

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

## **DISSERTATION**

**Die immunstimulatorische Wirkung  
von Cyanacrylate Skin Surface Stripping  
auf die Aktivierung und Migration von Langerhanszellen  
der menschlichen Haut  
*in vitro* und *in vivo***

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

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von  
Iliane Deckert  
aus Eutin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Blume-Peytavi  
2. Prof. Dr. med. U. Wollina  
3. Prof. Dr. M. Böhm

Datum der Promotion: 29.01.2010

Für meine Eltern, Annie und Reiner Deckert

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mir bei der Durchführung der Arbeit behilflich waren. Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. U. Blume-Peytavi für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Unterstützung und die bereichernden Anregungen bedanken. Sie ermöglichte mir im Studium außerdem tiefe Einblicke in vielfältige Bereiche der klinischen und experimentellen Dermatologie.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annika Vogt für die intensive Betreuung. Ihre offene Art ermöglichte es mir, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen. Neben den Erkenntnissen aus wissenschaftlichen Diskussionen möchte ich mich besonders herzlich für die gewissenhafte Begleitung bei der Erstellung der Dissertation bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. J. Lademann, der immer wieder bereit war, mit mir Fragen zu diskutieren, und der die Entstehung dieser Arbeit mit freundlichem Interesse begleitet hat. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Brice Mahé für seine vielen Anregungen und Ideen sowie seine aufmunternde Unterstützung bedanken. Weiterer Dank gilt Frau Dr. Katja Frieler (ehem. Mitarbeiterin am Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité), die mich sehr engagiert bei Fragen zur statistischen Auswertung unterstützt hat und mich über die Arbeit hinaus an der Faszination der Statistik teilhaben lassen.

Frau Heike Richter CTA und vor allem Frau Sabrina Hadam BTA haben mich äußerst geduldig im Labor eingearbeitet und mir durch ihre tatkräftige Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit wesentlich erleichtert bzw. möglich gemacht. Daher sei ihnen an dieser Stelle ganz besonders gedankt.

Für die vielen Momente der Aufmunterung und freundlichen Teilhabe möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Bereichs für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut und der Haare an der Hautklinik der Charité und ganz besonders bei meinen Mitstreiterinnen Julia Schmidt, Lida Massoudy und Frau Dr. Anna Mleczko herzlich bedanken.

Diese Arbeit hätte ohne die Zustimmung und Mitarbeit der Probandinnen und Probanden nicht realisiert werden können. Daher sei ihnen an dieser Stelle ganz besonders gedankt.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Michael Soden bedanken, der mir mit viel Geduld und Verständnis eine essentielle Unterstützung war.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	9
1.1	Einführung in die Thematik .....	9
1.2	Das Immunsystem der Haut .....	11
1.2.1	Die Dendritischen Zellen .....	12
1.2.2	Phagozytose und Antigenpräsentation durch dendritische Zellen .....	15
1.2.3	Die Reifung von Dendritischen Zellen.....	16
1.2.4	Die Langerhanszelle - Die Dendritische Zelle der Epidermis.....	18
1.3	Die Impfung als gezielte Immunmodulation.....	23
1.3.1	Strategien zur transkutanen Vakzinierung .....	24
1.4	Die Haut und der Haarfollikel im Kontext der perkutanen Penetration.....	26
1.4.1	Aufbau und Funktion der Haut.....	26
1.4.2	Aufbau und Funktion des Haarfollikels .....	28
1.5	Die perkutane Penetration .....	30
1.5.1	Aspekte der transfollikulären Penetration - Offene vs. geschlossene HF .....	31
1.5.2	Cyanacrylate skin surface stripping: Erleichterung perkutaner Penetration durch mechanische HF-Öffnung .....	32
1.6	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	34
<b>2</b>	<b>Methoden</b> .....	36
2.1	Methoden zur mechanischen und chemischen Reizung der Haut <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .	36
2.1.1	Vorbereitung der Brusthaut auf das CSSS und die TNF- $\alpha$ -Applikation.....	36
2.1.2	CSSS.....	36
2.1.3	TNF- $\alpha$ -Applikation .....	37

