln in menschlicher Haut, das Aufnahmeverhalten durch epidermale Langerhanszellen und die Aktivierung derer durch p24-Antigen beladene Partikel untersucht. Es zeigte sich, dass nach einem CSSS und dem Auftragen unterschiedlich großer und beschichteter Partikeltypen (PLA/PS-Partikel, $>/< 200\text{nm}$, +/-p24-Antigen) auf exzidierte humane Haut eine Penetration entlang des Haarfollikels erfolgte.

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie ließen sich in mehr als der Hälfte (50-70 %) der untersuchten Haarfollikel PLA- sowie PS-Partikel nachweisen.

Bei PLA-Partikeln einer Größe $> 200\text{ nm}$ zeigte sich in etwa 20 % der HF eine Penetration bis zum tiefen Infundibulum. Somit stellt sich der folliculäre Weg als geeignet für transepidermale Vakzinierungsstrategien dar, da über ihn die immunkompetenten Zielzellen der Haut, die im Bereich des distalen Infundibulums resident sind, erreicht werden können (Targeting).

Das zweite Ziel dieser experimentellen Arbeit war, aufbauend auf die vorangegangenen Penetrationsuntersuchungen, eine Aufnahme der p24-gekoppelten Partikel durch die LZ nach transfollikulärer Penetration nachzuweisen.

Die epidermalen LZ gelten als potente Immunzellpopulation und können durch Internalisierung der Antigen-beladenen Nanopartikel möglicherweise zusätzlich über MHC-I-Kreuzpräsentation des Antigens eine effektive zelluläre Immunantwort initiieren; diese ist gerade im Hinblick auf transepidermale Immunisierungsstrategien gegen HIV von großer Bedeutung.

Alle im Rahmen dieser experimentellen Arbeit untersuchten PS-Partikel ($>/< 200\text{ nm}$, +/- p24-Antigen) konnten nach topischer Applikation durch die Hautbarriere in die epidermalen Zellschichten gelangen und von den dort residenten Langerhanszellen aufgenommen werden.

Es zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine größenabhängige Aufnahme der Partikel durch epidermale LZ, die Zahl der „Partikel-positiven“ Zellen schwankte zwischen 1,5-3,5 %.

Somit wird sichtbar, dass die intrazelluläre Aufnahme der Partikel größenabhängig erfolgt und auch für die Penetrationseigenschaften wesentlich ist.

Eine Aufnahme von PLA-Partikeln konnte, wie auch in früheren Untersuchungen gezeigt, nicht nachgewiesen werden und liegt möglicherweise an der Instabilität der Partikel mit nachfolgender Freisetzung des Farbstoffes sowie Konglomeratbildung.

Neue unpublizierte Forschungsergebnisse der AG Dr. A. Vogt zeigen jedoch, dass sich HIV-1-p24-Antigen, welches an PLA-Partikel gekoppelt ist, nach transepidermaler Applikation in epidermalen LZ nachweisen lässt und somit prinzipiell für eine Translokation des Antigens über die Hautbarriere spricht.

Nach der Untersuchung der follikulären Penetration sowie Aufnahme der Partikel durch epidermale LZ bestand der letzte Teil dieser experimentellen Arbeit in der Erforschung der Aktivierung der LZ durch p24-Antigen beschichtete Partikel.

Es zeigte sich eine Stimulation der Immunzellen nach einem CSSS und transkutaner Applikation vor allem mit PLA 215_p24 durch Hochregulierung der Aktivierungsmarker CD80 sowie CD83. Da speziell PLA-Partikel bioabbaubar sind, gelten sie als attraktive Trägersysteme für transkutane Immunisierungsstrategien. In der hier vorliegenden Dissertation konnte bestätigt werden, dass p24-PLA-Partikel über den Haarfollikel penetrieren und die LZ aktivieren, was für die Initiierung einer effektiven Immunantwort von Bedeutung ist.

Auch ist eine Aufnahme transepidermal applizierter Partikel mit p24-Antigen durch LZ möglich und im Hinblick auf ein Targeting der epidermalen Immunzellpopulation wünschenswert.

Diese Arbeit zeigt, dass Nanopartikel mit p24-Antigen als Träger für eine transepidermale Immunisierung viel versprechend sind, da sie sowohl über den follikulären Kanal penetrieren, über die Hautbarriere translozieren, dort von epidermalen Langerhanszellen aufgenommen werden und diese zusätzlich stimulieren.

6. Literaturverzeichnis

1. **Foster,C.A. and Holbrook,K.A.**, Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: cell densities and phenotypic expression relative to epidermal growth. *Am.J.Anat.* 1989. **184**: 157-164.
2. **Holbrook,K.A., Underwood,R.A., Vogel,A.M., Gown,A.M., and Kimball,H.**, The appearance, density and distribution of melanocytes in human embryonic and fetal skin revealed by the anti-melanoma monoclonal antibody, HMB-45. *Anat.Embryol.(Berl)* 1989. **180**: 443-455.
3. **Morrison,K.M., Miesegaes,G.R., Lumpkin,E.A., and Maricich,S.M.**, Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage
1. *Dev.Biol.* 2009. **336**: 76-83.
4. **Foster,C.A., Bertram,J.F., and Holbrook,K.A.**, Morphometric and statistical analyses describing the in utero growth of human epidermis. *Anat.Rec.* 1988. **222**: 201-206.
5. **Saitou,M., Sugai,S., Tanaka,T., Shimouchi,K., Fuchs,E., Narumiya,S., and Kakizuka,A.**, Inhibition of skin development by targeted expression of a dominant-negative retinoic acid receptor
6. *Nature* 1995. **374**: 159-162.
6. **Eckert,R.L., Crish,J.F., Banks,E.B., and Welter,J.F.**, The epidermis: genes on - genes off. *J.Invest Dermatol.* 1997. **109**: 501-509.
7. **Arita,K., Akiyama,M., Tsuji,Y., McMillan,J.R., Eady,R.A., and Shimizu,H.**, Changes in gap junction distribution and connexin expression pattern during human fetal skin development. *J.Histochem.Cytochem.* 2002. **50**: 1493-1500.
8. **Smith,L.T. and Holbrook,K.A.**, Embryogenesis of the dermis in human skin. *Pediatr.Dermatol.* 1986. **3**: 271-280.
9. **Johnson,C.L. and Holbrook,K.A.**, Development of human embryonic and fetal dermal vasculature. *J.Invest Dermatol.* 1989. **93**: 10S-17S.
10. **ODLAND,G.F.**, A submicroscopic granular component in human epidermis. *J.Invest Dermatol.* 1960. **34**: 11-15.
11. **Schurer,N.Y. and Elias,P.M.**, The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv.Lipid Res.* 1991. **24**: 27-56.

