

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

DISSERTATION

Charakterisierung hautphysiologischer, lokal inflammatorischer und  
penetrationsdynamischer Parameter nach milder  
Hautbarriereschädigung -  
Praktische Bedeutung für transkutane Vakzinierungsstrategien

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lina Weiß  
aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Rancan F, Afraz Z, Hadam S, Weiß L, Perrin H, Kliche A, Schrade P, Bachmann S, Schäfer-Korting M, Blume-Peytavi U, Wagner R, Combadière B, Vogt A. **Topically applied virus-like particles containing HIV-1 Pr55gag protein reach skin antigen- presenting cells after mild skin barrier disruption.** Journal of Controlled Release. 2017.

Hierbei wurden Teile der in dieser Arbeit wiedergegebenen RT-qPCR Ergebnisse von topisch aufgetragenen VLPs auf mit CSSS bearbeitete Haut im Supplemental Material verwendet. Diese sind in Tabelle 2 dieser Arbeit integriert.

Pfannes EKB, Weiss L, Hadam S, Gonnet J, Combadière B, Blume-Peytavi U, Vogt A. **Physiological and Molecular Effects of in vivo and ex vivo Mild Skin Barrier Disruption.** Skin Physiology and Pharmacology. 2018.

Die oben genannte Publikation enthält in der folgenden Arbeit dargestellte Untersuchungen zur Hautphysiologie nach physikalischer Barrierschädigung sowie Untersuchungen von Sebutape Material, ebenso wie Teile der RT-qPCR Untersuchungen. Der Fokus der Publikation lag auf den Effekten von CSSS, der Effekt von Impfstoff wurde nicht betrachtet. Die folgende Arbeit stellt eine Erweiterung der in dieser Veröffentlichung dargestellten Untersuchungen dar. Teile dieser Ergebnisse finden sich in den Abbildungen 4, 6A sowie der Tabelle 1 der folgenden Arbeit wieder.

Gonnet J, Poncelet L, Meriaux C, Gonçalves E, Weiss L, Tchitchek N, Pedruzzi E, Soria A, Boccara D, Vogt A, Bonduelle O, Hamm G, Ait-Belkacem R, Stauber J, Fournier I, Wisztorski M, Combadiere B. **Mechanisms of innate events during skin reaction following intradermal injection of seasonal influenza vaccine.** Journal of Proteomics. 2020.

Die hier durchgeführten RT-qPCR Versuche waren Grundlage für einen Teil der Untersuchungen in oben genannter Publikation. Erste Testproben mit intradermal injiziertem Impfstoff wurden mit den in der folgenden Arbeit präsentierten Proben nach transkutaner Impfstoffauftragung untersucht und auch verglichen.

<b>1</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>10</b>
5.1	<b>HAUT ALS ZIELORGAN FÜR IMPFUNGEN</b>	<b>10</b>
5.2	<b>HAUT ALS BARRIERE</b>	<b>12</b>
5.2.1	<u>EIGENSCHAFTEN UND ROLLE EINER INTAKTEN HAUTBARRIERE</u>	12
5.2.2	<u>PHYSIOLOGIE EINER INTAKTEN HAUTBARRIERE</u>	13
5.2.3	<u>PENETRATIONSEIGENSCHAFTEN INTAKTER HAUT</u>	14
5.2.4	<u>BARRIERESCHÄDIGUNG UND IHR EINFLUSS AUF DIE HAUT</u>	15
5.2.5	<u>IMIQUIMOD UND SEINE WIRKUNG</u>	17
5.3	<b>HAUT ALS IMMUNKOMPETENTES ORGAN</b>	<b>18</b>
5.3.1	<u>IMMUNOLOGISCHE REAKTIONEN AUF BARRIERESCHÄDIGUNG</u>	19
5.4	<b>INFLUENZA: EIGENSCHAFTEN UND BEDEUTUNG FÜR DEN MENSCHEN</b>	<b>21</b>
5.5	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>24</b>
6.1	<b>VERSUCHSABLAUF TEIL 1</b>	<b>24</b>
6.1.1	<u>HAUTPROBEN</u>	25
6.1.2	<u>VORBEREITUNG DER HAUTPROBEN</u>	25
6.1.3	<u>HAUTBEHANDLUNG UND INKUBATION</u>	26
6.1.4	<u>PROTEINEXTRAKTION AUS ABRISSTAPES</u>	31
6.1.5	<u>PROTEINANALYSEN AUS SEBUTAPE-ABRISSEN</u>	31
6.1.6	<u>PROTEINANALYSEN AUS CSSS-ABRISSEN</u>	31
6.1.7	<u>GESAMTEPIDERMIS ANALYSEN</u>	32
6.1.8	<u>IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG</u>	33
6.2	<b>VERSUCHSABLAUF TEIL 2</b>	<b>36</b>
6.2.1	<u>HAUTPROBEN</u>	36
6.2.2	<u>VORBEREITUNG DER HAUTPROBEN</u>	36
6.2.3	<u>BEHANDLUNG DER HAUT UND INKUBATION</u>	37
6.2.4	<u>GEWINNUNG HUMANER HAUTZELLSUSPENSIONEN</u>	38
6.2.5	<u>RNA-EXTRAKTION UND QRT-PCR</u>	39
6.2.6	ANALYSE	40
6.3	<b>STATISTISCHE ANALYSE</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>41</b>
7.1	<b>HAUTPHYSIOLOGISCHE EVALUATION</b>	<b>41</b>
7.1.1	<u>PHYSIKALISCHE SCHÄDIGUNG</u>	41
7.1.2	<u>CHEMISCHE SCHÄDIGUNG</u>	43
7.2	<b>LOKAL INFLAMMATORISCHE EFFEKTE</b>	<b>46</b>
7.2.1	<u>ZYTKINBESTIMMUNG AUS SEBUTAPE-ABRISSEN</u>	46

7.2.2	<u>CHEMOKIN ARRAY ANALYSEN AUS DIAGNOSTISCHEN CSSS-ABRISSEN</u>	47
7.2.3	<u>ZYTKINBESTIMMUNG AUS GESAMTEPIDERMIS</u>	49
7.2.4	<u>RT-QPCR ANALYSEN DER EPIDERMIS</u>	53
<b>7.3</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER IMPFSTOFFPENETRATION</b>	<b>59</b>
7.3.1	<u>IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN VON KRYOSCHNITTEN</u>	59
7.3.2	<u>H1N1- IMPFSTOFFQUANTIFIZIERUNG AUS DIAGNOSTISCHEN_CSSS-ABRISSEN</u>	64
7.3.3	<u>H1N1-IMPSTOFFQUANTIFIZIERUNG AUS GESAMTEPIDERMIS</u>	65
<b>8</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>67</b>
<b>8.1</b>	<b>HAUTPHYSIOLOGISCHE EVALUATION</b>	<b>67</b>
8.1.1	<u>PHYSIKALISCHE BARRIERESTÖRUNG</u>	67
8.1.2	<u>CHEMISCHE BARRIERESTÖRUNG</u>	68
<b>8.2</b>	<b>LOKAL INFLAMMATORISCHE ÄNDERUNGEN</b>	<b>70</b>
8.2.1	<u>ZYTKINBESTIMMUNG AUS SEBUTAPE-ABRISSEN</u>	70
8.2.2	<u>CHEMOKIN ARRAY ANALYSEN AUS DIAGNOSTISCHEN CSSS-ABRISSEN</u>	72
8.2.3	<u>ZYTKINBESTIMMUNG AUS GESAMTEPIDERMIS</u>	73
<b>8.3</b>	<b>RT-QPCR ANALYSEN DES EPIDERMALEN INFLAMMATORISCHEN MILIEUS</b>	<b>75</b>
<b>8.4</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER IMPFSTOFFPENETRATION</b>	<b>81</b>
8.4.1	<u>IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN VON KRYOSCHNITTEN</u>	82
8.4.2	<u>H1N1-IMPSTOFFQUANTIFIZIERUNG AUS EPIDERMALEM GEWEBEMATERIAL</u>	82
<b>8.5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
8.5.1	<u>PHYSIKALISCHE BARRIERESCHÄDIGUNG</u>	86
8.5.2	<u>CHEMISCHE BARRIERESCHÄDIGUNG</u>	87
<b>8.6</b>	<b>ALLGEMEINE LIMITATIONEN DES VERSUCHSAUFBAUS</b>	<b>88</b>
<b>8.7</b>	<b>ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b><u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u></b>	<b>106</b>
<b>11</b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b>109</b>
<b>12</b>	<b><u>PUBLIKATIONS LISTE</u></b>	<b>111</b>
<b>13</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>112</b>

## 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

CCL: CC Chemokine Ligand

CCR: CC Chemokine Receptor

CXCL: CXC Chemokine Ligand

CX3CL: CX3C Chemokine Ligand

CSSS: Cyanoacrylate Skin Surface Stripping

DC: Dendritic Cells

GM-CSF: Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor

IFN: Interferon

IL: Interleukin

IP: Interferon Gamma Induced Protein

LC: Langerhans Cells

RT-qPCR: Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction

SC: Stratum Corneum

SLS: Sodium Lauryl Sulfate

TEWL: Transepidermal Waterloss

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TS: Tape Stripping

Ra: Rezeptorantagonist

VLP: Virus Like Particles

## 2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

<b>Abbildung 1:</b> Illustration relevanter Aspekte transkutaner Vakzinierung, welche im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden: Barrierestörung, Penetration und lokal kutane Immunreaktion.	<b>11</b>
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Übersicht über Versuchsteil 1.	<b>35</b>
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Übersicht über Versuchsteil 2.	<b>37</b>
<b>Abbildung 4:</b> Übersicht über die Ergebnisse hautphysiologischer Messungen vor sowie 24 und 48 Stunden nach physikalischer Schädigung.	<b>42</b>
<b>Abbildung 5:</b> Ergebnisse der hautphysiologischen Messungen nach chemischer Barrierschädigung mit 2% SLS und Imiquimod, dargestellt im Vergleich zu einer Okklusionskontrolle.	<b>44</b>
<b>Abbildung 6:</b> IL-1alpha Menge normalisiert auf Gesamtprotein, bestimmt aus Sebutape-Abrissen.	<b>47</b>
<b>Abbildung 7:</b> Semiquantitative Bestimmung von 31 Chemokinen im CSSS-Abriss Material von physikalisch geschädigter Haut.	<b>48</b>
<b>Abbildung 8:</b> Quantifizierung von IL-6 aus Gesamtepidermis Material.	<b>51</b>
<b>Abbildung 9:</b> Quantifizierung von IL-8 aus Gesamtepidermis Material.	<b>53</b>
<b>Abbildung 10:</b> Anti-CD1a Färbung.	<b>60</b>
<b>Abbildung 11:</b> Anzahl ausgezählter CD1a markierter Zellen, entsprechend Langerhans-Zellen in Epidermis und Dermis.	<b>61</b>
<b>Abbildung 12:</b> Anti-H1N1 Färbung.	<b>63</b>

## 3 TABELLENVERZEICHNIS

---

<b>Tabelle 1:</b> $\Delta\Delta$ Ct-Werte nach CSSS mit und ohne Vaxigrip®.	<b>55</b>
<b>Tabelle 2:</b> $\Delta\Delta$ Ct-Werte nach CSSS mit und ohne VLP.	<b>57</b>
<b>Tabelle 3:</b> Absolute H1N1 Menge aus Diagnostischem CSSS.	<b>64</b>
<b>Tabelle 4:</b> Absolute H1N1 Menge aus Gesamtepidermis.	<b>65</b>

#### 4 ABSTRACT

---

Einleitung: Transkutane Vakzinierung ist seit einigen Jahren im Fokus tiefergehender Forschung. Die in diesem Zusammenhang vielfach genutzten nadelfreien Impfmethode n erlauben es Probleme, die mit konventioneller Impfung einhergehen, zu umgehen. Gleichzeitig zeigten sich in Versuchen verschiedener Autoren vielversprechende Ergebnisse die immunologische Effektivität betreffend, darunter eine bevorzugte Induktion zellulärer Immunantworten. Es ergaben sich zudem Hinweise darauf, dass Penetrationsförderung und immunaktivierende Effekte wichtige Komponenten für die Entwicklung möglichst effektiver transkutaner Impfsysteme sind. Ob hierzu physikalische, chemische, bzw. biochemische Stimuli geeignet sind, ist bislang wenig bekannt.

Methodik: Basierend auf vorangegangenen klinischen Studien mit Verwendung von Vorbehandlungsmethoden der Haut bei transkutaner Impfung, wurden in dieser Arbeit die Effekte physikalischer und chemischer Methoden zur Barrierschädigung in Kombination mit topischer Auftragung eines Influenza-Impfstoffes untersucht. Hierbei wurden drei Schwerpunkte gesetzt: Es wurden hautphysiologische Parameter bestimmt, um das Ausmaß der durch die verwendeten Schädigungsmethoden ausgelösten Barriestörung zu evaluieren. Weitergehend wurde das reaktive inflammatorische Milieu der Epidermis mit verschiedenen ELISA sowie Array Analysen untersucht. Eine detailliertere Untersuchung durch RT-qPCR wurde für die Methode des Cyanoacrylat Skin Surface Strippings (CSSS) durchgeführt. Abschließend wurde mit Hilfe von histologischen Färbungen sowie unterschiedlichen ELISA der Einfluss der Schädigungsmethoden auf die Penetration des aufgetragenen Impfstoffes untersucht.

Ergebnisse: Für die physikalischen Schädigungsmethoden zeigte sich ein geringfügiger Einfluss auf die Hautphysiologie. Die Evaluation verschiedener Inflammationsmarker ergab jedoch Hinweise auf eine durch Tape Stripping erzeugte Stimulation von IL-1alpha, und Array Analysen deuteten auf eine vermehrte Immunreaktion des Gewebes nach Vorbehandlung mit CSSS im Vergleich zu Tape Stripping hin. RT-qPCR wies auf eine vermehrte Genexpression mehrerer proinflammatorischer Moleküle nach CSSS und CSSS mit gleichzeitiger Impfstoffauftragung hin.

Im Falle der chemischen Schädigungsarten zeigte sich ein milder Effekt auf die Hautphysiologie nach Okklusion von Wasser, ebenso wie von Imiquimod und Hinweise auf starke Störung der Hautbarriere durch 2% SLS unter Okklusion. Okklusion allein, sowie von Imiquimod zeigten einen stimulierenden Effekt auf IL-1alpha. Die Penetration zeigte sich durch Okklusion von SLS gesteigert.

Diskussion: Tape Stripping und CSSS zeigten sich als Methoden milder Barrierschädigung, welche trotz lediglich geringer Störung der Hautintegrität die Penetration von topisch appliziertem

Impfstoff zu fördern schienen. CSSS zeigte sich darüber hinaus als starker Immunstimulus, welcher eine vielseitige Immunantwort in Kombination mit topischer Impfstoffauftragung auslöste.

Alle untersuchten chemischen Schädigungsmethoden zeigten Hinweise auf eine vermehrte Durchlässigkeit der Hautbarriere, wobei SLS eine vergleichsweise sehr starke Schädigung auslöste. Okklusion allein und mit Imiquimod erwiesen sich als immunstimulatorisch und teilweise penetrationsfördernd, was sie vielversprechend für weitere Untersuchungen macht.

### **English:**

Introduction: Transcutaneous vaccination strategies have been in the focus of research for several years. Amongst these, needle-free vaccination methods avoid many challenges associated with conventional vaccination. Concomitantly, overall efficacy for various different approaches has been shown by other authors with delivery via the cutaneous route favoring the induction of cellular immune responses. Furthermore, an increase in penetration and immune activation have been discovered to be significant aspects in transcutaneous vaccination. Whether physical, chemical or biochemical stimuli are able to procure this is has not been thoroughly investigated.

Methods: Based on clinical studies using skin surface treatment in transcutaneous vaccination this project analysed the effects of physical and chemical skin barrier disruption in combination with topical vaccine application. Firstly, skin-physiological parameters were analysed to determine the degree of barrier disturbance by the disruption methods. Secondly, the inflammatory milieu of the epidermis was investigated with ELISA and Array analyses and a more detailed investigation using RT-qPCR was conducted for Cyanoacrylat Skin Surface Stripping (CSSS). Finally, the influence of skin barrier disruption on the penetration of topically applied vaccine was analysed using histological staining and ELISA.

Results: For physical disruption no persistent impairment of the skin physiology was found. The evaluation of different inflammation markers however showed signs of IL-1alpha stimulation after tape stripping, and array analyses indicated increased immune response to CSSS compared to tape stripping. RT-qPCR uncovered an increased gene-expression of various pro-inflammatory molecules after CSSS and CSSS combined with topical vaccine application.

In regard to the chemical disruption methods, occlusion of water and imiquimod indicated a mild effect on skin physiology, while more severe disruption was seen after 2 % SLS occlusion. Occlusion with water and imiquimod also showed a stimulating effect on the excretion of IL-1alpha. Penetration was increased following occlusion of SLS.

Discussion: Tape stripping and CSSS seemed to result in improved penetration of topically applied vaccine despite only causing mild and temporary skin barrier impairment. Furthermore, CSSS has shown itself to be an efficient immune-stimulus, causing a diverse immune response in combination with topical application of vaccine.

All investigated chemical methods of skin barrier disruption indicated an increased permeability of the skin barrier, with SLS causing a comparably severe perturbation. Occlusion by itself and in combination with imiquimod has been illustrated to be immune stimulating as well as penetration enhancing, making them promising methods for further investigation.

## 5 EINLEITUNG

---

### 5.1 HAUT ALS ZIELORGAN FÜR IMPFUNGEN

Eine wichtige Errungenschaft der Medizin ist der Prozess der Impfung. Der Mensch hat es dabei geschafft, sich die Reaktionen des Immunsystems auf Pathogene zunutze zu machen, um sich vor Infektionen zu schützen. Dies hat die Mortalität bestimmter Krankheiten stark reduziert. Die meisten Impfungen werden heutzutage immer noch mit Hilfe einer Nadel durchgeführt, was gewisse Risiken mit sich bringt. Gerade in Entwicklungsländern, wo die Inzidenz von Infektionskrankheiten besonders groß ist, kommt es aus Kostengründen häufig zur Wiederverwendung von Nadeln und zu ihrer unsachgemäßen Entsorgung. Dies kann die Übertragung schwerwiegender Infektionen wie Hepatitis B und C und auch HIV zur Folge haben. Darüber hinaus treten bei Mitarbeitern des Gesundheitssektors weltweit immer wieder Nadelstichverletzungen auf, welche für die Betroffenen nicht nur ein Infektionsrisiko, sondern auch eine emotionale Belastung darstellen. Es ist darüber hinaus nicht zu unterschätzen, wie viele Menschen unter einer Nadelphobie leiden und dass Impfungen für sie einen großen Stressfaktor darstellen [1]. Nadelfreie Impfverfahren stehen deshalb immer mehr im Fokus der Entwicklung und Forschung. Sie bieten auch den Vorteil zeiteffizient viele Menschen zu Impfen [2]. In Zeiten wachsender Globalisierung und vermehrter militärischer Konflikte, welche mit erhöhter Flüchtlingsmobilität einhergehen, ist dies von steigender Relevanz.

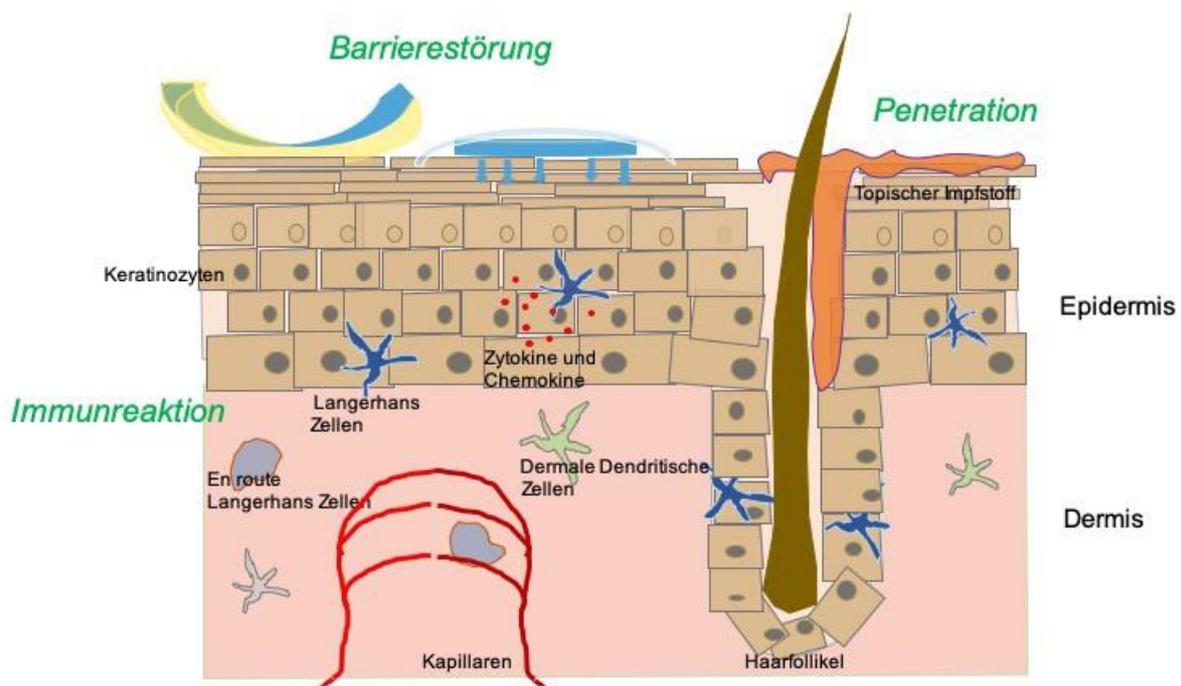
Es gibt eine wachsende Anzahl an Methoden, welche zum Ziel haben eine gute Balance zwischen Überwindung der Hautbarriere, optimaler Penetration der Wirkstoffe, sowie Einbeziehung des lokalen Immunsystems zu finden, mit unterschiedlich vielversprechenden Ergebnissen. Viele der Ansätze basieren dabei auf der Aktivierung der natürlichen Immunfunktion der Haut, welche im Folgenden näher beschrieben wird. Je nachdem wie invasiv hierbei das Verfahren zur Überwindung der Hautbarriere ist, werden die epidermalen, dermalen oder hypodermalen Immunzellen angesprochen [3]. Bedeutsam für eine Immunantwort ist jedoch ebenfalls eine vermehrte Penetration der Wirkstoffe, wofür verschiedene Ansätze zur Verfügung stehen [3].

Combadière et al. beschreiben drei Generationen von sog. transkutaner Vakzinierung. Anfänglich wurden die Möglichkeiten von Adsorption und Penetration lipophiler Substanzen genutzt, gefolgt von Verfahren, welche die Penetration der Wirkstoffe forcieren, sie werden also mehr oder weniger durch die oberste Hautschicht gedrängt. Verfahren der dritten Generation nutzen chemische, physikalische oder mechanische Schädigung um die Durchlässigkeit des Stratum corneum (SC) zu steigern und damit Impfstoffen die Penetration zu erleichtern [1, 3]. Dabei wurden unter anderem Verfahren wie Tape Stripping und Cyanoacrylat Skin Surface Stripping

(CSSS) erfolgreich verwendet [3-6]. Diese Verfahren scheinen ausserdem die Aktivierung des kutanen Immunsystems durch die Bildung bestimmter Zytokine zu fördern [7-9].

Die Distribution von Impfstoff in die Haut weist einige Vorteile gegenüber intramuskulärer Injektionen auf. Im Gegensatz zum Muskel residiert eine größere Anzahl immunkompetenter Zellen in der Haut und es besteht die Möglichkeit der direkten Drainage von Partikeln in die Lymphbahn [7]. Bei der Verabreichung von Impfstoff intradermal wurde in zahlreichen Studien festgestellt, dass die dermal erzeugte Immunantwort im Sinne eines Schutzes, den intramuskulären Injektionen in nichts nachstehen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass bei diesen Ansätzen eine kleinere Impfstoffmenge notwendig ist [3, 7]. Transkutane Impfansätze basierend auf Tape Stripping und CSSS führen sowohl zu einer humoralen als auch mukosalen Immunantwort, was in Tiermodellen und einer Vielzahl präklinischer und klinischer Studien im Menschen demonstriert werden konnte. In besonderem Maße kam es dabei allerdings auch zu einer Förderung von zellulären, speziell CD8+ T-Zellantworten, was diese Art der Impfstoffapplikation sehr attraktiv für die Entwicklung von Vakzinen gegen intrazelluläre Erreger oder auch Tumorerkrankungen macht [2, 4, 6, 10]. Darüber hinaus sind diese Impfvverfahren wenig invasiv, nicht schmerzhaft und somit von Patienten meist gut toleriert [4, 11].

Die relevanten Aspekte dieser Art transkutaner Vakzinierung, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind in Abbildung 1 zusammengefasst. Im Folgenden soll auf Aspekte, wie die Hautbarriere, das kutane Immunsystem und verschiedene Methoden zur Hautbarrierestörung im Detail eingegangen werden.



*Abbildung 1 Illustration relevanter Aspekte transkutaner Vakzinierung, welche im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden: Barrierestörung, Penetration und lokal kutane Immunreaktion.*

## **5.2 HAUT ALS BARRIERE**

Die Haut als das größte Organ des menschlichen Körpers erfüllt viele Funktionen. Diese reichen von Schutz gegen äußere Einflüsse, über Exkretion, Absorption und Thermoregulation, bis hin zur Hormonproduktion und Immunabwehr [12]. Verschiedene Hautabschnitte und -zellen sind dabei für die unterschiedlichen Eigenschaften verantwortlich [13].

### **5.2.1 Eigenschaften und Rolle einer intakten Hautbarriere**

Generell wird die Haut in verschiedene Teilabschnitte unterteilt, das SC, die viable Epidermis, die vaskularisierte Dermis sowie die Subkutis. Die Hautbarriere hat dabei mehrere Funktionen. Obwohl das SC als oberste Hautschicht einen wesentlichen Teil der Hautbarriere ausmacht, spielen die Zell-Zell-Kontakte in der darunterliegenden Epidermis ebenfalls eine wichtige Rolle; zum einen, weil die Hornschichten direkte Differenzierungsprodukte der darunterliegenden Keratinozyten sind, aber auch weil enzymatische Ausstattung, Lipidmatrices und nicht zuletzt Zell-Kontakt wie die sog. subkornealen Tight Junctions wesentlich an Aufbau und Dynamik der Barriere beteiligt sind [12, 13]. Die zwei prinzipiell wichtigsten Funktionen der Hautbarriere sind Schutz vor schädlichen eindringenden Noxen einerseits und Verlust körpereigener Substanzen andererseits [12]. Diese Prozesse sind essentiell, um das physiologische Milieu im Körper und damit die lebenswichtigen biochemischen und physikalischen Prozesse aufrechtzuerhalten.

Der Hauptbestandteil des SC sind die proteinreichen, zellkernlosen Korneozyten als Produkte der terminalen Differenzierung der Epidermis. Sie sind untereinander durch Corneodesmosomen verbunden und in eine komplexe lipidreiche Extrazellulärmatrix eingebettet. Diese die Zellen umgebende Matrix stellt eine Art Versiegelung dar und lässt sich in eine Zell- und eine Fettversiegelung unterteilen, wobei die Zell-Versiegelung aus einer Protein-Fett-Struktur besteht, welche direkt unter der Zellmembran liegt. Die Fettversiegelung verbindet die hydrophile polare Zell-Versiegelung inkl. Korneozyten mit der lipophilen unpolaren Lipidschicht im Interzellularraum [13-15]. Die im SC hauptsächlich vertretenen Lipidklassen sind Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol [13, 16].

Zur primären Abwehr von Bakterien und anderen infektiösen Erregern bieten die den Großteil der Epidermis ausmachenden Keratinozyten einen ersten Schutz, indem sie gespeicherte Zytokine freisetzen [12]. Dies passiert vor allem als Reaktion auf Störung der Hautoberflächenkontinuität [17]. Des Weiteren bieten Lipide, Säuren Enzyme und anti-mikrobielle Peptide u.a. , einen biochemischen Schutz vor Krankheitserregern [13].

Als Schutz vor penetrierenden Substanzen spielen die Korneozyten und die bilamellären Lipide welche sie umgeben, eine große Rolle. Ihre biochemischen Eigenschaften bestimmen welche Verbindungen zu welchem Ausmaß die Hautbarriere passieren können [12, 14, 16].

Die Vermeidung bzw. Minimierung von Wasserverlust wird durch die den Korneozyten anliegende Lipidmembran sichergestellt, ebenso wie durch die Elektrolytgradienten innerhalb der vitalen Epidermis [12].

### **5.2.2 Physiologie einer intakten Hautbarriere**

Für die Untersuchung zahlreicher Krankheiten sowie der Wirkung von Pharmaka und Kosmetika spielt die Einschätzung der Intaktheit der Hautbarriere eine wichtige Rolle. Nach mehreren Studien sind Autoren sich einig, dass es keinen einzelnen Parameter gibt um die Hautbarriere zuverlässig zu charakterisieren, sondern dass vielmehr mehrere Parameter untersucht werden müssen. Dies bezieht sich allem voran auf nicht invasive in vivo Messungen [12].

Einer der am häufigsten verwendeten Parameter zur Beurteilung der Hautbarriere ist der „transepidermale Wasserverlust“ (TEWL), als Indikator für die Menge an Wasser, welche durch Verdunstung aus der Haut entweicht. Bei erkrankter oder physikalisch geschädigter Haut ist häufig ein vergleichsweise erhöhter TEWL-Wert festzustellen [12, 18]. In gesunder Haut ist dieser Wert meist niedrig. Es gibt keinen spezifischen „Normwert“, da dieser von Faktoren wie Körperregion, Umgebungstemperatur u.ä. abhängt. Durchschnittswerte schwanken zwischen 2,3 g/m<sup>2</sup>/h in der Brustregion, 15,4 g/m<sup>2</sup>/h in der Wangenregion und 44 g/m<sup>2</sup>/h in der Axilla. Eine vergleichende TEWL-Messung sollte daher immer eine individuelle Referenzwert-Bestimmung vor Durchführung etwaiger Manipulationen beinhalten [19]. In diesem Kontext ist zu bemerken, dass es verschiedene technische Möglichkeiten gibt den TEWL zu bestimmen und dass die Ergebnisse verschiedener Messgeräte schlecht miteinander vergleichbar sind [20]. Darüber hinaus sind TEWL Messgeräte oft sehr empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen und sollten möglichst unter standardisierten Bedingungen benutzt werden. Ausführliche Richtlinien für die Messungen stehen in der Literatur zur Verfügung. Zu beachten ist u.a. die Durchführung der Messungen im selben Raum, bei vergleichbarer Raumtemperatur und Luftfeuchte sowie die Vermeidung von Luftbewegung durch das Öffnen von Türen u.ä. [21]. Weiterhin ist zu beachten, dass der TEWL lediglich die Durchlässigkeit der Hautbarriere von innen nach außen darstellt und nicht mit dem Eindringen von Stoffen aus der Umwelt in die Haut gleichzustellen ist. Man kann zwar Vermutungen anstellen und Rückschlüsse ziehen, um aber die Penetration von Stoffen durch das SC genau zu analysieren müssen weitere Verfahren, wie beispielsweise Tape-Abrisse, ergänzend verwendet werden [13].

Ein weiteres Verfahren zur Evaluation der Hautbarriere ist die Messung der Stratum corneum Hydratation. Hierbei wird die Wassermenge des SC indirekt durch die Impedanz, die Konduktanz oder die elektrische Kapazität gemessen, wobei die Impedanz, also der elektrische Hautwiderstand, am relevantesten für die Messung in vitalem Gewebe ist. Der Wassergehalt der Haut spielt eine große Rolle für die Permeabilität sowie die Elastizität und damit die

mechanischen Eigenschaften der Haut, ebenso wie für die biochemischen Prozesse. Ist die Hautbarriere geschädigt ist entsprechend oft ein reduzierter Wassergehalt des SC feststellbar [12, 22, 23]. In gesunder Haut ist das Verhältnis von TEWL zu SC Hydratation meist so, dass der TEWL gering und die SC Hydratation hoch ist, in geschädigter Haut ist dies häufig umgekehrt [12, 13, 24].

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Hautbarriere ist der Säureschutzmantel der Hautoberfläche. Der pH beeinflusst nicht nur die Durchlässigkeit der Haut, sondern auch zahlreiche biochemische und immunologische Funktionen. Eine weithin etablierte Methode zur Bestimmung des pH ist die Messung mit einer flachen Glaselektrode. Ebenso wie der TEWL wird der pH-Wert der Haut durch zahlreiche Faktoren sowohl endogen als auch exogen beeinflusst [12, 24, 25]. Diese Faktoren sind bei den Messungen unbedingt zu beachten und die Ergebnisse daher im Vergleich zueinander zu beurteilen.

Eine weitere bedeutende Größe zur Untersuchung der Hautbarriere ist der Sebumgehalt der Haut. Hautfette sind durch ihre Lipophilie ein starker Regulator für die Penetration verschiedener Stoffe in die Haut, ebenso wie für den Verlust von Molekülen, allem voran Wasser, aus der Haut [12]. Auch hier gibt es verschiedene Messansätze, wobei sich die photometrische Messung durchgesetzt hat [26]. Auf das genaue Prinzip dieser Messart wird im Methodenteil eingegangen.

### **5.2.3 Penetrationseigenschaften intakter Haut**

Die Möglichkeit der Penetration von Stoffen durch die Hautbarriere ist für zahlreiche Gebiete der Medizin interessant. Am augenscheinlichsten ist hierbei die Penetration von Wirkstoffen zur Behandlung von Hauterkrankungen.

Grundsätzlich können topisch applizierte Substanzen auf verschiedenen Wegen über die Hautbarriere gelangen. Während der intrazelluläre Weg durch die Lipidschichten und die Kerneozyten selbst führt, stellt der interzelluläre Weg für die meisten lipophilen Substanzen den bevorzugten Penetrationsweg dar [14, 27]. Limitationen bestehen darin, dass die Penetration ab einem Molekulargewicht von >500 Da deutlich eingeschränkt ist [16, 28, 29]. Auch die Penetration hydrophiler Moleküle ist eingeschränkt. In diesem Zusammenhang stellt die Möglichkeit der Penetration durch Hautanhangsgebilde, insbesondere Haarfollikel, einen wichtigen alternativen Penetrationsweg dar.

Heinrich et. al haben beschrieben, dass ein hoher Lipidgehalt von Cremes durch einen Okklusionseffekt die SC Hydratation steigern und somit Wirkstoffe vermehrt gelöst und in tiefere Schichten transportiert werden können. Dies kann jedoch auf Dauer auch negative Effekte haben, denn nach einer langen Anwendung solcher Produkte wurde eine Austrocknung der Haut beobachtet [15]. Penetrationsfördernde Stoffe wie Liposomen, eine Art Fetthülle, sind ebenfalls eine beliebte Form Wirkstoffe in die Haut einzubringen. Ihre Anwendung hat jedoch zur Folge,

dass die Hautbarriere teilweise gestört und daher vulnerabel gegenüber negativer Einflüsse wird [15]. Um die Penetration von Stoffen zu steigern ist eine, zumindest teilweise, Veränderung der Hautphysiologie und damit der Barriereeigenschaften jedoch fast nicht zu umgehen [30].

Barriereschädigende Einflüsse, wie bestimmte Chemikalien oder physikalische Noxen [15], können genutzt werden um die Penetration von Wirkstoffen zu erleichtern. Die Folgen dieser Schädigung der Hautbarriere sind durch die oben erwähnten Messmethoden nachvollzieh- und in einem bestimmten Ausmaß messbar [31].

#### **5.2.4 Barriereschädigung und ihr Einfluss auf die Haut**

Im Rahmen transkutaner Vakzinierung werden, wie oben beschrieben, verschiedene Methoden zur Erleichterung der Penetration durch Manipulation der Hautbarriere genutzt. Mit Bezug auf diese Arbeit soll daher auf einige ausgewählte Arten künstlich erzeugter Barriereschädigung näher eingegangen werden, sowohl chemischer als auch physikalischer Art.

##### *5.2.4.1 Chemische Schädigung durch SLS*

Natriumlaurylsulfat (SLS von engl. „sodium lauryl sulfate“) ist ein häufig verwendetes Tensid zur Schädigung der Hautbarriere. Es wird dafür in einer Okklusionskammer auf die Hautoberfläche aufgetragen, meistens auf einem Filterpapier, und für eine beliebige Zeit dort zum Einwirken belassen. Die Stärke der dadurch erzeugten Hautirritation hängt von der Konzentration der Lösung, der Applikationsfläche sowie der Einwirkdauer ab [24]. Zum einen führt SLS zu einer Änderung der Korneozytenproliferation und zu einem Umbau ihrer Intrazellulärmatrix [32]. Perkins et al. konnten weiterhin eine Ausschüttung bestimmter Zytokine nach einer einstündigen Anwendung von 20% SLS in gesunden Probanden feststellen [33]. Anstiege des TEWL sind bei Probanden bereits bei Konzentrationen von 2% über 6 Stunden [24] und 1% über 20 Minuten [34] festgestellt worden. Darüber hinaus wurde von einigen Autoren eine gesteigerte Durchlässigkeit der Hautbarriere gegenüber verschiedener Wirkstoffe beobachtet, wobei dies vor allem hydrophile Substanzen betraf. Hierbei wurde ein steigender Einfluss der SLS-Konzentration und der Einwirkzeit auf die Menge der penetrierten hydrophilen Wirkstoffe beobachtet [35].

##### *5.2.4.2 Physikalische Schädigung*

Neben der chemischen besteht die Möglichkeit der physikalischen Barrierestörung. Praktikable Verfahren sind dabei unter anderem Tape Stripping und CSSS. Auch wenn man bei der Anwendung dieser Verfahren sehr stark auf die Vergleichbarkeit der Durchführung achten muss, sind es kaum invasive, kostengünstige und wenig zeitintensive Verfahren, welche auch an Probanden in vivo durchgeführt werden können.

#### 5.2.4.2.1 Adhesive Tape Stripping

Bereits wenige Tesafilmabrisse können messbare Veränderungen hautphysiologischer Parameter induzieren [13, 34]. Tape Stripping ist dabei eine häufig verwendete Methode, um einen intendierten TEWL-Anstieg herbeizuführen. Der Grad der mechanischen Barrierestörung wurde in älteren Studien mit der Anzahl der Abrisse oder dem Auftreten eines Schimmerns auf dem behandelten Hautareal, was auf das Austreten von Gewebsflüssigkeit aus vitalen Zellen hinwies, charakterisiert [35]. In einem Großteil von Studien wurden mehrere Tape-Abrisse nacheinander durchgeführt, teilweise bis zur kompletten Entfernung des SC. Zur kompletten Entfernung des SC sind laut einiger Autoren zwischen 30 und 50 Abrisse nötig, wobei diese Anzahl bei manchen Individuen auch deutlich höher sein kann. Der entfernte Proteingehalt ist dabei nicht linear zur Anzahl der Abrisse und spielt eine wichtige Rolle, das Ausmaß der Barrierschädigung betreffend [16, 36, 37]. Verbunden damit wurde eine Steigerung der Penetration festgestellt, vor allem von hydrophilen und Stoffen mit höherem molekularem Gewicht als 500 Dalton [35]. Weiterhin ist beschrieben, dass bereits diese milde Barrierschädigung zur Aktivierung des Immunsystems führen kann [38].