2.2	Vorbereitung auf die Immunfluoreszenzfärbung: Methoden zur Gewinnung von Hautschnitten und Epidermisplättchen.....	38
2.2.1	Stanzen-Probengewinnung.....	38
2.2.2	Dispase-Andau zur Gewinnung der Epidermisplättchen .....	38
2.2.3	Kryoschnitte .....	39
2.2.4	Saugblasen.....	39
2.3	Immunfluoreszenzfärbung .....	40
2.3.1	Primär- und Sekundärantikörper .....	40
2.3.2	Durchführung .....	41
2.4	Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie .....	41
2.5	Fotografie .....	42
2.6	Bildbearbeitung .....	42
2.7	Methoden zur Bestimmung der Follikeldichte.....	43
2.7.1	Lichtmikroskopie .....	43
2.7.2	Fotografie .....	43
2.7.3	Phototrichogramm.....	43
2.8	Statistische Auswertung .....	44
2.9	Versuch zur Ermittlung der Langerhanszell-Dichte in Kryoschnitten und Epidermisplättchen von Brusthaut .....	45
2.9.1	Spenderkollektiv.....	45
2.9.2	Versuchsdurchführung .....	45
2.10	Versuch zur Ermittlung der Langerhanszell-Dichte <i>in vivo</i> in Unterarmepidermis-Saugblasen von gesunden Probanden .....	46
2.10.1	Probandenkollektiv.....	47
2.10.2	Versuchsdurchführung .....	47
2.11	Versuch zur Ermittlung der Follikeldichte in Brust- und Unterarmhaut .....	48
2.11.1	Probandenkollektiv.....	48
2.11.2	Follikeldichtebestimmung.....	48

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	49
3.1	Epidermisplättchen.....	49
3.1.1	CD1a <sup>+</sup> Zellen.....	49
3.1.2	HLA-DR <sup>+</sup> Zellen .....	51
3.1.3	CD83 <sup>+</sup> Zellen.....	53
3.1.4	CD86 <sup>+</sup> Zellen.....	55
3.2	Kryoschnitte .....	58
3.2.1	Quantitative Auswertung.....	58
3.2.2	Morphologische Auswertung .....	63
3.3	Saugblasen.....	67
3.4	Folikeldichte auf Unterarm- und auf Brusthaut .....	68
3.5	CSSS und digitale Fotografie: Zwei Methoden zur Ermittlung der Follikeldichte im Vergleich .....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	71
4.1	LC-Verteilung und das Immunprivileg des Haarfollikels.....	71
4.2	Aktivierungs- und Migrationsmuster von LC .....	72
4.3	Penetrationserleichterung durch HF-Öffnung.....	79
4.4	CSSS als Adjuvans.....	80
4.5	Entwicklung der transkutanen Vakzinierung – Ein Ausblick .....	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	83
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	85

## Glossar

AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
BMDC	<i>bone-marrow derived DC</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i> , zytotoxische T-Zelle
DC	<i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
DC-SIGN	<i>DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin</i>
DNFB	2,4-Dinitro-1-Fluorobenzen
EGFP	<i>enhanced green fluorescent-protein</i>
EP	Epidermisplättchen
HF	Haarfollikel
HIV	<i>humane immunodeficiency virus</i>
IL	Interleukin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
LC	<i>langerhans cell</i> , Langerhanszelle
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
SC	Stratum corneum
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i> , Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat



# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Impfungen gelten als die effektivste und kostengünstigste Methode zur Prävention einer Vielzahl von Infektionskrankheiten, einiger Tumoren und deren Begleit- und Folgeerkrankungen. Umfassende, weltweite Impfprogramme führten seit Mitte des 20. Jahrhunderts wesentlich zur Reduktion gefährlicher Infektionskrankheiten wie den Masern. Die Poliomyelitis steht kurz vor der Eradikation, Pocken gelten seit 1980 als ausgerottet. Durch die Hepatitis-B-Impfung konnte die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms erfolgreich gesenkt werden. Ähnlich stehen die Hoffnungen bei der Bekämpfung des Zervix-Karzinoms. Doch die konventionelle Impfpraxis steht vor einer Vielzahl ungelöster Probleme. Durch subkutane oder intramuskuläre Injektion von attenuierten Keimen, d.h. durch die heute üblichen Impfstrategien werden bisher keine ausreichend starken Immunantworten gegen chronisch persistierende Krankheitserreger wie den Hepatitis C- oder *human immunodeficiency* (HI)-Virus sowie gegen die Mehrzahl der Tumore erreicht. Immer noch problematisch sind auch die Instabilität der klassischen Impfersera und damit deren Haltbarkeit vor allem in tropischen Ländern. Des Weiteren stellen in Entwicklungsländern Infektionen durch unsaubere Injektionsnadeln ein ernst zu nehmendes Problem dar<sup>1,2</sup>.

In letzter Zeit ergaben sich verstärkt experimentelle Hinweise darauf, dass innovative Impfstrategien über Pflaster- und Aerosolapplikation auf Haut und Schleimhaut<sup>3</sup> z.T. geeigneter seien und zu potenteren Ergebnissen führen können als klassische subkutane und intramuskuläre Injektionen<sup>4</sup>. Die große Zahl an Dendritischen Zellen (DC) in der Haut ist dabei möglicherweise ein wichtiger Faktor<sup>5,6</sup>. DC, die Mikroorganismen erkennen und aufnehmen können, erreichen die Stimulation des spezifischen Immunsystems über Präsentation von Fremd-Antigen und führen so zur Induktion von Immunantworten. Somit sind die kutanen DC und besonders die epidermalen Langerhanszellen (LC) als deren Hauptvertreter ein privilegiertes Ziel der Bemühungen um neuartige, transkutane Impfstrategien.