12. **Schurer,N.Y., Plewig,G., and Elias,P.M.,** Stratum corneum lipid function. *Dermatologica* 1991. **183**: 77-94.
13. **Landmann,L.,** [The permeability barrier of the skin]. *Pharm.Unserer Zeit* 1991. **20**: 155-163.
14. **Urmacher,C.,** Histology of normal skin. *Am.J.Surg.Pathol.* 1990. **14**: 671-686.
15. **Meigel,W.N., Gay,S., and Weber,L.,** Dermal architecture and collagen type distribution 1. *Arch.Dermatol.Res.* 1977. **259**: 1-10.
16. **Fore,J.,** A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy.Wound.Manage.* 2006. **52**: 24-35.
17. **Salmon,J.K., Armstrong,C.A., and Ansel,J.C.,** The skin as an immune organ. *West J.Med.* 1994. **160**: 146-152.
18. **Bos,J.D.,** The skin as an organ of immunity. *Clin.Exp.Immunol.* 1997. **107 Suppl 1**: 3-5.
19. **Steinhoff,M., Brzoska,T., and Luger,T.A.,** Keratinocytes in epidermal immune responses. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 2001. **1**: 469-476.
20. **Salmon,J.K., Armstrong,C.A., and Ansel,J.C.,** The skin as an immune organ 1. *West J.Med.* 1994. **160**: 146-152.
21. **Bauer,J., Bahmer,F.A., Worl,J., Neuhuber,W., Schuler,G., and Fartasch,M.,** A strikingly constant ratio exists between Langerhans cells and other epidermal cells in human skin. A stereologic study using the optical disector method and the confocal laser scanning microscope. *J.Invest Dermatol.* 2001. **116**: 313-318.
22. **Kondo,S.,** The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1999. **4**: 177-183.
23. **Ansel,J.C., Luger,T.A., Lowry,D., Perry,P., Roop,D.R., and Mountz,J.D.,** The expression and modulation of IL-1 alpha in murine keratinocytes. *J.Immunol.* 1988. **140**: 2274-2278.
24. **Barker,J.N., Jones,M.L., Mitra,R.S., Crockett-Torabe,E., Fantone,J.C., Kunkel,S.L., Warren,J.S., Dixit,V.M., and Nickoloff,B.J.,** Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am.J.Pathol.* 1991. **139**: 869-876.

25. **Barker,J.N., Mitra,R.S., Griffiths,C.E., Dixit,V.M., and Nickoloff,B.J.**, Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 1991. **337**: 211-214.
26. **Kondo,S.**, The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1999. **4**: 177-183.
27. **Wittmann,M., Purwar,R., Hartmann,C., Gutzmer,R., and Werfel,T.**, Human keratinocytes respond to interleukin-18: implication for the course of chronic inflammatory skin diseases
6. *J.Invest Dermatol.* 2005. **124**: 1225-1233.
28. **Edelson,R.L.**, Cutaneous T-cell lymphomas: clues of a skin-thymus interaction. *J.Invest Dermatol.* 1976. **67**: 419-424.
29. **Luger,T.A., Stadler,B.M., Katz,S.I., and Oppenheim,J.J.**, Epidermal cell (keratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAF). *J.Immunol.* 1981. **127**: 1493-1498.
30. **Sauder,D.N., Carter,C.S., Katz,S.I., and Oppenheim,J.J.**, Epidermal cell production of thymocyte activating factor (ETAF). *J.Invest Dermatol.* 1982. **79**: 34-39.
31. **Kupper,T.S., Ballard,D.W., Chua,A.O., McGuire,J.S., Flood,P.M., Horowitz,M.C., Langdon,R., Lightfoot,L., and Gubler,U.**, Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *J.Exp.Med.* 1986. **164**: 2095-2100.
32. **Vejlsgaard,G.L., Ralfkiaer,E., Avnstorp,C., Czajkowski,M., Marlin,S.D., and Rothlein,R.**, Kinetics and characterization of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on keratinocytes in various inflammatory skin lesions and malignant cutaneous lymphomas. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1989. **20**: 782-790.
33. **Volc-Platzer,B., Leibl,H., Luger,T., Zahn,G., and Stingl,G.**, Human epidermal cells synthesize HLA-DR alloantigens in vitro upon stimulation with gamma-interferon. *J.Invest Dermatol.* 1985. **85**: 16-19.
34. **Wittmann,M., Purwar,R., Hartmann,C., Gutzmer,R., and Werfel,T.**, Human keratinocytes respond to interleukin-18: implication for the course of chronic inflammatory skin diseases. *J.Invest Dermatol.* 2005. **124**: 1225-1233.
35. **Albanesi,C., Cavani,A., and Girolomoni,G.**, Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J.Invest Dermatol.* 1998. **110**: 138-142.