Um den Prozess des Tape Strippings vergleichbar zu machen, haben einige Autoren mehrere Durchführungsbedingungen auf ihren Einfluss hin untersucht. Allen voran ist die anatomische Position von Bedeutung, verschiedene Körperregionen sind dabei unterschiedlich sensibel [21, 39]. Des Weiteren spielt die Zeit, in der Druck auf das Tape ausgeübt wird, eine große Rolle, ebenso wie die Methode des Druckaufbaus. Es wurde beobachtet, dass mit höherer Druckdauer eine größere Menge Protein des SC entfernt und begleitend ein schnellerer TEWL-Anstieg beobachtet werden kann [36]. Zur Vermeidung von Fältchen auf der Hautoberfläche wird die Verwendung einer Rolle empfohlen, um möglichst gleichmäßig Protein entfernen zu können. Darüber hinaus hängt die entfernte Proteinmenge von der Art des verwendeten Tapes ab, welche stets mit anzugeben ist [36, 40]. Löffler et al. zeigten weiterhin die Bedeutung der Art der Entfernung des Tapes auf. So wird bei schnellem Abreißen des Tapes weniger Hautmaterial mitgerissen als bei langsamen, da dort noch eine weitere Stresskomponente auf die Haut, nämlich Zug, ausgeübt wird [40]. Wie im Methodenteil gezeigt ist, wurde in dieser Arbeit auf Beachtung dieser Faktoren großen Wert gelegt.

#### 5.2.4.2.2 CSSS

Eine andere standardisierte Methode der nicht-invasiven physikalischen Barrierschädigung stellt das sog. Cyanoacrylat Surface Stripping (CSSS) dar. Mit Hilfe einer dünnen Schicht von Cyanoacrylatkleber werden nach Aushärten desselben, bis zu 30% des SC und zusätzlich auch Material aus Haarfollikelöffnungen entfernt [41]. Da es sich bei der Methode um ein ähnliches Prinzip wie bei Tape Stripping nur mit zusätzlicher Anwendung von Klebstoff handelt, ist es nicht

verwunderlich, dass bei einem CSSS die Barrierschädigung oft gravierender ist als bei Tape Stripping [42].

Während die Methode zum einen relevant für die Bestimmung von Penetration und Extraktion von Barrieremarkern ist, wurde eine standardisierte Variante in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Vogt, in der auch die im folgenden dargestellten Versuche durchgeführt wurden, als Methode zum verbesserten Einbringen von Wirkstoffen entwickelt [5, 11, 42]. Vogt et al. haben CSSS erfolgreich als Teil eines humanen Impfprotokolls etabliert, mit nachweislicher Immunogenität und Sicherheit, je nach verwendeter Vakzinzusammensetzung [4, 6, 11] In ersten präklinischen und auch klinischen Versuchen konnte dabei gezeigt werden, dass durch die Kombination aus Barriestörung und Immunaktivierung Penetration, zelluläre Aufnahme sowie eine präferentielle Induktion zellulärer Immunantworten möglich war [4, 8, 43]. Die im Folgenden beschriebenen weitergehenden Untersuchungen zur Art der Barriestörung sollen daher dem tieferen Verständnis dieser Prozesse dienen und wichtige Grundlagen für die Weiterentwicklung zu einer klinischen Anwendung legen.

### **5.2.5 Imiquimod und seine Wirkung**

In der durchgeführten Versuchsreihe war neben der Betrachtung der Hautbarriere auch die Immunkompetenz der Haut von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung von Imiquimod auf Penetrationseigenschaften der Haut untersucht.

Imiquimod ist ein sog. Toll-like-Rezeptor (TLR) Agonist. Über die Bindung an TLR 7 und 8 werden inflammatorische Reaktionen hervorgerufen. Genauer werden Keratinozyten zur vermehrten Zytokinproduktion angeregt, Immunzellen zum Ort der Auftragung rekrutiert, die Migration von Langerhanszellen zu den Lymphknoten gefördert und die Maturation von dendritischen Zellen stimuliert. TLR7 und 8 sind dabei unter anderem auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen zu finden [44, 45]. Anfänglich wurde Imiquimod zur Behandlung von genitalen und perianalen Warzen genutzt. Heute wird es darüber hinaus zur antiviralen und Tumorthherapie verwendet [44, 46]. Der antitumoröse Effekt wird durch die Aktivierung von NF $\kappa$ B über TLR 7/8 aktivierte Immunzellen und der darauffolgenden Aktivierung wichtiger proinflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha, IFN-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-12 sowie des GM-CSF und des GCF ausgelöst. Daraufhin wird die Bildung einer Th1 dominanten Immunantwort auf die von DCs oder Makrophagen präsentierten Antigene stimuliert [46, 47]. Weiterhin werden andere Zytokinachsen in einer Art zweitem Schub aktiviert. Dazu gehört unter anderem die IL-23-Achse, welche zur Bildung von IL17 und IL22 führt, welche wiederum die Bildung von Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden in den Keratinozyten stimulieren [46].

Da es ein verhältnismäßig kleines und hydrophobes Molekül mit einer molekularen Masse von 240,30 g/mol ist, bietet Imiquimod sich zur topischen Verwendung an. Von einigen Autoren

werden Rötungen im Bereich der behandelten Hautareale berichtet [47, 48], schädlich für normale Haut ist Imiquimod jedoch laut bisheriger Studienlage nicht [49].

Eine weitere Funktion von Imiquimod ist im Kontext dieser Arbeit besonders interessant. Einige Autoren haben Imiquimod erfolgreich als Adjuvanz für Impfstoffe verwendet. Meist wurde vor einer transkutanen oder intradermalen Impfung Imiquimod auf die Haut aufgetragen. Dabei wurde unter anderem beobachtet, dass das Imiquimod eine cytotoxische T-Zell Antwort hervorruft [8, 50] oder auch Memory-Zell-Bildung fördert, welche den protektiven Effekt von Impfungen mit bedingen [51]. Die oben beschriebenen inflammatorischen Prozesse legen nahe, dass Imiquimod die adaptive Immunantwort auf ein fremdes Antigen bei Verwendung als Adjuvanz steigert [38]. Eine weitere Möglichkeit Imiquimod als Adjuvanz zu nutzen ist, es in Nanokapseln zusammen mit dem Impfstoff zu formulieren. Vicente et al. haben dabei eine Th1-medierte Immunantwort nach intranasaler Applikation der Nanokapseln beobachtet [52].

### **5.3 HAUT ALS IMMUNKOMPETENTES ORGAN**

Der zweite wichtige und die Effizienz transkutaner Vakzinierungsstrategien bestimmende Aspekt der Haut, ist ihre immunologische Funktion. Die verschiedenen Schichten der Haut beheimaten verschiedene immunkompetente Zellen. In der Epidermis spielen neben den Keratinozyten vor allem Langerhanszellen (LCs) eine wichtige Rolle. LCs machen lediglich ca. 2% der epidermalen Zellen aus, schaffen es jedoch durch ihre Fortsätze ein schützendes immunologisches Netz zu bilden [7, 53, 54]. In der Dermis gibt es neben Mastzellen und Makrophagen sog. Dermale Dendritische Zellen (dDCs). Je nachdem wie tief Pathogene bzw. Antigene in die Haut eindringen, werden diese Zellen aktiviert. LCs und dDCs gehören zur Gruppe Antigenpräsentierender Zellen (APCs) [7, 53-57]. Die Aktivierung der APCs sowie der Keratinozyten der Epidermis geschieht durch sog. Danger Signale und hat eine Ausschüttung von Chemokinen, Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden zur Folge. Es kommt zu einer Art Kettenreaktion, bei der die ausgeschütteten Faktoren weitere Zellen aktivieren und weitere Immunzellen an den Invasionsort rekrutieren sowie die Expression oder Herunterregulation bestimmter Proteine hervorrufen. Die Aktivierung beispielsweise der epidermalen LCs findet durch die Bindung von Pathogenen oder ihren Bestandteilen an sog. Pattern recognition receptors (PRRs) und durch die bereits vorhandenen proinflammatorischen Zytokine statt. Zu den bekanntesten dieser Rezeptoren gehören hier die bereits erwähnten Toll-like-Rezeptoren [55]. Die aktivierten LCs reifen nach Aufnahme von Antigenen, lösen sich aus ihrer Umgebung und wandern in Richtung Lymphbahn, wo sie bis zu dem regional drainierenden Lymphknoten wandern. Dort stimulieren sie über verschiedene Oberflächenproteine T-Zellen, welche im Anschluss die adaptive Immunantwort formen [7, 58]. Antigen-spezifische Effektor-T-Zellen werden nach Rekrutierung im Lymphknoten über sog. Homing-Rezeptoren in das betroffene Gebiet rekrutiert. Darüber hinaus werden

Memory-T-Zellen angelegt, welche bei erneutem Kontakt des Körpers mit dem Antigen eine schnellere Immunantwort ermöglichen [55]. Neben dem Weg über LCs oder dDCs gibt es noch einen direkten Weg der Antigenpräsentation, bei dem die Antigene direkt über die Lymphbahn in den drainierenden Lymphknoten transportiert werden. Dort werden sie dann von „node-resident DCs“ aufgenommen und wie oben beschrieben weiter prozessiert. Dieser Weg ist deutlich schneller als der über die Haut-residenten Antigenpräsentierenden Zellen und hängt vor allem von der Größe des Antigenpartikels ab [7].

Auch wenn die APCs eine wichtige gerichtete Immunantwort der Haut auf schädigende Einflüsse initiieren, ist die Rolle der Keratinozyten keineswegs zu vernachlässigen. Als Reaktion auf äußere Stressoren schütten Keratinozyten Zytokine und Chemokine sowie andere Signalmoleküle aus bzw. stimulieren ihre Produktion, um eine kompetente lokalisierte Immunantwort hervorzurufen [59]. Allem voran sind hier insbesondere die IL-1 Familie, IL-6 und IL-8 zu nennen, aber auch GM-CSF und viele andere [58, 60-62]. Keratinozyten, Zytokine und Chemokine bilden ein komplexes Netzwerk, in welchem sich die Moleküle gegenseitig in ihrer Funktion und Bildung stimulieren bzw. regulieren [63].

### **5.3.1 Immunologische Reaktionen auf Barrierschädigung**

Die Haut reagiert auf die vielfältigsten äußeren Reize und Schädigungen mit der Ausschüttung pro-inflammatorischer und immunregulatorischer Mediatoren. Im Folgenden sollen in erster Linie die für diese Arbeit relevanten Moleküle kurz dargestellt werden.

Die IL-1 Familie stellt eine der wichtigsten Zytokin-Gruppen der Haut dar, da die verschiedenen Untertypen Initiatoren für zahlreiche Folgeprozesse sind. Das Gleichgewicht von IL-1alpha, IL-1beta und IL-1RA spielen hierbei eine wichtige Rolle. Während IL-1alpha in seiner aktiven Form von Keratinozyten selbst gebildet wird, wird IL-1beta zwar produziert aber ohne eine Co-Stimulation durch LCs nicht zur aktiven Form prozessiert. Im Rückschluss kann man also auf Basis der vorhandenen Mengen der beiden Moleküle in ihrer aktiven Form auf das ggf. vermehrte Vorhandensein von LCs schließen [58, 64]. Normalerweise sind IL-1 Vorläufermoleküle im Zytoplasma der Keratinozyten zu finden und werden bei Störung der Zellintegrität freigesetzt. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass im SC ein großer Pool an IL-1alpha vorhanden ist, welcher bei Schädigung des SC freigesetzt wird und eine immunologische Antwort der Haut zur Folge hat [65]. Als Reaktion auf eine steigende Konzentration von IL-1 wurde eine Produktion von zahlreichen weiteren Molekülen wie IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha und GM-CSF beschrieben. In Rückkopplung wird seine Synthese durch TNF-alpha, GM-CSF und TGF-beta1 stimuliert [64, 66]. Des Weiteren wird durch IL-1 die Keratinozytenproliferation angeregt sowie die Aktivierung der LCs [66].

Ein weiteres wichtiges Molekül der epidermalen immunologischen Reaktion ist TNF-alpha. Dieses wird von Keratinozyten und LCs produziert, wobei in Keratinozyten die Produktion durch IFN-gamma und IL-1alpha stimuliert wird. TNF-alpha induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen im Gewebe und sorgt damit zu einer Anlockung von Neutrophilen und Lymphozyten. Darüber hinaus trägt es zur Migration von LCs aufgrund der Beeinflussung der Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche bei [67]. Es stimuliert außerdem die IL-1alpha und IL-8 Produktion durch Keratinozyten [58]. TGF-beta1 wird ebenfalls durch Keratinozyten exprimiert und dies vermehrt nach UV-Exposition, wobei es zu ihrer Proliferation und Differenzierung beiträgt, ebenso wie zur Bildung von Extrazellulärmatrix. Es beeinflusst die LCs im Sinne einer Inhibierung der stimulierenden Wirkung von IL-1alpha, TNF-alpha und GM-CSF [68, 69]. IL-6 wird von humanen Keratinozyten produziert und stimuliert diese als Reaktion zur Proliferation mit dem Risiko der Hyperproliferation, wie sie beispielweise bei Psoriasis zu finden ist. Seine Produktion wird durch IL-1, TNF-alpha, IL-4, IL-13, TGF-alpha und TGF-beta angeregt [70]. IFN-beta als Mitglied der Interferonfamilie spielt ebenfalls eine multifunktionale regulatorische Rolle. Ihm wird eine wichtige Funktion bei der Abwehr viraler Infektionen zugeschrieben, wobei es hauptsächlich durch differenzierte Keratinozyten gebildet wird [71].

Neben den Zytokinen spielen auch Chemokine eine große Rolle in der epidermalen Immunantwort. Bei der Migration von LCs sind CCR6 und CCR7 relevant, wobei CCR7 hochreguliert wird bei Aktivierung von LCs und deren Migration zu den Lymphknoten. Monokine, allen voran IP-10 und IP-9, deren Bildung durch INF-gamma stimuliert wird, agieren als Liganden des CXCR3 und ziehen selektiv aktivierte T-Zellen an. Diese Moleküle sind in gesunder Haut nicht exprimiert, werden jedoch Zeit- und Dosisabhängig durch INF-gamma als Reaktion auf epidermale Schädigung gebildet [72, 73]. Weitere wichtige Chemokine sind GRO-alpha und IL-8, welche Neutrophile rekrutieren und selbst durch Neutrophile produziert werden können. In normaler Haut werden sie durch Keratinozyten als Reaktion auf Stimuli wie Chemikalien oder UV-Licht sowie ein vermehrtes Vorhandensein von IL-1alpha synthetisiert [58]. Ebenfalls relevant ist GM-CSF, ein essentielles Chemokin bei der Reifung von LCs, DCs und ihren Untergruppen [74]. Es wird durch Keratinozyten ausgeschüttet und trägt bei Schädigung zur Aktivierung der LCs und Proliferation der Keratinozyten selbst bei und fördert damit inflammatorische Reaktionen und Wundheilung [58].

Die ausgeschütteten Zytokine und Chemokine sind nicht bei jeder Art der Barrierschädigung dieselben. Teilweise lässt sich unterschiedliche Hochregulation der mRNA bestimmter Moleküle und ihrer Proteinmenge spezifisch für einen Stressor bzw. eine Art der Barrierschädigung beobachten [75, 76]. Nach SLS wurde so beispielsweise eine Steigerung von IL-8 Bildung beobachtet [76, 77]. Als Reaktion auf wiederholtes Tape Stripping wurde eine Veränderung auf Ebene der mRNA verschiedener Zytokine und Adhäsionsmoleküle dermal und epidermal

beobachtet. Allen voran wurde epidermal 6 Stunden nach Stripping eine erhöhte Konzentration an mRNA von TNF-alpha, IL-8, IL-10, IFN-gamma, ICAM-1, TGF-alpha und TGF-beta beobachtet. In immunologischen Färbungen konnte eine erhöhte Menge von ICAM-1 und E-selectin in der Epidermis als Folge der Schädigung beobachtet werden [78]. Im Zusammenhang mit der Verwendung verschiedener Schädigungsverfahren im Rahmen transkutaner Impfung sind die lokalen immunologischen Reaktionen jedoch teilweise nur unvollständig untersucht.

#### **5.4 INFLUENZA: EIGENSCHAFTEN UND BEDEUTUNG FÜR DEN MENSCHEN**

Für den Großteil der hier durchgeführten Versuche wurde ein Influenzaimpfstoff verwendet, daher soll im Folgenden kurz auf Influenza und die Gründe für eine Impfung gegen diese virale Erkrankung eingegangen werden.

Die Influenza ist eine Krankheit, welche den meisten Menschen bekannt ist. Jedes Jahr treten Epidemien verschiedener Schweregrade auf, typischerweise in den Wintermonaten, und jährlich sind Todesfälle als Folge einer Influenzainfektion zu beklagen. In Deutschland sind dies während einer „normalen“ Grippesaison zwischen 5000 und 15000 Menschen [79].

Personen mit einem erhöhten Risiko an Influenza zu erkranken sind Schwangere, Senioren, sehr junge Menschen und immungeschwächte Personen [80].

Es gibt drei verschiedene Virusstämme; A, B und C. Für die Erkrankung beim Menschen vor allem von Bedeutung sind Untergruppen der Stämme A und B [81]. Influenzaviren werden anhand ihrer Oberflächenproteine klassifiziert, dem Hämagglutinin (HA) und der Neuraminidase (NA). HA spielt für die Adsorption des Virus an die Oberfläche der Wirtszelle eine Rolle, darüber hinaus ist es fähig Membranen zu fusionieren und Erythrozyten zu agglutinieren. Das NA-Protein gewährleistet die Freisetzung von, durch die Wirtszelle neusynthetisierten, Viruspartikeln [79]. Die vom Menschen während einer Influenzainfektion gebildeten neutralisierenden Antikörper wirken hauptsächlich gegen die erwähnten Oberflächenproteine HA und NA [82]. Im Rahmen dieser Arbeit, für die Betrachtung der Eigenschaften, welche ein Partikel haben muss um die Hautbarriere zu überwinden, ist wichtig zu beachten, dass das HA-Protein aus zwei Teilen besteht, welche ein Gewicht von 50 und 26 kD besitzen. NA hat ein Gewicht von 56 bzw. 57 kD, je nachdem ob es sich um einen A oder B Stamm des Virus handelt [79].

Es ist naheliegend, dass aufgrund der hohen Zahl Betroffener und Verstorbener, sowie der hohen jährlichen finanziellen Last für die staatlichen Gesundheitssysteme durch medizinische Versorgung und Arbeitsausfall, zahlreiche Bestrebungen vorhanden sind, effektive Impfmöglichkeiten zu entwickeln. Seit einigen Jahren gibt es jährlich die Möglichkeit, vor allem für Risikopersonen, sich gegen den von der WHO für die kommende Grippesaison empfohlenen Grippestamm zu impfen [80]. Es gibt dabei verschiedene Arten von Impfstoffen, einige enthalten

nur die erwähnten Oberflächenproteine, andere enthalten Membranstücke mit den darauf befindlichen Proteinen (sog. Spaltimpfstoffe) oder sogar ganze Viruspartikel [83, 84].

In den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurde ein trivalenter, inaktivierter Influenzaspaltimpfstoff verwendet. Angesichts der besonderen Möglichkeit durch transkutane Impfansätze besonders zelluläre Antworten zu bevorzugen ist zu bemerken, dass diesem Impfstoff nur eine Modellfunktion, stellvertretend für Protein-basierte Impfstoffe, zukommt. Dies ist bedingt dadurch, dass ethische Vorgaben der zugehörigen klinischen Studien zu transkutaner Impfung die Prüfung mit zugelassenen, aber nicht verpflichteten Standardimpfstoffen forderten [4, 6, 9, 85].

## **5.5 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung verschiedener Methoden milder Hautbarriereschädigung in Kombination mit topischer Impfstoffauftragung, welche Intaktheit der Barriere, Hautphysiologie und das immunologische Milieu innerhalb des Gewebes beeinflussen.

Zum einen soll eine Charakterisierung des Ausmaßes der Hautbarriereschädigung durch unterschiedliche physikalische und chemische Methoden im Zeitverlauf und nach topischem Auftragen eines Influenzaimpfstoffes vorgenommen werden.

Weiterhin sollen mit Hilfe verschiedener Methoden die lokalen inflammatorischen Reaktionen der Haut auf ebendiese Schädigungsmethoden vor und nach Auftragung des Impfstoffes charakterisiert werden. Als Teil eines bereits etablierten transkutanen Impfmodells soll hier ein besonderer Fokus auf der Anwendung von CSSS als milde Hautschädigungsmethode liegen. Das Profil der hierdurch induzierten pro-inflammatorischen Mediatoren soll nach alleiniger Anwendung der Methode und in Kombination mit Impfstoff betrachtet werden.

Außerdem soll der Versuch unternommen werden, die Penetration des Impfstoffes und ggf. vorhandene Unterschiede in der Penetrationsdynamik als Reaktion auf die verschiedenen Arten der Barriereschädigung zu charakterisieren.

Ziel dieser Arbeit insgesamt ist es, den Einfluss milder Barriereschädigung auf Impfstoffpenetration und das reaktive lokale kutane Zytokin-Milieu zu charakterisieren. Die Schädigungsmethoden entsprechen dabei Ansätzen bestehender transkutaner Impfmodelle und die im Folgenden dargestellten Untersuchungen intendieren, die lokale Immunreaktion auf ebendiese besser nachzuvollziehen. Dies schließt eine bestehende Lücke zwischen Untersuchungen zur Methodik transkutaner Vakzinierung und immunologischen Reaktionen des Körpers, welche im Blut von Probanden bestimmt wurden. Ausgehend von den ersten sehr ermutigenden Daten aus klinischen Studien soll diese Arbeit in der Weiterführung dazu beitragen neue transkutane Vakzinierungsprotokolle zu entwickeln, welche zu ausreichendem Impfschutz

führen ohne übermäßig invasiv zu sein, und die physiologischen und immunologischen Prozesse hinter diesen Verfahren besser zu verstehen.

## 6 MATERIAL UND METHODEN

---

Die Untersuchungen und Methoden dieser Arbeit waren in zwei Hauptteile unterteilt, wovon der erste am Research Center for Hair and Skin Science der Klinik für Dermatologie an der Charité Universitätsmedizin Berlin und der zweite am Centre d'Immunologie et Maladies Infectieuses der Université Pierre et Marie Curie in Paris durchgeführt wurde. Im ersten Teil wurden verschiedene Hautbarrierestörungen, physikalischer und chemischer Art, und ihr Einfluss auf die Hautphysiologie, das Penetrationsverhalten von Impfstoff und die lokale kutane Immunreaktion untersucht. In einem zweiten Teil wurde eine der physikalischen Barrierestörungsmethoden in Kombination mit transkutaner Impfstoffapplikation in Bezug auf ihre lokale epidermale Immunantwort genauer analysiert. Die beiden Teile werden im Folgenden genauer beschrieben.

### 6.1 VERSUCHSABLAUF TEIL 1

Zum einen wurden hautphysiologische Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt, um deren Änderungen durch unterschiedliche Arten von Hautbehandlung zu untersuchen. Weiterhin wurden Sebutape-Abrisse der Hautoberfläche gewonnen, um das inflammatorische Milieu der Epidermis zu evaluieren. Diese Untersuchungen wurden durch die Analyse von einem diagnostischen CSSS-Abriss der Epidermis sowie der Untersuchung von Gesamtepidermismaterial ergänzt. Diagnostisches CSSS und Extrakte aus der übrigen Epidermis wurden darüber hinaus in Kombination mit Kryoschnitten von ganzen Hautblöcken zur Evaluation von Impfstoffpenetration verwendet. Im Folgenden werden Details zum Versuchsablauf und den einzelnen Methoden gegeben.

Nach Vorbereitung der Hautproben und Bestimmung der Hautphysiologie zum Zeitpunkt 0 h wurden verschiedene Arten von Barrierschädigung angewendet, wobei jedes vorher markierte Feld einer Schädigungsart zugeordnet war. Das Hautstück wurde anschließend in einer feuchten Kammer in einem Brutschrank bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Hautstück entnommen und die Finn Chambers der drei betroffenen Felder entfernt, ebenso wie das darin befindliche Filterpapier und ggf. verbliebene Flüssigkeit oder Creme (Erläuterung siehe chemische Schädigung im folgenden Abschnitt). Die Hautphysiologie wurde erneut bestimmt. Anschließend wurde ein Sebutape-Abriss der Hautoberfläche vorgenommen (Details siehe unten), wobei die gewonnenen Sebutapes in je ein Falconröhrchen (15 ml Falcon®, Corning Science México S.A. de C.V., México) mit der proteinhaltigen Seite nach innen gebracht und bei -80°C eingefroren wurden. Anschließend wurde auf jedes Feld 31,2 µl Vaxigrip® Impfstoff aufgetragen und die Haut für weitere 24 Stunden in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde das Hautstück entnommen und für jedes Feld erneut die Hautphysiologie bestimmt, gefolgt von einem diagnostischen CSSS von jedem Feld, wobei die gewonnenen Abrisse in jeweils einem Falconröhrchen bei -80°C eingefroren wurden.

Abschließend wurde jedes Hautfeld aus dem Gesamtstück herausgeschnitten, das subkutane Fettgewebe komplett entfernt und das Stück in vier Teilstücke à 0,25 cm<sup>2</sup> geteilt, welche dann in einem 3 ml verschließbaren Reaktionsröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert wurden. Auf die darauffolgenden Untersuchungen der gewonnenen Proben, ebenso wie auf die genaue Durchführung der einzelnen wichtigen Teilschritte soll im Folgenden genauer eingegangen werden. Abb. 2 zeigt die verschiedenen Arbeitsschritte und Versuchsteile schematisch zum besseren Verständnis.

### **6.1.1 Hautproben**

Hautexplantate von sieben gesunden menschlichen Spendern wurden untersucht, welche im Rahmen plastisch-chirurgischer Eingriffe exzidiert wurden. Bei allen Spendern handelte es sich um Frauen im Alter zwischen 32 und 63 Jahren, mit Phototypen von I-III nach Fitzpatrick. Entnahmeort der Haut war in sechs Fällen das Abdomen und in einem Fall die Brust. Es wurde ausschließlich Haut verwendet, die augenscheinlich keine Wunden, Hautläsionen, Dehnungsstreifen o.ä. aufwies. Die Haut wurde stets direkt am Entnahmetag verarbeitet.

In Einklang mit der institutionellen Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin und den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki wurde vor Verwendung der Haut das Einverständnis der Spenderinnen eingeholt. Die Hautproben wurden nach Erteilung der Zustimmung durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin zu dem Antrag „Experimentelle In vitro Untersuchungen zur Penetration und zur biologischen Wirkung von Mikro- und Nanopartikeln in menschlicher Haut“ verarbeitet.

### **6.1.2 Vorbereitung der Hautproben**

Nach Erhalt der Haut wurde diese auf Styroporblöcken mit möglichst gerader Oberfläche aufgespannt, nachdem sie von überschüssigem subkutanem Fettgewebe und Fettresten auf der Haut mit Hilfe von PBS (Aqua dest. und Pulver; PBS Dulbecco, Biochrom GmbH, Germany) befreit wurde. Es folgte eine Wischdesinfektion, bei der zwei Sprühstöße Softa-Man® (B.Braun Melsungen AG, Germany) auf die Hautoberfläche gesprüht und nach 30 Sekunden mit einem Tuch durch Wischen in eine Richtung, verbliebene Flüssigkeit entfernt wurde. Dies diente der Entfernung von weiteren Fettresten auf der Hautoberfläche, um potentielle Störungen bei den Messungen der Hautphysiologie zu minimieren. Des Weiteren simulierte dieses Prozedere eine Wischdesinfektion vor einer Impfung, um auf der Haut residierende Bakterien zu entfernen.

Auf der Haut wurden sechs Felder von jeweils einem Quadratzentimeter markiert mit einem Mindestabstand von 0,5 cm untereinander. Folgend wurden Hautphysiologische Messungen und die jeweiligen Behandlungen durchgeführt.

### **6.1.3 Hautbehandlung und Inkubation**

#### Hautphysiologische Evaluation

Entsprechend des beschriebenen Versuchsablaufs wurden bei jeder Hautprobe zu verschiedenen Zeitpunkten hautphysiologische Messungen durchgeführt. Die Parameter wurden für jedes einzeln markierte Hautfeld vor, 24 sowie 48 Stunden nach den Behandlungen bestimmt. Die Messungen wurden mit Geräten von Courage & Khazaka Electronics GmbH Köln durchgeführt, an einem mobilen „Multiprobe Adapter“ (MPA-Station) mit der zugehörigen Software MPA 5, ebenfalls von Courage, Khazaka.

##### 6.1.3.1.1 Hauttemperatur

Zu Beginn jeder Messreihe wurde eine Bestimmung der Hauttemperatur durchgeführt (Skin-Thermometer ST 500, Courage & Khazaka Electronics GmbH, Germany), unter Nutzung einer Infrarotmessmethode. Der Durchschnitt der Messfläche betrug 2,4 cm und die Messwerte wurden in °C angegeben.

##### 6.1.3.1.2 TEWL

Die TEWL-Messungen wurden mit einem Tewameter von Courage & Khazaka durchgeführt (Tewameter TM® 300, Courage & Khazaka Electronics GmbH, Germany). Der Messfühler besteht hierbei aus einem hohlen Plastikzylinder, welcher an beiden Enden offen ist und in dessen Wand zwei paarige Sensoren in einem gewissen Abstand voneinander angebracht sind. Ein Sensoren Paar besteht jeweils aus einer Einheit zur Messung der relativen Luftfeuchte und der Temperatur. Aus den verschiedenen Ergebnissen der Messpunkte wird dann indirekt der Dichtegradient des Wasserdrucks (die Evaporation) mit Hilfe eines Mikroprozessors bestimmt und in  $\text{g/h/m}^2$  wiedergegeben [39].

Es ist zu beachten, dass TEWL eine Messgröße ist, welche im Verhältnis zu vorhergehenden Messergebnissen derselben Hautstelle zu betrachten ist, und dass es keinen einheitlichen TEWL-Normwert gibt [19]. Es wurden immer drei Messzyklen pro Messung durchgeführt, wobei ein Messzyklus 21 Einzelmessungen enthielt, und dabei aus den letzten fünf Messergebnissen ein Mittelwert errechnet wurde, der den letztendlichen Messwert des Messzyklus darstellte.

##### 6.1.3.1.3 Sebumetrie

Zur sebumetrischen Messung wurde das Sebumeter® SM 815 (Sebumeter® SM 815, Courage & Khazaka Electronics GmbH, Germany) verwendet. Das hier verwendete Messprinzip entspricht einer sog. Fettfleck-Photometrie. Ein Stück mattiertes Band wird, eingespannt in einer Kassette, für 30 Sekunden auf das Hautfeld gedrückt. Dabei wird es,

je nach Menge des Sebums, mit dem es in Berührung gekommen ist, lichtdurchlässiger. Nach Abschluss der 30 Sekunden wird das Band in eine entsprechende Messstelle der MPA Station eingeführt, welche eine Fotodiode enthält. Dort wird die Transparenz gemessen und mit einem Wert, welcher vor Kontakt mit dem Sebum gemessen wurde, verglichen. Der ausgegebene Wert entspricht dem Sebumgehalt. Die Messergebnisse werden in sog. Sebumeter® Einheiten von 0-350 angegeben, die Einheit ist dabei angelehnt an  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  innerhalb eines bestimmten Bereiches. Die Messung wird immer einmalig durchgeführt. Die Messfläche des Gerätes beträgt  $64 \text{ mm}^2$ .

#### 6.1.3.1.4 Corneometrie

Die Corneometrie wurde mit dem Corneometer® CM 825 (Corneometer® CM 825, Courage & Khazaka Electronics GmbH, Germany) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine sog. Kapazitive Messmethode. Dies bedeutet, dass das Gerät bei Veränderungen des Wasserhaushaltes sogar kleine Veränderungen einer Dielektrizitätskonstante wahrnimmt. Das Corneometer wird zur Messung auf das Hautfeld gedrückt, bis die Software durch einen Piepton signalisiert, dass es einen Wert gemessen hat, dies dauert normalerweise ca. eine Sekunde. Dies wird drei Mal durchgeführt. Die gemessenen Werte werden in sog. relativen Corneometer® Einheiten angegeben. Bei der Messung ist es wichtig darauf zu achten, dass das Corneometer immer mit möglichst gleichem Druck auf das Hautfeld aufgesetzt wird, um vergleichbare Messergebnisse zu erhalten.

#### 6.1.3.1.5 pH-Messung

Der pH-Wert des Hautfeldes wurde mit Hilfe eines Skin-pH-Meter® (Skin-pH-Meter® PH 905, Courage & Khazaka Electronics GmbH, Germany) gemessen, welches aus einer sog. Kombi-Glaselektrode besteht. Eine  $\text{H}^+$ -Messelektrode ist in einem Glasstab dabei mit einer Referenzelektrode kombiniert. Der Messdurchmesser der Sonde beträgt etwa 1 cm und der Messbereich liegt zwischen 0 und 11. Die pH-Sonde wird bei jeder Messung drei Mal auf das Hautfeld aufgesetzt.

#### 6.1.3.1.6 Optische Kohärenz Tomografie

Teil jeder hautphysiologischen Evaluation war auch die Aufnahme eines sog. OCT-Bildes. Die Abkürzung OCT steht hierbei für Optische Kohärenz Tomografie und wird zur zweidimensionalen Darstellung externer vitaler menschlicher Gewebe verwendet, in unserem Falle der Hautoberfläche. Hierzu wurde ein Gerät mit dem Namen VivoSight der Firma Michelson Diagnostics verwendet. Die OCT ist ein interferometrisches Bildgebungsverfahren, welches eine Darstellung von Reflektionen verschiedener Gewebeschichten von nahem Infrarotlicht produziert und so Querschnittbilder von Gewebestrukturen Mikrometer genau darstellen kann [86]. Es ermöglichte die Epidermis

in ihrer Dicke darzustellen und eventuelle Veränderungen der Hautoberfläche bildlich festzuhalten.

#### 6.1.3.1.7 Umgebungsbedingungen

Um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten wurden die Messungen immer im selben Messraum, bei möglichst gleichbleibenden Umgebungsbedingungen durchgeführt. Die Raumtemperatur befand sich in einer Spanne zwischen 22,4 und 27,7 °C und die Luftfeuchtigkeit in einem Bereich von 19 bis 60,3 %. Während der Messungen wurde versucht möglichst wenig Luftbewegung z.B. durch Sprechen oder Herumlaufen zu erzeugen, um die Messungen nicht zu verfälschen. Die Hautproben wurden nach Entnahme aus dem Brutschrank stets für 30 Minuten bei Raumtemperatur akklimatisiert, um gleichmäßige Umgebungsbedingungen zu erzeugen.

#### 6.1.3.2 Physikalische Hautbarriereschädigung

Zur Untersuchung physikalischer Schädigungsmethoden der Haut wurden bei jedem Spender drei Felder genutzt. Eines der drei Felder blieb als Kontrolle ohne Behandlung, eines wurde mit einem einfachen Tape-Abriss behandelt, welcher der im Folgenden beschriebenen CSSS Methode entspricht, jedoch ohne Cyanoacrylat.

##### 6.1.3.2.1 CSSS-Abriss

In dem bearbeiteten Versuchsaufbau wurde ein sog. CSSS sowohl zur Barriereschädigung als auch für diagnostische Zwecke verwendet.

Dabei wurde ein Tropfen Cyanoacrylat (Sekundenkleber der Firma UHU; „UHU Sekunden Alleskleber geruchsfrei EASY“, UHU GmbH & Co. KG, Deutschland) auf das entsprechende Hautfeld getropft, nachdem zuvor zwei Tropfen auf einem Tuch verworfen wurden, um Lufteinschlüsse zu vermeiden. Folgend wurde zügig ein Stück Tesafilm (TESA Beiersdorf 66 mm x 50 mm) mit einer Handschuh-bedeckten Fingerkuppe in der Mitte des aufgebracht Tropfens auf das Hautfeld aufgetragen und, durch einen Papierstreifen von Verunreinigung geschützt, mit Hilfe einer Gummirolle in zehn Rollbewegungen angedrückt. Der Tesafilmstreifen wurde vorher längs zur Abrissrichtung geteilt, um eine handliche Größe zu bekommen und kein Material benachbarter Felder mit abzutragen. Eine Kante des Streifens wurde, zur Erleichterung des nach 20 Minuten folgende Abziehens, umgeschlagen. Dies geschah in einer zügigen Bewegung in eine Richtung. Anschließend wurde für die diagnostischen CSSS-Abrisse der Streifen mit einer desinfizierten Schere so beschnitten, dass das 1 cm<sup>2</sup> große Hautfeld mit einem Rand von ca. 2-4 mm übrigblieb. Der mit Sekundenkleber und Hautmaterial bedeckte Tesafilmstreifen wurde jeweils in ein 25 ml Falconröhrchen mit der materialbedeckten Seite nach innen eingeführt und die Falconröhrchen aller Hautfelder bei -80°C gelagert.

### 6.1.3.3 Chemische Hautbarriereschädigung

Auf weiteren drei Feldern wurde die Schädigung der Hautbarriere mit Hilfe von chemischen Substanzen durchgeführt. Auf einem Feld wurden 50 µl 2%-iger SLS-Lösung (Natriumdodecylsulfatlösung 2%; 2,0 g zu 100 g gereinigtes Wasser hergestellt von der Charité Apotheke am 04.10.2013), in einer 12 mm großen Finn Chamber (Finn Chambers Scanpor Large, Smart Practice, USA) auf einem Filterpapier (12 mm, Finn Chambers Smart Practice, USA) okkludiert.

Auf einem weiteren Feld wurden 0,00974 g (+/- 0,00004 g) 5%-iger Imiquimodcreme (Aldara® MEDA, Schweden, 12 Sachets je 250 mg) auf ein Filterpapier aufgetragen und mit der cremebedeckten Seite auf das Hautfeld gebracht und anschließend ebenfalls in einer Finn Chamber okkludiert. Auf das letzte Feld wurden 50 µl Aqua dest. auf ein Filterpapier aufgetragen und als Kontrolle in einer Finn Chamber okkludiert.

#### 6.1.3.3.1 Zusammensetzung Aldara 5% Creme®

Die verwendete Aldara Creme® enthielt neben Imiquimod folgende weitere Bestandteile:

- Isostearinsäure
- Benzylalkohol
- Cetylalkohol
- Stearylalkohol
- Weißes Vaseline
- Polysorbat 60
- Sorbitanstearat
- Glycerol
- Methyl-4-hydroxybenzoat
- Propyl-4-hydroxybenzoat
- Xanthan-Gummi
- Gereinigtes Wasser

Die Creme hat eine weiße, leicht gelbliche Farbe und befindet sich in einem Einmalbeutel aus Polyester/Aluminiumfolie. Pro Spender wurde ein frischer Einmalbeutel verwendet.