Doch die Haut stellt zu unserem Schutze mit ihrer robusten Hornhautschicht im gesunden Zustand eine wirkungsvolle Barriere zur Außenwelt dar, die transkutane Impfstrategien überwinden müssen. Topisch applizierte Substanzen können theoretisch nicht durch die Hornhaut, sondern auch durch Hautanhangsgebilde wie Drüsen und Haarfollikel (HF) wandern<sup>7</sup>. Studien zum "Follicular Targeting" zeigten, dass der HF de facto eine wichtige Rolle als

Reservoir von makromolekularen und partikulären Verbindungen spielt <sup>8</sup>. Allerdings erschwert das Vorhandensein von Talg und Debris die Penetration entlang der HF. Vorbehandlung der Haut mittels Cyanacrylate skin surface stripping (CSSS) kann die Anzahl der HF, die für die Penetration von topisch applizierten Substanzen und Verbindungen erleichtern <sup>9</sup>.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte kürzlich, dass topisch applizierte Nanopartikel und partikuläre Vakzine nach Vorbehandlung der Haut durch CSSS gezielt in HF angereichert werden konnten, von wo aus Diffusion in das perifollikuläre Gewebe und Aufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) erfolgte <sup>10, 11</sup>. In einer Pilotstudie an gesunden Probanden konnte durch topisches Auftragen von Grippeimpfstoff gezeigt werden, dass ein von uns entwickeltes Protokoll zur transkutanen Vakzinierung, welches auf Vorbehandlung der Haut mit CSSS basiert, gut verträglich und effektiv war <sup>12</sup>. Neben der bekannten penetrationsverstärkenden Wirkung von CSSS insbesondere auf den Penetrationsweg entlang von HF, wurden auch mögliche, durch die CSSS-Prozedur ausgelöste, immunstimulatorische Wirkungen diskutiert. In der Vergangenheit wurde bereits auf den Reichtum an LC speziell im HF-Infundibulum hingewiesen <sup>13, 14</sup>. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkung von CSSS auf den Aktivierungszustand von APC der Haut und auf deren Verteilung und Migration zu untersuchen. Dabei erhielt die Untersuchung der Dichte und Dendritizität von LC in der interfollikulären Epidermis im Vergleich zu den Zellen im HF-Epithel und perifollikulärem Gewebe besondere Bedeutung. Die Erforschung dieser Fragestellungen würde die Entwicklung von kutanen Impfstrategien mittels Pflasterapplikation erleichtern. Des Weiteren können neue Vakzine gegen bisher unbeherrschbare Krankheiten und auch für Individuen mit nur schwachen Immunantworten entwickelt werden.

Im Folgenden sollen zunächst die nach heutigem Verständnis wichtigen Gegebenheiten für die Reifung der dermalen DC erläutert werden (1.2). Anschließend soll der heutige Stand der Entwicklung kutaner Impfstrategien vermittelt werden (1.3). Zum Verständnis der bisher bekannten Reifungsprozesse der DC der Haut im Allgemeinen und der LC im Besonderen sind neben der Skizzierung des Immunsystems der Haut und des HF auch Kenntnisse über die Morphologie und die verschiedenen Funktionen der Haut und des Haarfollikels erforderlich (1.4), die anschließend geschildert werden. Abschließend wird die Technik des CSSS im Kontext der transkutanen Penetration topisch applizierter Substanzen erläutert (1.5). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Wirkung des CSSS auf DC der Haut anhand der Veränderung von Dichte und Morphologie der LC zu erfassen (1.6.).

## 1.2 Das Immunsystem der Haut

Das Immunsystem (lateinisch: immunis = frei, unberührt) ist ein komplexes System aus Zellen, Molekülen und Mechanismen, dessen Hauptaufgabe darin besteht, den Körper vor Infektionen durch fremde Substanzen und Organismen, aber auch vor entarteten eigenen Zellen z. B. Tumoren zu schützen. Dieser Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“, wie auch „harmlos“ und „gefährlich“, folgen die direkte Bekämpfung der Krankheitserreger und der Aufbau eines wirkungsvollen Schutzsystems gegen das erneute Eindringen des Pathogens. Der Ablauf dieser Immunantwort kann grundsätzlich über zwei unterschiedlich aufgebaute immunologische Effektorsysteme erfolgen: die angeborene (unspezifische) und die adaptive (spezifische) Immunität.