36. **Singer,K.H., Tuck,D.T., Sampson,H.A., and Hall,R.P.,** Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses. *J.Invest Dermatol.* 1989. **92**: 746-750.
37. **Garioch,J.J., Mackie,R.M., Campbell,I., and Forsyth,A.,** Keratinocyte expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) correlated with infiltration of lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) positive cells in evolving allergic contact dermatitis reactions. *Histopathology* 1991. **19**: 351-354.
38. **Nishibu,A., Ward,B.R., Boes,M., and Takashima,A.,** Roles for IL-1 and TNFalpha in dynamic behavioral responses of Langerhans cells to topical hapten application. *J.Dermatol.Sci.* 2007. **45**: 23-30.
39. **Griffiths,C.E., Dearman,R.J., Cumberbatch,M., and Kimber,I.,** Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man. *Cytokine* 2005. **32**: 67-70.
40. **Pivarcsi,A., Kemeny,L., and Dobozy,A.,** Innate immune functions of the keratinocytes. A review
1. *Acta Microbiol.Immunol.Hung.* 2004. **51**: 303-310.
41. **Katz,S.I., Tamaki,K., and Sachs,D.H.,** Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow
2. *Nature* 1979. **282**: 324-326.
42. **Romani,N., Holzmann,S., Tripp,C.H., Koch,F., and Stoitzner,P.,** Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 2003. **111**: 725-740.
43. **Christoph,T., Muller-Rover,S., Audring,H., Tobin,D.J., Hermes,B., Cotsarelis,G., Ruckert,R., and Paus,R.,** The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br.J.Dermatol.* 2000. **142**: 862-873.
44. **Taira,K., Narisawa,Y., Nakafusa,J., Misago,N., and Tanaka,T.,** Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles. *J.Dermatol.Sci.* 2002. **30**: 195-204.
45. **Angel,C.E., George,E., Brooks,A.E., Ostrovsky,L.L., Brown,T.L., and Dunbar,P.R.,** Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. *J.Immunol.* 2006. **176**: 5730-5734.
46. **Rodriguez,E.M. and Caorsi,I.,** A second look at the ultrastructure of the Langerhans cell of the human epidermis
1. *J.Ultrastruct.Res.* 1978. **65**: 279-295.

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

48. **Wolff,K.,** The fine structure of the Langerhans cell granule
1. *J.Cell Biol.* 1967. **35:** 468-473.

49. **Kubo,A., Nagao,K., Yokouchi,M., Sasaki,H., and Amagai,M.,** External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J.Exp.Med.* 2009. **206:** 2937-2946.

50. **Birbeck,M.S., Breathnach A.S., and Everall JD,** An electron microscopy study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J.Invest Dermatol.* 1961.

51. **McDermott,R., Ziylan,U., Spehner,D., Bausinger,H., Lipsker,D., Mommaas,M., Cazenave,J.P., Raposo,G., Goud,B., de la,S.H., Salamero,J., and Hanau,D.,** Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal Langerhans cells, which form where Langerin accumulates
1. *Mol.Biol.Cell* 2002. **13:** 317-335.

52. **Valladeau,J., Ravel,O., zutter-Dambuyant,C., Moore,K., Kleijmeer,M., Liu,Y., Duvert-Frances,V., Vincent,C., Schmitt,D., Davoust,J., Caux,C., Lebecque,S., and Saeland,S.,** Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity.* 2000. **12:** 71-81.

53. **Stambach,N.S. and Taylor,M.E.,** Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* 2003. **13:** 401-410.

54. **Poulin,L.F., Henri,S., de,B.B., Devilard,E., Kissenpfennig,A., and Malissen,B.,** The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells
1. *J.Exp.Med.* 2007. **204:** 3119-3131.

55. **Caux,C., it-Yahia,S., Chemin,K., de,B.O., eu-Nosjean,M.C., Homey,B., Massacrier,C., Vanbervliet,B., Zlotnik,A., and Vicari,A.,** Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin.Immunopathol.* 2000. **22:** 345-369.

56. **Liu,Y.J.,** Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity
3. *Cell* 2001. **106:** 259-262.

57. **Shortman,K. and Liu,Y.J.**, Mouse and human dendritic cell subtypes
10. *Nat.Rev.Immunol.* 2002. **2**: 151-161.

58. **Blauvelt,A., Glushakova,S., and Margolis,L.B.**, HIV-infected human Langerhans cells transmit infection to human lymphoid tissue ex vivo. *AIDS* 2000. **14**: 647-651.

59. **Valladeau,J., Ravel,O., zutter-Dambuyant,C., Moore,K., Kleijmeer,M., Liu,Y., Duvert-Frances,V., Vincent,C., Schmitt,D., Davoust,J., Caux,C., Lebecque,S., and Saeland,S.**, Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules
1. *Immunity.* 2000. **12**: 71-81.

60. **de Witte L., Nabatov,A., Pion,M., Fluitsma,D., de Jong,M.A., de,G.T., Piguet,V., van,K.Y., and Geijtenbeek,T.B.**, Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat.Med.* 2007. **13**: 367-371.

61. **Gogolak,P., Rethi,B., Hajas,G., and Rajnavolgyi,E.**, Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses
1. *J.Mol.Recognit.* 2003. **16**: 299-317.

62. **Schnurr,M., Then,F., Galambos,P., Scholz,C., Siegmund,B., Endres,S., and Eigler,A.**, Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells
1. *J.Immunol.* 2000. **165**: 4704-4709.

63. **Mellman,I. and Steinman,R.M.**, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001. **106**: 255-258.

64. **Vogt,A., Mahe,B., Costagliola,D., Bonduelle,O., Hadam,S., Schaefer,G., Schaefer,H., Katlama,C., Sterry,W., Autran,B., Blume-Peytavi,U., and Combadiere,B.**, Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J.Immunol.* 2008. **180**: 1482-1489.

65. **Cumberbatch,M., Dearman,R.J., Griffiths,C.E., and Kimber,I.**, Langerhans cell migration. *Clin.Exp.Dermatol.* 2000. **25**: 413-418.

66. **Randolph,G.J., Angeli,V., and Swartz,M.A.**, Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.* 2005. **5**: 617-628.