### 6.1.3.4 Diagnostischer Sebutape-Abriss

Der diagnostische Sebutape-Abriss hatte den Zweck Entzündungsmarker der Hautoberfläche zu Adsorbieren und diese nach dem Herauslösen aus dem Tape in weiteren biochemischen Verfahren zu quantifizieren [33]. In den hier beschriebenen Versuchen wurde das Sebutape® der Firma Cuderm Corp. (Dallas, TX, USA) verwendet. Das Sebutape wurde mit einer desinfizierten Pinzette vom Lagerungspapier abgezogen und auf ein Hautfeld aufgetragen. Daraufhin wurde es mit einem Streifen Papier abgedeckt und mit einer kleinen Gummirolle mit zehn Rollbewegungen angedrückt. Nach fünf Minuten wurde das Sebutape mit einer desinfizierten Pinzette in eine Richtung abgezogen und in ein 25 ml Falconröhrchen eingebracht, sodass die materialreiche Klebeseite nach innen zeigte und keinen Kontakt zur Röhrchenwand hatte oder sich verklebte. Solch ein Sebutape-Abriss wurde für jedes Hautfeld 24 Stunden nach Protokollbeginn, direkt vor der topischen Impfstoffauftragung durchgeführt. Die gewonnenen Tapes wurden anschließend bei -80°C gelagert.

#### 6.1.3.5 Impfstoffauftragung

Wie bereits erwähnt wurde auf jedes Hautfeld 24 Stunden nach Barrierschädigung 31,25 µl Vaxigrip® Impfstoff aufgetragen (VAXIGRIP® 2013/2014 intramuscular suspension, Sanofi Pasteur MSD GmbH, France). Der Impfstoff wurde in zehn Fertigspritzen mit je 0,5 ml Impfstoff bei ca. 4°C gelagert. 0,5 ml Impfstoff enthalten nach Herstellerinformation insgesamt 45 µg Hämagglutinin (HA) als Antigen, 15 µg für jeden enthaltenen Stamm. Für diesen ersten Teil der Arbeit wurde der Impfstoff der Grippesaison 2013/2014 verwendet, welcher folgende Influenzastämme enthielt:

- A/California/7/2009(H1N1) davon abgeleiteter verwendeter Stamm NYMC X-179A → 15 µg HA
- A/Victoria/361/2011 (H3N2) - entsprechend verwendeter Stamm NYMC X-223A abgeleitet von A/Texas/50/2012 → 15 µg HA
- B/Massachusetts/02/2012 → 15 µg HA

Diese entsprachen den Empfehlungen der WHO für die Grippesaison 2013/2014 für die nördliche Hemisphäre und die EU.

Vaxigrip® ist ein trivalenter Spaltimpfstoff. Dies bedeutet, dass er Antigene drei verschiedener inaktivierter Virusstämme enthält, die Antigene, allem voran HA, befinden sich dabei teilweise auf Membranstücken. Darüber hinaus lassen sich außer den Oberflächenproteinen auch andere Virusbestandteile wie beispielsweise Spaltstücke von Nukleoproteinen in sehr geringen Konzentrationen feststellen [81, 82]. In Vaxigrip® enthaltene Virusstämme werden auf befruchteten Hühnereiern aus gesunden Hühnerbeständen gezüchtet und anschließend weiterverarbeitet. Das Virus wird mit der Hilfe von Detergentien desintegriert, also „gesplittet“. Anschließend wird er durch Formalin oder 3-Propionolaktone inaktiviert. Es folgt ein Konzentrierungsschritt, bei dem zum Beispiel durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation, ein Antigenkonzentrat erzeugt wird [82, 87]. Um eine injizierbare Lösung zu erhalten, werden weitere Bestandteile hinzugefügt. Neben dem Antigen waren folgende weitere Inhaltsstoffe enthalten:

- Natriumchlorid
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
- Kaliumdihydrogenphosphat
- Kaliumchlorid
- Wasser für Injektionszwecke

Die Fertigspritzen waren ohne Injektionsnadeln und wurden unter sterilen Bedingungen geöffnet, die benötigte Impfstoffmenge entnommen und die Spritze mit dem dazugehörigen Gummipfropf wieder verschlossen und im Kühlschrank gelagert. Spritzen, welche länger als eine Woche nach erstmaliger Öffnung nicht verbraucht wurden, wurden verworfen.

Die Bestimmung der angegebenen aufgetragenen Impfstoffmenge beruht auf den Ergebnissen von Vogt et al., welche in vivo nach Auftragung von 0,5 ml Aggripal® Impfstoff auf 16 cm<sup>2</sup> mit

CSSS behandelte Haut eine Immunantwort im Blut von Probanden detektierten [4]. Aggripal® enthielt dabei wie auch Vaxigrip® insgesamt 45 µg Antigen. Um zu untersuchen ob die hier verwendeten Verfahren der Barrierestörung ähnliche Effekte haben, wurde daher dieselbe Antigenkonzentration verwendet und untersucht.

#### **6.1.4 Proteinextraktion aus Abrisstapes**

Um das mit dem Sebutape und CSSS gewonnene Material der Hautoberfläche quantifizieren zu können war es nötig dieses aus dem Tape zu lösen. Dafür wurden die in Falconröhrchen befindlichen Tapes für 3 Stunden mit je 2 ml PBS mit 0,005% Tween 20 (Sigma-Aldrich Corporation, USA) auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen in einem Sonicator in Eiswasser für 10 Minuten Ultraschallwellen ausgesetzt (Betriebsfrequenz 35 kHz, Sonorex Super RK102 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) und daraufhin jeweils 30 Sekunden gevortext (bei 1800 rpm) und 1 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde die Flüssigkeit aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

#### **6.1.5 Proteinanalysen aus Sebutape-Abrissen**

##### *6.1.5.1 Gesamtproteinquantifizierung*

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge von den Proteinlösungen aus den Sebutape-Abrissen wurde ein Bicinchoninsäure-Assay verwendet (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, USA, Katalognummer 23235).

##### *6.1.5.2 ELISA*

Zur Zytokinquantifizierung der aus den Sebutape-Abrissen gelösten Proteinlösungen wurden ELISA-KITs der Firma R&D (R&D Systems Incorporated, USA, Katalognummern DY200, DY201, DY280) verwendet. Es wurden dabei folgende Zytokine quantifiziert:

- IL-1alpha
- IL-1beta
- IL-1-Rezeptorantagonist

Die berechnete Proteinkonzentration wurde rechnerisch auf die Gesamtproteinmenge bezogen.

#### **6.1.6 Proteinanalysen aus CSSS-Abrissen**

Aus den Proteinlösungen, welche aus den diagnostischen CSSS-Abrissen gelöst wurden, wurden einerseits Chemokine im Rahmen einer Profiler Array Messung bestimmt, weiterhin wurde versucht mit Hilfe eines H1N1 Sandwich ELISA die Impfstoffkonzentration zu bestimmen.

##### *6.1.6.1 Gesamtproteinquantifizierung*

Für das Proteinmaterial, welches mit Hilfe des diagnostischen CSSS Abrisses 48h nach Beginn des Versuchsprotokolls von der Haut abgetragen wurde, wurde die Gesamtproteinmenge mit

einem Bradford Assay bestimmt (Coomassie Plus Assay Kit, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, USA, Katalognummer 23236).

#### 6.1.6.2 ELISA für H1N1

Zur Quantifizierung des nach 24 h Inkubation auf der Hautoberfläche verbliebenen Vaxigrip® Impfstoffes wurde ein H1N1 ELISA verwendet (eENZYME LLC, USA, Katalognummer CA-I179). Dieser ELISA war geeignet zur quantitativen Konzentrationsbestimmung von Hämagglutinin des Typ A/California/07/2009 in Konzentrationen von 0,03-30 ng/ml. Die Ergebnisse des ELISA wurden entsprechend in ng/ml angegeben.

#### 6.1.6.3 Proteome Profiler Array

Der Proteome Profiler Array von R&D (R&D Systems Incorporated, USA, Katalognummern ARY017) wurde verwendet, um sich einen Überblick über verschiedene Chemokine im Proteinmaterial aus CSSS-Abrissen zu verschaffen und einige Vertreter von diesen sowie einiger Zytokine im zweiten Versuchsteil ggf. näher zu untersuchen. Der Array wurde daher nur für einen Spender und die bei dessen Hautprobe durchgeführten physikalischen und chemischen Barrierestörungsmethoden durchgeführt, ohne die jeweiligen Kontrollen, zum direkten Vergleich zwischen Tape Stripping und CSSS bzw. Imiquimod und 2% SLS. Die Arrays sind dazu in der Lage, zahlreiche Moleküle gleichzeitig semiquantitativ zu bestimmen. Seine Reagenzien erzeugen auf einem Autoradiografiefilm Dots verschiedener Größe, welche die Mengen der Moleküle in den verschiedenen Proben repräsentieren und mit Hilfe einer speziellen Software bezüglich ihrer mittleren Pixeldichte quantifiziert werden können.

### **6.1.7 Gesamtepidermis Analysen**

#### 6.1.7.1 Proteinextraktion aus Gesamtepidermis Blöcken

Zur Extraktion von Protein aus Whole Tissue wurden zwei der gefrorenen Gewebelöcke mit der Dermisseite in Tissue-Tek® (O.C.T™, Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande) eingebettet, sodass die Epidermis frei lag. Die epidermale und obere dermale Schicht wurde mit Hilfe eines Kryostats (MICROM HM56 GMI Inc, USA) in zehn Schnitten à 100 µm, also in einer Gesamtdicke von 1000 µm, abgetragen und in einem 3 ml Eppendorfröhrchen gesammelt. Im Anschluss wurden die Schnitte in einem Homogenisator (Omni GLH Biolab Products, Germany) 10 Sekunden zerkleinert und mit 500 µl eines Extraktionspuffers (1 g Triton X, 1,576 g Tris-HCL, 0,877 g NaCl, 0,029 g EDTA) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Röhrchen 10 min in einem Ultraschallbad belassen, 30 Sekunden gevortext und für 4 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert.

#### 6.1.7.2 Gesamtproteinquantifizierung

Die Menge von Gesamtprotein aus den Whole Tissue Gewebeproben wurde mit Hilfe eines Coomassie-basierten Bradford Assays bestimmt (660nm Protein Assay Reagent, Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, USA, Katalognummer 22660).

#### 6.1.7.3 ELISA

Zur Analyse der epidermalen Whole Tissue Extrakte wurden IL-6 und IL-8 mit Hilfe von ELISA quantifiziert (Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products, USA, Katalognummern KHC0061C, KHC0081). Die verwendeten Kits hatten hierbei einen Detektionsbereich von <2,5 pg/ml für IL-6 und <5 pg/ml für IL-8. Die Ergebnisse wurden auf die bestimmte Gesamtproteinmenge normalisiert.

Weiterhin wurde zur Quantifizierung des nach 24 h Inkubation in die obere Epidermis penetrierten Vaxigrip® Impfstoffes derselbe H1N1 ELISA verwendet, wie zur Analyse der diagnostischen CSSS Abrisse (eENZYME LLC, USA, Katalognummer CA-I179).

#### 6.1.8 **Immunfluoreszenzfärbung**

Es bestand die Absicht, mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen in die Haut penetrierten Impfstoff bildlich darzustellen und mit Hilfe einer CD1a-Färbung, welche ein Oberflächenprotein von Langerhans und dermalen Dendritischen Zellen markiert, Immunzellen zuzuordnen. Beide Färbungen wurden jeweils nur für Proben eines Spenders (also n=1) durchgeführt. Hierbei konnte kein Farbsignal für den Impfstoff dargestellt werden. Dies war ebenso wenig in einer im Anschluss durchgeführten Probefärbung mit intradermal injiziertem Vaxigrip®-Impfstoff möglich. Da eine anti-CD1a Färbung allein keinen neuen Wissensgewinn erbracht hätte, wurde dieser Abschnitt der Experimente nach Analyse eines Spenders abgebrochen. Für zukünftige Versuche und das Troubleshooting soll an dieser Stelle dennoch kurz die Methodik dargestellt werden.

Eingefrorene Stücke der Hautfelder à 0,25 cm<sup>2</sup> wurden mit Hilfe eines Kryostats (MICROM HM56 GMI Inc., USA) in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgetragen. Der Block wurde dabei so geschnitten, dass die Schnitte möglichst vom Anfang und vom Ende des Hautblockes stammten. Bei den Blöcken handelte es sich um ein Viertel des gesamten Hautfeldes.

##### 6.1.8.1 CD1a-Färbung

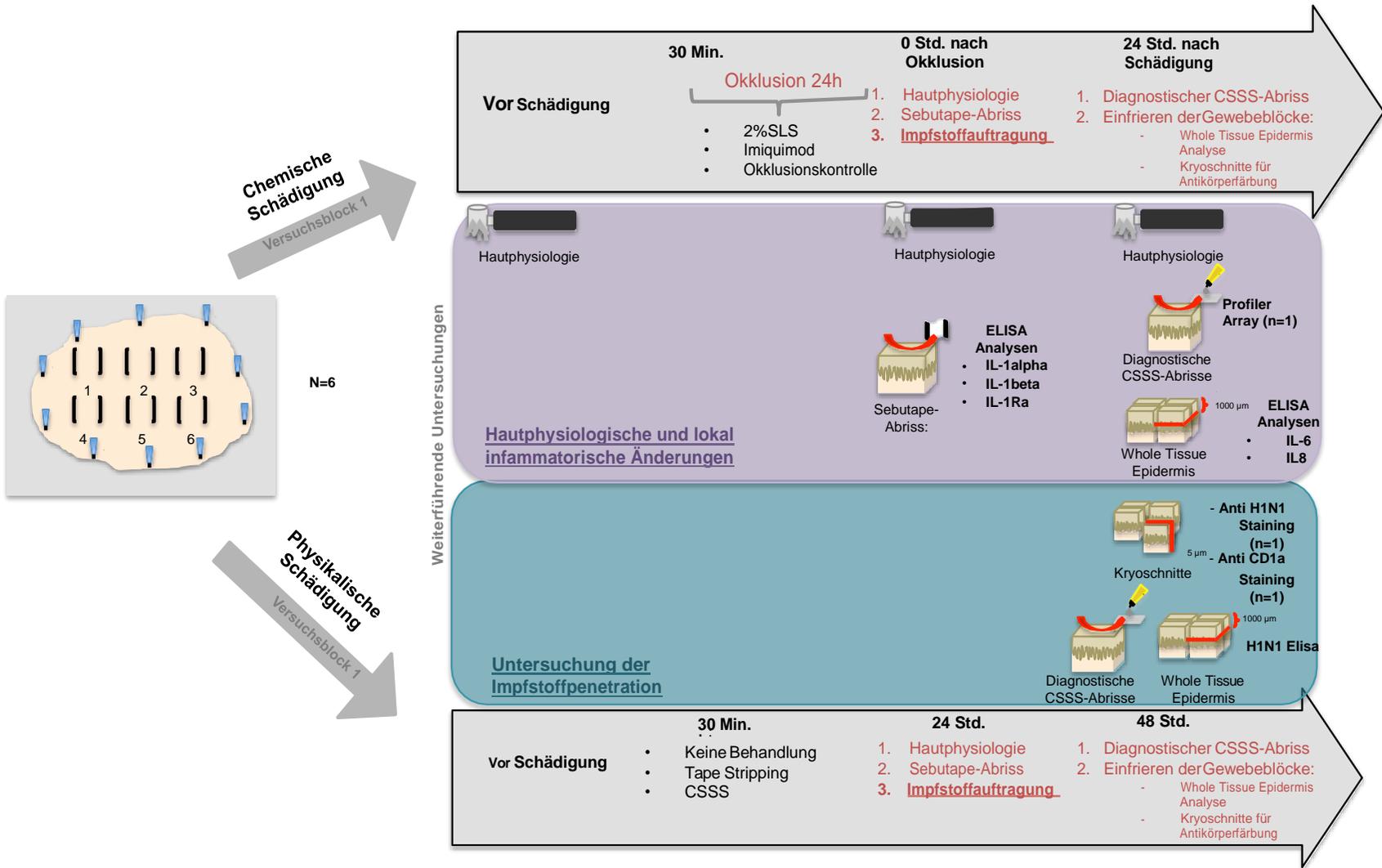
Bei dieser Färbung wurde das Protein CD1a angefärbt, ein Oberflächenprotein spezifisch für die Antigenpräsentierenden Zellen der Haut. Bei dem genutzten Primärantikörper handelte es sich um einen monoklonalen Maus antiHuman antiCD1a-Antikörper (DAKO Denmark A/S, Dänemark). Ihm folgte die Auftragung des sekundären Antikörpers, in diesem Fall antiMaus IgG

Fluorescein (VECTOR Laboratories Inc., USA). Nach Trocknung wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

#### 6.1.8.2 H1N1-Färbung

Bei dieser Färbung wurde versucht das Protein H1N1 anzufärben, ein Oberflächenprotein eines Influenzavirus, welches eines der Hauptbestandteile des Vaxigrip® Impfstoffes ist. Hierfür wurde ein monoklonaler Maus anti-Influenza A Antikörper, H1N1 Antigen (Merck Millipore, USA. Produktnummer MAB8256) als Primärantikörper verwendet und anti-Maus IgG Fluorescein (VECTOR Laboratories Inc., USA) als Sekundärantikörper. Im Anschluss wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

Abbildung 2 Schematische Übersicht über Versuchsteil 1. Dargestellt sind die Abläufe über den Zeitverlauf, ebenso wie die weitergehenden Untersuchungen den zu den verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Abriss- bzw. Gewebematerialien. Des Weiteren wurde dargestellt, welcher Subfragestellung die weiterführenden Untersuchungen zugeordnet sind.



## **6.2 VERSUCHSABLAUF TEIL 2**

Im zweiten Versuchsteil bestand die Zielsetzung darin das CSSS und seine Anwendung in Kombination mit Impfstoffen in seinen Einflüssen auf das epidermale inflammatorische und immunologische Milieu genauer zu untersuchen. Im Gegensatz zum ersten Versuchsteil stand hier eher die Betrachtung kurzfristiger Änderungen des Zytokin- und Chemokinmilieus im Vordergrund. So wurden die Hautproben mit CSSS-Abrissen behandelt und direkt im Anschluss ein Impfstoff aufgetragen, es wurden hierbei zwei verschiedene Impfstoffe in jeweils eigenen Proben betrachtet. Die ex vivo Hautproben wurden im Anschluss inkubiert, wobei für jede Probe Teile der Haut 4 Stunden, 16 Stunden und 24 Stunden nach Impfstoffauftragung exzidiert wurden. Es wurden Suspensionen epidermaler Zellen dieser jeweiligen Proben gewonnen, aus denen RNA extrahiert wurde. Diese wurde im Anschluss genutzt um mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-Polymerasechainreaction (qRT-PCR) die Genexpression proinflammatorischer epidermaler Zytokine und Chemokine zu analysieren.

Die Versuche dieses Teils wurden am Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses in Paris durchgeführt, welches Teil der Universités Sorbonnes – Pierre et Marie Curie ist und Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Vogt in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Charité Universitätsmedizin Berlin.

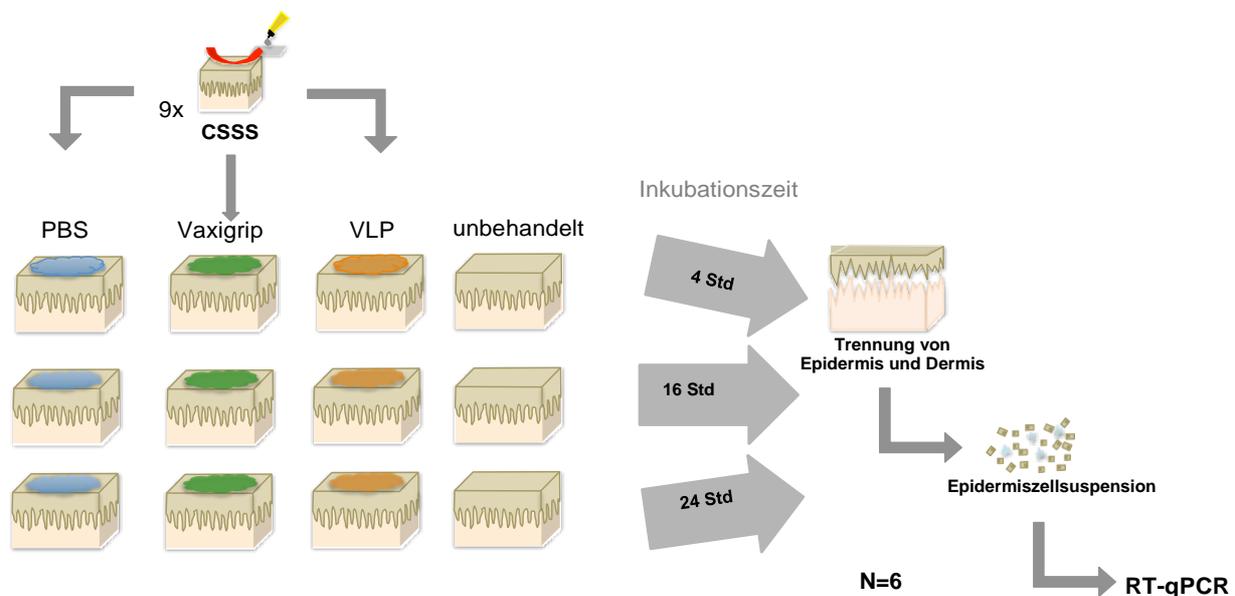
### **6.2.1 Hautproben**

Es wurden frische Hautproben von 6 Spendern untersucht, welche im Rahmen plastisch-chirurgischer Eingriffe der Brust (n=4) bzw. des Abdomens (n=2) entnommen wurden. Die Entnahme erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten entsprechend der institutionellen Ethikkommissionsbestimmungen des Hôpital Saint Louis Paris (IRB 00003835) und den ethischen Standards niedergelegt in der Deklaration von Helsinki. Bei den Hautexplantaten handelte es sich um Proben weiblicher Spenderinnen in einer Altersgruppe von 23 bis 50 Jahren, welche augenscheinlich gesunde Haut aufwiesen, mit Phototypen II-V nach Fitzpatrick.

### **6.2.2 Vorbereitung der Hautproben**

Nach Entnahme der Haut im Rahmen des chirurgischen Eingriffs wurde sie in sterilen Behältern mit isotonischer Kochsalzlösung verpackt und innerhalb von 2 bis 4 Stunden an das Labor geliefert. Hier wurde die Haut in zwei Wiederholungen unter einer Sterilbank in Povidon-Iod-Lösung (Betadine® dermique 10 %, MEDA pharma, France) und im Anschluss in PBS gewaschen und anschließend das subkutane Fettgewebe entfernt. Bei Bedarf wurde die Haut mit

Tüchern abgetupft, um PBS-Reste zu entfernen, und auf einem Styroporblock aufgespannt.



*Abbildung 3 Schematische Übersicht über Versuchsteil 2. Dargestellt sind die Abläufe über den Zeitverlauf, ebenso wie die weitergehenden Untersuchungen des zu den verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Zellmaterials.*

### 6.2.3 Behandlung der Haut und Inkubation

Auf sechs der Spenderexplantate wurden mit einem Hautmarker neun Felder von einer ungefähren Größe von 2 cm<sup>2</sup> markiert und bei fünf der Spender ein zusätzliches Feld von 1 cm<sup>2</sup>. Drei der größeren Felder wurden ohne jegliche Behandlung belassen, auf allen anderen wurde ein CSSS entsprechend der in Versuchsteil 1 dargestellten Methodik durchgeführt. Auf drei der größeren mit CSSS behandelten Felder wurde steriles PBS, und auf weitere drei Vaxigrip® Impfstoff (VAXIGRIP® 2014/2015 intramuscular suspension, Sanofi Pasteur MSD GmbH, France) in jeweils einer Menge von 62,4 µl pipettiert. Auf die 1 cm<sup>2</sup> großen Felder wurden 20 µg Virus-like particles (VLP-Pr55gag-CFDA) aufgetragen. Um Penetration zu ermöglichen wurden die Hautexplantate 30 min unter der Sterilbank belassen und im Anschluss die Hautfelder herausgeschnitten und in RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Thermo Scientific, USA), ergänzt mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS), Glutamin und einem antibiotisch-fungizidem Supplement (Invitrogen, Thermo Scientific, USA), überführt und bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 4 Stunden, 16 Stunden oder 24 Stunden für immer jeweils ein Feld der verschiedenen Behandlungsarten (zur Übersicht siehe Abbildung 3).

#### 6.2.3.1 Impfstoffe

##### 6.2.3.1.1 Vaxigrip® 2014/2015

Wie bereits erwähnt wurde auf jedes Hautfeld direkt nach Barrierschädigung 62,4 µl Vaxigrip® Impfstoff aufgetragen (VAXIGRIP® 2014/2015 intramuscular suspension, Sanofi Pasteur MSD GmbH, France). Der Impfstoff wurde in zehn Fertigspritzen mit je 0,5

ml Impfstoff bei ca 4°C gelagert. 0,5 ml Impfstoff enthalten nach Herstellerinformation insgesamt 45 µg Hämagglutinin (HA) als Antigen, 15 µg für jeden enthaltenen Stamm. Für diesen Teil der Arbeit wurde der Impfstoff der Grippesaison 2014/2015 verwendet, welcher folgende Influenzastämme enthielt:

- A/California/7/2009(H1N1) davon abgeleiteter verwendeter Stamm NYMC X-179A → 15 µg HA
- A/Texas/50/2012 (H3N2)- davon abgeleitet verwendeter Stamm NYMC X-223A → 15 µg HA
- B/Massachusetts/02/2012 → 15 µg HA

Diese entsprachen den Empfehlungen der WHO für die Grippesaison 2014/2015 für die nördliche Hemisphäre und die EU.

Neben dem Antigen waren folgende weitere Inhaltsstoffe enthalten.

- Natriumchlorid
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
- Kaliumdihydrogenphosphat
- Kaliumchlorid
- Wasser für Injektionszwecke

Die Fertigspritzen waren ohne Injektionsnadeln und wurden unter sterilen Bedingungen geöffnet, die benötigte Impfstoffmenge entnommen und die Spritze mit dem dazugehörigen Gummipfropf wieder verschlossen und im Kühlschrank gelagert. Spritzen, welche länger als eine Woche nach erstmaliger Öffnung nicht verbraucht wurden, wurden verworfen.

#### 6.2.3.1.2 VLP

Virus-like particles sind Trägersysteme, in denen verschiedene zur Impfung genutzte Antigene in einer Kapsidhülle eingeschlossen werden. Die in diesen Versuchen genutzten VLPs enthielten Pr55<sup>gag</sup> Polyproteine. Das Pr55<sup>gag</sup> Vorläuferprotein enthält dabei verschiedene Proteine, die Teil des HIV-1 darstellen. Die VLPs wurden von einem Kooperationspartner der Gruppe Vogt der Charité Universitätsmedizin Berlin, der Gruppe Wagner am Institut für medizinische Mikrobiologie in Regensburg, hergestellt. Hierfür wurden DNA Plasmide welche das chimerische Gen für Pr55<sup>gag</sup> enthielten in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus transferiert und diese Viren dann in Insektenzellen zum Proliferieren gebracht. Diese exprimierten die chimerische Proteine in Form von VLPs und wurden durch verschiedene Prozesse isoliert [5].

#### 6.2.4 Gewinnung humaner Hautzellsuspensionen

Zur Gewinnung epidermaler Zellen und anschließender Analyse ihres RNA-Gehaltes wurden die einzelnen Hautfelder nach ihrer Inkubation verdaut. Hierzu wurden sie mit Hilfe steriler Skalpelle

in kleinere Stückchen von ca. 0,3 mm<sup>2</sup> geschnitten und mit Dispase II (2,4 U/ml) in RPMI 1640 Medium bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend die Epidermis mit Hilfe einer sterilen Pinzette von der Dermis getrennt. Die Epidermisblättchen wurde gesammelt und für 10 Minuten mit Trypsin weiter verdaut (Trypsin-EDTA 0.2%, Sigma). FCS wurde zur Inhibierung der enzymatischen Reaktion hinzugefügt und das verdaute epidermale Gewebe, unter Zuhilfenahme eines sterilen Injektionsspritzenstopfens als Stößel, durch einen 70 µm Filter gepresst. Die Zellen wurden mit 1,5 ml PBS mit 1%igem FCS-Anteil suspendiert, 50 µl davon wurden genutzt, um mit Hilfe von Trypan Blau die Zellzahl zu bestimmen. Das restliche Pellet wurde bei 1800 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abpipettiert und die Zellpellets bei -80°C eingefroren.

### **6.2.5 RNA-Extraktion und qRT-PCR**

Zur Extraktion der in den Epidermalen Zellen enthaltenen RNA wurde ein RNeasy Mini Kit für Zellsuspensionen von bis zu 7.10<sup>6</sup> Zellen (Qiagen GmbH, Germany, Katalognummer 74104) verwendet und die RNA-Menge mit Hilfe eines Nanodrop quantifiziert. Die extrahierte RNA der zwölf Einzelproben wurden auf eine gleiche Konzentration mit RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt und mit einem SuperScript® Synthesis Kit (SuperScript™ VILO cDNA Synthesis Kit, Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, USA, Katalognummer 11754250) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend auf eine Konzentration von 1 ng/µl und 4 ng/µl verdünnt. Für die anschließende quantitative PCR Analyse wurde ein Master Mix verwendet (SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, USA, Katalognummer A25780) mit QuantiTect Primer Assays (Qiagen GmbH, Germany, Produktnummer 249900). Für die sechs Proben, welche mit einer Kombination aus CSSS und Vaxigrip® bearbeitet wurden, wurden Analysen für folgende Auswahl von Genen durchgeführt:

- IFN-beta
- IFN-gamma
- IL-6
- CX3CL1
- TGF-beta
- IL-16
- CCL2
- IL-8
- IL-1Ra
- GM-CSF
- CCR7
- CCL22
- CXCL9
- Chemerin
- IP-10

Für den Großteil der Genanalysen wurden 5 µl einer cDNA-Konzentration von 1 ng/µl verwendet, für IFN-gamma, IL-6, GM-CSF, CXCL9 und Chemerin wurden 5 µl einer 4 ng/µl Konzentration verwendet.

Für die fünf Proben, welche mit CSSS und VLP bearbeitet wurden, wurden folgende Gene analysiert:

- IFN-beta
- CX3CL1
- CCR7
- IL-1Ra
- IL-1alpha
- IL-1beta
- TNF-alpha

#### **6.2.6 Analyse**

Eine semi-quantitative Bestimmung der RNA-Sequenzen wurde mit Hilfe der  $\Delta$ Ct Methode durchgeführt, nachdem die Gen-spezifischen Ct Werte auf einen Durchschnitts Ct-Wert der beiden Housekeeping-Gene GAPDH und beta-Actin normalisiert wurden.

### **6.3 STATISTISCHE ANALYSE**

Zur statistischen Analyse sowie Erstellung der Grafiken der Ergebnisse wurde GraphPad Prism 5.0 verwendet. Da es bei den unterschiedlichen Untersuchungen maximal sieben Spender gab und jeweils sehr viele verschiedene Faktoren betrachtet wurden handelt es sich bei dieser Arbeit um eine orientierende, übersichtsschaffende Arbeit. Um Bias durch zu häufiges Testen und zufällige Signifikanzen zu vermeiden wurden die Ergebnisse im Folgenden vor allem deskriptiv beschrieben. An ausgewählten Stellen wurden statistische Tests verwendet, diese werden im Ergebnissteil an entsprechender Stelle spezifiziert.

## 7 ERGEBNISSE

---

### 7.1 HAUTPHYSIOLOGISCHE EVALUATION

Im Folgenden sollen die Ergebnisse zu den hautphysiologischen Untersuchungen dargestellt werden, um die Effekte der verschiedenen Arten von Barrierschädigung zu evaluieren. Physikalische und chemische Behandlungsarten sollen dabei getrennt betrachtet und Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden aufgedeckt werden.

#### 7.1.1 Physikalische Schädigung

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen hautphysiologischen Messparameter. Für die physikalischen Barrierschädigungsarten wurden die Messungen vor Schädigung sowie 24 und 48 Stunden nach Schädigung durchgeführt. In diesem Kontext ist bei der Betrachtung der Messergebnisse zu beachten, dass nach der Messung zum Zeitpunkt 24 Std Impfstoff topisch auf alle Behandlungsfelder aufgetragen wurde.

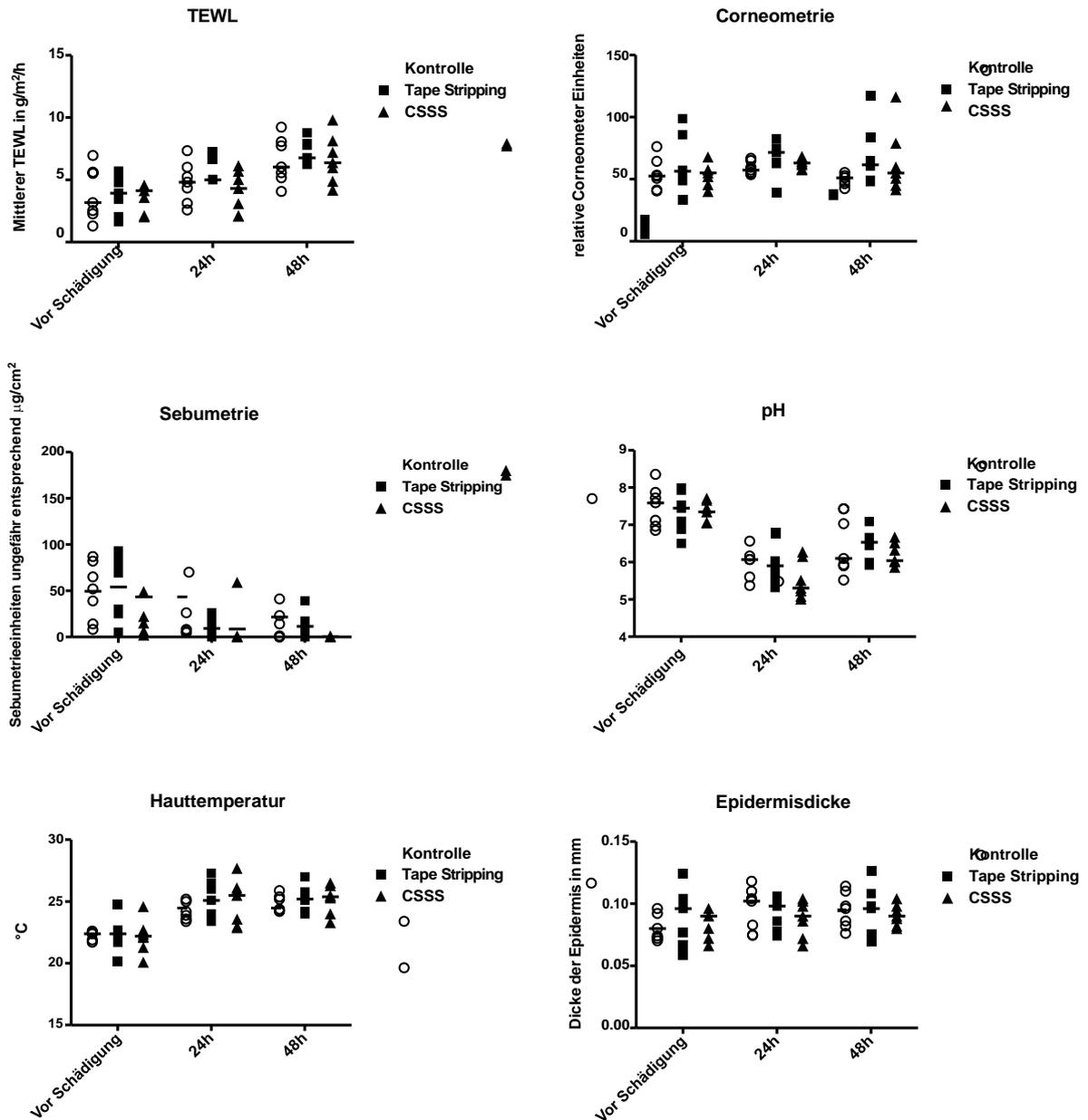
Aufgrund des geringen Stichprobengröße  $n$  und der teilweise großen Streuung beschränkt sich diese Arbeit auf die deskriptive Betrachtung der Ergebnisse. Aufgrund der größeren statistischen Genauigkeit bei kleinen Stichproben wurde zusätzlich der Median dargestellt. Die Parameter sollen im Folgenden einzeln betrachtet werden.

#### TEWL

Bei Betrachtung der Mediane fällt auf, dass ein genereller Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes über den Zeitverlauf beobachtet wurde. Zwischen den einzelnen Behandlungsarten sind keine großen Unterschiede zu bemerken. Der generelle TEWL Anstieg aller Behandlungsfelder zwischen 24 und 48 Stunden ist größer als der vor der Schädigung auf 24 Stunden, was für eine gesteigerte Barrieredysfunktion spricht.

#### Corneometrie

Die Corneometrie ist eine indirekte Möglichkeit zur Bestimmung des Wassergehaltes der Haut über eine Messung der elektrischen Leitfähigkeit. In der Regel verhält sie sich gegenteilig zum TEWL Wert. In unserem Fall zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Werte. Auffällig war die Tape Stripping Kohorte zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Schädigung, wo die Werte im Vergleich zu den Messungen vor Schädigung gestiegen waren, dies war in geringerem Ausmaß auch für die Proben von CSSS sichtbar. Weiterhin auffällig ist die deutlich geringere Variabilität zwischen den Spendern zu diesem Zeitpunkt, welche für alle Behandlungsfelder vor Schädigung und 48 Stunden danach deutlich breiter ist.



*Abbildung 4 Übersicht über die Ergebnisse hautphysiologischer Messungen vor sowie 24 und 48 Stunden nach physikalischer Schädigung. Dargestellt sind die Werte von Transepidermalem Wasserverlust (TEWL), Corneometrie, Sebumetrie, pH, Hauttemperatur und durch OCT gemessener Epidermisdicke zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Schädigungsarten des Tape Stripping und CSSS sind im Vergleich mit der Kontrolle dargestellt. Der schwarze Strich in den jeweiligen Abbildungen repräsentiert den Median. (Zu Teilen in abgewandelter Form in Pfannes und Weiss et al. [11])*

### Sebumetrie

Bei Betrachtung der Messungen des oberflächlichen Sebumgehaltes ist eine progressive Abnahme zu beobachten. Sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Schädigung ist eine im Vergleich zum Kontrollfeld stärkere Reduktion des Sebumgehaltes nach Tape Stripping und CSSS zu beobachten. Zum Zeitpunkt 48 Stunden war bei der CSSS Kohorte sogar

kein Sebum mehr messbar, was mit der verstärkten Reduktion der Hautoberflächenlipide durch diese Abrissmethode zu erklären ist.