Die Haut besitzt neben ihrer Funktion als physikalische Barriere zwischen Körper und Umgebung verschiedene unspezifische Verteidigungsmechanismen gegen Pathogene, denen sie direkt exponiert ist. Auf Angriffe von Parasiten und Mikroorganismen kann die Haut schnell und effektiv reagieren und dabei die kutane Homöostase aufrechterhalten. Somit verfügt sie über ein effizientes angeborenes Immunsystem, das Pathogenstrukturen (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) und Gewebeerstörungen erkennen kann. Zum angeborenen Abwehrsystem gehören die Zelltypen Phagozyten, Mastzellen, Granulozyten und die Natürlichen Killer (NK)-Zellen. Zusätzlich übernehmen die antimikrobiellen Proteine  $\beta$ -Defensine, Cathelicidine und Lysozym wichtige Schutzfunktionen in der Epidermis. In der Dermis stehen Komplementsystem und Interferone im Vordergrund<sup>15</sup>.

Auch wenn das angeborene Abwehrsystem gerade für die frühe Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist, gelingt es ihm jedoch häufig nicht alleine, den Erreger zu vernichten. Ein infektiöser Organismus, der diese ersten Abwehrlinien durchbricht, muss dann über die adaptive Immunantwort bekämpft werden. Diese unterscheidet sich von der angeborenen Immunität durch die spezifische Erkennung von Mikroben und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das einen stärkeren Schutz gegen eine erneute Infektion bietet. Hauptakteure der adaptiven Immunität sind APC, darunter fallen vor allem die DC und Makrophagen, aber auch B-Zellen.

Die Mechanismen der angeborenen humoralen und der erworbenen zellvermittelten Immunantwort dienen der Abwehr von Infektionen, der Kontrolle von Mikroorganismen und der Erkennung von kutanen Tumoren. Fällt die Immunüberwachung aus oder kommt es zur

Überfunktion können verschiedenste Hauterkrankungen wie Psoriasis, Atopische Dermatitis und Kontakt-Hypersensibilität, Vitiligo, Lichen planus und Alopecia areata auftreten.

### 1.2.1 Die Dendritischen Zellen

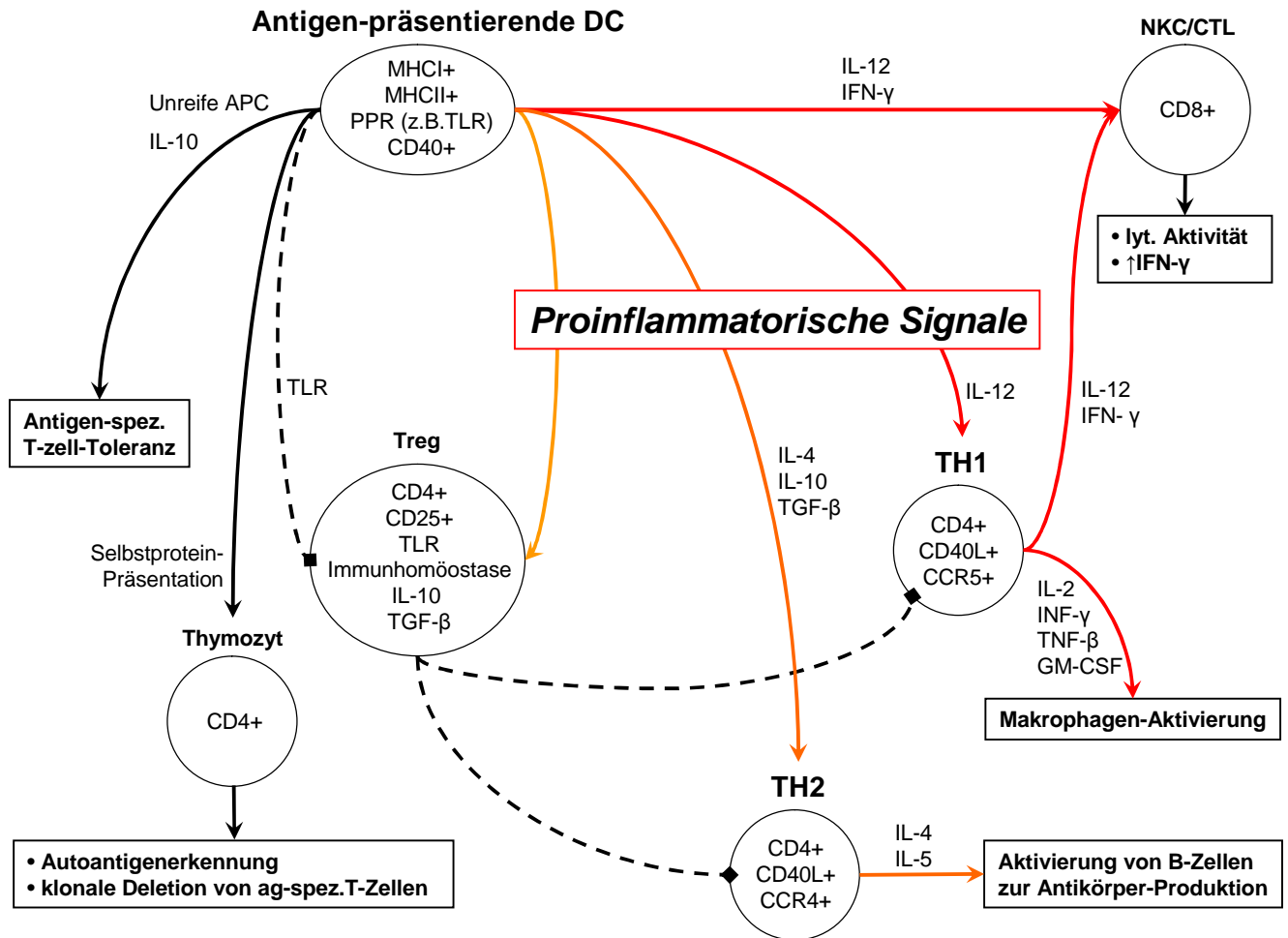
Zellulärer Bestandteil des Immunsystems sind die DC, die als phagozytierende Zellen hervorragend auf die Aufnahme von Fremdmaterial vorbereitet sind. Ihren Namen haben sie wegen ihres sternförmig verzweigten Zellkörper erhalten, der sie dazu prädestiniert, sich amöboid durch das Gewebe zu bewegen. Die große Zelloberfläche erleichtert die Aufnahme von Antigen und die Adhäsion an naive Lymphozyten<sup>16</sup>.