67. **Steinman,R.M. and Pope,M.**, Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J.Clin.Invest* 2002. **109**: 1519-1526.

68. **Lipscomb,M.F. and Masten,B.J.**, Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 2002. **82**: 97-130.
69. **Valladeau,J. and Saeland,S.**, Cutaneous dendritic cells. *Semin.Immunol.* 2005. **17**: 273-283.
70. **Toebak,M.J., Gibbs,S., Bruynzeel,D.P., Scheper,R.J., and Rustemeyer,T.**, Dendritic cells: biology of the skin
1. *Contact Dermatitis* 2009. **60**: 2-20.
71. **Angel,C.E., Lala,A., Chen,C.J., Edgar,S.G., Ostrovsky,L.L., and Dunbar,P.R.**, CD14+ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a+ counterparts. *Int.Immunol.* 2007. **19**: 1271-1279.
72. **Klechevsky,E., Morita,R., Liu,M., Cao,Y., Coquery,S., Thompson-Snipes,L., Briere,F., Chaussabel,D., Zurawski,G., Palucka,A.K., Reiter,Y., Banchereau,J., and Ueno,H.**, Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity.* 2008. **29**: 497-510.
73. **Mellman,I. and Steinman,R.M.**, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001. **106**: 255-258.
74. **Kissenpfennig,A., Henri,S., Dubois,B., Laplace-Builhe,C., Perrin,P., Romani,N., Tripp,C.H., Douillard,P., Leserman,L., Kaiserlian,D., Saeland,S., Davoust,J., and Malissen,B.**, Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells
1. *Immunity.* 2005. **22**: 643-654.
75. **Bechetoille,N., Andre,V., Valladeau,J., Perrier,E., and zutter-Dambuyant,C.**, Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in Th2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *J.Leukoc.Biol.* 2006. **80**: 45-58.
76. **Randolph,G.J., Angeli,V., and Swartz,M.A.**, Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.* 2005. **5**: 617-628.
77. **Toebak,M.J., Gibbs,S., Bruynzeel,D.P., Scheper,R.J., and Rustemeyer,T.**, Dendritic cells: biology of the skin
1. *Contact Dermatitis* 2009. **60**: 2-20.
78. **Jamora,C., DasGupta,R., Kocieniewski,P., and Fuchs,E.**, Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development
1. *Nature* 2003. **422**: 317-322.

79. **Kaplan,E.D. and Holbrook,K.A.**, Dynamic expression patterns of tenascin, proteoglycans, and cell adhesion molecules during human hair follicle morphogenesis 1. *Dev.Dyn.* 1994. **199**: 141-155.
80. Moore, K. L and Persaud, TVN. *The Developing Human.* 2003. Saunders.
Ref Type: Generic
81. **Blume,U., Ferracin,J., Verschoore,M., Czernielewski,J.M., and Schaefer,H.**, Physiology of the vellus hair follicle: hair growth and sebum excretion. *Br.J.Dermatol.* 1991. **124**: 21-28.
82. **Lademann,J., Richter,H., Schaefer,U.F., Blume-Peytavi,U., Teichmann,A., Otberg,N., and Sterry,W.**, Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol.Physiol* 2006. **19**: 232-236.
83. **Vogt,A., Hadam,S., Heiderhoff,M., Audring,H., Lademann,J., Sterry,W., and Blume-Peytavi,U.**, Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp.Dermatol.* 2007. **16**: 946-950.
84. **Alibardi,L.**, Comparative aspects of the inner root sheath in adult and developing hairs of mammals in relation to the evolution of hairs
6. *J.Anat.* 2004. **205**: 179-200.
85. **Langbein,L., Rogers,M.A., Praetzel,S., Aoki,N., Winter,H., and Schweizer,J.**, A novel epithelial keratin, hK6irs1, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath, including specialized huxley cells (Flugelzellen) of the human hair follicle. *J.Invest Dermatol.* 2002. **118**: 789-799.
86. **Steinert,P.M., Parry,D.A., and Marekov,L.N.**, Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 41409-41419.
87. **Manabe,M. and O'Guin,W.M.**, Existence of trichohyalin-keratohyalin hybrid granules: co-localization of two major intermediate filament-associated proteins in non-follicular epithelia
5. *Differentiation* 1994. **58**: 65-75.
88. **Ohyama,M., Terunuma,A., Tock,C.L., Radonovich,M.F., Pise-Masison,C.A., Hopping,S.B., Brady,J.N., Udey,M.C., and Vogel,J.C.**, Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J.Clin.Invest* 2006. **116**: 249-260.
89. **Cotsarelis,G.**, Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J.Invest Dermatol.* 2006. **126**: 1459-1468.

90. **Ohyama,M., Vogel,J.C., and Amagai,M.,** Gene ontology analysis of human hair follicle bulge molecular signature. *J.Dermatol.Sci.* 2007. **45**: 147-150.
91. **Tiede,S., Kloepper,J.E., Bodo,E., Tiwari,S., Kruse,C., and Paus,R.,** Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur.J.Cell Biol.* 2007. **86**: 355-376.
92. **Tiede,S., Kloepper,J.E., Whiting,D.A., and Paus,R.,** The 'follicular trochanter': an epithelial compartment of the human hair follicle bulge region in need of further characterization. *Br.J.Dermatol.* 2007. **157**: 1013-1016.
93. **Mecklenburg,L., Tobin,D.J., Muller-Rover,S., Handjiski,B., Wendt,G., Peters,E.M., Pohl,S., Moll,I., and Paus,R.,** Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis. *J.Invest Dermatol.* 2000. **114**: 909-916.
94. **Christoph,T., Muller-Rover,S., Audring,H., Tobin,D.J., Hermes,B., Cotsarelis,G., Ruckert,R., and Paus,R.,** The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege
1. *Br.J.Dermatol.* 2000. **142**: 862-873.
95. **Paus,R., Christoph,T., and Muller-Rover,S.,** Immunology of the hair follicle: a short journey into terra incognita
3. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1999. **4**: 226-234.
96. **Christoph,T., Muller-Rover,S., Audring,H., Tobin,D.J., Hermes,B., Cotsarelis,G., Ruckert,R., and Paus,R.,** The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege
1. *Br.J.Dermatol.* 2000. **142**: 862-873.
97. **Bertolino,A.P.,** Clinical hair loss: diagnosis and treatment. *J.Dermatol.* 1993. **20**: 604-610.
98. **Elias,P.M.,** Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J.Invest Dermatol.* 2005. **125**: 183-200.
99. **Darlenski,R., Sassning,S., Tsankov,N., and Fluhr,J.W.,** Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 2009. **72**: 295-303.
100. **Schaefer,H. and Lademann,J.,** The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol* 2001. **14 Suppl 1**: 23-27.