### pH

Die pH Werte der Oberfläche verhalten sich ähnlich. 24 Stunden nach Schädigung ist ein Absinken des Oberflächen pH zu beobachten, welcher für Tape Stripping stärker ist als der des Kontrollfeldes und für CSSS wiederum mehr als für Tape Stripping. Zum Zeitpunkt 48 Stunden haben sich die pH Werte der Kontrollen nicht stark verändert, die nach Tape Stripping und CSSS sind jedoch angestiegen. Generell war jedoch zu beiden Zeitpunkten nach Schädigung für alle Felder ein reduzierter pH Wert zu verzeichnen.

### Hauttemperatur

Die Werte der unterschiedlichen Behandlungsarten sowie der Kontrolle unterschieden sich im Verlauf der Messungen nicht signifikant. Generell ist jedoch ein Ansteigen der Hauttemperatur nach Inkubation zu beobachten, wobei dieser Anstieg sich zwischen den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nicht stark unterscheidet. Eine Erklärung ist die Inkubation bei 37°C, welche erst nach Schädigung begonnen wurde. Auch wenn die Haut vor den Messungen eine halbe Stunde vorher aus dem Inkubationsschrank genommen wurde, um sich an die Umgebungstemperatur anzugleichen, entsprach dies nicht der Ausgangstemperatur.

### Epidermisdicke

Die Bestimmung der Epidermisdicke mit Hilfe des OCT zeigte keine auffälligen Veränderungen zwischen den Behandlungsarten oder über den Zeitverlauf. Generell ist zu sagen, dass die Variabilität der Werte verhältnismäßig groß war.

## **7.1.2 Chemische Schädigung**

Wie für die physikalischen Schädigungsarten wurden auch für die chemischen Schädigungsarten der TEWL, Corneometrie, Sebumetrie, pH, Hauttemperatur und Epidermisdicke bestimmt. Da die chemische Schädigung für 24 Stunden unter Okklusion stattfand entsprechen die zweiten Messwerte dem Zeitpunkt 0 nach Okklusionsende und die dritte Messung 24 Stunden nach Okklusion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt, alle Spender als individuelle Punkte zu den jeweiligen Zeitpunkten und Behandlungsarten, ebenso wie der Median der Werte.

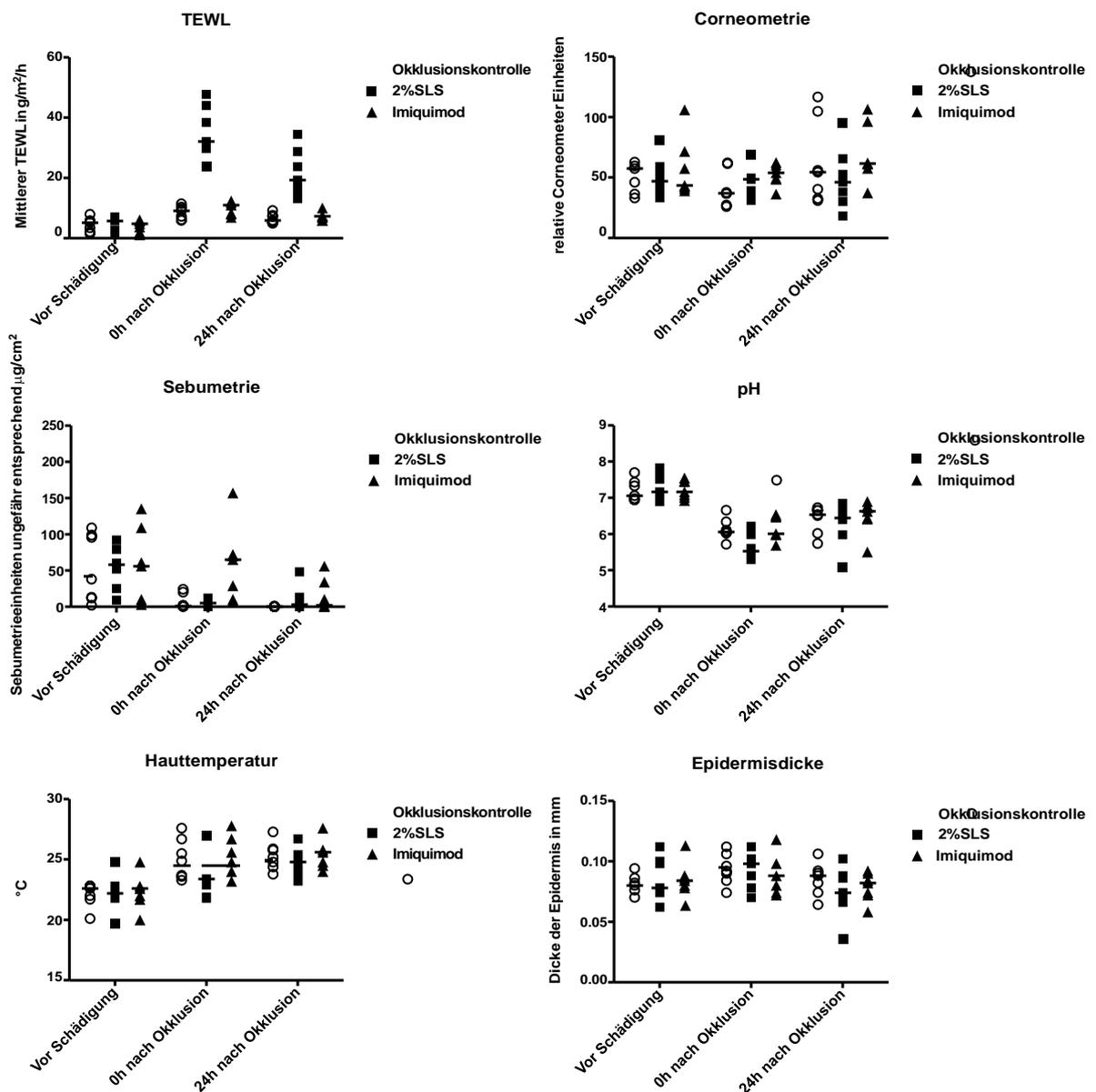
### TEWL

Ähnlich wie nach physikalischer Barrierschädigung ist eine generelle Steigerung des TEWL nach Okklusion und Schädigung zu beobachten. Für die Kohorte nach 2% SLS waren die TEWL Werte nach Behandlung sowohl direkt nach Ende der Okklusion als auch

24 Stunden danach deutlich größer als die der beiden anderen Behandlungsfelder. Für alle drei Behandlungsmethoden war 24 Stunden nach Okklusion ein Absinken des TEWL zu beobachten, was für eine Normalisierung in Richtung der Ausgangswerte vor Schädigung spricht.

### Corneometrie

Die Ergebnisse der corneometrischen Messung zeigten eine große Varianz zwischen den verschiedenen Spendern. Der Median für die Okklusion mit SLS blieb über die Zeit betrachtet relativ konstant, der der Okklusionskontrolle zeigte einen Abfall direkt nach Okklusion und einen erneuten Anstieg auf den Ausgangswert 24 Stunden danach. Bei



*Abbildung 5 Ergebnisse der hautphysiologischen Messungen nach chemischer Barrierschädigung mit 2% SLS und Imiquimod, dargestellt im Vergleich zu einer Okklusionskontrolle. Die Werte sind vor Schädigung sowie direkt, also 0 Stunden, und 24 Stunden nach Schädigung dargestellt.*

Imiquimod war ein leichter Anstieg der Werte sowohl 0 Stunden nach Okklusion sowie progredient 24 Stunden nach Okklusion zu beobachten.

### Sebumetrie

Der Sebumgehalt der Hautoberfläche zeigte sich für die Okklusionskontrolle und SLS direkt und 24 Stunden nach Okklusion im Vergleich zu vorher stark reduziert. Bei Imiquimod war der Sebumgehalt direkt nach der Okklusion leicht erhöht, sank dann aber auf ähnliche Werte wie die anderen beiden Behandlungsfelder 24 Stunden nach Okklusion.

### pH

Direkt nach Okklusion war der pH Wert aller Felder deutlich gesunken, wobei die Werte der SLS Kohorte stärker gesunken sind als die der anderen beiden Behandlungsarten. 24 Stunden nach Okklusion stiegen die pH Werte wieder etwas an, wobei sie für alle drei Felder etwa gleich waren.

### Hauttemperatur

Wie bei der physikalischen Schädigung war die Hauttemperatur nach der Inkubation für alle Behandlungsfelder erhöht. Die mit SLS okkludierten Proben zeigten eine im Vergleich reduzierte Hauttemperatur direkt nach Okklusion. 24 Stunden danach glichen sich die SLS Proben den anderen Feldern wieder an.

### Epidermisdicke

Bei Betrachtung der Epidermisdicke fällt auf, dass die unterschiedlichen Behandlungsfelder sich nicht stark unterscheiden. Generell ist jedoch zu beobachten, dass die Epidermisdicke aller drei Behandlungsfelder direkt nach Ende der Okklusion etwas erhöht zu sein schien im Vergleich zum Zustand vor Schädigung und 24 Stunden nach Okklusion.

## **7.2 LOKAL INFLAMMATORISCHE EFFEKTE**

Im Folgenden werden die Ergebnisse aller Untersuchungen dargestellt, welche sich auf das lokal inflammatorische Milieu der Haut bezogen haben. Dies schließt Untersuchungen beider Versuchsabschnitte ein. Begonnen wird mit der Betrachtung des gewonnenen Materials aus Sebutape Abrissen, gefolgt von diagnostischem CSSS und Gesamtepidermismaterial und abschließend den Ergebnissen aus RT-qPCR. Bei den verschiedenen Untersuchungen werden die Ergebnisse von physikalischer und chemischer Barrierschädigung jeweils getrennt betrachtet.

### **7.2.1 Zytokinbestimmung aus Sebutape-Abrissen**

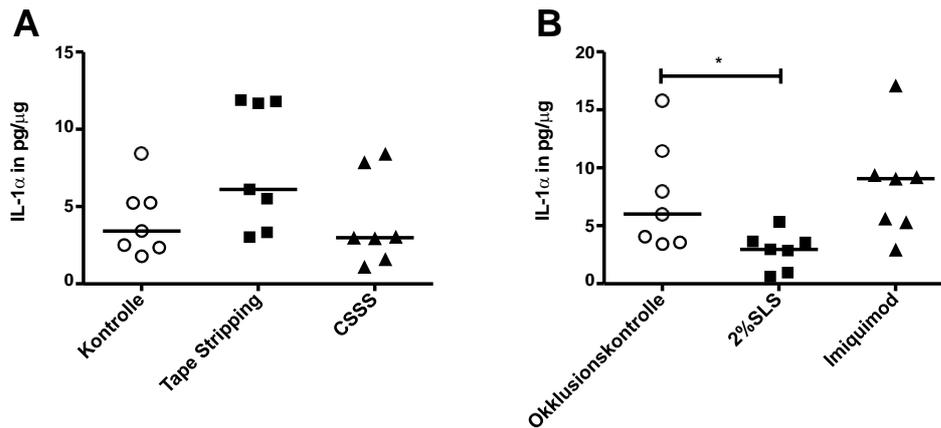
#### **IL-1 ELISA-Analysen**

Aus Sebutape-Abrissen, welche 24 Stunden nach Beginn des Versuchsprotokolls von der Oberfläche aller Hautfelder genommen wurden, wurde Protein extrahiert und in der erhaltenen Lösung die Menge von IL-1alpha mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die gemessenen Proteinmengen wurden auf die ebenfalls bestimmte Gesamtproteinmenge normalisiert. In Abbildung 6 sind die Resultate der Bestimmung zu sehen.

Abbildung 6 A zeigt die Ergebnisse für die Felder physikalischer Barrierschädigung. Es sind die individuellen Werte sowie ihr Median gezeigt. Auffällig ist, dass der IL-1alpha Gehalt der Sebutape-Abrisse 24 Stunden nach Tape Stripping höher war als der der Kontrolle und nach CSSS. Ein zur statistischen Orientierung durchgeführte Kruskal-Wallis Test zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede für die untersuchte Spenderzahl.

Die Teilabbildung B zeigt die IL-1alpha Mengen nach chemischer Barrierschädigung kurz nach Ende der Okklusion. Im Vergleich zur Okklusionskontrolle zeigten die Werte nach 2% SLS Okklusion sich deutlich niedriger. Okklusion von Imiquimod zeigt eine erhöhte Menge IL-1alpha im Vergleich zur Okklusionskontrolle. Ein durchgeführter Kruskal-Wallis Test wies auf signifikante Unterschiede hin, wobei sich mit Hilfe eines Mann-Whitney Tests der Unterschied zwischen den mit SLS okkludierten Proben zur Okklusionskontrolle als statistisch signifikant ( $p= 0,0262$ ) geringer herausstellte.

Der verwendete ELISA konnte in den Proben kein IL-1beta oder IL-1 RA nachweisen. Um einen Fehler auszuschließen wurde die Bestimmung wiederholt, wiederum mit negativen Ergebnissen. Da bereits hochsensitive Kits verwendet wurden, wurde keine weitere Bestimmung durchgeführt. Im Rahmen der Untersuchungen mit RT-qPCR wurde jedoch auch IL-1RA DNA in der Epidermis für die physikalischen Schädigungsarten quantifiziert.

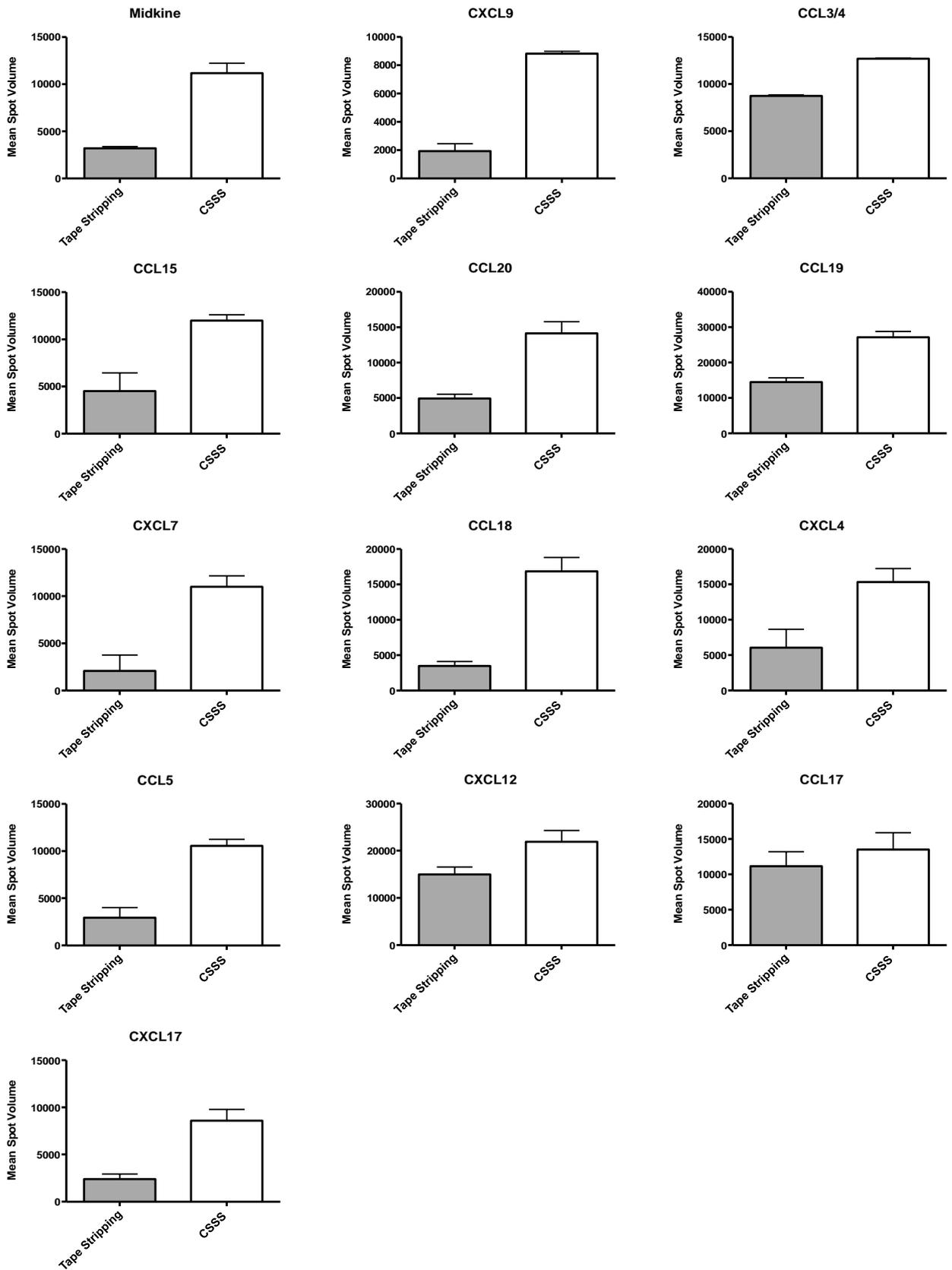


*Abbildung 6 IL-1alpha Menge normalisiert auf Gesamtprotein, bestimmt aus Sebutape-Abrissen. A stellt die IL-1alpha Menge unbehandelter Haut sowie nach Tape Stripping und CSSS dar. In B sind die gemessenen IL-1alpha Mengen nach chemischer Schädigung durch 2% SLS und Imiquimod dargestellt zusammen mit den Ergebnissen einer Okklusionskontrolle. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem \* markiert, mit  $p > 0,05$  als Grenze für Signifikanz.*

### 7.2.2 Chemokin Array Analysen aus diagnostischen CSSS-Abrissen

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse des Chemokin Profiler Arrays nach physikalischer Barrierschädigung dargestellt, welcher für Proben eines Spenders durchgeführt wurde. Bei dem Probenmaterial handelte es sich um Protein, welches aus diagnostischen CSSS-Abrissen 48 Stunden nach Durchführung physikalischer Hautschädigung, also Tape Stripping und CSSS, und 24 Stunden nach topischer Impfstoffauftragung durchgeführt wurde. Es wurden hierbei nur die beiden Schädigungsmethoden untersucht, ohne eine Probe von intakter Haut. Dies beruht darauf, dass das Potential der CSSS Methode im Vergleich zu einfachem Tape Stripping untersucht werden sollte in Hinblick auf weiterführende immunologische Untersuchungen dieser Methode.

Der Vergleich des mittleren Pixel-Volumens zeigt, dass für alle 31 getesteten Moleküle der Wert für CSSS immer höher war, für einige der Moleküle sogar mehr als das Fünffache. Im genutzten Array wurden Proteine quantifiziert und die Ergebnisse zeigen, dass sogar 48 Stunden nach Barrierschädigung die Menge an exprimierten Chemokinen deutlich höher nach CSSS ist als nach simplem Tape Stripping. Aufgrund dieser Beobachtung haben wir im Versuchsteil 2 einige der hier untersuchten und bekanntermaßen für inflammatorische Prozesse in der Haut bekannte Moleküle im Rahmen einer RT-qPCR Analyse der Epidermis nach CSSS und Impfstoffauftragung genauer untersucht.



*Abbildung 7* Semiquantitative Bestimmung von 31 Chemokinen im CSSS-Abriss Material von physikalisch geschädigter Haut. Verglichen wird hier das Mean Spot Volume, welches der mittleren Pixeldichte eines belichteten Fotofilms entspricht.

Da die Ergebnisse des Chemokin Arrays nach chemischer Schädigung weniger kohärent eindeutig waren und im Folgenden nicht weiter untersucht wurden, soll hier nur kurz auf die gesehenen Unterschiede eingegangen werden. Generell fiel auf, dass die Proteinexpression geringer war als bei den Proben nach physikalischer Schädigung. Für viele der getesteten Moleküle war die semiquantitativ bestimmte Proteinmenge nach 2% SLS Okklusion größer im Vergleich zur Probe mit Imiquimod unter Okklusion. Für die Moleküle SRPSOX, CCL14, CCL1, IP-10 und CXCL11 war sie nach Imiquimod größer.

Aufgrund der generell geringeren Proteinmenge haben wir uns gegen eine genauere immunologische Untersuchung chemischer Barrierschädigungsmethoden entschieden. Eine Entscheidung diesbezüglich musste aus finanziellen und zeitlichen Gründen getroffen werden.

### **7.2.3 Zytokinbestimmung aus Gesamtepidermis**

Im Rahmen der Gesamtepidermis Analyse wurde Material von allen sieben Spendern für jeweils die verschiedenen Hautschädigungsmethoden inklusive Kontrollen gewonnen. Für die physikalischen Schädigungsmethoden erfolgte die Entnahme am Ende des Versuchsablaufes, also 48 Stunden nach Durchführung der Schädigung, 24 Stunden nach Auftragung des Vaxigrip® Impfstoffes und einige Minuten nach Durchführung eines diagnostischen CSSS auf allen drei Hautfeldern.

Für die chemischen Schädigungsmethoden erfolgte die Entnahme ebenfalls am Ende des Versuchsablaufes, also 24 Stunden nach Ende der Okklusion mit den verschiedenen Agenzien, 24 Stunden nach Auftragung des Vaxigrip® Impfstoffes und einige Minuten nach Durchführung eines diagnostischen CSSS auf allen drei Hautfeldern (zur Übersicht siehe Abb. 2 im Methodenteil). Aufgrund von Blasenbildung konnte hier bei einigen Spendern kein Epidermismaterial für die Analyse gewonnen werden, da sich hier die Epidermis bzw. Teile davon gelöst und verklumpt hatten, sodass diese nicht angemessen konserviert werden konnten.

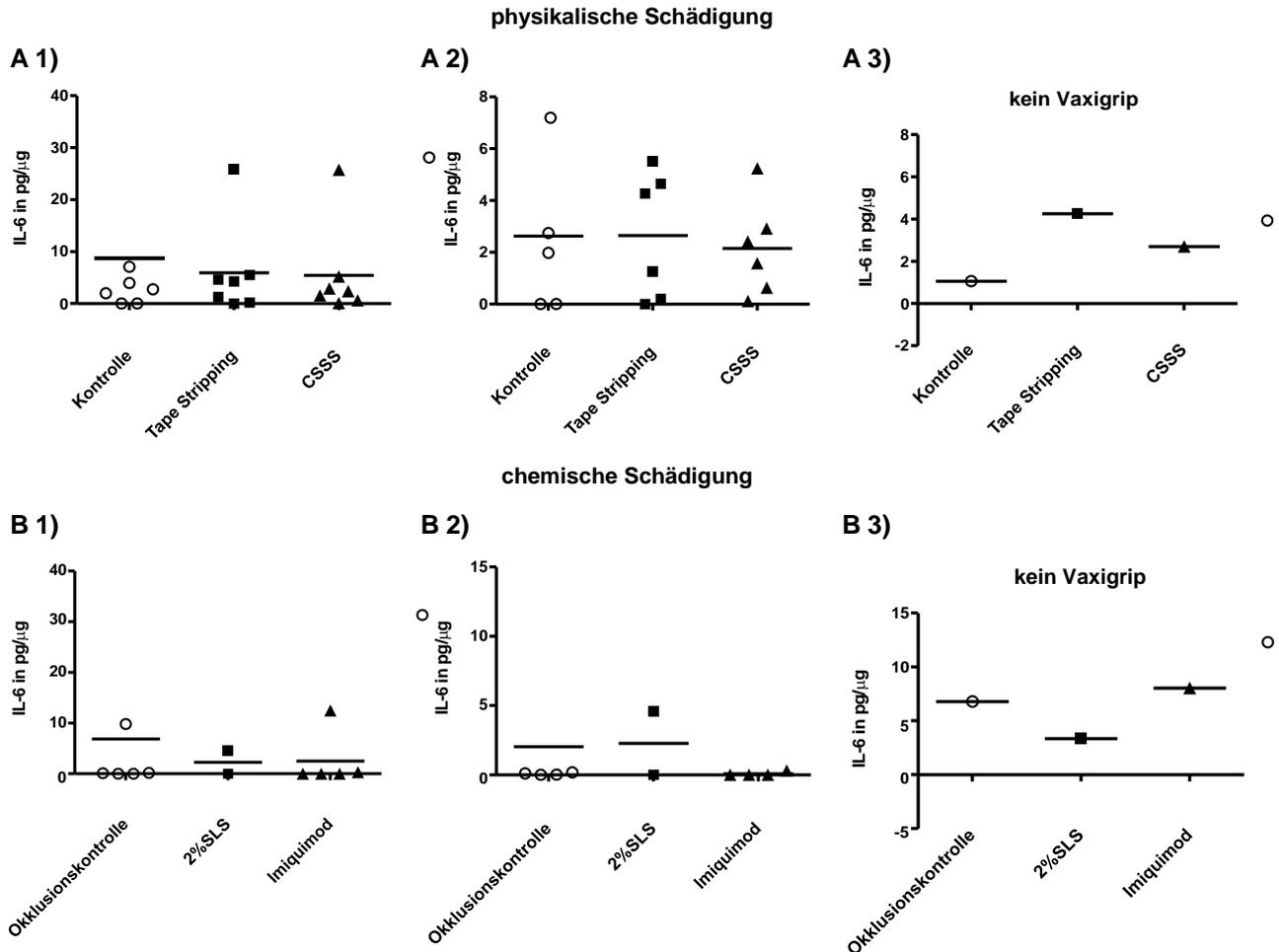
#### **7.2.3.1 IL-6**

Physikalische Schädigung: Abbildung 8 A1) zeigt die Menge an quantifiziertem Interleukin 6 normalisiert auf Gesamtprotein in pg/µg für n=7. Bei den Werten der Kontrolle war bei zwei Spendern kein IL-6 nachweisbar. Bei Tape Stripping war dies bei einem Spender der Fall. Es fällt auf, dass es bei allen drei Behandlungsmethoden einen Ausreißer in der Abbildung A1) gibt. Bei näherer Betrachtung stellt sich heraus, dass diese Ausreißer durch die Werte eines bestimmten Spenders entstanden. Entfernte man die Werte dieses Spenders aus der Berechnung verteilten sich die Werte deutlich gleichmäßiger (siehe Abbildung 8 A2). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden sind gering, CSSS zeigte eine leicht geringere Menge IL-6 als die anderen beiden Methoden. Da man aufgrund des Zeitpunktes der Materialentnahme nicht genau zwischen dem Einfluss der

puren Schädigungsart und dem zusätzlichen Einfluss des aufgetragenen Impfstoffes differenzieren kann, haben wir zusätzlich einen Hautspender analysiert, bei dem alle Arten der Schädigung dem Versuchsablauf entsprechend durchgeführt, jedoch kein Vaxigrip®-Impfstoff aufgetragen wurde. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 8 A3) aufgeführt. Hier finden sich deutlichere Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden. Die Kontrolle zeigte eine deutlich geringere Menge IL-6 als die beiden Schädigungsarten. Die IL-6 Menge nach Tape Stripping war höher und die nach CSSS entsprach den Mengen, welche bei den anderen Spendern mit aufgetragenem Impfstoff gesehen wurden.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde IL-6 als eines der zu bestimmenden Moleküle in die umfangreichere Analyse mit Hilfe der RT-qPCR eingeschlossen. Hierbei wurde CSSS mit und ohne Impfstoff, sowie unbehandelte Haut und ihr Einfluss auf die DNA-Expression verschiedener inflammatorischer Chemokine und Zytokine zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Chemische Schädigung: Abbildung 8 B1) zeigt die Menge an quantifiziertem Interleukin 6 normalisiert auf Gesamtprotein in pg/ $\mu$ g für n=7. Bei den Werten der Okklusionskontrolle waren bei einem Spender kein IL-6 nachweisbar und bei einem weiteren keine Epidermis gewinnbar. Bei 2% SLS konnte nur für zwei Spender Epidermis gewonnen werden und bei einem von diesem war kein IL-6 nachweisbar. Bei Imiquimod konnte für fünf Spender Material zur Quantifizierung gewonnen werden, für drei von diesen war jedoch kein IL-6 nachweisbar. Aufgrund der unterschiedlichen Mengen an n kann man nur ansatzweise Unterschiede zwischen der Okklusionskontrolle und Imiquimod betrachten. Imiquimod zeigte hierbei eine geringere Menge IL-6. Es fällt auf, dass es bei beiden Methoden Ausreißer gibt. Wie bei der physikalischen Schädigung waren diese durch die Werte eines bestimmten Spenders bedingt. Entfernt man die Werte dieses Spenders aus der Berechnung gleichen sich die Ergebnisse der Spender mehr aneinander an, wobei die Werte hier deutlich mehr gegen Null gehen (siehe Abb. 8 B2)). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden sind weiterhin gering, Imiquimod zeigt eine geringfügig geringere Menge IL-6 als die Okklusionskontrolle. Auch für die chemischen Schädigungsmethoden wurden Werte eines Spenders ohne Impfstoff bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 8 B3) dargestellt. Auch hier finden sich deutlichere Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden der Barrierschädigung. Generell war die Menge an bestimmtem IL-6 größer, vor allem für die Okklusionskontrolle. Die von SLS entsprach derer der Proben mit Impfstoff und nach Imiquimod ohne Impfstoff war eine deutlich größere Menge IL-6 nachzuweisen.



**Abbildung 8** Quantifizierung von IL-6 aus Gesamtepidermis Material. Die Abbildungen zeigen die individuellen ebenso wie den Median aller Werte. A1) zeigt die IL-6 Menge normalisiert auf Gesamtprotein für die verschiedenen Arten physikalischer Schädigung in pg/µg für sieben Spender. A2) zeigt die IL-6 Menge normalisiert auf Gesamtprotein für die verschiedenen Arten physikalischer Schädigung in pg/µg für sechs Spender. A3) zeigt die Ergebnisse eines Spenders, bei dem kein Impfstoff aufgetragen wurde. B1) zeigt die IL-6 Menge normalisiert auf Gesamtprotein für die verschiedenen Arten chemischer Schädigung in pg/µg für sieben Spender. B2) zeigt die IL-6 Menge normalisiert auf Gesamtprotein für die verschiedenen Arten chemischer Schädigung in pg/µg für sechs Spender. B3) zeigt die Ergebnisse eines Spenders nach chemischer Schädigung bei dem kein Impfstoff aufgetragen wurde.

### 7.2.3.2 **IL-8**

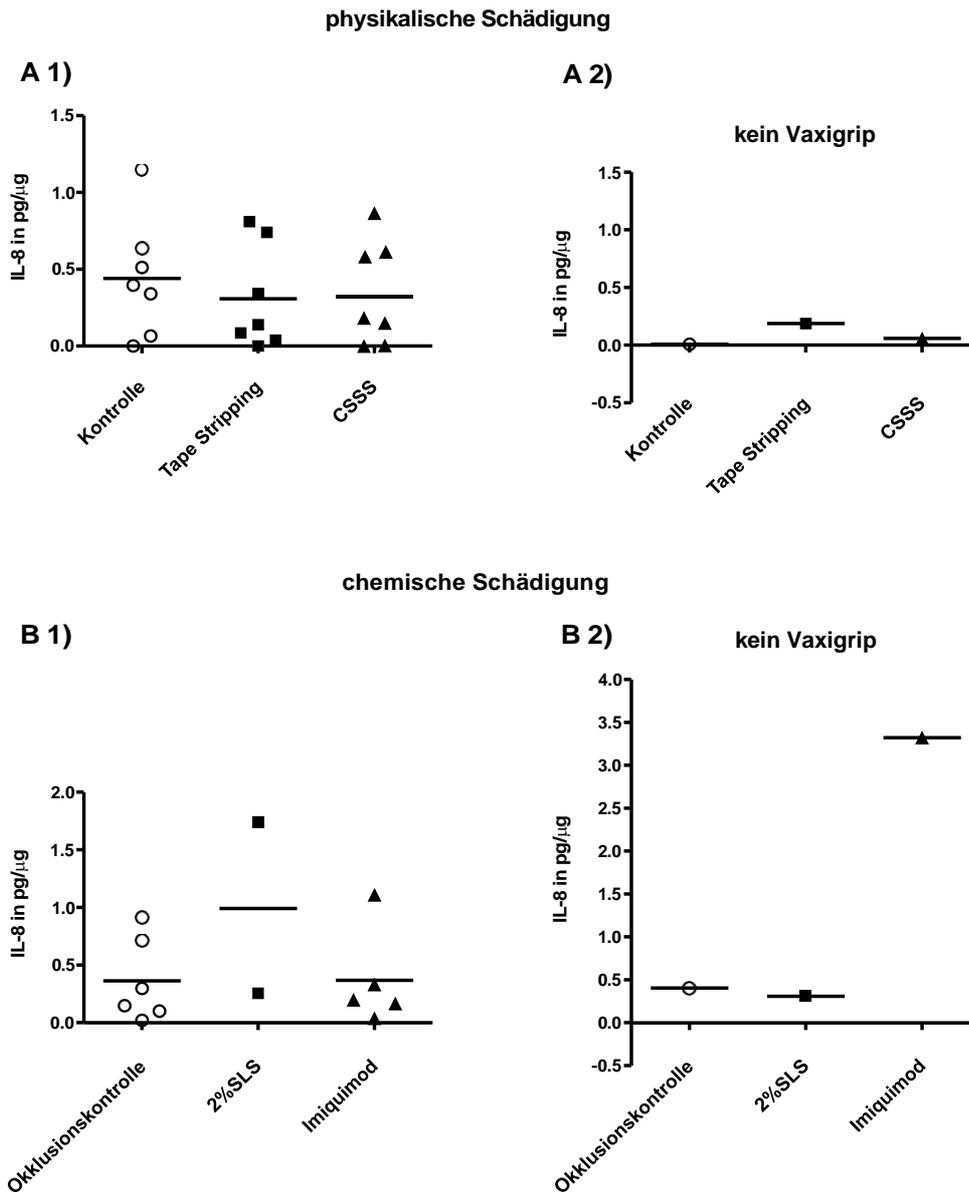
**Physikalische Schädigung:** Abbildung 9 A1 zeigt die Menge an quantifiziertem Interleukin 8 normalisiert auf Gesamtprotein in pg/µg für n=7. Bei allen drei Methoden physikalischer Hautschädigung war bei jeweils einem Spender kein IL-8 nachweisbar. Die durchschnittlichen Interleukinmengen liegen bei allen Methoden unter 1 pg/µg. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden sind gering, wobei die Kontrolle mit ungeschädigter Haut im Mittel geringfügig mehr IL-8 enthielt. Da man auch hier, wie bei IL-6, aufgrund des Zeitpunktes der Materialentnahme nicht genau zwischen dem Einfluss der reinen Schädigungsart und dem zusätzlichen Einfluss des aufgetragenen Impfstoffes differenzieren kann haben wir zusätzlich einen Hautspender analysiert, bei dem alle Arten der Schädigung dem Versuchsablauf entsprechend durchgeführt wurden, jedoch kein

Vaxigrip®-Impfstoff aufgetragen wurde. Die erhaltenen Werte sind in Abb. 9 A2) dargestellt. Hier finden sich weithin entgegengesetzte Beobachtungen zu den Proben mit Impfstoff.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde auch IL-8 als eines der zu bestimmenden Moleküle in die umfangreichere Analyse mit Hilfe von RT-qPCR eingeschlossen.

Chemische Schädigung: Abbildung 9 B1 zeigt die Menge an quantifiziertem Interleukin 8 normalisiert auf Gesamtprotein in pg/µg für n=7. Bei den Werten der Okklusionskontrolle war bei einem Spender keine Epidermis gewinnbar. Bei 2% SLS konnte nur für zwei Spender Epidermis gewonnen werden und bei Imiquimod konnte für fünf Spender Material zur Quantifizierung gewonnen werden. Aufgrund des kleinen n der 2% SLS Proben, sowie des großen Unterschieds zwischen den beiden Proben, lassen sich die Ergebnisse nicht im Vergleich mit den anderen Methoden beurteilen. Die Okklusionskontrolle unterscheidet sich quasi nicht von Imiquimod unter Okklusion.

Auch hier haben wir zusätzlich einen Hautspender analysiert, bei dem alle Arten der Schädigung dem Versuchsablauf entsprechend durchgeführt, jedoch kein Vaxigrip®-Impfstoff aufgetragen wurde. Die erhaltenen Werte sind in Abb. 9 B2) zu sehen. Hier finden sich, wie bei den physikalischen Methoden, weithin entgegengesetzte Beobachtungen als bei den Proben mit Impfstoff.



*Abbildung 9* Quantifizierung von IL-8 aus Gesamtepidermis Material. Die Abbildungen zeigen die individuellen, ebenso wie den Median aller Werte. A1) zeigt die IL-8 Menge normalisiert auf Gesamtprotein für die verschiedenen Arten physikalischer Schädigung in pg/µg für sieben Spender. A2) zeigt die gemessenen IL-8 Menge für einen Spender ohne aufgetragenen Vaxigrip® Impfstoff für die verschiedenen physikalischen Schädigungsmethoden. B1) zeigt die IL-8 Menge normalisiert auf Gesamtprotein für die verschiedenen Arten chemischer Schädigung in pg/µg für sieben Spender. B2) zeigt die IL-8 Menge für einen Spender ohne aufgetragenen Vaxigrip® Impfstoff für die verschiedenen chemischen Schädigungsmethoden.

#### 7.2.4 RT-qPCR Analysen der Epidermis

Die Real-Time PCR Analysen epidermaler Proben wurden in einem abweichenden Setting durchgeführt. Das Ziel dieses Versuchsblocks war die Untersuchung des lokalen epidermalen Immunsystems auf die CSSS Methode und ihre Kombination mit Impfstoffen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten. Wiederum wurde primär ein Influenzavakzin verwendet, für eine

reduzierte Anzahl an betrachteten Molekülen und reduzierte Spenderzahl jedoch auch ein VLP Impfstoff.

#### **7.2.4.1 Auswertung**

Ct-Werte stellen im Prozess der qPCR den sog. Cycle threshold dar, welcher dem Punkt im Ablauf der Reaktion entspricht, an welchem das gemessene Fluoreszenzsignal erstmals größer ist als der Background. Vereinfacht bedeutet dies, dass je geringer der Ct-Wert, desto mehr DNA des gesuchten Moleküls ist vorhanden. Entsprechend ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu beachten, dass ein geringer Wert einer größeren DNA-Menge entspricht als ein höherer Wert.

Der  $\Delta$ Ct Wert stellt den Ct Wert abzüglich des Wertes eines sog. Housekeeping-Gens dar, welcher eine Art Vergleichsstandard für die generell vorhandene DNA-Menge darstellt.

Die in Tabelle 1 und 2 dargestellten Ergebnisse sind die Differenzen der Mittelwerte der  $\Delta$ Ct-Werte zwischen unbehandelter Haut und jeweils CSSS oder CSSS mit Impfstoff. Weiterhin dargestellt ist die Standardabweichung. Da bei der vorliegenden Analyse die  $\Delta$ Ct-Werte genutzt wurden, bedeuten positive  $\Delta\Delta$ Ct-Werte eine im Vergleich zu unbehandelter Haut erhöhte Genexpression nach Anwendung von CSSS bzw. CSSS mit Impfstoff.