Alle Arten von DC kommen ursprünglich aus dem Knochenmark, wo für sie Flt-3 Ligand (*fibromyalgy syndrome-like tyrosine kinase 3*) und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating growth factor*) entscheidende Wachstumsfaktoren sind. Unter deren Einfluss differenzieren aus CD (*cluster of differentiation*) 34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen lymphoide und myeloide Vorläuferzellen<sup>17</sup>. In der myeloiden Linie bilden sich noch im Knochenmark CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*)<sup>+</sup> und CLA<sup>-</sup> Vorläufer aus. Sie wandern im Allgemeinen als CD1a<sup>+</sup> LC in die Epidermis respektive als CD1a<sup>-</sup> interstitielle DC in die Dermis und andere Gewebe.

DC werden auch als Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem bezeichnet, da sie sowohl an angeborenen Abwehrmechanismen als auch an der Einleitung von spezifischer Immunität und Toleranz beteiligt sind. Matzinger<sup>18</sup> postuliert, dass DC für die Induktion einer T-Zell-Antwort so genannte Gefahren-Signale benötigen. Es sei also nur eine immunologische Reaktion gegen „Fremdes im Kontext mit endogenen oder exogenen Faktoren“ möglich. Zu den endogenen Faktoren gehören Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interferone und CD40-Ligand. Diese Moleküle werden bei Stress, Verletzung und Nekrose freigesetzt.

Die für die Stimulation der DC relevanten exogenen Faktoren werden als PAMP beschrieben. PAMP nennt man Pathogenstrukturen, die vom Immunsystem sehr früh nach der Invasion als exogene Gefahren-Signale erkennen kann. Der *pattern recognition receptor* (PRR) hat Ligandenfunktion für PAMP. Zu diesen evolutionär sehr alten Rezeptor-Proteinen gehören etwa der Mannoserezeptor, das HIV-1 bindende Lektin DC-SIGN (*DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) und Toll-Rezeptoren (*Toll-like receptors*, TLR). TLRs erkennen bakterielle und virale Komponenten und induzieren Zytokine und Chemokine, die wiederum sowohl das

angeborene als auch das erworbene Immunsystem aktivieren können<sup>19, 20</sup>. Für die Übermittlung einer Gefahren-Information an naive T-Zellen können DC über Ligation von TLR und Aktivierung von NF- $\kappa$ B die T<sub>H</sub>1-polarisierenden Zytokine sezernieren und somit eine T<sub>H</sub>1-Antwort induzieren. Diese führt über Makrophagen-Aktivierung zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen, die auch das Abtöten von intrazellulären Erregern ermöglicht. Bei entsprechendem Zytokinmilieu (Abb. 1) wird über den MHCII/TCR-Komplex analog eine T<sub>H</sub>1- oder eine T<sub>H</sub>2-Antwort eingeleitet. Die im Zusammenhang mit der klassischen Impfung wichtige Aktivierung von B-Zellen zur Produktion von Antikörpern als Ausdruck der T<sub>H</sub>2-Antwort wird solchermaßen eingeleitet. DC können aber auch ohne T-Zell-Hilfe direkt naive B-Zellen aktivieren, deren Proliferation und Isotypenwechsel induzieren<sup>21</sup>. Eine starke IL-12-Sekretion durch DC und eine hohe DC/T-Zell-Ratio führt zu einer direkten Stimulation von CTL und NK-Zellen<sup>22</sup>.