101. **Genina,E.A., Bashkatov,A.N., Sinichkin,Y.P., Kochubey,V.I., Lakodina,N.A., Altshuler,G.B., and Tuchin,V.V.,** In vitro and in vivo study of dye diffusion into the human skin and hair follicles. *J.Biomed.Opt.* 2002. **7**: 471-477.
102. **Barry,B.W.,** Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2002. **54 Suppl 1**: S31-S40.
103. **Otberg,N., Patzelt,A., Rasulev,U., Hagemeister,T., Linscheid,M., Sinkgraven,R., Sterry,W., and Lademann,J.,** The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2008. **65**: 488-492.
104. **Hueber,F., Schaefer,H., and Wepierre,J.,** Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol.* 1994. **7**: 237-244.
105. **Lademann,J., Knorr,F., Richter,H., Blume-Peytavi,U., Vogt,A., Antoniou,C., Sterry,W., and Patzelt,A.,** Hair follicles--an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charite -Universitätsmedizin Berlin, Germany. *Skin Pharmacol.Physiol* 2008. **21**: 150-155.
106. **Otberg,N., Richter,H., Schaefer,H., Blume-Peytavi,U., Sterry,W., and Lademann,J.,** Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J.Invest Dermatol.* 2004. **122**: 14-19.
107. **Mills,O.H., Jr. and Kligman,A.M.,** The follicular biopsy. *Dermatologica* 1983. **167**: 57-63.
108. **Lademann,J., Patzelt,A., Richter,H., Schanzer,S., Sterry,W., Filbry,A., Bohnsack,K., Rippke,F., and Meinke,M.,** Comparison of two In Vitro Models for the Analysis of Follicular Penetration and its Prevention by Barrier Emulsions. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 2009.
109. **Panyam,J. and Labhasetwar,V.,** Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2003. **55**: 329-347.
110. **Reddy,S.T., Swartz,M.A., and Hubbell,J.A.,** Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 2006. **27**: 573-579.

111. **Kroll,R.A., Pagel,M.A., Muldoon,L.L., Roman-Goldstein,S., Fiamengo,S.A., and Neuwelt,E.A.,** Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery* 1998. **43**: 879-886.
112. **He,Q., Liu,J., Sun,X., and Zhang,Z.R.,** Preparation and characteristics of DNA-nanoparticles targeting to hepatocarcinoma cells. *World J.Gastroenterol.* 2004. **10**: 660-663.
113. **Shenoy,D.B. and Amiji,M.M.,** Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int.J.Pharm.* 2005. **293**: 261-270.
114. **Alvarez-Roman,R., Barre,G., Guy,R.H., and Fessi,H.,** Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 2001. **52**: 191-195.
115. **Lassalle,V. and Ferreira,M.L.,** PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromol.Biosci.* 2007. **7**: 767-783.
116. **Lee,H.H., Sang,S.U., Lee,J.H., and Kim,H.W.,** Biomedical nanocomposites of poly(lactic acid) and calcium phosphate hybridized with modified carbon nanotubes for hard tissue implants. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.* 2011.
117. **Rancan,F., Papakostas,D., Hadam,S., Hackbarth,S., Delair,T., Primard,C., Verrier,B., Sterry,W., Blume-Peytavi,U., and Vogt,A.,** Investigation of polylactic acid (PLA) nanoparticles as drug delivery systems for local dermatotherapy. *Pharm.Res.* 2009. **26**: 2027-2036.
118. **Ataman-Onal,Y., Munier,S., Ganee,A., Terrat,C., Durand,P.Y., Battail,N., Martinon,F., Le,G.R., Charles,M.H., Delair,T., and Verrier,B.,** Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J.Control Release* 2006. **112**: 175-185.
119. **Reddy,S.T., Swartz,M.A., and Hubbell,J.A.,** Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 2006. **27**: 573-579.
120. **Ishii,Y., Nakae,T., Sakamoto,F., Matsuo,K., Matsuo,K., Quan,Y.S., Kamiyama,F., Fujita,T., Yamamoto,A., Nakagawa,S., and Okada,N.,** A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J.Control Release* 2008. **131**: 113-120.