Auf eine Analyse mit statistischen Tests wurde verzichtet, da bei der Betrachtung der Standardabweichungen diese als verhältnismäßig hoch im Vergleich zu den eigentlichen Differenzen auffallen und daher zum einen kaum signifikante Ergebnisse zu erwarten sind und falls doch diese zum anderen wenig verlässlich sein würden. So wurde eine unnötige statistische Testung vermieden.

#### **7.2.4.2 Vaxigrip®**

Tabelle 1 fasst die Ergebnisse des Versuchsteils 2 für Vaxigrip® zusammen. Dargestellt sind die Mittelwerte der  $\Delta\Delta$ Ct Werte der vierzehn untersuchten Moleküle, jeweils 4 Stunden, 16 Stunden und 24 Stunden nach Behandlung der Haut entsprechend des Protokolls und oben beschriebener Auswertung.

*Tabelle 1  $\Delta\Delta$ Ct-Werte nach CSSS mit und ohne Vaxigrip®. Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte der Behandlungsarten jeweils zu unbehandelter Haut. Grün unterlegte Felder zeigen eine vermehrte Genexpression nach Behandlung. Orange unterlegte Felder markieren eine besonders niedrige Standardabweichung entsprechender Werte. Rote Schrift betont Werte, welche isoliert für eine Kombination aus CSSS mit Impfstoff erhöht waren und blaue Schrift isoliert für CSSS.*

		$\Delta\Delta$ CSSS 4h	$\Delta\Delta$ CSSS+Vaxigrip 4h	$\Delta\Delta$ CSSS 16h	$\Delta\Delta$ CSSS+Vaxigrip 16h	$\Delta\Delta$ CSSS 24h	$\Delta\Delta$ CSSS+Vaxigrip 24h
CCL22	Mittelwert	0,484	0,041	-0,244	-0,395	0,300	0,733
	SD	0,781	0,539	0,532	0,794	0,616	0,709
CXCL9	Mittelwert	0,729	-0,288	-0,960	1,651	-0,489	2,221
	SD	1,916	1,300	2,579	2,941	2,393	3,977
IL-8	Mittelwert	1,166	1,300	0,870	0,059	-0,089	0,143
	SD	0,993	1,315	1,081	0,953	1,271	0,595
IL-16	Mittelwert	0,308	0,120	-0,053	0,308	-0,065	-0,202
	SD	0,158	0,392	0,588	0,678	0,939	1,178
Chemerin	Mittelwert	-0,091	0,057	0,233	-0,393	0,105	0,086
	SD	1,101	1,887	0,751	0,492	0,774	1,014
CX3CL1	Mittelwert	0,228	0,329	0,138	0,562	-0,054	0,165
	SD	0,596	0,574	0,974	1,423	1,102	0,668
IP-10	Mittelwert	0,005	-0,559	0,908	1,100	-0,166	1,131
	SD	1,260	1,615	1,057	2,701	2,404	2,557
GM-CSF	Mittelwert	0,767	1,189	0,669	0,981	0,801	1,795
	SD	0,831	0,894	1,412	1,547	0,968	2,551
TGFbeta	Mittelwert	0,431	-0,201	0,174	0,297	-0,003	0,198
	SD	0,516	0,510	0,719	1,398	0,556	1,111
CCR7	Mittelwert	0,544	0,450	0,068	-0,013	0,316	0,480
	SD	0,876	1,038	0,516	1,466	0,992	0,757
IL-6	Mittelwert	1,017	0,816	-0,443	-0,351	-0,686	-0,746
	SD	1,090	1,147	0,561	1,539	0,577	1,462
IL-1Ra	Mittelwert	-0,528	-0,977	-0,427	-0,529	-0,509	-1,129
	SD	0,459	0,677	0,421	0,782	0,580	1,542
CCL2	Mittelwert	-0,188	0,203	0,350	0,650	-0,331	0,231
	SD	0,980	0,652	0,569	0,884	1,926	0,587
IFNbeta	Mittelwert	0,130	-1,727	0,672	1,565	0,511	0,366
	SD	0,797	1,084	2,739	2,550	1,320	1,960

#### 7.2.4.2.1 Akute Inflammatorische Reaktion:

**IL-8:** Bei IL-8 zeigte sich 4 h und 16 h nach Behandlung für beide Arten der Bearbeitung eine vermehrte Expression, welche 4 Stunden nach Behandlung mit alleinigem CSSS auch eine geringe Standardabweichung zeigte. Generell wurde die Differenz zu unbehandelter Haut über die Zeit geringer, 24 h nach Durchführung war eine alleinige vermehrte Expression nach CSSS mit Vaxigrip® zu sehen.

**IL-6:** Für IL-6 fiel eine gesteigerte Genexpression für CSSS sowie CSSS mit Vaxigrip® 4 Stunden nach Anwendung auf, gefolgt von einem größer werdenden Abfall über die Zeit. 24 Stunden nach CSSS war hier die negative Differenz von CSSS zu unbehandelter Haut größer als ihre Standardabweichung.

**IL-1Ra:** Die Genexpression von IL-1Ra war zu allen Zeitpunkten stets am größten in unbehandelter Haut, wodurch die dargestellten Differenzen alle negativ sind. Zum Zeitpunkt 4 h war hierbei in beiden Fällen die Standardabweichung geringer als die Differenz. Für CSSS isoliert war dies 16 h nach Durchführung weiterhin der Fall.

IFN-beta: Bei IFN-beta war 4 h nach CSSS eine isolierte Vermehrung der Expression im Vergleich zu unbehandelter Haut zu sehen. Zu den restlichen Zeitpunkten zeigte auch die Kombination mit Vaxigrip® eine Steigerung, mit einem Maximum für beide Behandlungen nach 16 h Inkubation.

#### 7.2.4.2.2 Chemotaxis und Zell-Maturation

IL-16: Die Expression von IL-16 zeigte eine Erhöhung für beide Behandlungsarten 4 h nach Durchführung und isoliert für CSSS mit Impfstoff 16 h nach Behandlung, wobei hier die Differenz zu unbehandelter Haut gestiegen ist.

Chemerin: Bei Chemerin zeigte sich eine isolierte geringfügige Expressionserhöhung 4 h nach CSSS gepaart mit Impfstoffauftragung. 16 Stunden nach CSSS zeigte sich außerdem eine isolierte positive Differenz. 24 h nach Behandlung zeigten sowohl CSSS als auch CSSS mit Vaxigrip® eine erhöhte Genexpression.

CX3CL1: Die Expression von CX3CL1 fiel 4 h und 16 h nach Durchführung vermehrt für beide Arten der Behandlung auf, wobei sie nach alleinigem CSSS zwischen den Zeitpunkten sank und für CSSS mit Vaxigrip® stieg und bis 24 Stunden nach Behandlung sank, wobei zu diesem Zeitpunkt die Genexpression weiterhin alleinig erhöht war.

GM-CSF: GM-CSF zeigte bei beiden Behandlungen und zu allen Zeitpunkten eine vermehrte Genexpression. Nach CSSS mit Impfstoff war 4 h nach Durchführung darüber hinaus die Standardabweichung sehr gering.

CCL2: CCL2 zeigte für die Mittelwerte der Proben nach CSSS mit Vaxigrip® zu allen Zeitpunkten eine erhöhte Expression, mit einem Maximum nach 16 Stunden Inkubation. 4 und 24 Stunden nach Behandlung war die Expressionssteigerung isoliert für CSSS mit Impfstoff.

#### 7.2.4.2.3 T-Zellantwort

CCL22: Vier Stunden nach Behandlung zeigten die Proben nach CSSS als auch die mit zusätzlicher Impfstoffauftragung eine, im Vergleich zu unbehandelter Haut, erhöhte Genexpression von CCL22. Das gleiche galt für 24 h nach Behandlung, wobei hier darüber hinaus für die Proben nach CSSS mit Vaxigrip® die Standardabweichung auch sehr gering war, was die hier gesehene Expressionserhöhung besonders betont. Die Differenz war hierbei 24 h nach Behandlung auch höher als nach 4 h.

CXCL9: Für CXCL9 zeigte sich 4 h nach Behandlung eine isolierte Genexpressionserhöhung durch CSSS. 16 h und 24 h nach Behandlung war dies isoliert für CSSS mit Vaxigrip® der Fall. Die Differenz zu unbehandelter Haut war hierbei zwischen 16 und 24 Stunden ansteigend.

**IP-10:** Für IP-10 zeigten sich 4 Stunden nach CSSS eine geringfügig vermehrte Genexpression und 16 h nach Behandlung sowohl für CSSS als auch für CSSS mit Impfstoff eine Steigerung selbiger. Für CSSS mit Impfstoff persistierte diese Erhöhung 24 h nach Durchführung.

**TGF-beta:** Für TGF-beta zeigte sich 4 Stunden nach Behandlung für CSSS allein eine vermehrte Genexpression im Vergleich zu unbehandelter Haut. Zum Zeitpunkt 16 h war dies für beide Behandlungsarten der Fall. 24 h nach CSSS mit Vaxigrip® war hier die Expression isoliert vermehrt.

**CCR7:** CCR7 zeigte 4 und 24 Stunden nach Behandlung eine vermehrte Expression für beide Interventionen. 16 h nach Durchführung war dies außerdem für CSSS isoliert der Fall.

### 7.2.4.3 VLP

*Tabelle 2  $\Delta\Delta$ Ct-Werte nach CSSS mit und ohne VLP. Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte der Behandlungsarten jeweils zu unbehandelter Haut. Grün unterlegte Felder zeigen eine vermehrte Genexpression nach Behandlung. Orange unterlegte Felder markieren eine besonders niedrige Standardabweichung entsprechender Werte. Rote Schrift betont Werte, welche isoliert für eine Kombination aus CSSS und Impfstoff erhöht waren und blaue Schrift isoliert für CSSS.*

		$\Delta\Delta$ CSSS 4h	$\Delta\Delta$ CSSS+VLP 4h	$\Delta\Delta$ CSSS 16h	$\Delta\Delta$ CSSS+VLP 16h	$\Delta\Delta$ CSSS 24h	$\Delta\Delta$ CSSS+VLP 24h
<b>IL-1alpha</b>	Mittelwert	0,032	-0,383	-0,528	0,199	-0,156	-0,152
	SD	0,839	0,678	0,573	0,941	0,967	1,115
<b>IL-1beta</b>	Mittelwert	-0,098	-0,511	-0,285	-0,364	-1,545	-1,056
	SD	1,173	0,293	0,910	0,780	3,632	4,194
<b>IL-1Ra</b>	Mittelwert	-0,296	-1,288	-0,470	-0,770	0,301	0,225
	SD	0,362	0,546	0,514	0,661	1,571	2,002
<b>CX3CL1</b>	Mittelwert	-0,373	-0,794	-0,366	-0,733	-1,933	-1,591
	SD	1,330	1,572	1,136	0,791	3,683	4,338
<b>TNFalpha</b>	Mittelwert	-0,010	-0,258	0,010	-0,695	-0,495	0,100
	SD	1,466	0,651	0,714	0,981	1,919	1,054
<b>IFNbeta</b>	Mittelwert	-0,138	-1,159	-0,528	0,457	-0,150	-1,470
	SD	1,309	1,326	0,852	1,857	2,713	3,030
<b>CCR7</b>	Mittelwert	-0,339	-1,372	-0,577	-0,623	-0,962	-0,994
	SD	1,976	0,947	1,201	1,328	3,654	3,898

Tabelle 2 fasst die Ergebnisse des Versuchsteils 2 für die Untergruppe VLP zusammen. Hier wurde dasselbe Protokoll wie bei den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Versuchen mit Vaxigrip®-Impfstoff verwendet. Anstelle von Vaxigrip® wurde ein VLP Impfstoff verwendet, dessen Zusammensetzung im Methodenteil genauer beschrieben ist. Aufgrund einer nur begrenzt zur Verfügung gestandenen Menge ebendieser VLPs, konnten die Versuche nur für fünf Spender durchgeführt werden.

#### 7.2.4.3.1 Akute Inflammatorische Reaktion:

**IL-1alpha:** Die Genexpression von IL-1alpha war 4 Stunden nach Durchführung nach CSSS allein geringfügig vermehrt. Zu einem größeren Ausmaß war dies für CSSS mit VLP 16 h nach Behandlung der Fall.

IL-1beta: IL-1beta zeigte keine vermehrte Expression. Nach 24 h Inkubation schien hier die Genexpression in unbehandelter Haut deutlich höher als nach der Behandlung zu sein.

IL-1Ra: IL-1Ra zeigte ähnlich wie bei den Ergebnissen von Vaxigrip® 4 und 16 Stunden nach Behandlung keine vermehrte Expression. Für die Proben nach CSSS kombiniert mit VLP zeigte sich hierbei sogar eine besonders geringe Standardabweichung. Anders als bei Vaxigrip® zeigte sich hier 24 h nach Inkubationsbeginn für CSSS ohne und mit Impfstoff eine vermehrte Genexpression von IL-1Ra.

TNF-alpha: TNF-alpha schien eine isoliert, wenn auch nur geringfügige, Vermehrung der Genexpression 16 h nach CSSS aufzuweisen. Nach 24 h war dies isoliert für CSSS mit VLP-Impfstoff der Fall.

IFN-beta: Für IFN-beta zeigte sich bis auf eine Genexpressionserhöhung 16 h nach CSSS mit VLP, im Vergleich zu unbehandelter Haut keine positive Differenz.

#### 7.2.4.3.2 Chemotaxis und Zell-Maturation

CXC3CL1: Bei CXC3CL1 zeigte sich keine vermehrte Expression. Nach 24 h Inkubation schien auch hier die Genexpression in unbehandelter Haut deutlich höher als nach der Behandlung zu sein.

#### 7.2.4.3.3 T-Zellantwort

CCR7: Anders als bei Vaxigrip® zeigte sich für CCR7 keine vermehrte Expression nach Behandlung. 4 Stunden nach CSSS Anwendung mit VLP war die Expression in unbehandelter Haut sogar so viel größer, dass hier die Standardabweichung vergleichsweise gering war.

### **7.3 UNTERSUCHUNG DER IMPFSTOFFPENETRATION**

Die folgende Darstellung zu den Untersuchungen der Penetrationsdynamik von Impfstoff beginnt mit der Darstellung histologischer Färbungen von Kryoschnitten, gefolgt von Analysen von diagnostischem CSSS und Gesamtepidermis-Material. Auch hierbei werden die Ergebnisse von physikalisch und chemisch behandelter Haut getrennt betrachtet.

#### **7.3.1 Immunhistologische Färbungen von Kryoschnitten**

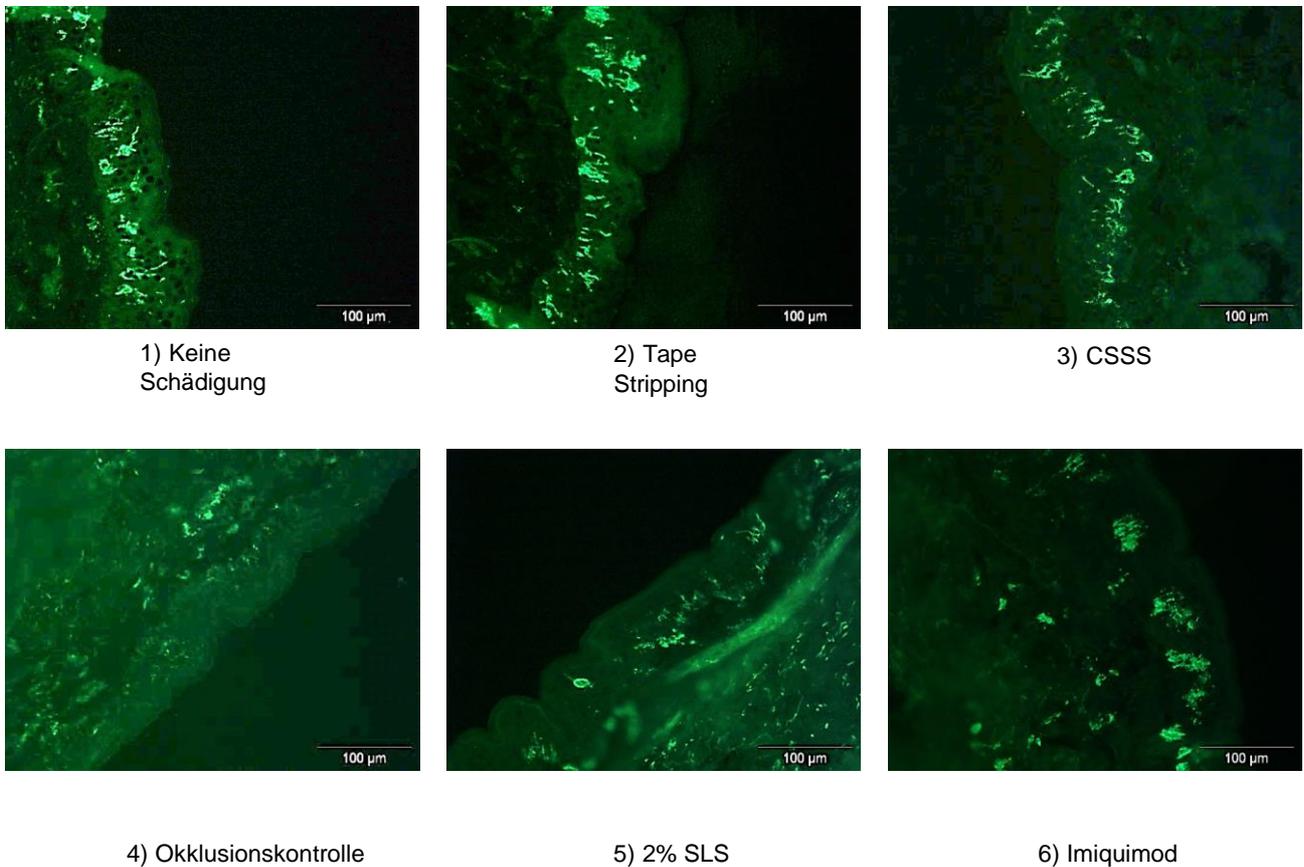
Die Kryoschnitte wurden am Ende des Ablaufs von Versuchsteil 1 gewonnen. Dies bedeutet für die physikalisch geschädigten Proben 48 Stunden nach Schädigung und 24 Stunden nach Impfstoffauftragung, sowie einige Minuten nach Durchführung eines diagnostischen CSSS-Abrisses, und für die chemischen Schädigungsarten 24 Stunden nach Beendigung der Schädigung und 24 Stunden nach Impfstoffauftragung und des weiteren einige Minuten nach diagnostischem CSSS-Abriss.

Es wurden nur Schnitte eines Spenders, jedoch bei diesem für alle Behandlungsarten, angefertigt, um das Potenzial der beabsichtigten Färbungen zur Gewinnung neuer Erkenntnisse zu evaluieren. Nachdem keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen wurden, wurden die weiteren Spender nicht untersucht. Die Ergebnisse dieses einen Spenders sollen an dieser Stelle jedoch trotzdem kurz wiedergegeben werden.

##### **7.3.1.1 CD1a:**

Neben der reinen Betrachtung der gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop wurden für eine Anzahl von 4 bis 13 Schnitten die Anzahl von angefärbten Zellen jeweils in der Epidermis und Dermis ausgezählt.

Abbildung 10 zeigt ausgewählte mikroskopische Bilder der CD1a gefärbten Schnitte eines Spenders für die jeweiligen Hautoberflächenbehandlungsarten, bei einer 20-fachen Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 200 ms.



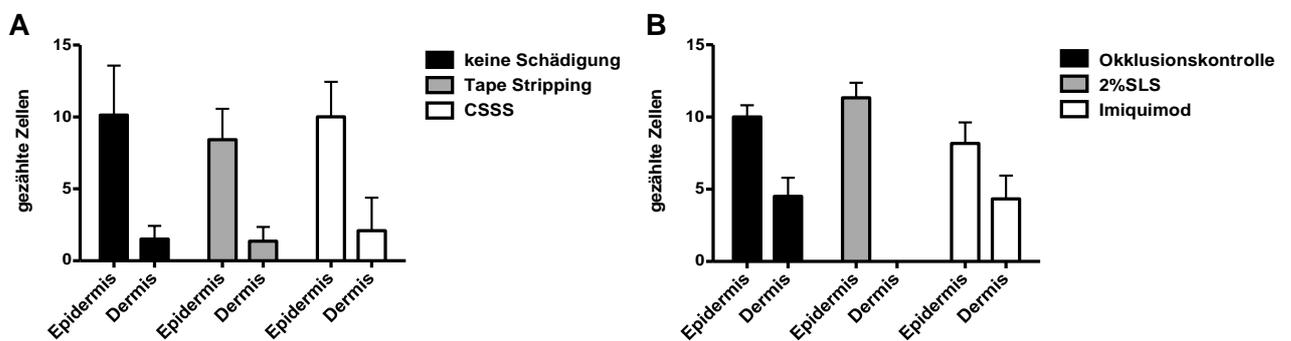
*Abbildung 10 Anti-CD1a Färbung. Übersicht ausgewählter Aufnahmen von mit anti-CD1a gefärbten Kryoschnitten eines Spenders bei 20-facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 200ms*

Die Schnitte der unbehandelten und der Tape Stripping Probe zeigten deutlich zu erkennende Zellcorpi von LCs sowie ein Netz von Dendriten. Bei ungeschädigter Haut konnten in der Epidermis ein Mittelwert von zehn und in der Dermis von einer angefärbten Zelle ausgezählt werden. Nach Tape Stripping waren in der Epidermis durchschnittlich acht und in der Dermis ebenfalls eine Zelle sichtbar (Abb. 11 A).

Bei der Betrachtung der Schnitte von den Feldern, welche mit CSSS bearbeitet waren (Abb. 10 3)) fiel auf, dass die LCs im Vergleich zu den anderen Schädigungsarten teilweise weniger dendritisch und eher abgerundet erschienen. Außerdem ist zu bemerken, dass die Zellzahl in der Dermis im Vergleich zu den anderen physikalischen Schädigungsarten bzw. der Negativkontrolle höher war, nämlich durchschnittlich eine Zelle mehr (Abb. 11 A). Dies deutet auf eine stärkere Aktivierung und Auswanderung der Zellen hin.

Bei der chemischen Schädigung war auffällig, dass bei der Behandlung mit Imiquimod (Abb. 10 6)) bei einem Schnitt auch eine verstärkte Abrundung der Zellen zu beobachten war. Wohingegen die Okklusionskontrolle und die Probe nach 2% SLS eher dendritisch differenzierte Zellen in der Epidermis zeigten (Abb. 10 4) und 5)).

Es ist zu beobachten, dass die größte Dichte an Langerhans-Zellen in der Epidermis bei einer vorherigen Behandlung mit 2% SLS (Abb. 11) zu verzeichnen war, mit durchschnittlich 11 markierten Zellen, wobei gleichzeitig keine Zellen in der Dermis zu sehen waren. Die Okklusionskontrolle zeigte im Mittel zehn Zellen in der Epidermis und vier in der Dermis. Bei Imiquimod waren es acht markierte Zellen in der Epidermis und vier in Dermis.



*Abbildung 11* Anzahl ausgezählter CD1a markierter Zellen, entsprechend Langerhans-Zellen in Epidermis und Dermis. A zeigt die gezählten LCs der gefärbten Schnitte nach physikalischer Barrierschädigung. B zeigt die Zellzahlen nach chemischer Barrierschädigung.

### 7.3.1.2 H1N1:

Die H1N1-Färbung zeigte keine kohärenten, eindeutigen Ergebnisse. Dennoch sollen die Beobachtungen im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### Keine Schädigung

In der Epidermis war ein geringes Farbsignal sichtbar. In der Dermis waren vereinzelt Zellartige Strukturen zu erkennen, welche ein starkes Signal abgaben. Generell waren mögliche Partikelansammlungen vor allem in der Dermis zu erkennen, am ehesten handelte es sich dabei jedoch um Verschleppungen von Partikeln von der Hautoberfläche.

#### Tape Stripping

Auf der Hautoberfläche war möglicherweise abgelagertes Material zu erkennen, welches auch in der Epidermis zu sehen war. Zwischen den Keratinozyten der Epidermis waren signalreiche Anfärbungen zu erkennen, evtl. handelte es sich dabei um Langerhanszellen und ihre Dendriten oder einfach um Zellzwischenräume. Im Vergleich zu den CSSS

Bildern ist jedoch eher an zellulären Strukturen zu denken. In der Dermis waren Strukturen mit einem starken Farbsignal zu erkennen.

### CSSS

Im Bereich der Epidermis war ein Farbsignal zu registrieren mit vereinzelt größeren Signalen, was auf Zellkörper o.ä. hindeutet. Teilweise waren in der Epidermis auch Partikelansammlungen i.S. von Nestern zu erkennen, dabei kann es sich zwar um Verschleppungen handeln die Beschränkung auf die dunklen intraepidermalen Areale spricht jedoch eher für Zellen. Auf der Hautoberfläche waren vereinzelt kleine Materialansammlungen zu sehen. In der Dermis waren gefärbte Zellen zu erkennen.

### Okklusionskontrolle

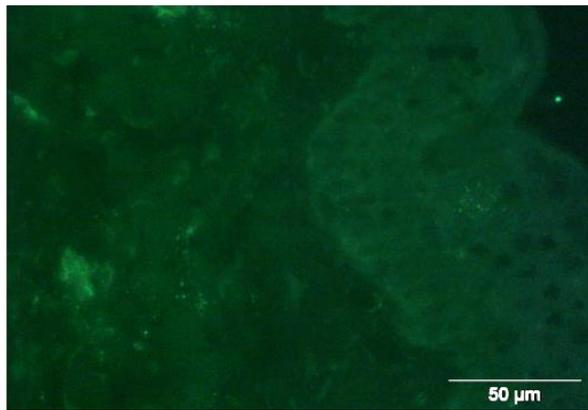
Intraepidermal war ein starkes Fluoreszenzsignal zu erkennen, dermal waren wiederum Zellen fluoreszierend zu sehen.

### 2% SLS

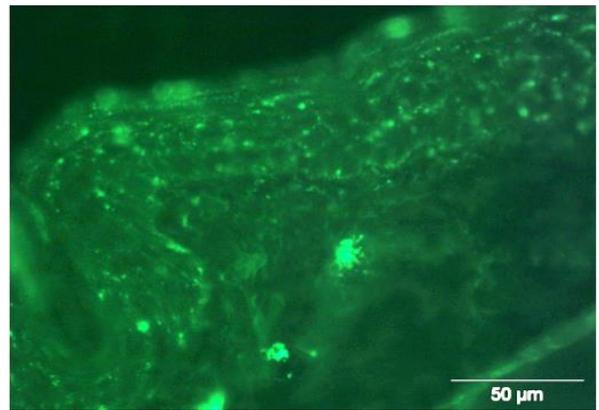
Auf der Hautoberfläche war ein Farbsignal zu verzeichnen ebenso wie in der Epidermis, wobei es hier sehr stark war, besonders im Bereich der Basalmembran. Ähnlich wie bei CSSS bearbeiteter Haut waren hier Partikelansammlungen in „Zelllöchern“ zu erkennen jedoch mit einem besseren Signal.

### Imiquimod

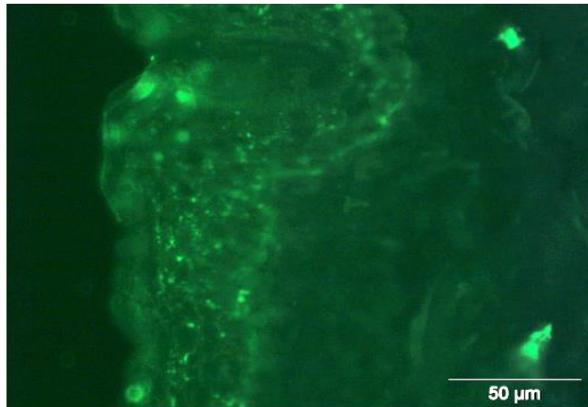
In der Epidermis war eine starke Färbung zu erkennen zum Teil assoziiert mit Zellen, zum Teil, soweit mit der verwendeten Technik beurteilbar, eher interzellulär zwischen den Keratinozyten. Partikuläre Ansammlungen können in einigen Bildern nicht ausgeschlossen werden. In der Dermis waren ebenfalls zellartige Strukturen mit einem Farbsignal zu erkennen. Auf einem Schnitt waren darüber hinaus auch Partikel sichtbar.



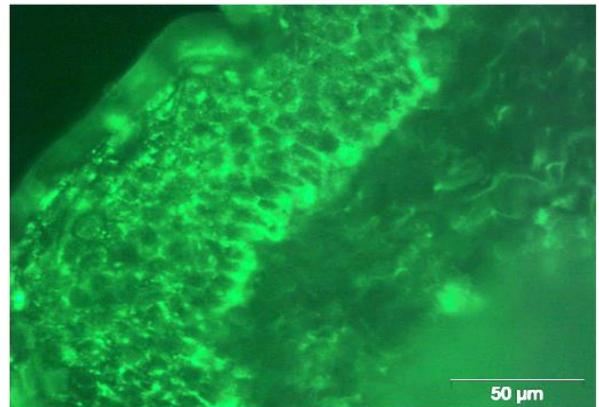
Keine  
Schädigung



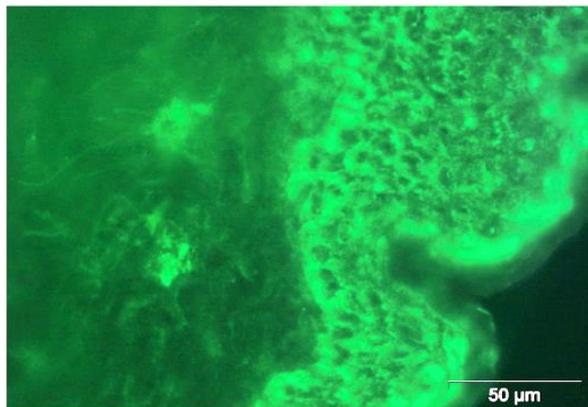
Tape  
Stripping



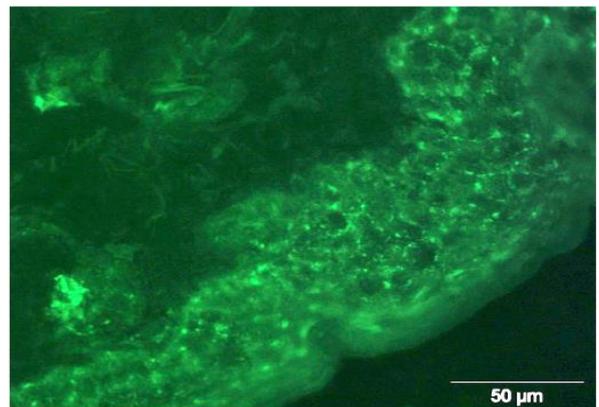
CSSS



2% SLS



Imiquimod



Okklusionskontrolle

*Abbildung 12* Anti-H1N1 Färbung. Gezeigt sind ausgewählte Schnitte einer anti-H1N1 Färbung von Kryoschnitten eines Spenders mit 6 verschiedenen Behandlungsmethoden der Hautoberfläche bei 40-facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 200ms.

### 7.3.2 H1N1- Impfstoffquantifizierung aus diagnostischen CSSS-Abrissen

Die diagnostischen CSSS-Abrisse wurden am letzten Tag des Versuchsablaufs von Block 1 durchgeführt, also für die physikalischen Schädigungsmethoden 48 Stunden nach Schädigung und für die chemischen 24 Stunden nach Beendigung der Okklusion und damit der Schädigung. Außerdem sowohl für die physikalischen als auch chemischen Methoden jeweils 24 Stunden nach Impfstoffauftragung. Im Rahmen dieses ELISA wurde versucht den Impfstoff bzw. einen Proteinanteil, welcher Teil des Vaxigrip® Impfstoffes ist, H1N1, zu quantifizieren. Die Idee dahinter war, dass das Absammeln von ca. 30% der Hornschicht mittels CSSS es ermöglicht, die Penetration topisch applizierter Substanzen in die oberen Hornschichtkompartimente zu untersuchen. Die bestimmte Menge an H1N1 wurde hierbei als absolute Proteinmenge in ng angegeben. Zur Kontrolle wurde auch CSSS Material eines Spenders getestet, bei dem das Versuchsprotokoll entsprechend der Beschreibung im Methodenteil, allerdings ohne Auftragen von Impfstoff, durchgeführt wurde.

*Tabelle 3 Absolute H1N1 Menge aus Diagnostischem CSSS. Gezeigt sind die gemessenen absoluten Mengen von H1N1 Protein in ng für die Proben physikalischer und chemischer Schädigung von n=7 als individuelle Werte aller Spender sowie der Mittelwert der jeweiligen Schädigungsgruppe.*

Spender	<u>Un-</u> <u>behandelt</u>	<u>Tape</u> <u>Stripping</u>	<u>CSSS</u>	<u>Okklusions-</u> <u>kontrolle</u>	<u>2% SLS</u>	<u>Imiquimod</u>
1	0,74	0,00	23,19	0,00	1,98	8,72
2	13,71	0,00	0,00	0,00	3,68	8,21
3	2,11	0,00	0,00	0,00	0,00	34,44
4	0,00	0,00	5,53	5,68	0,00	0,00
5	125,42	88,00	85,42	46,71	62,19	148,65
6	690,58	187,35	257,03	273,81	0,00	375,74
7	46,71	22,19	98,32	0,00	67,35	26,06
Mittelwert	125,61	42,51	67,07	46,60	19,31	85,97
Standard- abweichung	253,17	71,52	93,19	101,64	31,12	137,57

In den Impfstoff-behandelten Proben war H1N1 nachweisbar, allerdings waren die durchschnittlich nachgewiesenen Mengen sehr variabel. Bei einer Probe der unbehandelten Kontrolle wurde kein H1N1 nachgewiesen. Bei Tape Stripping wurde bei vier Proben und bei CSSS bei zwei Proben kein Protein nachgewiesen. Bei Betrachtung der Durchschnittswerte wird deutlich, dass bei der Kontrolle, also auf unbehandelter Haut, deutlich mehr H1N1 nachgewiesen wurde. Bei einfachem Tape Stripping wurde hingegen die geringste Menge an Protein quantifiziert.

Auch nach chemischer Schädigung waren die nachgewiesenen H1N1 Mengen sehr unterschiedlich. Bei vier Proben der Okklusionskontrolle wurde kein Protein nachgewiesen, nach

2% SLS waren es drei und nach Imiquimod-Okklusion ein Spender. Die Variabilität zwischen den Spendern war wiederum sehr groß. Die durchschnittlich nachgewiesene Menge H1N1 war für mit 2% SLS behandelte Haut am geringsten und für mit Imiquimod behandelte am größten.

### 7.3.3 H1N1-Impfstoffquantifizierung aus Gesamtepidermis

Im Rahmen der Gesamtepidermis Analyse wurde Material von allen sieben Spendern für jeweils die verschiedenen Hautschädigungsmethoden inklusive Kontrollen gewonnen. Für die physikalischen Schädigungsmethoden erfolgte die Entnahme am Ende des Versuchsablaufes, also 48 Stunden nach Durchführung der Schädigung, 24 Stunden nach Auftragung des Vaxigrip® Impfstoffes und einige Minuten nach Durchführung eines diagnostischen CSSS auf allen drei Hautfeldern. Für die chemischen Schädigungsmethoden erfolgte die Entnahme ebenfalls am Ende des Versuchsablaufes, also 24 Stunden nach Ende der Okklusion mit den verschiedenen Agenzien, 24 Stunden nach Auftragung des Vaxigrip® Impfstoffes und einige Minuten nach Durchführung eines diagnostischen CSSS auf allen drei Hautfeldern (zur Übersicht siehe Abb. 2 im Methodenteil). Aufgrund von Blasenbildung konnte hier bei einigen Spendern kein Epidermismaterial für die Analyse gewonnen werden.

Das Ziel der Versuche war es, H1N1 als Bestandteil des aufgetragenen Vaxigrip®-Impfstoffes quantitativ in Epidermismaterial nachzuweisen. Dies sollte Aufschluss über den Einfluss der unterschiedlichen Schädigungsmethoden auf die Penetration des Impfstoffes geben.

*Tabelle 4 Absolute H1N1 Menge aus Gesamtepidermis. Gezeigt sind die gemessenen absoluten Mengen von H1N1 Protein in ng für die Proben physikalischer und chemischer Schädigung von als individuelle Werte aller Spender sowie der Durchschnittswert der jeweiligen Schädigungsgruppe. Leere Felder sind bei den Proben, wo aufgrund von Blasenbildung keine Epidermis mehr für die Bestimmung gewonnen werden konnte. Außerdem dargestellt sind die gemessenen H1N1 Werte eines Spenders ohne Impfstoff.*

Spender	Un- behandelt	Tape Stripping	CSSS	Okklusions- kontrolle	2% SLS	Imiquimod
1	0,15	0,24	0,14	0,04	0,48	0,43
2	0,35	0,01	0,33	0,05		0,40
3	0,20	0,21	0,11	0,31		0,51
4	1,17	0,18	0,12	0,31	0,04	
5	0,09	0,00	0,13	0,06		0,11
6	0,18	0,13	0,02			
7	0,00	0,12	0,06	0,14		
Mittelwert	0,30	0,13	0,13	0,15	0,26	0,36
Standard- abweichung	0,40	0,09	0,10	0,13	0,31	0,17
Kontrolle ohne Vaxigrip®	0,11	0,08	0,1	0,13	0,11	0,08

Die Durchschnittswerte des nachgewiesenen H1N1 liegen für alle Arten physikalischer Schädigung unter 0,5 ng, wobei sie für das Kontrollfeld ohne Barrierschädigung größer als bei den beiden anderen Methoden ist, ähnlich wie bei den Ergebnissen aus dem CSSS Oberflächenabrissmaterial (siehe Tab. 3 und vgl. Tab. 4). Bei einem Spender ohne Schädigung wurde kein Protein gefunden, bei Tape Stripping war dies bei einem und bei CSSS bei keinem Spender der Fall.

Zur Kontrolle wurde ähnlich wie bei IL-6 und IL-8 auch der H1N1 ELISA bei den Proben eines Spenders ohne Impfstoffauftragung durchgeführt (siehe Tab. 4). Hierbei fiel auf, dass auch bei diesen Proben eine geringe Proteinmenge nachweisbar war. Auch wenn diese geringer war als die der Proben bei denen Impfstoff aufgetragen wurde deutet dies, vor allem mit Blick auf die Anzahl der Spender bei denen kein H1N1 detektiert wurde, auf eine mögliche Kreuzreaktion mit anderem vorhandenem Proteinmaterial in den Proben hin.