**Abb. 1 Polarisierung der Immunantwort durch DC**

DC sind wichtige Regulatoren der Immunantwort. Je nach Zusammensetzung des Zytokinmilieus und der eigenen Reife verhalten DC sich tolerogen oder immunstimulatorisch<sup>23</sup>. In Gegenwart proinflammatorischer Signale können DC naive T-Lymphozyten in eine  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Antwort lenken. In Gegenwart von großen Mengen an IL-12 werden T-Zellen in eine  $T_H1$ -Antwort dirigiert. Eine niedrige Sekretion von IL-12 und ein erhöhter Spiegel an IL-4 und IL-10 wiederum generieren  $T_H2$ -Zellen<sup>22, 24</sup>. Vor allem  $CD1d^+$  DC können CTL und NK-Zellen direkt stimulieren.  $CD1d$  wird allerdings auf LC nicht exprimiert<sup>25</sup>.  $CD8^+$  Zellen können auch über Kreuzpräsentation durch LC aktiviert werden<sup>26</sup>. Dermale DC würden somit eher die humorale Immunität stärken, LC induzierten vorrangig die zelluläre Immunität<sup>27</sup>. Dementsprechend findet man in Maushaut-drainierenden Lymphknoten LC vor allem in den T-Zell-Zonen, dermale DC aber nahe der B-Zell-Follikel, wo sich folliculäre  $T_H$ -Zellen befinden. Sowohl  $T_H1$ -als auch  $T_H2$ -Zellen sind essentiell für eine konsequente Immunantwort auf Virusinfektionen<sup>28, 29</sup>. Je nach Virus mag dabei die notwendige  $T_H1/2$ -Gewichtung unterschiedlich sein. Die Kenntnis der  $T_H1/2$ -Gewichtung ist somit relevant für eine erfolgreiche Immunisierung über DC. Diese kann durch die Auswahl geeigneter Adjuvantien beeinflusst werden. Bei der Tumorelimination steht die Stimulation von CTL über DC im Vordergrund (vgl. Abb. 2). Grundstruktur der Grafik erstellt nach Informationen aus<sup>30</sup>.

## 1.2.2 Phagozytose und Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

DC phagozytieren mit hoher Effizienz Pathogene, die sie nach deren Prozessierung in antigene Moleküle schließlich in Peptidform auf *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen der Klasse I und II präsentieren. MHC-I-induzierte CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen, denen Peptide auf MHC-II-Molekülen präsentiert worden sind, haben anschließend die Fähigkeit, sich nach erneutem Antigenkontakt schnell zu teilen und gezielt auf Erreger zu reagieren. Sind die APC-T-Zellaktionen von kurzer Dauer, bilden sich aus naiven T-Zellen zentrale CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen<sup>31</sup>.

Unreife Zellen sind durch ein starkes Vorkommen von MHC-II-Molekülen in intrazellulären Lysosomen gekennzeichnet. Auf der Zelloberfläche aber werden nur wenige MHC-II-Moleküle, wenige kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 und kein CD83 exprimiert (Tab. 1)<sup>16</sup>. Nach der Antigenaufnahme können DC unter Wirkung von inflammatorischen Zytokinen oder mikrobiellen Produkten in einen reifen Zustand übergehen. In den reifen DC werden die MHC-II-Moleküle mit Peptid-Antigenen beladen und bei schwacher Bindung wieder entfernt. Bei starker Bindung verlassen die Peptid:MHC-II-Moleküle die Lysosomen. Die Komplexe akkumulieren auf der Zelloberfläche und werden dort über Tage stabil exprimiert<sup>32</sup>. Im Unterschied zu anderen Phagozyten reichen in DC nano- bis picomolare Antigenkonzentrationen für effiziente Präsentation aus<sup>33</sup>.