121. **Glenn,G.M., Taylor,D.N., Li,X., Frankel,S., Montemarano,A., and Alving,C.R.,** Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat.Med.* 2000. **6**: 1403-1406.
122. **Giudice,E.L. and Campbell,J.D.,** Needle-free vaccine delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2006. **58**: 68-89.
123. **Lassalle,V. and Ferreira,M.L.,** PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromol.Biosci.* 2007. **7**: 767-783.
124. **Nasir,A.,** Dermatologic toxicity of nanoengineered materials. *Arch.Dermatol.* 2008. **144**: 253-254.
125. **Kenney,R.T., Frech,S.A., Muenz,L.R., Villar,C.P., and Glenn,G.M.,** Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N.Engl.J.Med.* 2004. **351**: 2295-2301.
126. **Vogt,A., Combadiere,B., Hadam,S., Stieler,K.M., Lademann,J., Schaefer,H., Autran,B., Sterry,W., and Blume-Peytavi,U.,** 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J.Invest Dermatol.* 2006. **126**: 1316-1322.
127. **Alvarez-Roman,R., Naik,A., Kalia,Y.N., Guy,R.H., and Fessi,H.,** Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J.Control Release* 2004. **99**: 53-62.
128. **Lademann,J., Otberg,N., Richter,H., Weigmann,H.J., Lindemann,U., Schaefer,H., and Sterry,W.,** Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol* 2001. **14 Suppl 1**: 17-22.
129. **Cross,S.E., Innes,B., Roberts,M.S., Tsuzuki,T., Robertson,T.A., and McCormick,P.,** Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol.Physiol* 2007. **20**: 148-154.
130. **Pflucker,F., Wendel,V., Hohenberg,H., Gartner,E., Will,T., Pfeiffer,S., Wepf,R., and Gers-Barlag,H.,** The human stratum corneum layer: an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol* 2001. **14 Suppl 1**: 92-97.
131. **Lademann,J., Weigmann,H., Rickmeyer,C., Barthelmes,H., Schaefer,H., Mueller,G., and Sterry,W.,** Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol* 1999. **12**: 247-256.

132. **Manabe,M. and O'Guin,W.M.**, Existence of trichohyalin-keratohyalin hybrid granules: co-localization of two major intermediate filament-associated proteins in non-follicular epithelia
5. Differentiation 1994. **58**: 65-75.
133. **Mahe,B., Vogt,A., Liard,C., Duffy,D., Abadie,V., Bonduelle,O., Boissonnas,A., Sterry,W., Verrier,B., Blume-Peytavi,U., and Combadiere,B.**, Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen-presenting cells by hair follicles and their transport in mice. *J.Invest Dermatol.* 2009. **129**: 1156-1164.
134. **Mattheolabakis,G., Lagoumintzis,G., Panagi,Z., Papadimitriou,E., Partidos,C.D., and Avgoustakis,K.**, Transcutaneous delivery of a nanoencapsulated antigen: induction of immune responses. *Int.J.Pharm.* 2010. **385**: 187-193.
135. **Michel,M., L'Heureux,N., Pouliot,R., Xu,W., Auger,F.A., and Germain,L.**, Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 1999. **35**: 318-326.
136. **Toll,R., Jacobi,U., Richter,H., Lademann,J., Schaefer,H., and Blume-Peytavi,U.**, Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J.Invest Dermatol.* 2004. **123**: 168-176.
137. **Starcher,B., Aycock,R.L., and Hill,C.H.**, Multiple roles for elastic fibers in the skin. *J.Histochem.Cytochem.* 2005. **53**: 431-443.
138. **Banchereau,J. and Steinman,R.M.**, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998. **392**: 245-252.
139. **Guebre-Xabier,M., Hammond,S.A., Epperson,D.E., Yu,J., Ellingsworth,L., and Glenn,G.M.**, Immunostimulant patch containing heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* enhances immune responses to injected influenza virus vaccine through activation of skin dendritic cells. *J.Virol.* 2003. **77**: 5218-5225.
140. **Sahoo,S.K., Panyam,J., Prabha,S., and Labhasetwar,V.**, Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J.Control Release* 2002. **82**: 105-114.
141. **Desai,M.P., Labhasetwar,V., Amidon,G.L., and Levy,R.J.**, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm.Res.* 1996. **13**: 1838-1845.

142. **Horisawa,E., Kubota,K., Tuboi,I., Sato,K., Yamamoto,H., Takeuchi,H., and Kawashima,Y.,** Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharm.Res.* 2002. **19**: 132-139.
143. **Foster,K.A., Yazdanian,M., and Audus,K.L.,** Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium. *J.Pharm.Pharmacol.* 2001. **53**: 57-66.
144. **Hirota,K., Hasegawa,T., Hinata,H., Ito,F., Inagawa,H., Kochi,C., Soma,G., Makino,K., and Terada,H.,** Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages. *J.Control Release* 2007. **119**: 69-76.
145. **Raghuvanshi,R.S., Katare,Y.K., Lalwani,K., Ali,M.M., Singh,O., and Panda,A.K.,** Improved immune response from biodegradable polymer particles entrapping tetanus toxoid by use of different immunization protocol and adjuvants. *Int.J.Pharm.* 2002. **245**: 109-121.
146. **Vogt,A. and Blume-Peytavi,U.,** [Biology of the human hair follicle. New knowledge and the clinical significance]. *Hautarzt* 2003. **54**: 692-698.
147. **Scott,R.C., Corrigan,M.A., Smith,F., and Mason,H.,** The influence of skin structure on permeability: an intersite and interspecies comparison with hydrophilic penetrants. *J.Invest Dermatol.* 1991. **96**: 921-925.
148. **Scheicher,C., Mehlig,M., Dienes,H.P., and Reske,K.,** Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow-derived dendritic cells results in up-regulation of interleukin-1 alpha and interleukin-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation. *Eur.J.Immunol.* 1995. **25**: 1566-1572.
149. **Moore,A., McGuirk,P., Adams,S., Jones,W.C., McGee,J.P., O'Hagan,D.T., and Mills,K.H.,** Immunization with a soluble recombinant HIV protein entrapped in biodegradable microparticles induces HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes and CD4+ Th1 cells. *Vaccine* 1995. **13**: 1741-1749.
150. **Maloy,K.J., Donachie,A.M., O'Hagan,D.T., and Mowat,A.M.,** Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with ovalbumin entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Immunology* 1994. **81**: 661-667.
151. **Aline,F., Brand,D., Pierre,J., Roingeard,P., Severine,M., Verrier,B., and mior-Poisson,I.,** Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination. *Vaccine* 2009. **27**: 5284-5291.