Für die Proben, welche mit 2% SLS vorbehandelt wurden, konnte nur für zwei Spender Epidermismaterial zur Proteinanalyse gewonnen werden. Für die Okklusionskontrolle war dies bei sechs und für Imiquimod bei vier Spendern der Fall. Auf die Ergebnisse der 2% SLS Proben soll aufgrund der großen Diskrepanz zwischen den beiden Werten und der geringen Anzahl an überhaupt erhaltenen Ergebnissen nicht genauer eingegangen werden. Vergleicht man Imiquimod und die Okklusionskontrolle so ist der Mittelwert nach Imiquimodbehandlung größer als der der Kontrolle. Generell ist die Menge von quantifiziertem H1N1 deutlich unter 1 ng und damit sehr gering (siehe Tab. 4). Betrachtet man auch hier die Proben des Einzelspenders ohne Impfstoff, so wurde, wie bei den physikalischen Schädigungsarten, Protein nachgewiesen.

### 8.1 HAUTPHYSIOLOGISCHE EVALUATION

Die Ergebnisse der hautphysiologischen Messungen legen nahe, dass CSSS als physikalische Hautschädigungsmethode deutlich effektiver als einfaches Tape Stripping ist, um die Durchlässigkeit der Haut kurzfristig zu verstärken, ohne jedoch zu langfristigen Veränderungen der Hautphysiologie zu führen. Dies ist entgegen der Aussage einiger Autoren, welche dies als Argument gegen seine Anwendung in transkutaner Vakzinierung verwenden [88]. Tatsächlich konnte sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass CSSS allenfalls ca. 30% der epidermalen Hornschicht entfernt und bei klinischer Anwendung milde bis moderate Erytheme bildet, die sich zurückbilden [88]. Chemische Schädigungsmethoden in Verwendung mit Okklusion zeigten einen deutlich stärkeren und nachhaltigeren Einfluss auf die Hautbarriere, vor allem die Verwendung von SLS, entsprechend vorhandener Forschungsergebnisse. Imiquimod scheint hierbei aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften eine mildere und daher vielversprechendere Form der Hautbeeinflussung zu bewirken.

#### 8.1.1 Physikalische Barrierestörung

Auf Seiten physikalischer Methoden zur Schädigung der Hautbarriere war im Rahmen dieser Arbeit einfaches Tape Stripping sowie CSSS im Fokus der Untersuchungen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist in der Literatur vor allem der TEWL als physiologischer Marker einer Barrierschädigung [14] im Zusammenhang mit Tape Stripping betrachtet worden, wobei meist ein Anstieg ebendessen beobachtet wurde [13, 34]. Um eine messbare Beeinflussung nachzuweisen sind jedoch laut einiger Autoren häufig mehrere aufeinanderfolgende einfach Tape Strippings nötig [16, 24, 35, 36]. Im Rahmen neuerer Untersuchungen haben Autoren weiterhin einen TEWL Anstieg in *ex vivo* Haut beschrieben, welcher mit physiologischen Degenerierungsprozessen zusammenhängt. Eine Verstärkung des TEWL Anstiegs konnte in diesen Untersuchungen jedoch dennoch zuverlässig durch Tape Stripping erzeugt werden [89]. Dies gilt auch für die Corneometrie, welche ebenfalls ein guter Marker zur Evaluation der Intaktheit der Hautbarriere ist [31, 40]. Hierbei wurde nach mehrfachem Tape Stripping ein Anstieg bis zu 24h nach Durchführung beobachtet [24]. In *ex vivo* Hautproben war dies jedoch nicht reproduzierbar [89].

In dieser Arbeit wurde ein einziger Tape Strip durchgeführt, um den Zusatz von Cyanoacrylat für das CSSS im direkten Vergleich zu betrachten. Daher ist es nicht überraschend, dass für die Tape Stripping Kohorte keine großen Änderungen der Hautphysiologie zu beobachten waren. Anders sieht dies bei CSSS aus, hier wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass mit nur einem CSSS 30% des Stratum Corneums entfernt werden kann [42]. Generell besteht die Meinung, dass der Einfluss auf die Hautphysiologie durch Tape Stripping mit der Menge des

abgetragenen SC korreliert, was auf das CSSS als effizientere Abrissmethode übertragbar sein sollte [24, 90]. Das größere Ausmaß an durch CSSS entferntem SC scheint jedoch, basierend auf den hier gewonnenen Ergebnissen, nicht mit einer persistierenden Schädigung der Hautbarriere korreliert zu sein [11].

Die beobachteten Unterschiede die Sebumetrie und Epidermisdicke betreffend, nämlich eine leichte Reduktion beider Parameter nach Tape Stripping und verstärkt nach CSSS, welche selbst 24 Stunden und 48 Stunden nach Durchführung messbar war, ist durch eben die vermehrte Entfernung des SC durch CSSS im Vergleich zu Tape Stripping erklärbar. Ähnliches gilt für die beobachtete Veränderung des Hautoberflächen pHs, welcher 24 Stunden nach Beginn der Inkubation sowohl für die Kontrolle als auch für die Abrissmethoden einen Abfall zeigte, dieser war für CSSS jedoch etwas stärker im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen. In diesem Fall ist die Annahme zu stellen, dass das CSSS den Säureschutzmantel der Haut stärker beeinflusst. Außerdem ist eine den pH beeinflussende Komponente des Cyanoacrylats nicht auszuschließen. Bei genauer Betrachtung der pH Werte fällt jedoch auch auf, dass die Ausgangswerte vor Schädigung sehr hohe pH Werte zeigten, um die 7, wobei ein normaler Haut-pH jedoch um die 5 beträgt. Das Absinken des pH im Zeitverlauf beschreibt also eher eine Annäherung an physiologische Werte. Eine Rolle könnte hier die Inkubation bei 37°C gespielt haben. Zudem handelt es sich bei den verwendeten Hautproben um exzidierte Haut, die im Rahmen chirurgischer Eingriffe anfällt. Umfassende Desinfektionsprozesse, aber auch Kontakt während der OP mit Körperflüssigkeiten, können die Oberfläche hierbei sekundär verändern.

### **8.1.2 Chemische Barrierestörung**

Bei der Beurteilung der Ergebnisse aus den hautphysiologischen Messungen nach chemischer Barrierschädigung wurden die Messresultate direkt nach 24 h Okklusion sowie 24 h danach betrachtet. Die Impfstoffauftragung erfolgte hier direkt nach den Messungen nach Ende der Okklusion und muss auch hier als potenzieller Einflussfaktor auf die Messung 24 Stunden nach Okklusion beachtet werden.

Zum einen ist der Effekt von okkludiertem Wasser, also die Okklusionskontrolle, zu betrachten. Hier fiel ein erhöhter TEWL im Vergleich zum Basiswert auch 24 h nach Okklusion auf, wenn auch geringfügiger als direkt nach Okklusion. Dies ist eher ungewöhnlich, da in der Literatur ein TEWL Anstieg direkt nach Okklusion zwar beschrieben ist, dieser sich jedoch meist nach 1 Stunde normalisiert [91-93]. Hier lässt sich postulieren, dass die mangelnde aktive Durchblutung der Haut in den hier genutzten ex vivo Hautproben ursächlich war. Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen wurden in vivo durchgeführt. Der weiterhin gesehene Abfall in pH und Sebumgehalt nach Okklusion lässt sich durch bereits beschriebene Beobachtungen erklären, dass Okklusion nachweislich zu Störung der Lipidschicht der Epidermis sowie der

Kohäsion des SC generell führt [90]. Der Effekt von okklusiv angewendetem Wasser wurde hierbei sogar mit der Wirkung von Surfactants verglichen [94]. Generell wird von anderen Autoren eine Steigerung der Stratum corneum Hydratation beschrieben nach Okklusion mit Wasser, was physiologischen Überlegungen entspricht [91, 95, 96]. Hier scheint die Messweise von Bedeutung zu sein, da andere Autoren, unter Benutzung eines Corneometers ähnlicher Art wie in dieser Arbeit, keine Änderungen in der Corneometrie nach Okklusion festgestellt haben [92, 97]. Der in dieser Arbeit gesehene Abfall der Corneometrie direkt nach Okklusion mit Wasser ist jedoch eher ungewöhnlich.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von okklusiv aufgetragenem SLS entsprechen die Beobachtungen weitestgehend Erkenntnissen aus der Literatur. Der sehr prominente TEWL Anstieg nach SLS Okklusion wurde wiederholt beschrieben und entspricht gängigen Methoden um künstliche Hautbarrierestörungen im Rahmen verschiedener Experimente zu erzeugen [98]. Die hiesigen Ergebnisse stimmen mit Berichten aus der Literatur überein, dass ein erhöhter TEWL bis 24 h nach Ende der Okklusion und länger messbar ist [24, 93, 98], wobei die Dauer und das Ausmaß dieses Anstiegs abhängig ist von der Konzentration der SLS Lösung sowie der Dauer der Okklusion [32, 91, 99]. Einige Autoren beschrieben, dass die Okklusion die Wirkung von SLS nicht signifikant beeinflusst und das entsprechende Effekte auch ohne diese zu sehen sind [92]. Ein verstärkender Effekt durch die Okklusion ist jedoch naheliegend und wird weitgehend angenommen [91, 96]. Auch in der Literatur mehrfach beschrieben ist ein Abfall der Stratum corneum Hydratation bzw. der sog. Kapazitätz (elektrische Kapazität), bestimmt durch die Corneometrie [24, 91, 92]. Fluhr et al. beschrieben sogar einen bis 24 h nach Ende der Okklusion progredienten Abfall der Kapazitätz gefolgt von einem Anstieg [24]. Auch wenn die im Rahmen dieser Arbeit gesehene Beobachtungen zumindest auf einen Abfall an Kapazitätz direkt nach Okklusion hindeuten, so sind sie jedoch weniger eindeutig. Die weiterhin gesehene Abfälle von Sebumgehalt und pH wurden in dieser Form bisher nicht konkret beschrieben, liegen jedoch nahe, wenn man beachtet, dass die Hautbarriere durch SLS bekanntermaßen geschädigt wird. Es wird eine langanhaltende inflammatorische Reaktion gesehen, genauso wie ein Einfluss auf die Kohärenz des SC und das Proliferationsverhalten und die Struktur der Zellen, vor allem in Kombination mit Okklusion [32, 90, 100]. Interessant ist die Beobachtung von reduzierter Hauttemperatur nach SLS Okklusion. SLS scheint in seiner Anwendung in diesem Zusammenhang einen kühlenden Effekt zu haben.

Bei der Interpretation der Ergebnisse mit okklusiv aufgetragenem Imiquimod ist die generelle Formulierung der Creme zu beachten. Der TEWL nach Okklusion verhält sich bei Imiquimod ähnlich wie die Okklusionskontrolle, weswegen der beobachtete leichte Anstieg am ehesten der Okklusion an sich zuzuschreiben ist, was wie oben dargestellt in der Literatur mehrfach beschrieben ist. Ähnliches gilt für den Hautoberflächen pH. Die beschriebenen Unterschiede im

Sebumgehalt sowie Wassergehalt des SC sind am ehesten auf die Creme Formulierung zurückzuführen, wobei hier die simple pharmakologische Überlegung, dass die zusätzliche fett- und wasserhaltige Schicht das SC vor Austrocknung schützt, naheliegt. Diese Beobachtungen unterstützen den Konsens, dass Imiquimod für normale Haut nicht schädlich ist [49].

## **8.2 LOKAL INFLAMMATORISCHE ÄNDERUNGEN**

Da die Zytokin- und Chemokin-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten und im Rahmen unterschiedlicher Versuchsabläufe durchgeführt wurden, sollen die Ergebnisse zunächst separat voneinander und für die verschiedenen Arten der Hautbarriereschädigung betrachtet werden. Es ist zu beachten, dass die Sebutape-Abrisse die immunologische Situation der superfiziellen Epidermis vor Auftragung des Impfstoffes darstellten und die anderen Analysen die Situation danach.

Generell war zu beobachten, dass CSSS klare lokal inflammatorische Reaktionen der Haut auslösten, was durch vermehrte Präsenz akut-inflammatorischer Moleküle gekennzeichnet war. Weitergehende Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass die Kombination von CSSS mit topischer Impfstoffauftragung zu weitergehender Immunaktivierung, u.a. mit Steigerung der T-Zellantwort führte. Die Untersuchungen der chemischen Hautbarriereschädigung zeigten weniger klare Beeinflussung des lokalen kutanen Immunsystems, weshalb die Ressourcen zur weitergehenden Analyse für CSSS genutzt wurden. Imiquimod zeigte jedoch auch Hinweise auf eine moderate Immunaktivierung nach okklusiver Anwendung.

### **8.2.1 Zytokinbestimmung aus Sebutape-Abrissen**

Physikalische Barrierestörung: Die Analyse epidermalen Materials aus Sebutape-Abrissen zeigte einige interessante Erkenntnisse. 24 h nach einem einfachen Tape Abriss konnte in den Proben dieser Kohorte eine erhöhte Menge an IL-1alpha festgestellt werden. Nach CSSS, einer eigentlich stärker schädigenden Methode, waren keine Änderungen im epidermalen IL-1alpha Gehalt, verglichen mit unbehandelter Haut, zu beobachten. Ein Anstieg von IL-1alpha als Reaktion auf kleinste Störungen der Haut ist in der Literatur vielfach beschrieben [65, 101, 102]. Hierbei werden IL-1alpha, und auch andere Zytokine wie TNF-alpha, von Keratinozyten produziert, teilweise gespeichert und bei Störung der epidermalen Integrität als Startpunkt lokaler Immunreaktionen freigesetzt [17, 55, 101]. Diese Erkenntnisse werden in unseren Ergebnissen bei der Betrachtung der IL-1alpha Mengen nach Tape Stripping also wiedergegeben. Erstaunlich ist, dass diese Beobachtungen nach CSSS nicht gemacht wurden. Vermutliche Ursache hierfür ist die beschriebene Erkenntnis, dass IL-1alpha in der Epidermis gespeichert vorliegt um als Reaktion auf Störungen der Hautoberfläche schnell sezerniert werden zu können [17]. Die Entfernung von deutlich mehr SC Material durch CSSS im Vergleich zu Tape Stripping legt nahe,

dass erwähnter Speicher von IL-1alpha mit dem CSSS abgetragen werden und für beschriebene Ausschüttung nicht mehr zur Verfügung stehen [11, 103].

Das geringfügige Vorhandensein von IL-1beta sowie IL-1Ra in dem untersuchten Sebutapematerial stellt ebenfalls eine interessante Beobachtung dar. Bezüglich der Ursachen ergeben sich verschiedene Vermutungen. Es ist zu sagen, dass mit dem Sebutape nur die oberste epidermale Schicht auf ihre Zusammensetzung untersucht werden kann. Da die beiden Zytokine aktiv von den Zellen der Epidermis hergestellt werden müssen, ist es unwahrscheinlich, dass sie in ausreichender Menge produziert würden, um in der obersten Schicht des SC nachweisbar zu werden. Diese Beobachtung wurde für andere Zytokine auch in der Literatur beschrieben [33, 101, 104, 105]. Weiterhin spielt das zeitliche Profil der epidermalen Immunreaktion auf Barrierestörung hier eine Rolle. IL-1beta und andere Zytokine wurden in verschiedenen Studien meist in ihrer höchsten Konzentration ca. 2,5 bis 7 Stunden nach Störung nachgewiesen [78, 106]. Auch wenn ebenfalls eine gemessene Erhöhung bis 24 Stunden nach mehrfachem Tape Stripping beschrieben ist [107], scheint Sebutape für die Quantifizierung in diesem Zusammenhang nicht tiefgreifend genug zu sein.

Chemische Schädigung: Betrachtet man die Ergebnisse der Sebutape-Analysen nach chemischen Schädigungsarten, fallen einige interessante Beobachtungen auf.

SLS zeigte eine signifikant geringere IL-1alpha Menge in dem Abrissmaterial im Vergleich zur Okklusionskontrolle. Obwohl in der Literatur an zahlreichen Stellen eine vermehrte Ausschüttung von IL-1alpha nach SLS Anwendung auf der Haut beschrieben wird, so ist es wichtig immer auch die Konzentration der SLS Lösung zu beachten, da diese mit steigender Tendenz mit einer erhöhten IL-1alpha Freisetzung vergesellschaftet ist [33, 108-110]. Dennoch ist ebenfalls beschrieben, dass durch Tape Stripping gewonnene IL-1alpha Mengen nach SLS Anwendung mit langen Inkubationszeiten sinken. Dies wird damit erklärt, dass die generelle Proteinmenge durch die Irritation durch SLS sinkt und die Zellkohäsion des SC stark reduziert wird [90, 103]. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass auch die Okklusion an sich zu einer inflammatorischen Reaktion der Epidermis führt und daher wäre ein Vergleich mit Werten vor Okklusion wünschenswert. Weiterhin lässt sich postulieren, dass das SLS das SC so sehr schädigt, dass der IL-1alpha Pool weitestgehend zerstört wird und damit seine Hauptursprungsquelle wegfällt.

Die Beobachtung, dass IL-1beta und IL-1Ra unter der Nachweisgrenze der verwendeten Kits waren, lässt sich durch Beobachtungen anderer Autoren erklären, dass diese Zytokine de novo gebildet werden und damit eher in tieferliegenden Schichten des SC nachweisbar sind, ähnlich wie bei den physikalischen Schädigungsarten [33, 101, 103-105, 111, 112]. Eine zeitliche Komponente scheint hier nur marginal von Einfluss zu sein, da zwar die lange Inkubation von 24

h die IL-1alpha Menge verringern kann, andere Autoren jedoch eine generelle inflammatorische Reaktion der Epidermis auf SLS bis zu 6 Tage nach Anwendung beschreiben [100, 103]. Darüber hinaus wurde der Sebutape-Abriss kurz nach Ende der SLS Okklusion durchgeführt.

Mit Imiquimod okkludierte Haut zeigte direkt nach Ende der Behandlung eine im Vergleich zur Okklusionskontrolle erhöhte Menge an IL-1alpha in epidermalem Sebutape-Abrissmaterial. Diese Beobachtung ist weitestgehend in der Literatur beschrieben, hierbei ist IL-1alpha ein Zytokin, welches nach topischer Imiquimodanwendung schnell in der Epidermis freigesetzt wird [46, 104, 113-115]. Ebenfalls ist in der Literatur ein Anstieg der IL-1beta Konzentration nach Applikation beschrieben, jedoch wird dieses Zytokin vor allem von LCs sekretiert. Daher ist es nachvollziehbar, dass es im Sebutapematerial nicht in ausreichender Menge nachgewiesen werden konnte, da hierbei hauptsächlich Material des SC gewonnen wird und die LCs eher in den tieferen Schichten der Epidermis lokalisiert sind [101, 104, 105].

Okklusion allein zeigte im Vergleich zu unbehandelter Haut ebenfalls einen stimulierenden Einfluss auf die Ausschüttung von IL-1alpha, was durchaus Erkenntnissen anderer Autoren entspricht [17, 111].

### **8.2.2 Chemokin Array Analysen aus diagnostischen CSSS-Abrissen**

Physikalische Schädigung: Obwohl mit den Profiler Arrays Profiler nur ein Spender orientierend untersucht wurde, zeigte sich, dass in tieferen Schichten der Epidermis sogar 48 h nach Behandlung noch Unterschiede in Chemokin Expression zu sehen waren. Daher wurde im Rahmen des Versuchsteils 2 eine genauere Betrachtung mit Hilfe von RT-qPCR mit Vaxigrip® direkt nach CSSS durchgeführt, um die Beobachtungen aus Sebutape und Array zu überprüfen und zu schauen welche Zytokine nach CSSS im Vergleich zu unbehandelter Haut verändert sind und welchen Einfluss der Impfstoff darüber hinaus hat.

Die Profiler Array Analysen wurden, wie bereits erwähnt, für einen Spender durchgeführt. Die Ergebnisse waren für die physikalischen Störungsarten am ausgeprägtesten, weswegen diese Grundlage für weitergehende Untersuchungen waren. Beim untersuchten Material handelte es sich um diagnostische CSSS Abrisse, welche 48 Stunden nach Schädigung von der Hautoberfläche genommen wurden. Im Chemokin Array fiel auf, dass für alle untersuchten Moleküle die quantifizierte Menge nach CSSS deutlich größer war als nach Tape Stripping. Diese Erkenntnis unterstützt die oben beschriebene Vermutung, dass zur Untersuchung der Einflüsse von CSSS auf das immunologische Milieu der Haut eine Analyse tieferer Schichten der Epidermis vonnöten ist. Ein diagnostischer CSSS ermöglicht dies bereits besser als ein Sebutape-Abriss.

Weiterhin wiesen die Ergebnisse der Arrays darauf hin, dass trotz des geringen Ausmaßes an tatsächlicher Hautschädigung durch CSSS, wie es durch die Hautphysiologie und Sebutape-

Analysen beschrieben wurde, CSSS nichtsdestotrotz einen aktivierenden Einfluss auf das epidermale inflammatorische und immunologische Milieu hat.

So interessant die Beobachtungen der Arrays sind, so ist ein potenzieller Einflussfaktor zu bedenken. 24 Stunden vor Durchführung des diagnostischen CSSS wurde Vaxigrip® Impfstoff auf die Haut aufgetragen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Impfstoff in Kombination mit CSSS einen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Die RT-qPCR Analysen haben diesen Faktor aufgegriffen und CSSS und CSSS mit Impfstoff unabhängig voneinander untersucht.

Chemische Schädigung: Ähnlich wie nach physikalischer Schädigung wurden bei näherer Untersuchung von CSSS-Abriss Material eine größere Menge an Protein nach chemischer Schädigung vor allem durch SLS nachgewiesen.

Hier liegt es, wie bei den physikalischen Methoden und bereits bei der Diskussion der Sebutape-Abriss Ergebnisse beschrieben, nahe, dass CSSS eine größere Menge an SC Material gewinnt. Generell waren die absolut gemessenen Chemokinmengen im Vergleich mit den physikalischen Methoden jedoch deutlich geringer.

Auch nach topischer Imiquimodanwendung zeigten sich verschiedene Chemokine exprimiert. Da es jedoch keine Kontrollprobe ohne Imiquimod zum Vergleich gab ist die Aussagekraft stark limitiert. Umso mehr, da nur ein Spender analysiert wurde.

### **8.2.3 Zytokinbestimmung aus Gesamtepidermis**

Ähnlich wie bei der Array Analyse ist bei der Beurteilung der Gesamtepidermis Ergebnisse zu beachten, dass 24 Stunden vorher Impfstoff auf die Hautfelder aufgetragen wurde, was zur Verfälschung der Resultate führen könnte.

Des Weiteren handelt es sich bei der hiesigen Analyse nur um eine Momentaufnahme und auch wenn die Bestimmung auch für eine unbehandelte Kontrolle durchgeführt wurde, so gibt es keine Vergleichswerte zu anderen Zeitpunkten. Dies wurde in der weitergehenden RT-qPCR Analyse entsprechend beachtet.

#### **8.2.3.1 IL-6**

Physikalische Schädigung: Die Untersuchungen von Gesamtepidermismaterial zeigte keine Unterschiede in der IL-6 Konzentration zwischen unbehandelter, Tape gestrippter oder mit CSSS behandelter Haut 48 Stunden nach Schädigung. IL-6 ist ein wichtiger Teil kutaner Immunabwehr mit Beeinflussung der Migration und Differenzierung von LCs sowie Initiation von Reparaturmechanismen der Haut nach Barrierschädigung [3, 106, 109, 116, 117]. Allerdings ist naheliegend, dass diese Effekte durch IL-6 früh nach Schädigung der Hautbarriere erwartet werden und in der Tat ist eine mRNA Expression von IL-6 zwischen 15 Minuten und 7 Stunden nach Schädigung beschrieben [106, 117].

Es ist daher nicht verwunderlich, dass hier, 48 Stunden nach Schädigung, keine Unterschiede in IL-6 Expression mehr zu sehen waren [11].

Chemische Schädigung: Die Untersuchungen an Gesamtepidermis waren leider aufgrund der geringen Kohortengröße wenig aussagekräftig, vor allem im Falle SLS-geschädigter Haut, da hier Blasenbildung bei 5 Spendern die Untersuchungen der Epidermis verhinderten. Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt weitergehend eine große Variabilität der Werte auf, je nachdem ob man Ausreißer ausschließt oder nicht, ist der Median für die beiden Werte unter dem oder auf selber Höhe mit dem der Werte der Okklusionskontrolle. Darstellungen in der Literatur würden eine erhöhte IL-6 Menge vermuten lassen, wobei jedoch von einem früheren Anstieg, als 24 Stunden nach Ende der Anwendung, auszugehen ist [7, 78, 106, 109, 110, 118].

Interessant ist die Tatsache, dass die Ergebnisse für die Okklusionskontrolle denen von unbehandelter Haut (welche bei den physikalischen Schädigungsarten zu sehen sind) sehr nahe waren, was den Aussagen von Zhai und Maibach entspricht, wonach Okklusion an sich keine schwerwiegende inflammatorische Reaktion in der Epidermis erzeugt[96].

Für die Proben, welche mit Imiquimod behandelt wurden, zeigten sich ähnlich wie nach SLS keine erhöhte IL-6 Konzentration in den Proben der Epidermis 24 Stunden nach Ende der topischen Anwendung. Anderen Autoren zufolge stellt IL-6 jedoch sehr wohl ein wichtiges Molekül in der inflammatorischen Reaktion der Haut auf Imiquimod dar [104, 113, 116, 119]. Ähnlich wie bei den anderen Schädigungsarten ist IL-6 jedoch eher ein Molekül der schnellen Immunantwort, sodass davon auszugehen ist, dass ein eventueller Anstieg deutlich früher als 24 Stunden nach Ende der Anwendung beobachtbar wäre [46, 101].

#### **8.2.3.2 IL-8**

Physikalische Schädigung: Ähnlich wie für IL-6 zeigte die Gesamtepidermis Analyse mit Hilfe von ELISA keine Unterschiede in vorhandener IL-8 Menge zwischen den Testfeldern physikalischer Barrierestörung. IL-8 spielt in den frühen Abwehr- und Reparaturprozessen der Haut eine große Rolle und wird sogar als Indikator für das Ausmaß einer Hautschädigung angewendet. Es hat eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen sowie bei ihrer Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem [78, 120-122]. Die Produktion von IL-8 wird meist durch IL-1alpha und TNF-alpha bedingt, geschieht in verschiedenen Zellen der Haut von Keratinozyten, LCs bis zu Fibroblasten und wird von der Expression seines Rezeptors CCL20 begleitet [101, 109]. Ähnlich wie bei den anderen bisher erwähnten Zytokinen wurde bei IL-8 eine recht frühe Expression nach Schädigung durch Tape Stripping festgestellt, Anstiege der mRNA Level wurden 6 Stunden danach

und vermehrt vorhandenes Protein bis 24 Stunden nach Behandlung festgestellt [78, 107, 123, 124]. Es ist dadurch wenig verwunderlich, dass 48 Stunden nach Schädigung keine großen Unterschiede in der gemessenen IL-8 Menge zu verzeichnen waren.

Chemische Schädigung: Wie bei IL-6 ist für die Gesamtepidermis Analyse zu IL-8 zu sagen, dass die Werte der Okklusionskontrolle denen der normalen unbehandelten Hautkontrolle sehr ähneln, was vorhandener Literatur entspricht [96].

Bei den chemischen Schädigungsarten sind für SLS auch für IL-8 der Gesamtepidermis die Unterschiede zwischen den beiden messbaren Proben sehr groß, und der Median liegt daher deutlich über dem der Okklusionskontrolle. An sich würde dies jedoch weitestgehend der Literatur entsprechen. Diese beschreibt mehrfach die Erhöhung von IL-8 in der Epidermis durch SLS, unter anderem stimuliert durch IL-1alpha, TNF-alpha und IL-24 und ausgeschüttet durch Fibroblasten und Keratinozyten, mit dem Hauptziel der Chemotaxis, wie der Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen, sowie der Initiierung von DC Migration [33, 62, 103, 108-111, 118].

Nach Imiquimod ist kein Unterschied in der IL-8 Menge im Vergleich zur Okklusionskontrolle in Gesamtepidermis zu beobachten. Hierbei gilt jedoch ähnliches wie für IL-6, IL-8 wird der Literatur nach eher früh nach Anwendung von Imiquimod vermehrt nachgewiesen, nichtsdestotrotz ist ein Anstieg von IL-8 nach topischem Imiquimod beschrieben [113, 115, 116].

### **8.3 RT-QPCR ANALYSEN DES EPIDERMALEN INFLAMMATORISCHEN MILIEUS**

Sicherlich wäre es interessant gewesen die unterschiedlichen Behandlungsmethoden auch in ihrem Einfluss auf die Zytokin- und Chemokinexpression zu untersuchen. Hier wurde jedoch eine Entscheidung zugunsten einer großen Anzahl verschiedener Moleküle im Rahmen von CSSS mit Impfstoffauftragung zu untersuchen getroffen.

Die zahlreichen Aspekte, welche bei dieser Methode untersucht wurden machen die Interpretation sehr komplex.

Weiterhin sinnvoll bei der Untersuchung wäre sicher eine Bestandsaufnahme zum Zeitpunkt 0 gewesen, um zu sehen ob die Genexpression zum Zeitpunkt „4 Stunden“ Veränderungen zeigt. Im hier durchgeführten Versuchsaufbau wurde zwar mit unbehandelter Haut verglichen, hierbei konnten jedoch eventuelle Einflüsse von Lagerung oder Alterung der Haut nicht berücksichtigt werden.

#### 8.3.1.1.1 Akut inflammatorische Reaktion:

IL-8: Die in der PCR gesehene verstärkte Genexpression von IL-8 nach CSSS sowie CSSS plus Impfstoff 4 Stunden nach Schädigung entspricht den Vermutungen, welche bei der Analyse der Gesamtepidermis Proben beschrieben wurden. IL-8 ist eines der Zytokine, welches durch aktivierte Keratinozyten und Fibroblasten ausgeschüttet wird und als Protein zwischen 6 und 24 h nachweisbar ist [33, 62, 78]. Die hier beobachteten Ergebnisse unterstützen daher diese Beobachtungen, sowohl was die zeitliche Dynamik angeht, als auch die Tatsache, dass es als Reaktion auf Beeinträchtigungen der Hautbarriere ausgeschüttet wird [4, 120, 123, 125]. Die hier dargestellten Ergebnisse legen einen verlängernden Effekt von Vaxigrip® auf die verstärkte DNA-Expression, 16 h und 24 h nach Behandlung, nahe. Wie bereits beschrieben spielt IL-8 eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten und dendritischen Zellen und trägt somit zur Amplifikation der akuten Immunreaktion bei sowie zum gezielten Dirigieren von T-Lymphozyten [62, 120]. Vogt et al. haben in diesem Zusammenhang bereits eine serologische IL-8 Erhöhung bei mit CSSS und einem Influenzaimpfstoff geimpften Individuen festgestellt [4].

IL-6: Für IL-6 zeigte sich eine Expressionserhöhung nach CSSS und CSSS mit Vaxigrip® im Vergleich zu unbehandelter Haut 4 Std nach Bearbeitung der Proben. IL-6 wird ebenfalls als Reaktion auf Hautbarriereschädigung ausgeschüttet, vor allem aus Keratinozyten, LCs, Mastzellen und Fibroblasten und spielen unter anderem bei der reaktiven Aktivierung und Migration von DCs eine Rolle, ebenso bei der Aktivierung und Wachstumstimulation und Differenzierung von B-Lymphozyten und Stimulierung von T-Zellen [13, 63, 109, 118, 126, 127]. Häufig wird es innert 24 Std nach Schädigung ausgeschüttet, was durch eine hier gesehene vermehrte Genexpression 4 Std nach Barriereschädigung durchaus unterstützt wird [46, 104]. Im Blut von mit CSSS geimpften Personen wurde keine erhöhte Konzentration von IL-6 beobachtet [4], jedoch lokal nach nasaler Applikation von Impfstoff in Nanokapseln mit Imiquimod als Adjuvanz [52]. Die hier dargestellten Ergebnisse weisen auf einen vorrangigen Effekt von CSSS unabhängig von der topischen Impfstoffauftragung hin.

IL-1Ra: Die für IL-1Ra gesehene Tendenzen reduzierter Genexpression nach Hautschädigung und nochmal reduziert nach CSSS mit Vaxigrip® und VLP Impfstoff, hauptsächlich 4 und 16 Stunden nach Durchführung, stellt eine interessante Beobachtung dar. Das IL-1 System einschließlich IL-1Ra gehört zur ersten Immunreaktion nach Barriestörung. Es wird durch LCs und Keratinozyten ausgeschüttet und im Normalzustand besteht eine Art Balance zwischen IL1alpha/beta und IL-1Ra, Bei Schädigung und Initiierung der immunologischen Prozesse ändert sich dieses

Gleichgewicht zugunsten der pro-inflammatorischen IL-1 alpha und beta [127-129]. Ebendiese Tatsache wird in unseren Ergebnissen wiedergespiegelt, was die These der inflammatorischen Stimulation nach CSSS unterstützt, welche im Rahmen der Betrachtung der Sebutape-Abriss Ergebnisse gestellt wurde. Weiterhin lässt sich anhand der Ergebnisse postulieren, dass dieser Effekt nach CSSS längere Zeit anhält, was die Idee nahelegt, dass die Wirkung von IL-1 als pro-inflammatorischer Stimulus bis zu 24 Std nach Schädigung durch die verminderte Sekretion von IL-1Ra gefördert wird.

IFN-beta: IFN-beta gehört zu den Klasse I Interferonen und wirkt unter anderem antiviral über Rezeptoren an anderen Zellen, wobei die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IP-10 stimuliert wird. Es wird dabei von infizierten Zellen sowie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet [79, 124]. In den hiesigen PCR Untersuchungen lässt sich eine erhöhte Genexpression nach CSSS Anwendung mit anschließender Impfstoffauftragung sowohl von Vaxigrip® als auch VLP 16 h nach Durchführung sehen. Dies würde der Rolle des Moleküls entsprechen und eine entsprechende Immunaktivierung als Reaktion auf den Impfstoff nahelegen. CSSS allein scheint ebenfalls einen stimulierenden Effekt zu haben, wenn auch in einem geringeren Ausmaß.

IL-1alpha: Generell schienen sich die verschiedenen Behandlungsarten nicht auffällig voneinander zu unterscheiden. Dies könnte unter anderem dadurch bedingt sein, dass IL-1alpha wie bereits beschrieben v.a. vorgefertigt in einer Art Speicher vorliegt, um bei Bedarf schnell ausgeschüttet zu werden [55, 63, 110, 129]. Weiterhin ist zu vermuten, dass IL-1alpha schon früher als 4 h nach Schädigung vermehrt exprimiert wird, da es Ausgangspunkt für die weitergehende Immunantwort ist [63, 78, 107, 124, 128]. Nichtsdestotrotz war 16 h nach Schädigung eine vermehrte Genexpression zu sehen, welche für CSSS mit VLP am deutlichsten war. Hier kann es also zu einer vermehrten Bildung von IL-1alpha gekommen sein, provoziert durch das topisch aufgetragene VLP. Dies deutet also auf eine zusätzlich stimulierende Wirkung des Impfstoffes hin. Eine geringgradige Vermehrung der Genexpression war darüber hinaus auch 4 h nach Durchführung zu sehen. Hier würde die Untersuchung einer größeren Kohorte sicherlich genauere Auskünfte geben.

IL-1beta: Für IL-1beta zeigte sich eine geringere Genexpression nach Behandlung im Vergleich zu unbehandelter Haut. Auch hier lässt sich vermuten, dass eine vermehrte Genexpression zu einem früheren Zeitpunkt möglich wäre. Ein Maximum vermehrter Expression wird unter anderem zwischen 2 und 3 Stunden nach Schädigung der Haut beschrieben, wobei IL-1beta vor allem durch LCs gebildet wird [3, 7, 55, 78, 128]. Die

Tatsache, dass es vor allem durch LCs gebildet wird könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass in den hiesigen Ergebnissen keine großen Unterschiede zwischen den Behandlungsarten und generell keine großen Mengen des Gens zu sehen waren, da anzunehmen ist, dass LCs nur einen sehr geringen Anteil der Zellen in den Epidermiszellsuspensionen ausmachen.

TNF-alpha: Die gesehene Steigerung der Expression 24 h nach kombinierter Anwendung von CSSS und VLP ist eher konterintuitiv, da es sich bei TNF-alpha ebenso wie IL-1alpha um ein Zytokin der primären Immunantwort handelt. Es ist hierbei eng mit IL-1alpha Ausschüttung verbunden und führt seinerseits zur Produktion und Sekretion anderer Zytokine und Chemokine wie IL-8, IL6, GM-CSF und weiteren. Es wird durch LCs, dDCs und Mastzellen und Keratinozyten ausgeschüttet, über den Zeitpunkt gibt es jedoch verschiedene Berichte [55, 101, 104, 109, 115, 124]. Obwohl von einer frühen Ausschüttung zusammen mit IL-1alpha und beta auszugehen wäre, beschreiben andere Autoren 24 h nach Barrierschädigung eine vermehrte Freisetzung [78, 107]. Dies wiederum wird für die Proben von CSSS mit VLP ansatzweise in den hier dargestellten Ergebnissen widergespiegelt.

#### 8.3.1.1.2 Chemotaxis und Zell-Maturation

IL-16: IL-16 ist ein Chemokin, welches bei der späten Immunantwort eine Rolle spielt. Es wird von LCs sekretiert und ist relevant für die chemotaktische Anziehung von anderen dendritischen Zellen, CD4+ T-Zellen und Eosinophilen [125, 130]. Im Verlauf der Zeit wäre daher ein Anstieg der Expression dieses Chemokins zu erwarten, wie er in der Literatur als biphasische Reaktion auf Allergenexposition 4 und 12 Stunden nach Stimulation in Haut mit Atopischer Dermatitis beschrieben ist [130]. Die Ergebnisse dieser Arbeit scheinen dies zum Zeitpunkt 4h für CSSS mit und ohne Impfstoff zu bestätigen und Hinweis auf eine verlängerte Expression 16 h nach topischer Auftragung von Vaxigrip® zu geben.

Chemerin: CSSS allein und mit zusätzlicher Auftragung von Impfstoff schienen in den hier wiedergegebenen Untersuchungen vor allem 24 h nach Durchführung eine vermehrte Genexpression von Chemerin anzudeuten. In Anbetracht der Rolle von Chemerin ist dies in der Tat interessant. Chemerin ist ein sog. Adipokin und scheinbar in der Angiogenese und Stimulation von Endothelzellen sowie der Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen beteiligt [131]. Weiterhin wird es als wichtiges Molekül in der bakteriellen Abwehr der Epidermis beschrieben, wobei es von Keratinozyten ausgeschüttet wird [132]. Außerdem soll es an der Chemotaxis von dendritischen Zellen und Makrophagen sowie NK-Zellen

beteiligt sein und somit an der Immunaktivierung sowie einer Tumorabwehr, welche von aktuellem Forschungsinteresse ist [133-135].