Allgemein wird angenommen, dass für die Einleitung der adaptiven Immunreaktion in Form von CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Präsentation viraler Peptide auf MHC-I-Molekülen von Virus-infizierten DC notwendig ist. Dafür werden Proteine im Zytosol durch Proteasom gespalten. Über den Antigentransporter TAP (*transporter associated with antigen processing*) gelangen die Peptide ins Lumen des Endoplasmatischen Reticulums und werden dort auf MHC-I-Moleküle geladen. Für MHC-I-Moleküle sind alternative Aufnahmewege relevant: Über Integrine können bei der Viruslyse in der Peripherie sterbende Zellen und Tumorzellen durch DC phagozytiert werden. Tumor- oder virale Antigene und exogene Peptide anderer, nicht replizierender Mikroorganismen können auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation an CD8<sup>+</sup> T-Zellen bezeichnet<sup>34</sup>. Tatsächlich lösen *in vivo* fast alle DC T-Zellantworten aus. Sie weisen im Vergleich zu B-Zellen und Monozyten im Lymphknoten eine 10 bis 100-fach höhere Expression von Peptid:MHC-Komplexen auf und zeigen im reifen Zustand eine hohe Expression von kostimulatorischen Molekülen der B7 (CD83, CD86)-Familie auf<sup>35</sup>.

Wegen dieses hohen Besatzes an MHC-Molekülen kann eine DC 100 bis 3000 T-Zellen in einer gemischten Leukozyten-Reaktion stimulieren <sup>16</sup>.

### 1.2.3 Die Reifung von Dendritischen Zellen

In der Biologie von DC spielt der Prozess der Reifung eine zentrale Rolle. Dieser wird durch Entzündung und Infektion von Geweben initiiert und ist durch Veränderungen der Zellmorphologie, des Phänotyps und der Funktion der DC gekennzeichnet.

Für das Reifestadium ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B charakteristisch. Dieser wird bei der Rezeptorbindung durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  oder aber auch durch CD40- und TLR-Liganden wie LPS induziert. CD40L <sup>33</sup>, *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) <sup>36</sup>, Fas /CD95-Ligand <sup>37</sup>, TNF- $\alpha$  <sup>33</sup> und IFN- $\gamma$  <sup>38</sup> werden auch von T-Zellen produziert, die damit zusätzlich die Reifung von DC erleichtern. Nach Kontakt und Aufnahme von Fremdartigen sowie bei inflammatorischen Signalen wandert die DC über die Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten und über das Blut zu peripheren Lymphorganen. Die DC zeigen dann eine verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, B7-DC, ICOS-L), Mitgliedern der TNF-Familie (4-1BBL, OX40L, CD70) und den Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 <sup>39</sup>. Für CD86 ist eine bis zu 100-fache Verstärkung der Expression beschrieben, aber vor allem zeichnen sich reife DC durch die Oberflächenexpression von CD83 aus.

Als einer der bekanntesten Reifungsmarker von DC wird das Glycoprotein CD83 auch von LC exprimiert <sup>40</sup>. Es besteht aus einem extrazellulären Immunglobulin-ähnlichem Einzelstrang, einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Strang <sup>40</sup>. Verglichen mit anderen Leukozytenlinien koexprimieren CD83<sup>+</sup> Zellen MHC-II-Moleküle auf hohem Niveau <sup>41</sup>. CD83 wird zusammen mit den Kostimulatoren CD80 und CD86 während der DC-Reifung hochreguliert, was ihm eine wichtige Rolle in der Einleitung der Immunantwort zukommen lässt <sup>42</sup>. CD80 und CD86 sind Subtypen der B7-Molekül-Familie, die hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sie bei Atopischer Dermatitis auf DC betroffener Hautareale anzutreffen sind <sup>43</sup>.

Humanes Leukozyten-Antigen (HLA)-DR gehört mit HLA-DP und HLA-DQ zu der Gruppe der humanen MHC-Klasse-Antigene. Die Hauptfunktion von HLA-DR besteht dementsprechend in der Peptidpräsentation. HLA-DR ist ein Transmembran-Glykoprotein bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit <sup>44</sup>. Es wird auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten, aktivierten Natürlichen Killerzellen, DC und menschlichen Stammzellen



exprimiert<sup>45, 46</sup>. Auf unreifen DC ist die Expression der MHC-II-Moleküle noch niedrig, da diese von Lysosomen wieder aufgenommen werden. Auf reifen DC sinkt der Umsatz der MHC-Klasse-II-Moleküle um das 10 bis 100-fache. Daraus folgt, dass präsentierte Peptide nun entsprechend länger für die Erkennung von T-Zellen verfügbar sind<sup>30</sup>. Reife DC können also in hohem Maße Antigen präsentieren. Dies trägt letztendlich entscheidend dazu bei, dass naive T-Zellen zu Effektorzellen differenzieren und expandieren. Sofern das Antigenpeptid von einem MHC-I-Komplex präsentiert wird, das wie oben geschildert bei zytosolischen, viralen und kreuzpräsentierenden Peptiden auf DC der Fall ist, wird die Entstehung von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Effektorzellen (CTL) gefördert. Wird das Antigen jedoch auf ein MHC-II-Molekül geladen und von einer reifen DC präsentiert, wird die Bildung von Effektorzellen des T-Helfer (T<sub>H</sub>)-Typs favorisiert.