152. **Wang,X., Uto,T., Sato,K., Ide,K., Akagi,T., Okamoto,M., Kaneko,T., Akashi,M., and Baba,M.,** Potent activation of antigen-specific T cells by antigen-loaded nanospheres. *Immunol.Lett.* 2005. **98**: 123-130.
153. **Lamalle-Bernard,D., Munier,S., Compagnon,C., Charles,M.H., Kalyanaraman,V.S., Delair,T., Verrier,B., and taman-Onal,Y.,** Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J.Control Release* 2006. **115**: 57-67.
154. **Kanchan,V. and Panda,A.K.,** Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* 2007. **28**: 5344-5357.
155. **Foged,C., Brodin,B., Frokjaer,S., and Sundblad,A.,** Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int.J.Pharm.* 2005. **298**: 315-322.
156. **Gutierrez,I., Hernandez,R.M., Igartua,M., Gascon,A.R., and Pedraz,J.L.,** Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. *Vaccine* 2002. **21**: 67-77.
157. **Berthier-Vergnes,O., Bermond,F., Flacher,V., Massacrier,C., Schmitt,D., and Peguet-Navarro,J.,** TNF-alpha enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS Lett.* 2005. **579**: 3660-3668.
158. **O'Hagan,D.T. and Singh,M.,** Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert.Rev.Vaccines.* 2003. **2**: 269-283.
159. **Thiele,L., Rothen-Rutishauser,B., Jilek,S., Wunderli-Allenspach,H., Merkle,H.P., and Walter,E.,** Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J.Control Release* 2001. **76**: 59-71.
160. **Chong,C.S., Cao,M., Wong,W.W., Fischer,K.P., Addison,W.R., Kwon,G.S., Tyrrell,D.L., and Samuel,J.,** Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J.Control Release* 2005. **102**: 85-99.
161. **Fonteneau,J.F., Kavanagh,D.G., Lirvall,M., Sanders,C., Cover,T.L., Bhardwaj,N., and Larsson,M.,** Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 2003. **102**: 4448-4455.

162. **Salmon,J.K., Armstrong,C.A., and Ansel,J.C.,** The skin as an immune organ
1. *West J.Med.* 1994. **160**: 146-152.
163. **Kondo,S.,** The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1999. **4**: 177-183.
164. **Wittmann,M., Purwar,R., Hartmann,C., Gutzmer,R., and Werfel,T.,** Human keratinocytes respond to interleukin-18: implication for the course of chronic inflammatory skin diseases
6. *J.Invest Dermatol.* 2005. **124**: 1225-1233.
165. **Cho,J.H., Youn,J.W., and Sung,Y.C.,** Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J.Immunol.* 2001. **167**: 5549-5557.
166. **Nickoloff,B.J. and Naidu,Y.,** Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1994. **30**: 535-546.
167. **Vandermeulen,G., Daugimont,L., Richiardi,H., Vanderhaeghen,M.L., Lecouturier,N., Ucakar,B., and Preat,V.,** Effect of tape stripping and adjuvants on immune response after intradermal DNA electroporation. *Pharm.Res.* 2009. **26**: 1745-1751.
168. **Fukunaga,A., Khaskhely,N.M., Sreevidya,C.S., Byrne,S.N., and Ullrich,S.E.,** Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J.Immunol.* 2008. **180**: 3057-3064.
169. **Caux,C., zutter-Dambuyant,C., Schmitt,D., and Banchereau,J.,** GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992. **360**: 258-261.
170. **Araki,M., Imafuku,S., Furue,M., Shimada,S., and Tamaki,K.,** Activation pattern of Langerhans cells in the afferent and efferent phases of contact hypersensitivity. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1999. **4**: 164-168.
171. **van den Berg,J.H., Nuijen,B., Beijnen,J.H., Vincent,A., van,T.H., Kluge,J., Woerdeman,L.A., Hennink,W.E., Storm,G., Schumacher,T.N., and Haanen,J.B.,** Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum.Gene Ther.* 2009. **20**: 181-189.
172. **Combadiere,B. and Mahe,B.,** Particle-based vaccines for transcutaneous vaccination. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 2008. **31**: 293-315.

173. **Fan,H., Lin,Q., Morrissey,G.R., and Khavari,P.A.,** Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat.Biotechnol.* 1999. **17**: 870-872.
174. **Shi,Z., Zeng,M., Yang,G., Siegel,F., Cain,L.J., van Kampen,K.R., Elmets,C.A., and Tang,D.C.,** Protection against tetanus by needle-free inoculation of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous vaccines. *J.Virol.* 2001. **75**: 11474-11482.
175. **Mitsui,H., Watanabe,T., Saeki,H., Mori,K., Fujita,H., Tada,Y., Asahina,A., Nakamura,K., and Tamaki,K.,** Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J.Invest Dermatol.* 2004. **122**: 95-102.
176. **Moresi,J.M. and Horn,T.D.,** Distribution of Langerhans cells in human hair follicle. *J.Cutan.Pathol.* 1997. **24**: 636-640.
177. **Thomas,J.A., Biggerstaff,M., Sloane,J.P., and Easton,D.F.,** Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cells in normal human skin. *Histochem.J.* 1984. **16**: 507-519.
178. **PAS 71: Definition of Nanoparticles** , BSI 2008 (Accessed July 23, 2008 at <http://www.bsi-global.com/en/Standards-and-Publications/Industry-Sectors/Nanotechnologies/PAS-71/>).