CX3CL1: CX3CL1 wird von DCs als Ligand exprimiert und ist in dieser Rolle bei der NK-Zell-Migration relevant, wobei es hierbei die Produktion von IFN-gamma stimuliert. Es ist außerdem an der Anlockung und Adhäsion von Leukozyten beteiligt und steigert die Phagozytose. Durch seine Förderung von Makrophagen- und Fibroblasten-Akkumulation spielt es weiterhin eine wichtige Rolle bei der Wundheilung [136-139]. An sich sind dies Prozesse, der fortgeschrittenen Immunaktivierung. In den hier gesehenen Ergebnissen zeigten sich Hinweise auf eine leichte Genexpressionssteigerung durch CSSS allein, welche jedoch stark durch die Größe des untersuchten n bedingt war. Für die Kombination von CSSS mit Vaxigrip® zeigte sich diese Steigerung ausgeprägter, was nach VLP nicht sichtbar war. An dieser Stelle könnte es sich lohnen eine größere Stichprobenzahl zu untersuchen, um zu sehen ob sich diese Beobachtung bestätigt, da sie in der Tat Hinweis auf eine vermehrte Immunaktivierung nach transkutaner Vakzinierung wäre. Diese wäre, den hiesigen Ergebnissen nach, sogar Impfstoff spezifisch.

GM-CSF: GM-CSF zeigte zu allen Zeitpunkten eine vermehrte Expression als Reaktion auf CSSS mit und ohne Vaxigrip®, mit der höchsten Expressionsrate nach CSSS und Impfstoffauftragung 4 und 24 Stunden nach Durchführung. Es ist in der Literatur beschrieben, dass GM-CSF von TNF stimuliert innert 24 h nach Beeinträchtigung der Hautintegrität ausgeschüttet wird. Es wird hierbei v.a. durch Mastzellen sekretiert und ist essentiell beim Wachstum von Gewebe und ist bei der Maturation von DCs beteiligt [55, 140, 141]. In verschiedenen Versuchen wurde es außerdem als Adjuvanz bei transkutaner Vakzinierung verwendet, wobei es zu einer Vermehrten DC Aktivierung führte [140, 142]. Die hier beschriebenen Beobachtungen stehen also in Kongruenz mit der Literatur und deuten darauf hin, dass die Verwendung von CSSS mit topischer Impfstoffauftragung über GM-CSF zu einer vermehrten Aktivierung von LCs und dDCs und damit einer Immunantwort führt [11].

CCL2: In der hier beschriebenen Versuchskonstellation zeigte sich vor allem nach kombinierter Anwendung von CSSS und Vaxigrip® eine gesteigerte Expression von CCL2 zu allen bestimmten Zeitpunkten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei CCL2 um ein Molekül der sekundären Immunaktivierung nach Schädigung der Hautbarriere handelt, welches vor allem an der Chemotaxis beteiligt ist. Es wird von aktivierten dendritischen Zell-Subgruppen sowie Endothelzellen und Fibroblasten produziert und sekretiert und stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen, zur Förderung der Migration von APCs zum Lymphknoten, sowie die Aktivierung weiterer

Monozyten und neutrophiler Granulozyten [3, 79, 109]. Dies scheint durch die hier verwendete Methode transkutaner Vakzinierung verstärkt zu werden.

#### 8.3.1.1.3 T-Zellantwort

CCL22: Die Ergebnisse der PCR deuten auf eine vermehrte Genexpression von CCL22 nach CSSS und in geringerem Ausmaß nach CSSS mit Vaxigrip®-Impfstoff 4 Stunden nach Behandlung im Vergleich zu unbehandelter Haut hin, welche sich 12 Stunden später nicht mehr zeigt. Außerdem scheint 24 Std nach Behandlung die Genexpression für die Proben nach CSSS mit Impfstoff erneut gestiegen zu sein im Vergleich zu CSSS und unbehandelter Haut. Letzteres ist sehr interessant wenn man bedenkt, dass der Literatur nach CCL22 ein Chemokin, welches bei sog. skin homing von T-Zellen involviert ist, also der Anlockung von T-Zellen in die Haut [55]. Die zeitliche Komponente wird in diesem Zusammenhang für die Aktivierung einer CTL Antwort nach transkutaner Vakzinierung ebenfalls für 24 h und 48 h nach Durchführung beschrieben [16].

CXCL9: Bei der Genexpression für CXCL9 fiel eine geringgradige Erhöhung nach CSSS 4 Stunden nach Durchführung auf, mit einer deutlichen Verminderung zum Zeitpunkt 16 h. Die Kombination von CSSS und Impfstoff zeigte 16 h und 24 h nach Durchführung eine stärkere Genexpression als unbehandelte Haut und als CSSS allein. Die Sekretion von CXCL9 aus Keratinozyten wird normalerweise durch IFN-gamma stimuliert und ist ebenfalls bei der T-Zell-Rekrutierung involviert [55]. Die hiesigen Versuche deuten auf einen stimulierenden Effekt auf ebendiese Funktionen durch die Kombination von CSSS und Vaxigrip® Impfstoff hin.

IP-10: Bei IP-10 war vermutbar, dass die Expression für beide Behandlungen nach 16 h Inkubation vermehrt und nach CSSS mit Impfstoffauftragung 24 Std nach Bearbeitung deutlich vermehrt war im Vergleich zu den anderen Proben. Da es sich bei IP-10 um ein von Keratinozyten ausgeschüttetes Molekül handelt, welches an der Rekrutierung von T-Zellen in die Haut beteiligt ist und im Rahmen verschiedener Stimulationsstudien mit Immunmodulatoren zwischen 6 und 96 h nach Exposition als erhöht beschrieben wurde und nach Tape Stripping bereits 1 Stunde nach Durchführung [55, 110, 124, 143], wäre auch hier eine weitergehende Untersuchung mit mehr Proben interessant, zumal Vaxigrip® einen zusätzlichen Stimulus darzustellen scheint. IP-10 wird häufig als ein sog. Th1 Chemokin bezeichnet, welche v.a. mononukleäre Phagozyten aktivieren und damit die Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene [144, 145].

TGF-beta: TGF-beta zeigte einen Genexpressionsanstieg 4 und 16 h nach Bearbeitung der Haut mit CSSS und 16 und 24 h nach Bearbeitung für CSSS mit Impfstoff. TGF-beta ist in der Literatur häufig in Assoziation mit IL-6 beschrieben und soll unter anderem an

der Stimulation von Th17 Zellen beteiligt sein [146] sowie an der Maturation von LCs und dDCs sowie des Prozessierens naiver CD8 Zellen zu CD 8 Effektor-T-Zellen [3, 126]. Es kann von fast allen Zellen der Haut, welche an immunologischen Prozessen beteiligt sind ausgeschüttet werden [147] und wird wie viele der anderen hier untersuchten Moleküle als Reaktion auf Integritätsstörung der Hautbarriere ausgeschüttet, wobei eine vermehrte Ausschüttung u.a. 6 Std nach Tape Stripping beschrieben wurde [78, 108, 148]. Die in den hier beschriebenen Untersuchungen gesehenen Unterschiede nach leichter Barrierschädigung bestätigen diese Erkenntnisse. Die weiterhin gesteigerte Expression nach CSSS und Impfstoff 24 Stunden nach Durchführung, ist im Zusammenhang mit der T-Zell Aktivierung relevant, da diese für transkutane Vakzinierung mehr als gewünscht ist und die hier beschriebenen Ergebnisse Hinweis auf eine solche geben. Die Rolle von TGF-beta in diesem Zusammenhang mit einer größeren Kohorte weiter zu untersuchen scheint vielversprechend [11].

CCR7: Die Ergebnisse für CCR7 wiesen auf eine vermehrte Expression nach Auftragung von Vaxigrip® gepaart mit CSSS sowie CSSS alleine bereits 4 h nach Durchführung hin und erneut 20 Stunden später. Für eine geringere Anzahl an Spendern sowie die Anwendung von VLPs war dies jedoch nicht sichtbar. CCR7 spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Memory T-Zellen sowie der Migration von Effektor T-Zellen aus dem Lymphknoten und LCs in den Lymphknoten [3, 7, 55]. Wenn man diese Wirkung von CCR7 betrachtet lässt sich vermuten, dass mit einer vermehrten Expression von CCR7 möglicherweise eher in der Dermis zu rechnen ist. Eine Wiederholung der Versuche mit einer größeren Kohorte scheint hier daher ebenfalls vielversprechend.

Abschließend ist für alle PCR Ergebnisse auch nochmals die Gesamtexpression der verschiedenen Gene zu betrachten, wobei ein geringes  $\Delta$ CT einer hohen Anzahl von Transkripten entspricht. Hierbei fällt auf, dass IL-1Ra, TGF-beta und IL-8 die größten Mengen aufwiesen, gefolgt von CCL22, IL-1alpha und TNF-alpha. Dies unterstreicht wiederum die oben individuell dargestellten Rollen dieser Moleküle in der primären Immunabwehr.

#### **8.4 UNTERSUCHUNG DER IMPFSTOFFPENETRATION**

Die Penetrationsuntersuchungen deuteten eine vermehrte Aktivierung CD1a positiver LCs in der Epidermis nach CSSS und Imiquimod an sowie eine tiefe Penetration von topisch aufgetragenem Impfstoff, vor allem nach CSSS und SLS Anwendung. Die Resultate sind jedoch nur wenig belastbar und daher nur als Hinweise zu betrachten. Weitergehende Untersuchungen sind hier daher wünschenswert.

## **8.4.1 Immunhistologische Färbungen von Kryoschnitten**

### **8.4.1.1 CD1a**

Die vermehrte Abrundung von LCs welche nach CSSS und Imiquimod gesehen wurde ist durchaus mit der Literatur kongruent, welche diese Verfahren unabhängig voneinander als Immunaktivatoren beschreiben, welche mit einer Aktivierung des lokalen Immunsystems der Haut assoziiert sind [3, 4, 38, 44, 104, 149, 150]. Perspektivisch ist zu evaluieren die beiden Verfahren zur Weiterentwicklung transkutaner Vakzinierungsverfahren zu kombinieren.

### **8.4.1.2 H1N1**

Allgemein ist zu sagen, dass die gesehene Partikelgröße in den Mikroskopaufnahmen eher gegen markiertes H1N1 als Molekül spricht, wenn man sie sich im Vergleich zu den Zellen anschaut. Der Fakt, dass auch zelluläre Strukturen durch den Antikörper angefärbt werden deutet auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers hin, da eine so starke Fluoreszenz durch die Markierung von H1N1 allein eher unwahrscheinlich ist, rein aufgrund der applizierten Menge. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden weitere Versuche mit intradermal injiziertem Vaxigrip® Impfstoff durchgeführt und Kryoschnitte dieser Proben nach derselben Methode gefärbt. Die Ergebnisse waren für Proben mit und ohne Impfstoff, sowohl nach CSSS-Abriss als auch intradermaler Injektion nicht eindeutig zuordnungsbar. Zur Weiteren Klarstellung wurde mit dem Antikörper ein Sandwich-ELISA durchgeführt, welcher kein messbares Signal zeigte. Daher wurde aufgrund nicht sicher einordbarer Ergebnisse die Färbung nicht für die Gesamtzahl an Spendern durchgeführt.

Die Natur des Impfstoffes machte die Auswahl eines Antikörpers sehr schwierig, zumal es für H1N1 nur wenige, für Immunfärbung geeignete Antikörper gibt. Diese Art von Untersuchungen sind sicherlich leichter mit fluoreszierenden Partikeln durchzuführen, wie es in unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach gemacht wurde. Da in dieser Arbeit jedoch die Immunaktivierung der Haut und die Penetration desselben Impfstoffes als Gesamtbild betrachtet werden sollte bestand nur die Möglichkeit einer separaten Färbung. Das dies nicht in der geplanten Form funktionierte ist als Tatsache hinzunehmen.

## **8.4.2 H1N1-Impfstoffquantifizierung aus epidermalem Gewebematerial**

Bei der H1N1 Quantifizierung aus CSSS Abrissen ist die Inkohärenz der einzelnen gemessenen Werte zu bemerken, welche die Belastbarkeit der Ergebnisse infrage stellen. Was die Bestimmung an sich angeht ist zu sagen, dass es sich bei dem benutzten ELISA-Kit um ein Kit handelte, welches eher zur Quantifizierung ganzer Viruspartikel verwendet wird. Aufgrund der geringen Auswahl an möglichen Kits musste hier jedoch mit dem Vorhandenen gearbeitet werden. Wie schon bei der Färbung erwähnt, handelt es sich bei Vaxigrip® um einen Spaltimpfstoff. Es ist daher zu erwarten, dass der verwendete ELISA möglicherweise kein

zuverlässiger Quantifizierungsmarker ist, zum einen weil er möglicherweise nicht alle Spaltstücke erkennt und zum anderen, weil man nicht sagen kann, wie sich der Impfstoff nach den verschiedenen Prozessierungsschritten des Versuches verhält, ggf. ist von einer Konglomeratbildung, Zerfall o.ä. auszugehen. Entsprechend dieser Limitationen sind die Ergebnisse zu interpretieren.

#### **8.4.2.1 Diagnostische CSSS-Abrisse**

Bei isolierter Betrachtung der individuellen Werte fällt auf, dass die Spender 1-4 deutlich geringere Werte gezeigt haben als die restlichen Spender.

Physikalische Schädigung: Bei Betrachtung der Durchschnittswerte lässt sich postulieren, dass in unbehandelter Haut, wo im CSSS-Abrissmaterial mehr Vaxigrip® nachgewiesen werden konnte, im Umkehrschluss weniger Impfstoff in die Haut penetriert. Entsprechend dazu, würde nach Tape Stripping, wo sich die geringste Impfstoffmenge im Durchschnitt fand, die größte Menge in tiefere Hautschichten penetrieren. Die Durchschnittswerte für Tape Stripping und CSSS liegen hierbei jedoch nicht weit auseinander und sind beide mindestens halb so groß wie der von unbehandelter Haut, was auf eine tatsächlich im Vergleich vermehrte Penetration hindeutet. Bei Betrachtung der individuellen Werte dominiert jedoch eine starke Varianz der Werte, welche die Tendenz der Durchschnittswerte nur bedingt widerspiegelt.

Chemische Schädigung: Bei den chemischen Schädigungsverfahren zeigte sich die größte Impfstoffmenge nach Imiquimodanwendung, sowohl was den Durchschnittswert als auch die individuellen Werte (bis auf eine Ausnahme) betrifft. Dies suggeriert eine Wirkung von Imiquimod, welche zu einer vermehrten Ansammlung von Impfstoffpartikeln auf der Haut führt bzw. die Penetration in tiefere Hautschichten verhindert.

Die durchschnittlich geringste Menge von Vaxigrip® aus CSSS Abrissen war nach 2% SLS Okklusion zu beobachten, wobei hier die Unterschiede zwischen den individuellen Werten nach SLS und der Okklusionskontrolle keine kongruenten Unterschiede in eine Richtung zeigten, bzw. teilweise für SLS höher als für die Kontrolle waren. Die Durchschnittswerte weisen jedoch auf eine deutlich geringere Menge an Impfstoff nach SLS-Anwendung hin, was auf eine vermehrte Penetration in tiefere Schichten hindeutet, als mit dem CSSS untersucht werden kann. Dies ist wenig überraschend, da SLS bekanntermaßen die Interzellulärverbindungen der epidermalen Zellen aufweicht, was vor allem hydrophilen Substanzen die Penetration erleichtert [27, 31, 35, 90, 103].

Okklusion alleine hatte im Vergleich zu unbehandelter Haut eine geringere gemessene Menge H1N1 zur Folge, was auf eine vermehrte Penetration in tiefere Hautschichten hindeutet.

#### **8.4.2.2 Gesamtepidermis**

Die H1N1 Mengen welche aus Gesamtepidermis gewonnen wurden waren im Vergleich zu dem Material aus dem CSSS Abriss deutlich geringer, mit Durchschnittswerten unter 0,4 pg. Die Varianz zwischen den einzelnen Spendern war hier jedoch nicht auffällig größer als die Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsarten.

Die ebenfalls gemessene Kontrolle ohne Impfstoffauftragung zeigte ebenfalls ein quantifizierbares Signal. Auch wenn dieses geringer war als die Durchschnittswerte der Proben mit Impfstoff, ist dies ein Hinweis auf eine gewisse Reaktion des im Rahmen des Versuchs gewonnenen Gewebeextrakts mit dem Kit.

Physikalische Schädigung: Die Unterschiede in der H1N1 Menge nach den verschiedenen Behandlungsarten unterschieden sich von Spender zu Spender, was die Behandlungsart mit der größten H1N1 Menge angeht. Daher sind die Durchschnittswerte aller Spender nur bedingt interpretierbar, welcher die größte Menge durchschnittlich in unbehandelter Haut sieht. Im individuellen Vergleich lässt sich sagen, dass unbehandelte Haut sowie Haut nach Tape Stripping in gleicher Zahl der Fälle die Probe mit der größten H1N1 Menge darstellten, jeweils für drei Spender. Nach CSSS war dies nur einmal der Fall. Wenn man sich diese Ergebnisse in Verbindung mit den oberflächlicheren Abrissen ansieht und dem leicht erhöhten H1N1 Gehalt in den Proben nach CSSS Schädigung im Vergleich zu Tape Stripping, lässt sich argumentieren, dass dies eine Erklärung für den geringeren Anteil in der tieferen Schicht ist. Im Vergleich zu unbehandelter Haut ist für beide Schädigungsmethoden jedoch eine reduzierte H1N1 Menge nachweisbar, was darauf hindeutet, dass Impfstoff in beiden Fällen in eine tiefere, möglicherweise dermale Hautschicht penetriert ist. Dies würde dem Stand der Forschung entsprechen, dass Barrierschädigung die Penetration von verschiedenen Stoffen in tiefere Hautschichten erleichtert [35, 40, 90, 151-154]. Bei Betrachtung der Literatur wäre jedoch davon auszugehen, dass sich deutlichere Unterschiede zwischen Tape Stripping und CSSS zeigen, im Sinne von vermehrter Penetration nach CSSS, da hierbei deutlich mehr SC entfernt und die Penetrationsbarriere entsprechend stärker verringert wird [3, 35, 37, 42, 103, 150].

Ein vermutlich wichtiger Faktor was die Penetration von Vaxigrip® angeht ist seine physiologische Zusammensetzung. Da es sich primär um eine hydrophile Lösung handelt, ist generell von einer eher schlechten Penetration auszugehen. Penetrations-fördernde Barrierschädigung scheint laut der Literatur vor allem primär die Penetration hydrophiler Substanzen positiv zu beeinflussen [3, 27, 31]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass einfaches Tape Stripping als Methode zur Entfernung der obersten schützenden Sebumschicht des SC ausreicht. Eine weitergehende Erleichterung von Penetration durch CSSS lässt sich möglicherweise für Haarfollikel im Speziellen vermuten, wie es von anderen Autoren bereits beschrieben ist [4, 41, 42, 155-157].

Hier scheint ebenfalls vor allem die Penetration hydrophiler Substanzen erleichtert zu werden [3, 35, 43, 90, 158].

Aufgrund der Varianz zwischen den einzelnen Spendern und einer positiven Messung trotz fehlendem Vorhandensein von Impfstoff ist das verwendete Kit vermutlich jedoch nicht die zuverlässigste Methode. Die mangelnde Darstellbarkeit mit Hilfe histologischer Färbung legt zukünftig die Verwendung eines anderen Impfstoffes oder einen Zusatz fluoreszierender Farbstoffe oder eine radiologische Markierung zur besseren Detektierbarkeit nahe, wie dies von anderen Autoren mit belastbareren Ergebnissen getan wurde [24, 152, 159-161].

Eine weitere Schwierigkeit ist die nicht sicher beurteilbare Größe der Impfstoffmoleküle. Auch wenn die 500 Dalton Regel für Haarfollikel, vor allem in Kombination mit CSSS, als nur bedingt gültig erwiesen wurde, gilt sie für den Rest der Haut [29, 150]. Barrierschädigung ist hierbei dafür bekannt eine Ungültigkeit dieser Regel zur Folge zu haben [16]. Generell ist der genaue Aufbau der im Impfstoff enthaltenen Partikel von Bedeutung, dies ist jedoch mit zahlreichen Untersuchungen in sich selbst verbunden und nicht Fokus dieser Arbeit [162].

Chemische Schädigung: Die Beurteilung der gemessenen Werte für die chemischen Schädigungsarten ist nur äußerst eingeschränkt möglich, da aufgrund von Blasenbildung und darauffolgende Ablösung der oberen Hautschicht nach dem diagnostischen CSSS für viele Proben nach SLS und Imiquimod keine Epidermis zur Analyse zur Verfügung stand.

Nach 2% SLS Okklusion konnten nur zwei Proben gemessen werden, welche auch noch sehr unterschiedliche Werte ergaben. Nach Imiquimod lässt sich zumindest sagen, dass drei der vier gemessenen Proben, die im Vergleich mit den anderen Behandlungsarten größte Menge gemessenen H1N1 aufwiesen. Dies deckt sich wiederum mit den Beobachtungen aus den oberflächlichen CSSS-Abrissen. Wiederum ist hier nicht differenzierbar, ob Imiquimod tatsächlich die Penetration in die Dermis einschränkt bzw. zu einer Ansammlung in der Epidermis führt, oder die Creme selbst mit dem Kit interagiert. Die geringe Vergleichsmenge aus dem Kontrollversuch ohne Impfstoffauftragung deutet auf ersteres hin. Hier könnte die Formulierung der Imiquimodcreme eine entscheidende Rolle spielen, da die in der Creme vorhandenen Fettsäuren wohl einer tieferen Penetration eher entgegenwirken, trotz dem sie das SC aufweichen [27].

Im Vergleich der Okklusionskontrolle mit unbehandelter Haut lässt sich von einer vermehrten Penetration ausgehen, was eine Bestätigung vorhandener Veröffentlichungen entspricht. Hierbei wurde die Okklusion von Wasser für morphologische Änderungen der Haut, sowie eine vermehrte Durchlässigkeit der Lipidbarriere des SC verantwortlich gemacht [96, 97, 163].

## 8.5 ZUSAMMENFASSUNG

### 8.5.1 Physikalische Barrierschädigung

In Bezug auf die hautphysiologischen Parameter ist zusammenfassend zu sagen, dass CSSS im Vergleich zu einfachem Tape Stripping sowie unbehandelter Haut nach 24 Stunden keine markanten Unterschiede in seiner Beeinflussung der Hautphysiologie zeigte. Lediglich Hinweise die generelle Dicke des SC betreffend wurden gesehen. Dies bedeutet, dass 24 h nach Durchführung keine persistenten Schäden durch CSSS beobachtbar waren. Umso interessanter sind die folgenden Untersuchungen des inflammatorischen Milieus, um herauszufinden ob trotz dieser Beobachtungen eine Beeinflussung des lokalen Immunsystems zu beobachten ist und ob ein topisch aufgetragener Impfstoff zu diesem Zeitpunkt in seiner Penetration beeinflusst wird [11].

In Zusammenschau der Ergebnisse der oberflächlichen Sebutape-Abrisse vor topischer Impfstoffauftragung lässt sich feststellen, dass CSSS im Vergleich zu einfachem Tape Stripping keinen massiven schädigenden Einfluss auf die Epidermis hat, welche eine ausgeprägte Immunreaktion nach sich führen würde und 24 Stunden nach Durchführung noch messbar ist [11]. Dies unterstützt zum einen die Beobachtungen der Hautphysiologie über die geringfügige Invasivität des CSSS als Verfahren und zum anderen die Beobachtung, dass um CSSS als Immunsystem aktivierendes Verfahren zur verbesserten Präsentation von in Impfstoffen enthaltenen Antigenen zu verwenden, eine Auftragung des Impfstoffes direkt nach Durchführung des CSSS nötig ist. Dies wurde durch die Beobachtungen in den ELISA-Analysen von Gesamtepidermis unterstützt, bei welchen keine Auffälligkeiten zwischen den verschiedenen Methoden nach topischer Impfstoffauftragung auffielen.

Array Analysen zeigten jedoch deutliche Unterschiede zwischen Tape Stripping und CSSS, woraufhin letzteres weitergehend untersucht wurde. In der Tat zeigten die Ergebnisse quantitativer RT-PCR Hinweise auf vermehrte Genexpression verschiedener Moleküle. Der Großteil der Gene zeigte eine vermehrte Expression als Reaktion auf CSSS in Kombination mit Impfstoff. Für viele der Moleküle war auch eine Gentranskriptionserhöhung für alleiniges CSSS zu sehen, welche der Transkriptionserhöhung nach Kombination mit Impfstoff vorausging oder für die früheren Zeitpunkte gleichzeitig bestand. Dies war vor allem für Moleküle der T-Zellaktivierung der Fall; CCL22, CXCL9, IP-10, TGF-beta und für CX3CL1, relevant für die Chemotaxis, und IL-8 der primären Immunantwort. Für CCL22, CX3CL1, IL-8, IP-10 und TGF-beta zeigten sich der isolierte Einfluss der Kombination aus CSSS mit Impfstoff nach 24 Stunden, für IL-16 war dies nach 16 Stunden schon der Fall. Bei diesen Molekülen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination der Barrierschädigung mit topischer Impfstoffauftragung zu einer Verlängerung und somit einer Verstärkung der immunologischen Reaktion führt. Eine

Transkription, welche nur durch die kombinierte Anwendung von Impfstoff und CSSS bedingt war, ohne beobachteten Einfluss alleinigen CSSS war für CXCL9, CCL2 und TNF-alpha zu sehen. Gene, welche durch die Methode des CSSS beeinflusst wurden, waren CCR7, IL-6, und IL-1Ra. Darüber hinaus war die DNA der Gene für GM-CSF und IFN-beta hauptsächlich durch CSSS allein erhöht, durch die Kombination mit Impfstoff jedoch noch etwas in ihrer Expression erhöht. Es besteht hierbei eine Erhöhung der Moleküle der akuten inflammatorischen Reaktion der Haut. Dies unterstreicht die vorhandenen Effekte auf immunstimulatorische Prozesse in Verbindung mit Reifung dendritischer Zellen, Rekrutierung verschiedener immunkompetenter Zellen sowie T-Zell-Aktivierung hin und daher die immunologische Effektivität dieser transkutanen Vakzinierungsmethode [11].

Was die Penetration angeht zeigten sich in den Ergebnissen Hinweise auf eine vermehrte Penetration nach Tape Stripping und CSSS. Die limitierte Verlässlichkeit der genutzten Methoden ließen jedoch keine ausreichend differenzierte Betrachtung zwischen den beiden Methoden zu.

Abschließend lässt sich sagen, das Tape Stripping und CSSS nachweislich milde Barrierschädigungsarten der Haut darstellen, welche mit vermehrter Impfstoffpenetration in Verbindung stehen. CSSS stellt darüber hinaus trotz seiner geringfügigen Schädigung der Hautbarriere einen Stimulus für epidermale Immunreaktionen dar, welcher in Kombination mit topischer Impfstoffauftragung zur Aktivierung einer schützenden Immunantwort führen kann. In Anbetracht dieser Eigenschaften ist es durchaus empfehlenswert die hier dargestellten orientierenden Ergebnisse im Rahmen ausführlicherer individueller Untersuchungen zu erhärten.

### **8.5.2 Chemische Barrierschädigung**

Okklusion zeigte in den Ergebnissen der hautphysiologischen Untersuchungen Hinweise auf vermehrte Durchlässigkeit der Hautbarriere, was weitestgehend der vorhandenen Literatur entspricht. Okklusion allein zeigte einen stimulierenden Einfluss auf die Sekretion von IL-1alpha. Andere inflammatorische Folgen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Die Penetration von Impfstoff schien durch Okklusion vermehrt. Die Kombination aus diesen Beobachtungen macht eine weitergehende Beurteilung von Okklusion, möglicherweise in Kombination mit physikalischer Barrierschädigung, durchaus attraktiv.

SLS wies bei den hautphysiologischen Messungen, wie aus der Literatur vorbekannt, eine deutliche Steigerung von TEWL und Senkung von SCH auf, was einer klaren Einschränkung der Barrierefunktion entspricht. Im Rahmen der immunologischen Untersuchungen konnten keine Hinweise auf Stimulierung einer Immunreaktion gefunden werden, was jedoch eher durch die Proben bedingt war. Die Penetration schien durch SLS gefördert zu werden. Auch hier sind weitergehende Untersuchungen zur Verwendung bei transkutaner Vakzinierung sicherlich

sinnvoll. Das Ausmaß der Barrierschädigung ist jedoch im Vergleich mit den anderen Methoden am größten und kann nur bedingt als mild bezeichnet werden.

Imiquimod zeigte keine eindeutige Beeinflussung der Hautphysiologie und damit keine Hinweise auf Schädigung der Hautoberfläche. In Bezug auf das inflammatorische Milieu der Epidermis schien Imiquimod einen stimulierenden Einfluss zu haben, was vorhandenen wissenschaftlichen Erkenntnissen entspricht. Die Ergebnisse der Penetrationsuntersuchungen wiesen auf eine Art Kumulation in der Epidermis hin. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint auch hier eine weitergehende Untersuchung, ggf. in Kombination mit CSSS durchaus vielversprechend.

## **8.6 ALLGEMEINE LIMITATIONEN DES VERSUCHSAUFBAUS**

Der Versuchsaufbau zur Messung von hautphysiologischen Parametern, Mikroskopie und Extraktion mit nachfolgender Bestimmung von Entzündungsmediatoren und Impfstoffpenetration war sehr komplex. Die limitierte Verfügbarkeit humaner Hautproben sowohl in Hinsicht auf Zahl der Spender als auch Größe der verfügbaren Proben bedingen, dass die Untersuchungen nicht in beliebig hohen Stückzahlen wiederholt werden konnten und einige Screening-Untersuchungen, wie dargestellt, nur orientierend erfolgen konnten. Die Ergebnisse sind daher in diesem entsprechenden Kontext zu interpretieren. Die verschiedenen Teilversuche, welche Erkenntnisse hervorbrachten, sollten mit einer größeren Stichprobe ggf. wiederholt und ergänzt werden um eine fundierte wissenschaftliche Aussage machen zu können.

Da die Entwicklung der Ablaufprotokolle bereits Teil der hier präsentierten Dissertationsarbeit waren, ergaben sich im Laufe der Experimente einzelne Punkte, die in Folgeuntersuchungen optimiert werden könnten. Zum einen wurde im Verlauf anderer Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe festgestellt, sowie in der Literatur bereits berichtet, dass die physikalischen Schädigungsmethoden der Haut am besten direkt von der topischen Impfstoffauftragung gefolgt werden sollte [42, 140]. Dies geschah im ersten Teil des hier beschriebenen Versuchsaufbaus erst nach 24 Stunden. Des Weiteren wurde für die hautphysiologischen Messungen zwar ein Ausgangswert vor Schädigung bestimmt, allerdings kein Wert direkt nach der Schädigung. Zur Betrachtung der Effekte der verschiedenen Methoden wäre dies sicherlich sinnvoll gewesen, in Anbetracht der Tatsache, dass jedoch der Fokus auf Untersuchung der physiologischen Bedingungen zum Zeitpunkt der Impfstoffauftragung lag wurde davon abgesehen. Diese beiden Punkte zusammenhängend aufgreifend ist aufgrund der Erkenntnisse in der Literatur davon auszugehen, dass direkt nach Durchführung des CSSS ein höherer TEWL Anstieg zu beobachten gewesen wäre, was wiederum möglicherweise mit einer erhöhten Permeabilität für den Impfstoff in Verbindung gestanden hätte [152, 164].

Im Versuchsteil 2 wurden daher auf Basis der Zytokinevaluation im Versuchsblock 1 die Bedingungen entsprechend angepasst.

Weiterhin ist die Impfstoffauftragung als Einflussfaktor zu beachten, welche 24 Stunden nach Bearbeitung der Haut, im Falle der physikalischen Methoden, durchgeführt wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass sie Einfluss auf die hautphysiologischen Messungen im weiteren Verlauf gehabt haben kann. Hier wären jeweilige Kontrollfelder ohne Impfstoff wünschenswert gewesen. In Anbetracht der limitierten Menge des humanen Materials war dies jedoch nicht umsetzbar.

Ähnliches gilt für die Untersuchungen des inflammatorischen Milieus. Bei der Interpretation der PCR Ergebnisse ist ebenfalls zu beachten, dass große individuelle Schwankungen in der Streuung der Einzelwerte bestanden. Des Weiteren ist zu beachten, dass teilweise mehrere Platten von PCRs für die jeweiligen Gengruppen gemessen werden mussten, da nicht alle Proben auf eine Platte passten. Zwar wurden die Ergebnisse jeweils auf Housekeeping-Gene genormt, jedoch ist eine gewisse Variabilität zwischen den Platten anzunehmen und die Ergebnisse entsprechend zu beurteilen. Zukünftige Untersuchungen an größeren Serien können bei der Bestätigung der hier erhaltenen Ergebnisse helfen.

Der methodische Nachweis der Penetration auch kleiner Impfstoffmengen gestaltete sich in vielerlei Hinsicht problematisch. Während in Vorarbeiten und auch in parallel durchgeführten Projekten der Arbeitsgruppe mittels zusätzlicher Immunfluoreszenzmarkierung eine gute Lokalisation von penetrierten Impfstoffpartikeln [5, 165], kleineren Proteinen [43] und chemisch synthetisierten Wirkstoffen [166] möglich war, stellte der hier verwendete Grippeimpfstoff bedingt durch das hohe Molekulargewicht der Fragmente und viel Hintergrundfluoreszenz bei sehr geringen Impfstoffmengen eine unerwartet hohe Herausforderung dar.

Ein optimierter Ansatz für zukünftige Untersuchungen könnte daher eine effizientere Integration der verschiedenen Parameter in ein experimentelles Modell mit weniger Zeit- und Materialaufwand sein. Intradermale Mikrodialyse, die es erlaubt penetrierte Substanzen zusammen mit Entzündungsmarkern mittels in die Haut eingelegte Mikrodialysemembran zu sammeln, wäre hier eine Möglichkeit [167]. Auch hier stellt das hohe Molekulargewicht des proteinbasierten Impfstoffs eine Herausforderung dar, sowohl bezüglich der Penetration an sich und hinsichtlich der zu wählenden Porengröße entsprechender Dialysemembranen. Die zu erwartenden geringen Konzentrationen im Eluat ließen sich am ehesten mittels Massenspektrometrie oder aber mit eigens designten ELISA-Experimenten, bzw. Luminex-Beads, welche hochsensitive Bestimmungen in geringen Volumina ermöglichen, untersuchen. Diese Art von aufbauenden Experimenten würden aufgrund der Etablierungsarbeiten eine eigene neue Arbeit ergeben.

## 8.7 ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN

Das Konzept zur Nutzung der Haut für transkutane Impfstrategien beinhaltet neben dem Erreichen einer ausreichenden Penetration von Impfstoffen die Frage nach einer optimalen Aktivierung des Immunsystems. Präklinische und klinische Studien weisen darauf hin, dass Vorbehandlungen der Haut nicht nur Penetration, sondern auch die Aufnahmefähigkeit von antigen-präsentierenden Zellen erhöhen können, Ansätze zur Nutzung dieser Effekte in Form von Impfpflastern umfassen daher physikalische, chemisch-irritative aber auch biochemische Ansätze.

In dieser Arbeit sollten physikalische (Skin Surface Stripping), chemische (SLS-Behandlung) und immunologisch-biochemische Strategien (Vorbehandlung mit dem TLR\_Agonisten Imiquimod) hinsichtlich ihrer Förderung der Impfstoffpenetration und der Induktion inflammatorischer Antworten im Gewebe untersucht werden.

Hinsichtlich der Effekte auf die Hautbarriere war CSSS als physikalische Schädigungsmethode eine balancierte Methode, welche ohne permanente Schädigung der Hautintegrität Immunaktivierung bewirkte und in den parallel durchgeführten in vivo Untersuchungen als nicht-invasive Methodik allenfalls eine milde Erythembildung an hautgesunden menschlichen Probanden induzierte [11]. Die untersuchten chemischen Methoden zeigten ebenfalls Hinweise auf lokale Immunaktivierung und im Fall von SLS starke Penetrationssteigerung, jedoch war die Hautphysiologie nachhaltiger beeinflusst. Da die Penetration des Grippeimpfstoffes insgesamt sehr gering war, ließen die Experimente keine klaren Schlussfolgerungen hinsichtlich des penetrationsverstärkenden Effektes zu.

Das erkannte Potential von CSSS in Kombination mit Impfstoff war vor allem durch die Beobachtung gekennzeichnet, dass unterscheidbare Effekte zwischen alleiniger Schädigung und zusätzlicher Impfstoffauftragung zu beobachten waren. Der Impfstoff scheint hier kutane Zytokine und Chemokine in Richtung einer vermehrten T-Zellantwort zur Folge zu haben, eine Erkenntnis, welche in ähnlicher Form bereits, wie in der Einleitung beschrieben, in in vivo Studien beobachtet wurde.

Die Weiterführung dieser Arbeit würde eine Untersuchung der gesehenen Immunmarkeränderungen mit einer größeren Stichprobenzahl beinhalten. Weiterhin wäre eine Kombination mit serologischen Untersuchungen entsprechender in vivo Experimente ratsam, um herauszufinden inwieweit die lokalen immunologischen Reaktionen der Haut systemische Auswirkungen haben. In einem separaten Versuchsaufbau ist über eine Kombination von CSSS und Imiquimod für transkutane Vakzinierung in Erwägung zu ziehen, um die beobachteten Effekte im Zusammenspiel zu betrachten. Die Kombination von CSSS und SLS würde dabei voraussichtlich zu einer zu großen Beeinträchtigung der Hautbarriere führen, was mit negativen

Effekten einhergehen könnte. Des Weiteren scheint es vielversprechend verschiedene Arten von Impfstoffen in einem ähnlichen Setting zu betrachten, um zu bestimmen welche Formulierung am effektivsten mit CSSS als Penetrationserleichterung und Immunaktivierung gepaart werden kann.

Diese Arbeit zeigte nachweisliche lokal inflammatorische Aktivierung durch Hautbarriereschädigung sowie eine geringfügig vermehrte Penetration topisch aufgetragenen Impfstoffes. Die Charakterisierung der Erhöhung kutaner inflammatorischer Moleküle unterstreicht das bereits in der Literatur beschriebene Potenzial transkutaner Impfung unter Verwendung milder Barriereschädigung. Darüber hinaus trägt sie dazu bei, eine gezieltere Auswahl von Adjuvantien zu treffen und den Prozess in seiner Effektivität weiter zu verbessern. Interessanterweise ergaben die weitergehenden Analysen, der im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten klinischen Studie ebenfalls, dass trotz einer nur limitierten Penetration zelluläre Immunantworten detektiert werden konnten. Zudem ist bekannt, dass bereits limitiertes Auftragen immunstimulatorischer Agenzien zu systemisch messbaren Reaktionen des Immunsystems führt [9]. Innovative Ansätze zum Einbringen hochmolekularer Substanzen über die Hautbarriere bieten neue Möglichkeiten für die Formulierung von Impfstoffen speziell für transkutane Zwecke [168-170].

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

---

1. Mitragotri S. Immunization without needles. *Nat Rev Immunol.* 2005; **5**(12): 905-16.
2. Giudice EL and Campbell JD. Needle-free vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; **58**(1): 68-89.
3. Combadiere B and Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin.* 2011; **7**(8): 811-27.
4. Vogt A, Mahe B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, Schaefer H, Katlama C, Sterry W, Autran B, Blume-Peytavi U, Combadiere B. Transcutaneous Anti-Influenza Vaccination Promotes Both CD4 and CD8 T Cell Immune Responses in Humans. *J Immunol.* 2008; **180**(3): 1482-9.
5. Rancan F, Afraz Z, Hadam S, Weiss L, Perrin H, Kliche A, Schrade P, Bachmann S, Schafer-Korting M, Blume-Peytavi U, Wagner R, Combadiere B, Vogt A. Topically applied virus-like particles containing HIV-1 Pr55(gag) protein reach skin antigen-presenting cells after mild skin barrier disruption. *J Control Release.* 2017; **268**: 296-304.
6. Combadiere B, Vogt A, Mahe B, Costagliola D, Hadam S, Bonduelle O, Sterry W, Staszewski S, Schaefer H, van der Werf S, Katlama C, Autran B, Blume-Peytavi U. Preferential amplification of CD8 effector-T cells after transcutaneous application of an inactivated influenza vaccine: a randomized phase I trial. *PLoS One.* 2010; **5**(5): e10818.
7. Nicolas JF and Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev Vaccines.* 2008; **7**(8): 1201-14.
8. Engelke L, Wintera G, Hook S, Engert J. Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. *Vaccine.* 2015; **33**(7): 4663-74.
9. Goncalves E, Bonduelle O, Soria A, Loulergue P, Rousseau A, Cachanado M, Bonnabau H, Thiebaut R, Tchitchek N, Behillil S, van der Werf S, Vogt A, Simon T, Launay O, Combadiere B. Innate gene signature distinguishes humoral versus cytotoxic responses to influenza vaccination. *J Clin Invest.* 2019; **129**(5): 1960-71.
10. Haidari G, Cope A, Miller A, Venables S, Yan C, Ridgers H, Reijonen K, Hannaman D, Spentzou A, Hayes P, Bouliotis G, Vogt A, Joseph S, Combadiere B, McCormack S, Shattock RJ. Combined skin and muscle vaccination differentially impact the quality of effector T cell functions: the CUTHIVAC-001 randomized trial. *Sci Rep.* 2017; **7**(1): 13011.
11. Pfannes EK, Weiss L, Hadam S, Gonnet J, Combadière B, Blume-Peytavi U, Vogt A. Physiological and Molecular Effects of in vivo and ex vivo Mild Skin Barrier Disruption. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018; **31**: 115-24.
12. Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr JW. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; **72**(2): 295-303.

13. Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008; **17**(12): 1063-72.
14. Bouwstra JA and Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*. 2006; **1758**(12): 2080-95.
15. Heinrich K, Heinrich U, Tronnier H. Influence of different cosmetic formulations on the human skin barrier. *Skin Pharmacol Physiol*. 2014; **27**(3): 141-7.
16. Choi MJ, Zhai H, Löffler H, Dreher F, Maibach HI. Effect of Tape Stripping on Percutaneous Penetration and Topical Vaccination. *Exog Dermatol*. 2003; **2**(5): 262-9.
17. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier Disruption Stimulates Interleukin-1alpha Expression and Release from a Pre-Formed Pool in Murine Epidermis. *J Invest Dermatol*. 1996; **106**(3): 397-403.
18. Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol*. 2006; **15**(7): 483-92.
19. Kottner J, Lichterfeld A, Blume-Peytavi U. Transepidermal water loss in young and aged healthy humans: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dermatol Res*. 2013; **305**: 315-23.
20. Pinnagoda J, Tupka RA, Coenraads PJ, Nater JP. Comparability and reproducibility of the results of water loss measurements a study of 4 evaporimeters. *Contact Dermatitis*. 1989; **20**: 241-6.
21. Pinnagoda J, Tupka RA, Coeraads PJ, Nater JP. Transepidermal water loss with and without sweat gland inactivation. *Contact Dermatitis*. 1989; **21**: 16-22.
22. Rawlings AV and Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther*. 2004; **17**: 43-8.
23. Verdier-Sevrain S, Bonté F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol*. 2007; **6**: 75-82.
24. Fluhr JW, Kuss O, Diepgen T, Lazzerini S, Pelosi A, Gloor M, Berardesca E. Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types. *Br J Dermatol*. 2001; **145**: 696-703.
25. Fluhr JW and Elias PM. Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'. *Exog Dermatol*. 2002; **1**(4): 163-75.
26. Pierard GE, Pierard-Franchimont C, Marks R, Paye M, Rogiers V. EEMCO Guidance for the in vivo Assessment of Skin Greasiness. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2000; **13**: 372-89.
27. Trommer H and Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006; **19**(2): 106-21.

28. Finnin BC and Morgan TM. Transdermal Penetration Enhancers: Applications, Limitations, and Potential. *J Pharm Sci.* 1999; **88**(10): 955-8.
29. Bos JD and Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol.* 2000; **9**(3): 165-9.
30. Mohammed D, Hirata K, Hadgraft J, Lane ME. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *Eur J Pharm Sci.* 2014; **51**: 118-22.
31. Karande P, Jain A, Mitragotri S. Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. *J Control Release.* 2006; **110**(2): 307-13.
32. Kobiela T, Lelen-Kaminska K, Stepulak M, Lekka M, Malejczyk M, Arct J, Majewski S. The influence of surfactants and hydrolyzed proteins on keratinocytes viability and elasticity. *Skin Res Technol.* 2013; **19**(1): e200-8.
33. Perkins MA, Osterhues MA, Farage MA, Robinson MK. A noninvasive method to assess skin irritation and compromised skin conditions using simple tape adsorption of molecular markers of inflammation. *Skin Res Technol.* 2001; **7**: 227-37.
34. Farahmand S, Tien L, Hui X, Maibach HI. Measuring transepidermal water loss: a comparative in vivo study of condenser-chamber, unventilated-chamber and open-chamber systems. *Skin Res Technol.* 2009; **15**(4): 392-8.
35. Chiang A, Tudela E, Maibach HI. Percutaneous absorption in diseased skin: an overview. *J Appl Toxicol.* 2012; **32**(8): 537-63.
36. Breternitz M, Flach M, Prassler J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. A randomized, controlled study. *Br J Dermatol.* 2007; **156**(2): 231-40.
37. Jacobi U, Weigmann HJ, Ulrich J, Sterry W, Lademann J. Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin Res Technol.* 2005; **11**(2): 91-6.
38. Vandermeulen G, Daugimont L, Richiardi H, Vanderhaeghen ML, Lecouturier N, Ucakar B, Preat V. Effect of tape stripping and adjuvants on immune response after intradermal DNA electroporation. *Pharm Res.* 2009; **26**(7): 1745-51.
39. Rogiers V and EEMCO Group. EEMCO Guidance for the Assessment of Transepidermal Water Loss in Cosmetic Sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001; **14**: 117-28.
40. Loffler H, Dreher F, Maibach HI. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol.* 2004; **151**(4): 746-52.
41. Lademann J, Otberg N, Jacobi U, Hoffman RM, Blume-Peytavi U. Follicular Penetration and Targeting. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2005; **10**: 301-3.

42. Vogt A, Hadam S, Deckert I, Schmidt J, Stroux A, Afraz Z, Rancan F, Lademann J, Combadiere B, Blume-Peytavi U. Hair follicle targeting, penetration enhancement and Langerhans cell activation make cyanoacrylate skin surface stripping a promising delivery technique for transcutaneous immunization with large molecules and particle-based vaccines. *Exp Dermatol*. 2015; **24**(1): 73-5.
43. Rancan F, Amselgruber S, Hadam S, Munier S, Pavot V, Verrier B, Hackbarth S, Combadiere B, Blume-Peytavi U, Vogt A. Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells. *J Control Release*. 2014; **176**: 115-22.
44. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009; **182**(9): 5836-45.
45. Lopez PA, Denny M, Hartmann A, Probst HC, von Stebut E, Tenzer S, Schild H, Stassen M, Langguth P, Radask MP. Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *J Dermatol Sci*. 2017; **87**: 252-9.
46. Flutter B and Nestle FO. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. *Eur J Immunol*. 2013; **43**(12): 3138-46.
47. Desai T, Chen CL, Desai A, Kirby W. Basic pharmacology of topical imiquimod, 5-fluorouracil, and diclofenac for the dermatologic surgeon. *Dermatol Surg*. 2012; **38**(1): 97-103.
48. Metcalf S, Crowson AN, Naylor M, Haque R, Cornelison R. Imiquimod as an antiaging agent. *J Am Acad Dermatol*. 2007; **56**(3): 422-5.
49. Cantisani C, Lazic T, Richetta AG, Clerico R, Mattozzi C, Calvieri S. Imiquimod 5% Cream Use in Dermatology, Side Effects and Recent Patents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2012; **6**: 65-9.
50. Stein P, Rechtsteiner G, Warger T, Bopp T, Fuhr T, Pruffer S, Probst HC, Stassen M, Langguth P, Schild H, Radsak MP. UV exposure boosts transcutaneous immunization and improves tumor immunity: cytotoxic T-cell priming through the skin. *J Invest Dermatol*. 2011; **131**(1): 211-9.
51. Goldinger SM, Dummer R, Baumgaertner P, Mihic-Probst D, Schwarz K, Hammann-Haenni A, Willers J, Geldhof C, Prior JO, Kundig TM, Michielin O, Bachmann MF, Speiser DE. Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and -9 ligands triggers memory and effector CD8(+) T-cell responses in melanoma patients. *Eur J Immunol*. 2012; **42**(11): 3049-61.

52. Vicente S, Peleteiro M, Diaz-Freitas B, Sanchez A, Gonzalez-Fernandez A, Alonso MJ. Co-delivery of viral proteins and a TLR7 agonist from polysaccharide nanocapsules: a needle-free vaccination strategy. *J Control Release*. 2013; **172**(3): 773-81.
53. Gamazo C, Pastor Y, Larraneta E, Berzosa M, Irache JM, Donnelly RF. Understanding the basis of transcutaneous vaccine delivery. *Ther Deliv*. 2019; **10**: 63-80.
54. Steinmann RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev*. 1991; **9**: 271-96.
55. Kupper TS and Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol*. 2004; **4**(3): 211-22.
56. Rossi M and Young JW. Human dendritic cells, potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005; **175**: 1373-81.
57. Mathers AR and Larregina AT. Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunol Res*. 2006; **36**: 127-36.
58. Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci*. 2000; **24**: 29-38.
59. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest*. 1992; **90**: 482-7.
60. Bos JD and Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today*. 1993; **14**: 75-8.
61. Kupper TS. The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol*. 1990; **94**: 146-50.
62. Barker J, Mitra R, Griffiths C. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*. 1991; **337**: 211-4.
63. Ansel J, Perry P, Damm D, Phan T, Hart C, Luger T, Hefeneider S. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol*. 1990; **94**: 101-7.
64. Stamatas GN, Morello AP, Mays DA. Early Inflammatory Processes in the Skin. 2013; **13** (8): 1250-69.
65. Lee RT, Briggs WH, Cheng GC, Rossiter HB, Libby P, Kupper T. Mechanical deformation promotes secretion of IL-1 $\alpha$  and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*. 1997; **159**: 5084-8.
66. Enk AH and Katz SI. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; **89**: 1398-402.

67. Groves RW, Allen MH, Ross EL, Barker JN, Macdonald DM. Tumor necrosis factor-alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br J Dermatol.* 1995; **132**: 345-52.
68. Wang XJ, Greenhalgh DA, Bickenbach JR, Jiang A, Bundman DS, Krieg T, Derynck R, Roop DR. Expression of a dominant-negative type II transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) receptor in the epidermis of transgenic mice blocks TGF- $\beta$ -mediated growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; **94**: 2386-91.
69. Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor  $\beta$ 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med.* 1998; **187**: 961-6.
70. Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch Dermatol Res.* 1999; **291**: 400-4.
71. Bielenberg DR, McCarty MF, Bucana CD, Yuspa SH, Morgan D, Arbeit JM, Ellis LM, Cleary KR, Fidler IJ. Expression of interferon- $\beta$  is associated with growth arrest of murine and human epidermal cells. *J Invest Dermatol.* 1999; **112**: 802-9.
72. Tensen CP, Flier J, Van der Raaij-Helmer EM, Sampat-Sardjoeipersad S, Van der Schors RC, Leurs R, Scheper RJ, Boorsma DM, Willemze R. Human IP-9: a keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3). *J Invest Dermatol.* 1999; **112**: 716-22.
73. Sarris AH, Esgleyes-Ribot T, Crow M, Broxmeyer HE, Karasavvas N, Pugh W, Grossman D, Deisseroth A, Duvic M. Cytokine loops involving interferone-gama and IP-10, a cytokine chemotactic for CD4+ lymphocytes: an explanation for the epidermotropism of cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 1995; **86**: 651-8.
74. Pastore S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 1997; **99**: 3009-17.
75. Proksch E, Feingold KR, Man MQ, Elias PM. Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest.* 1991; **87**: 1668-73.
76. Wilmer JL, Burleson FG, Kayama F, Kanno J, Luster MI. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 1994; **102**(6): 915-22.
77. Hunziker T, Brand CU, Kapp A, Waelti ER, Braathen LR. Increased levels of inflammatory cytokines in human skin lymph derived from sodium lauryl sulphate-induced contact dermatitis. *Br J Dermatol.* 1992; **127**(3): 254-7.

78. Nickoloff BJ and Naidu Y. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol.* 1994; **30**(4):535-46.
79. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Orthomyxoviren, In: *Molekulare Virologie.* 3. Auflage, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag; 2010. p. 355-382.
80. WHO. Influenza virus infections in humans ( February 2014 ). 2014. [https://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/virology\\_laboratories\\_and\\_vaccines/influenza\\_virus\\_infections\\_humans\\_feb14.pdf?ua=1](https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/virology_laboratories_and_vaccines/influenza_virus_infections_humans_feb14.pdf?ua=1)
81. Stephenson I, Nicholson KG. Influenza: vaccination and treatment. *Eur Respir J.* 2001; **17**: 1282-93.
82. Chaloupka I, Schuler A, Marschall M, Meier-Ewert H. Comparative Analysis of Six European Influenza Vaccines. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis.* 1996; **15**: 121-7.
83. Leroux-Roels I and Weber F. Intanza ((R)) 9 microg intradermal seasonal influenza vaccine for adults 18 to 59 years of age. *Hum Vaccin Immunother.* 2013; **9**(1):115-21.
84. Clayville LR. Influenza Update.A Review of Currently Available Vaccines. *Pharm D.* 2011; **36**(10): 659-684.
85. Puissant-Lubrano B, Bossi P, Gay F, Crance JM, Bonduelle O, Garin D, Bricaire F, Autran B, Combadiere B. Control of vaccinia virus skin lesions by long-term-maintained IFN-gamma+TNF-alpha+ effector/memory CD4+ lymphocytes in humans. *J Clin Invest.* 2010; **120**(5): 1636-44.
86. Zysk AM, Nguyen FT, Oldenburg AL, Marks DL, Boppart SA. Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside. *J Biomed Opt.* 2007; **12**(5): 051403.
87. Doroshenko A, Halperin SA. Trivalent MDCK cell culture- derived influenza vaccine Optaflu® (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines.* 2009; **8**(6): 679-688.
88. Matsuo K, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S. Frontiers of transcutaneous vaccination systems: novel technologies and devices for vaccine delivery. *Vaccine.* 2013; **31**(19): 2403-15.
89. Doge N, Avetisyan A, Hadam S, Pfannes EKB, Rancan F, Blume-Peytavi U, Vogt A. Assessment of skin barrier function and biochemical changes of ex vivo human skin in response to physical and chemical barrier disruption. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017; **116**: 138-148.
90. Kezic S and Nielsen JB. Absorption of chemicals through compromised skin. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009; **82**(6): p. 677-88.
91. du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties

- in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res Technol.* 2013; **19**(3): 265-78.
92. Ramsing DW and Agner T. Effect of glove occlusion on human skin (I) Short-term experimental exposure. *Contact Dermatitis.* 1996; **34**: 1-5.
  93. Agner T, Serup J. Time course of occlusive effects on skin evaluated by measurement of transepidermal water loss (TEWL). *Contact Dermatitis.* 1993; **28**: 6-9.
  94. Warner RR, Boissy YL, Lilly NA, Spears MJ, McKillop K, Marshall JL, Stone KJ. Water Disrupts Stratum Corneum Lipid Lamellae: Damage is Similar to Surfactants. *J Invest Dermatol.* 1999; **113**: 960-6.
  95. Faergemann J, Aly R, Wilson DR, Maibach HI. Skin occlusion: effect on *Pityrosporum orbiculare*, skin PCO<sub>2</sub>, pH, transepidermal water loss, and water content. *Arch Dermatol Res.* 1983; **275**(6): 383-7
  96. Zhai H, Maibach HI. Occlusion vs. skin barrier function. *Skin Res Technol.* 2002; **8**: 1-6.
  97. Fluhr JW, Lazzerini S, Distante F, Gloor M, Berardesca E. Effects of prolonged occlusion on stratum corneum barrier function and water holding capacity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 1999; **12**: 193-8.
  98. PaepeDe K, Derde MP, Roseeuw D, Rogiers V. Claim substantiation and efficiency of hydrating body lotions and protective creams. *Contact Dermatitis.* 2000; **42**: 227-34.
  99. Tupker RA. Prediction of irritancy in the human skin irritancy model and occupational setting. *Contact Dermatitis.* 2003; **49**: 61-9.
  100. Petersen LJ, Lyngholm AM, Arendt-Nielsen L. A novel model of inflammatory pain in human skin involving topical application of sodium lauryl sulfate. *Inflamm Res.* 2010; **59**(9): 775-81.
  101. Miao X, Luo D, Min W, Lin X, Wang D, Xu Y, Wu D. Potential efficacy of imiquimod on immunity-related cytokines in murine skin in vivo and in human Langerhans cells in vitro. *Int J Dermatol.* 2012; **51**:1116-22.
  102. Denda M. Influence of dry environment on epidermal function. *J Dermatol Sci.* 2000; **24**: 22-8.
  103. de Jongh CM, Verberk MM, Spiekstra SW, Gibbs S, Kezic S. Cytokines at different stratum corneum levels in normal and sodium lauryl sulphate-irritated skin. *Skin Res Technol.* 2007; **13**(4): 390-8.
  104. Suzuki H, Wang B, Shivji GM, Toto P, Amerio P, Tomai MA, Miller RL, Sauder DN. Imiquimod, a Topical Immune Response Modifier, Induces Migration of Langerhans Cells. *J Invest Dermatol.* 2000; **114** (1): 135-41.
  105. Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Nunez G.

- Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. 2006; **440**(7081): 233-6.
106. Wood LC, Stadler AK, Liou A, Campbell IL, Grunfeld C, Elias PM, Feingold KR. Barrier disruption increases gene expression of cytokines and the 55 kD TNF receptor in murine skin. *Exp Dermatol*. 1997; **6**: 98-104.
  107. Marks DJ, Radulovic M, McCartney S, Bloom S, Segal AW. Modified skin window technique for the extended characterisation of acute inflammation in humans. *Inflamm Res*. 2007; **56**(4): 168-74.
  108. Coquette A, Berna N, Vandebosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y. Analysis of interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol in Vitro*. 2003; **17**(3): 311-21.
  109. Lee HY, Stieger M, Yawalkar N, Kakeda M. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators Inflamm*. 2013; **2013**: 916497.
  110. Williams IR and Kupper TS. Immunity at the Surface: Homeostatic Mechanisms of the Skin Immune System. *Life Sci*. 1996; **58**(18): 1485-507.
  111. Wong R, Tran V, Morhenn V, Hung SP, Andersen B, Ito E, Wesley Hatfield G, Benson NR. Use of RT-PCR and DNA microarrays to characterize RNA recovered by non-invasive tape harvesting of normal and inflamed skin. *J Invest Dermatol*. 2004; **123**(1): 159-67.
  112. Zepter K, Häffner A, Soohoo LF, De Luca D, Tang HP, Fisher P, Chavinson J, Elmets CA. Induction of biologically active IL-1 beta-converting enzyme and mature IL-1 beta in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli. *J Immunol*. 1997; **159**: 6203-8.
  113. Gupta AK, Browne M, Bluhm R. Imiquimod: A Review. *J Cutan Med Surg*. 2002; 554-60.
  114. Barland CO, Zettersten E, Brown BS, Ye J, Elias PM, Ghadially R. Imiquimod-Induced Interleukin-1 $\alpha$  Stimulation Improves Barrier Homeostasis in Aged Murine Epidermis. *J Invest Dermatol*. 2004; **122**: 330-6.
  115. Schiller M, Metze D, Luger TA, Grabbe S, Gunzer M. Immune response modifiers – mode of action. *Exp Dermatol*. 2006; **15**: 331-41.
  116. Kono T, Kondo S, Pastore S, Shivji GM, Tomai MA, McKenzie RC, Sauder DN. Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. *Lymphokine Cytokine Res*. 1994; **13**: 71-6.
  117. Wang X, Schnuck M, Kallen KJ, Neumann C, Trautwein C, Rose-John S, Proksch E. The Interleukin-6 Cytokine System Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis. *J Invest Dermatol*. 2004; **123**: 124-31.

118. Jin SH, Choi D, Chun YJ, Noh M. Keratinocyte-derived IL-24 plays a role in the positive feedback regulation of epidermal inflammation in response to environmental and endogenous toxic stressors. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014; **280**(2): 199-206.
119. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S, Han G, Wohn C, Lu J, Xing X, Nair RP, Voorhees JJ, Elder JT, Wang XJ, Sano S, Prens EP, DiGiovanni J, Pittelkow MR, Ward NL, Gudjonsson JE. Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One*. 2011; **6**(4): e18266.
120. Amarbayasgalan T, Takahashi H, Dekio I, Morita E. Interleukin-8 content in the stratum corneum as an indicator of the severity of inflammation in the lesions of atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013; **160**(1): 63-74.
121. Schroder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol*. 1987; **139**(10): 3474-83.
122. Duffy D, Perrin H, Abadie V, Benhabiles N, Boissonnas A, Liard C, Descours B, Reboulleau D, Bonduelle O, Verrier B, Van Rooijen N, Combadiere C, Combadiere B. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells. *Immunity*. 2012; **37**(5): 917-29.
123. Dickel H, Gambichler T, Kamphowe J, Altmeyer P, Skrygan M. Standardized tape stripping prior to patch testing induces upregulation of Hsp90, Hsp70, IL-33, TNF- $\alpha$  and IL-8/CXCL8 mRNA: new insights into the involvement of 'alarmins'. *Contact Dermatitis*. 2010; **63**: 215-22.
124. Dickson MC, Ludbrook VJ, Perry HC, Wilson PA, Garthside SJ, Binks MH. A model of skin inflammation in humans leads to a rapid and reproducible increase in the interferon response signature: a potential translational model for drug development. *Inflamm Res*. 2015; **64**(3-4): 171-83.
125. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Ve Immunol Immunopathol*. 2002; **88** (1-2): 1-12.
126. Loré K, Sönnernborg A, Spetz AL, Andersson U, Andersson J. Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *J Immunol Methods*. 1998; **214**(1): 97 - 111.
127. Sugawara T, Gallucci RM, Simeonova PP, Luster MI. Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine*. 2001; **15**(6): 328-36.
128. Klueh U, Zenghe L, Feldman B, Kreutzer D. Importance of Interleukin-1 and Interleukin-1 Receptor Antagonist in Short-Term Glucose Sensor Function in Vivo. *J Diabetes Sci Technol*. 2010; **4**(5): 1073-86.
129. Kupper TS and Groves RW. The Interleukin-1 Axis and Cutaneous Inflammation. *J Invest Dermatol*. 1995; **105**(1): S62-6.

130. Reich K, Heine A, Hugo S, Blaschke V, Middel P, Kaser A, Tilg H, Blaschke S, Gutgesell C, Neumann C. Engagement of the Fc RI Stimulates the Production of IL-16 in Langerhans Cell-Like Dendritic Cells. *J Immunol.* 2001; **167**(11): 6321-9.
131. Roediger B and Weninger W. Group 2 innate lymphoid cells in the regulation of immune responses. *Adv Immunol.* 2015; **125**: 111-54.
132. Banas M, Zegar A, Kwitniewski M, Zabieglo K, Marczyńska J, Kapinska-Mrowiecka M, LaJevic M, Zabel BA, Cichy J. The expression and regulation of chemerin in the epidermis. *PLoS One.* 2015; **10**(2): e0117830.
133. Pachynski RK, Zabel BA, Kohrt HE, Tejeda NM, Monnier J, Swanson CD, Holzer AK, Gentles AJ, Sperinde GV, Edalati A, Hadeiba HA, Alizadeh AA, Butcher EC. The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses. *J Exp Med.* 2012; **209**(8): 1427-35.
134. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brezillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med.* 2003; **198**(7): 977-85.
135. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood.* 2007; **109**(9): 3625-32.
136. Ishida Y, Gao JL, Murphy PM. Chemokine Receptor CX3CR1 Mediates Skin Wound Healing by Promoting Macrophage and Fibroblast Accumulation and Function. *J Immunol.* 2007; **180**(1): 569-79.
137. Crola Da Silva C, Lamerant-Fayel N, Paprocka M, Mitterrand M, Gosset D, Dus D, Kieda C. Selective human endothelial cell activation by chemokines as a guide to cell homing. *Immunology.* 2009; **126**(3): 394-404.
138. Badr G, Badr BM, Mahmoud MH, Mohany M, Rabah DM, Garraud O. Treatment of diabetic mice with undenatured whey protein accelerates the wound healing process by enhancing the expression of MIP-1alpha, MIP-2, KC, CX3CL1 and TGF-beta in wounded tissue. *BMC Immunol.* 2012; **13**: 32.
139. Staumont-Salle D, Fleury S, Lazzari A, Molendi-Coste O, Hornez N, Lavogiez C, Kanda A, Wartelle J, Fries A, Pennino D, Mionnet C, Prawitt J, Bouchaert E, Delaporte E, Glaichenhaus N, Staels B, Julia V, Dombrowicz D. CX(3)CL1 (fractalkine) and its receptor CX(3)CR1 regulate atopic dermatitis by controlling effector T cell retention in inflamed skin. *J Exp Med.* 2014; **211**(6): 1185-96.

140. Karande P, Mitragotri S. Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies . *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2010; 175-201.
141. Larregina A, Morelli A, Kolkowski E, Fainboim L. Flow cytometric analysis of cytokine receptors on human Langerhans ' cells . Changes observed after short-term culture. *Immunology.* 1996; **87**: 317-25.
142. Dang Y, Wagner WM, Gad E, Rastetter L, Berger CM, Holt GE, Disis ML. Dendritic cell-activating vaccine adjuvants differ in the ability to elicit antitumor immunity due to an adjuvant-specific induction of immunosuppressive cells. *Clin Cancer Res.* 2012; **18**(11): 3122-31.
143. Engel AL, Holt GE, Lu H. The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2011; **4**(2): 275-89.
144. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol.* 2009; **18**(12): 1036-43.
145. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; **187**(6): 875-83.
146. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; **27**:519-50.
147. Mizutani H, Black R, Kupper TS. Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J Clin Invest.* 1991; **87**(3): 1066-71.
148. Jensen JM, Schütze S, Förl M, Krönke M, Proksch E. Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest.* 1999; **104**(12): 1761-70.
149. Burns RP, Ferbel B, Tomai M, Miller R, Gaspari AA. The imidazoquinolines, imiquimod and R-848, induce functional, but not phenotypic, maturation of human epidermal Langerhans' cells. *Clin Immunol.* 2000; **94**(1): 13-23.
150. Vogt A, Combadiere B, Hadam S, Stieler KM, Lademann J, Schaefer H, Aufran B, Sterry W, 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**(6): 1316-22.
151. Godefroy S, Peyre M, Garcia N, Muller S, Sesardic D, Partidos CD. Effect of skin barrier disruption on immune responses to topically applied cross-reacting material, CRM(197), of diphtheria toxin. *Infect Immun.* 2005; **73**(8): 4803-9.

152. Levin J and Maibach H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *J Control Release*. 2005; **103**(2): 291-9.
153. Ogiso T, Paku T, Iwaki M, Tanino T. Mechanism of the Enhancement Effect of n-Octyl- $\beta$ -D-thioglucoiside on the Transdermal Penetration of Fluorescein Isoiliocyanate-Labeled Dextrans and the Molecular Weight Dependence of Water-Soluble Penetrants through Stripped Skin. *J Pharm Sci*. 1994; **83**(12): 1676-81.
154. Feldmann RJ and Maibach H. Penetration of <sup>14</sup>C Hydrocortisone Through Normal Skin. *Arch Dermatol*. 1965; **91**(6): 661-6.
155. Shim J, Seok Kang H, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release*. 2004; **97**(3): 477-84.
156. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*. 2004; **99**(1): 53-62.
157. Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration Profile of Microspheres in Follicular Targeting of Terminal Hair Follicles. *J Invest Dermatol*. 2004; **123**(1): 168-76.
158. Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007; **59**(6): 427-43.
159. Morgen M, Lu GW, Du D, Stehle R, Lembke F, Cervantes J, Ciotti S, Haskell R, Smithey D, Haley K, Fan C. Targeted delivery of a poorly water-soluble compound to hair follicles using polymeric nanoparticle suspensions. *Int J Pharm*. 2011; **416**(1): 314-22.
160. Mittal A, Raber AS, Schaefer UF, Weissmann S, Ebensen T, Schulze K, Guzman CA, Lehr CM, Hansen S. Non-invasive delivery of nanoparticles to hair follicles: a perspective for transcutaneous immunization. *Vaccine*. 2013; **31**(34): 3442-51.
161. Lekki J, Stachura Z, Dąbroś W, Stachura J, Menzel F, Reinert T, Butz T, Pallon J, Gontier E, Ynsa MD, Moretto P, Kertesz Z, Szikszai Z, Kiss AZ. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. *Nucl Instrum Meth B*. 2007; **260**(1): 174-7.
162. Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R, Lopez-Quintela MA. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J Invest Dermatol*. 2007; **127**(7): 1701-12.
163. Matsumara H, Oka K, Umekage K. Effect of occlusion on human skin. *Contact Dermatitis*. 1995; **33**: 231-5.
164. Schmid-Wendtner MH and Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006; **19**(6): 296-302.
165. Mahe B, Vogt A, Liard C, Duffy D, Abadie V, Bonduelle O, Boissonnas A, Sterry W, Verrier B, Blume-Peytavi U, 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**(5): 1156-64.
166. Frombach J, Unbehauen M, Kurniasih IN, Schumacher F, Volz P, Hadam S, Rancan F, Blume-Peytavi U, Kleuser B, Haag R, Alexiev U, Vogt A. Core-multishell nanocarriers enhance drug penetration and reach keratinocytes and antigen-presenting cells in intact human skin. *J Control Release.* 2019; **299**: 138-48.
167. Doge N, Honzke S, Schumacher F, Balzus B, Colombo M, Hadam S, Rancan F, Blume-Peytavi U, Schafer-Korting M, Schindler A, Ruhl E, Skov PS, Church MK, Hedtrich S, Kleuser B, Bodmeier R, Vogt A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin - assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J Control Release.* 2016; **242**: 25-34.
168. Vogt A, Wischke C, Neffe AT, Ma N, Alexiev U, Lendlein A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin - Do existing technologies match clinical challenges? *J Control Release.* 2016; **242**: 3-15.
169. Sonzogni AS, Yealland G, Kar M, Wedepohl S, Gugliotta LM, Gonzalez VDG, Hedtrich S, Calderon M, Minari RJ. Effect of Delivery Platforms Structure on the Epidermal Antigen Transport for Topical Vaccination. *Biomacromolecules.* 2018; **19**(12): 4607-16.
170. Witting M, Molina M, Obst K, Plank R, Eckl KM, Hennies HC, Calderon M, Friess W, Hedtrich S. Thermosensitive dendritic polyglycerol-based nanogels for cutaneous delivery of biomacromolecules. *Nanomedicine.* 2015; **11**(5): 1179-87.

## 10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

Ich, Lina Weiß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung hautphysiologischer, lokal inflammatorischer und penetrationsdynamischer Parameter nach milder Hautbarriereschädigung - Praktische Bedeutung für transkutane Vakzinierungsstrategien“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Im Rahmen der hier beschriebenen Versuche hatte ich Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Pfannes EKB, Weiss L, Hadam S, Gonnet J, Combadière B, Blume-Peytavi U, Vogt A. Physiological and Molecular Effects of in vivo and ex vivo Mild Skin Barrier Disruption. Skin Physiology and Pharmacology. 2018; IF 2,366

Beitrag im Einzelnen:

Diese Publikation wurde in geteilter Erstautorenschaft von mir und Frau Dr. Barbosa-Pfannes erstellt. Alle Textstellen, die ex vivo Versuche betreffen wurden hierbei von mir verfasst. Diese basierten auf Teilen verschiedener Abschnitte dieser Monografie, nämlich von der Bestimmung Hautphysiologischer Parameter, sowie Cytokinquantifizierung aus Sebutapes und RT-qPCR Analysen.

Im Detail habe ich die letzten drei Absätze der Einleitung geschrieben sowie den kompletten Teil zu den ex vivo Experimenten im Methodenteil auf Seite 117. In den Ergebnissen habe ich die letzten zwei Abschnitte auf Seite 119 verfasst, außerdem die Abbildungen 4 und 5 erstellt. In der Diskussion wurden verschiedene Abschnitte von mir geschrieben, unter anderem der erste Abschnitt auf Seite 120 sowie der letzte Abschnitt auf Seite 120 kontinuierlich bis Seite 122. Selbstverständlich wurden hier und da noch kleinere Modifikationen an verschiedensten Stellen durch die anderen beteiligten Autoren vorgenommen, jedoch ohne den Inhalt zu verändern.

Publikation 2: Rancan F, Afraz Z, Hadam S, Weiß L, Perrin H, Kliche A, Schrade P, Bachmann S, Schäfer-Korting M, Blume-Peytavi U, Wagner R, Combadière B, Vogt A. Topically applied virus-like particles containing HIV-1 Pr55gag protein reach skin antigen-presenting cells after mild skin barrier disruption. Journal of Controlled Release. 2017; IF 7,877

Beitrag im Einzelnen:

Teile der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse von RT-qPCR Analysen zu topischer Auftragung von VLPs in mit CSSS behandelte Haut, wurden in dieser Publikation veröffentlicht. Figure 3 im Supplemental Material wurde durch mich erstellt und ein kurzer Verweis hierauf im letzten Abschnitt des Ergebnisteils des Papers von mir geschrieben. Diese enthält eine Übersicht über alle durch RT-qPCR untersuchten Moleküle sowie vorhergehend eine Beschreibung der verwendeten Methoden. Ebenso habe ich am letzten Abschnitt der Diskussion, welche die Rolle von IL-1alpha nach CSSS und im Rahmen transkutaner Impfung diskutiert, mitgeschrieben.

Publikation 3: Gonnet J, Poncelet L, Meriaux C, Gonçalves E, Weiss L, Tchitchek N, Pedruzzi E, Soria A, Boccara D, Vogt A, Bonduelle O, Hamm G, Ait-Belkacem R, Stauber J, Fournier I,

Wisztorski M, Combadiere B. Mechanisms of innate events during skin reaction following intradermal injection of seasonal influenza vaccine. Journal of Proteomics. 2020; IF 3,537.

Beitrag im Einzelnen:

Die für diese Monographie durchgeführten RT-qPCR Versuche waren Grundlage für einen Teil der Untersuchungen in oben genannter Publikation. Die im Supplemental Material auf Seite 3 beschriebenen RT-qPCR Analysen wurden auf Basis der in dieser Monographie beschriebenen RT-qPCR Versuche durchgeführt. Erste Testproben mit intradermal injiziertem Impfstoff wurden mit den in der hiesigen Arbeit präsentierten Proben nach transkutaner Impfstoffauftragung untersucht und auch verglichen. Text wurde für diese Publikation von mir nicht verfasst.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift der Doktorandin

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

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

## 12 PUBLIKATIONSLISTE

---

- Pfannes EKB, Weiss L, Hadam S, Gonnet J, Combadière B, Blume-Peytavi U, Vogt A. **Physiological and Molecular Effects of in vivo and ex vivo Mild Skin Barrier Disruption.** Skin Physiology and Pharmacology. 2018; IF 2,366
- Rancan F, Afraz Z, Hadam S, Weiß L, Perrin H, Kliche A, Schrade P, Bachmann S, Schäfer-Korting M, Blume-Peytavi U, Wagner R, Combadière B, Vogt A. **Topically applied virus-like particles containing HIV-1 Pr55gag protein reach skin antigen-presenting cells after mild skin barrier disruption.** Journal of Controlled Release. 2017; IF 7,877
- Weiss L, Wustmann K, Semmo M, Schwerzmann M, Semmo N. **Elbasvir/Grazoprevir combination, an alternative in antiviral hepatitis C therapy in patients under amiodarone treatment.** Case Reports in Gastroenterology. 2017; IF 0,4
- Gonnet J, Poncelet L, Meriaux C, Gonçalves E, Weiss L, Tchitchek N, Pedruzzi E, Soria A, Boccara D, Vogt A, Bonduelle O, Hamm G, Ait-Belkacem R, Stauber J, Fournier I, Wisztorski M, Combadiere B. **Mechanisms of innate events during skin reaction following intradermal injection of seasonal influenza vaccine.** Journal of Proteomics. 2020; IF 3,537.

### 13 DANKSAGUNG

---

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei einigen Personen, welche mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, zu bedanken.

Herzlichen Dank möchte ich meinen Betreuerinnen Dr. Annika Vogt und Dr. Béhazine Combadière aussprechen, ohne deren Betreuung und Lenkung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, welche mir stets professionelle und persönliche Unterstützung zukommen ließen und nie die Geduld mit mir verloren.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Sabrina Hadam, Dr. Eva Barbosa-Pfannes und Dr. Janna Frommbach bedanken, die mich geduldvoll in der Erlernung notwendiger Methoden angeleitet haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiteren sehr großen Dank möchte ich Dr. Jessica Gonnet und Helene Perrin entgegenbringen, welche mir ebenfalls eine herzliche und strukturierte Einarbeitung zuteilwerden ließen und mich lehrten das praktische wissenschaftliche Arbeiten zu schätzen. Besonderen Dank möchte ich Dr. Gonnet darüber hinaus dafür ausdrücken, dass sie mich nicht nur professionell, sondern auch persönlich in ihrer Arbeitsgruppe willkommen hieß und mich bis heute mit ihrer Freundschaft beehrt.

Außerdem möchte ich mich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanken, welche mich über all die Jahre ideell und finanziell unterstützte und mir damit die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichte.

Der größte Dank geht an meine Familie, allem voran an meine Mutter, ohne deren Unterstützung es mir nie möglich gewesen wäre zu diesem Punkt in meinem Leben zu gelangen. Selbst in den schwersten Zeiten wurde mir ihre Liebe und Unterstützung zuteil und sie gab mir den nötigen Rückhalt und die Kraft, welche für die Fertigstellung dieser Arbeit nötig war.