7. Anhang

7.1. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Embryonale und fetale Entwicklung der Epidermis.....	4
Abb. 2: Darstellung von Langerhanszellen.....	8
Abb. 3: Antigenpräsentation und Aktivierung von T-/B-Zellen durch DZ.....	11
Abb. 4: Migration von Langerhanszellen.....	13
Abb. 5: Zeitliche Entwicklung des Haarfollikels.....	15
Abb. 6: Schematische Darstellung des anagenen Haarfollikels.....	18
Abb. 7: Hauptpenetrationswege durch die Haut.....	19
Abb. 8: CSSS - Durchführung.....	27
Abb. 9: FACS - Analyse.....	31
Abb. 10: Beispielhaftes Dot-Plot-Diagramm und Histogramm.....	32
Abb. 11: Partikelpenetration: PS 121 nm und PS 222 nm im Vergleich.....	34
Abb. 12: Penetration der 121 nm und 222 nm PS-Partikel in menschliche Haarfollikel.....	35
Abb. 13: Partikelpenetration: PS 123_p24 nm und PS 241_p24 nm im Vergleich.....	36
Abb. 14: Penetrationsaufnahmen von PS 123_p24 nm und PS 241_p24 nm.....	37
Abb. 15: Partikelpenetration: PS 157 nm und PLA 167_p24 nm im Vergleich.....	39
Abb. 16: Bilder der folliculären Penetration (PLA 157 nm, PLA 167_p24 nm).....	40
Abb. 17: Partikelpenetration: PS 202 nm und PLA 230_p24 nm im Vergleich.....	41
Abb. 18: Beispiele für die folliculäre Penetration von > 200 nm PLA-Partikel.....	42
Abb. 19: Zusammenfassung der folliculären Partikelpenetration.....	43
Abb. 20: Beispiele für in-vitro-Aufnahme verschiedener Partikeltypen.....	45
Abb. 21: Aufnahme der > 200 nm PS-Partikel durch LZ an exzidierte Haut.....	47
Abb. 22: Aufnahme der < 200 nm PS-Partikel durch LZ an exzidierte Haut.....	48
Abb. 23: Zusammenfassung der Partikelaufnahme durch LZ.....	49
Abb. 24: Aufnahme PLA-Partikel durch LZ an exzidierte Haut.....	50
Abb. 25: Aufnahme der > 200 nm PS-Partikel durch KZ an exzidierte Haut.....	52
Abb. 26: Aufnahme der < 200 nm PS-Partikel durch KZ an exzidierte Haut.....	53
Abb. 27: Aktivierungsmessungen an LZ mit CD80 und p24-PS/PLA-Partikeln.....	55

Abb. 28: Aktivierungsmessungen an LZ mit CD83 und p24-PS/PLA-Partikeln.....	56
Abb. 29: Zusammenfassung der Aktivierungsmessungen.....	58
Abb. 30: Aufnahmeuntersuchungen mit verschiedenen Inkubationszeiten.....	65
Tab. 1a: PLA-Partikel Daten.....	23
Tab. 1b: PS-Partikel Daten.....	24
Tab. 2: Antikörper und MACS-Separationskit.....	24
Tab. 3: Verwendete Chemikalien.....	25
Tab. 4: Geräte.....	26
Tab. 5: Partikeltypen für die Aufnahmeuntersuchungen.....	46
Tab. 6: Partikeltypen für die Aktivierungsuntersuchungen.....	54
Tab. 7: Aktivierungsmessung mit CD83: prozentuale Ergebnisse.....	57

7.2. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
CCR7	CC-Chemokinrezeptor 7
CD	Cluster of Differentiation
CSSS	Cyanoacrylate Skin Surface Stripping
DDZ	Dermale Dendritische Zelle (n)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fetal calf serum (foetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunden
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KZ	Keratinozyten
LZ	Langerhans Zelle(n)
MACS	Magnetic-activated Cell Sorting
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
ml	Milliliter
n	Anzahl der Versuche

p24	p24-core protein des HI-Virus
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyde
PLA	Polylactic Acid
PLA 157	Polylactid Acid Partikel mit einer Größe von 157 nm
PLA 167_p24	Polylactid Acid Partikel mit einer Größe von 167 nm, beschichtet mit dem p24-Antigen
PLA 202	Polylactid Acid Partikel mit einer Größe von 202 nm
PLA 230_p24	Polylactid Acid Partikel mit einer Größe von 167 nm, beschichtet mit dem p24-Antigen
PLA 215_p24	Polylactid Acid Partikel mit einer Größe von 215 nm, beschichtet mit dem p24-Antigen
PS	Polystyrol
PS 121	Polystyrol Partikel mit einer Größe von 121 nm
PS 123_p24	Polystyrol Partikel mit einer Größe von 123 nm, beschichtet mit dem p24-Antigen
PS 222	Polystyrol Partikel mit einer Größe von 222 nm
PS 241_p24	Polystyrol Partikel mit einer Größe von 241 nm, beschichtet mit dem p24-Antigen
PS 255_p24	Polystyrol Partikel mit einer Größe von 255 nm, beschichtet mit dem p24-Antigen
SSC	Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	unter anderem
vergl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Erklärung

Ich, Sarah Emely Amselgruber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Nanopartikel als Trägersysteme für transepidermale Vakzinierung -
Zielgerichteter Transport von Antigenen über die Hautbarriere“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,

ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer

Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 05.09. 2011

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich recht herzlich bei Frau Professor Dr. med. U. Blume-Peytavi für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit an der dermatologischen Klinik der Charité zu promovieren, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. F. Rancan für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und ihr großes Entgegenkommen, jederzeitig mit Ratschlägen und Anregungen helfend einzugreifen und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beizutragen.

An gleicher Stelle gebührt mein Dank auch Frau Dr. A. Vogt für ihren profunden fachlichen Rat zu Beginn dieser Dissertation.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau S. Hadam bedanken, die mir immer mit Rat und Tat und viel Humor bei der Laborarbeit zur Seite stand und mir somit eine große Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit war.

Weiterhin danke ich der Abteilung für Plastisch-Ästhetische Chirurgie der Asklepios Klinik Birkenwerder für die Bereitstellung der Hautpräparate.

Ich danke allen Mitarbeitern des CRC und CCP für die freundliche Aufnahme am Institut, allen voran Frau H. Thomas.

Zuletzt und aus tiefsten Herzen danke ich meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich jederzeit mit vollstem Vertrauen unterstützt haben.