Genauere Kenntnisse über die adäquate Aktivierung der DC zur Auslösung von T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Antworten sind somit essentiell für gezielte Interventionen in das Immunsystem. Anhand der geschilderten Sachverhalte wird deutlich, dass die Einflussnahme auf DC und die Steuerung ihrer angeborenen und erworbenen Immunantworten vielversprechende therapeutische Ansätze liefern kann.

	<b>Unreife DC</b>	<b>Reife DC</b>
<b>CD13, CD33, CD14</b>	++	(+)
<b>CD40, CD80, CD86</b>	(+)	+++
<b>CD83</b>	-	++
<b>CCR1, CCR5, CCR6</b>	++	-
<b>CCR7</b>	-	+
<b>Phagozytose</b>	+++	(+)
<b>Antigenpräsentation</b>	+	+++
<b>IL-12 Freisetzung</b>	+	+++

**Tab. 1 Phänotypwechsel der DC während des Reifungsprozesses**

Unreife DC exprimieren die myeloischen Antigene CD13 und CD33 stark, ebenso die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CCR6. Die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 sind schwach exprimiert bei fehlender Expression von CD83. Die finale Reifung wird durch CD40-Ligation hervorgerufen, wodurch DC große Mengen an IL-12 produzieren<sup>30</sup>.

## 1.2.4 Die Langerhanszelle - Die Dendritische Zelle der Epidermis

Langerhanszellen (LC) bilden als DC-Hauptpopulation der Epidermis ein dichtes Netzwerk in den basalen und supra-basalen Schichten der Epidermis. Sie etablieren Kontakte mit unmittelbar benachbarten Keratinozyten und über Dendritenausläufer auch mit weiter entfernten Hornzellen. Ihre Dichte variiert je nach anatomischer Lokalisation zwischen 200 und 1000 Zellen/mm<sup>2</sup>. An sonnenexponierten Hautstellen finden sich signifikant niedrigere LC-Dichten. Interessanterweise zeigten LC in Gebieten herabgesetzter LC-Dichte ein drei- bis vierfach erhöhtes Zellvolumen.<sup>47</sup> In humaner Brusthaut wurde mittels konfokaler Laserscanmikroskopie ein Verhältnis von einer LC auf 53 andere epidermale Zellen ermittelt. LC machen somit unter 2 % der epidermalen Zellen aus; bei diesen Messungen bezog man erstmals die variierende Dicke der Epidermis mit ein<sup>48</sup>. LC exprimieren E-Cadherin und MHC-II-Moleküle und gelten als unreife DC in der Epidermis. In der Epidermis exprimieren LC exklusiv hohe Level an CD1a. Über die Isoformen CD1a, CD1b und CD1c können sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen Eigen-Antigene und mikrobielle Lipid-Antigene präsentiert werden<sup>49</sup>.

### 1.2.4.1 Morphologie

In Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-CD1a-Antikörpern zeigen normale epidermale LC große, diskusförmige Zellkörper (12 µm Ø) mit fünf bis neun, oft mehr als 25 µm messenden Dendriten pro Zelle. Die flache Oberfläche der LC ist parallel zur Hautoberfläche ausgerichtet. LC bilden ein einschichtiges Netzwerk, das gleichmäßig in den suprabasalen Hautschichten verteilt ist. Dabei stehen die LC nicht in direktem Kontakt untereinander<sup>47</sup>. Nach Haut-Organ-Kultur bzw. TNF-α-Injektion fielen allerdings Überlappungen von Dendriten zwei oder sogar drei benachbarter LC auf<sup>50</sup>.

Mit Laserscan-Methoden können in Mäusen bei 5 bis 10 % der LC Dendriten-Extensionen und Retraktionen im *steady state* (Basisaktivität) beobachtet werden. Nach Applikation von TNF-α steigt die Beweglichkeit der LC und es kommt zu einer amöboiden lateralen Migration zwischen den Keratinozyten. Die Dichte der LC nimmt dabei um knapp 30 % zu. Unter Haptenapplikation erreicht die Reifung der LC ihren Höhepunkt nach 24 bis 30h<sup>50</sup>. Durch Birbeck-Granula definierte epidermale LC hatten 18 bis 24h nach Tape stripping nachweisbar Melanosomen über phagozytische Vakuolen aufgenommen, nicht aber in der Kontrolle<sup>51</sup>. Allerdings konnten schon 5h nach Ansetzen von „Explant“-Kulturen unter dem Elektronenmikroskop erste aus der Epidermis emigrierende Zellen beobachtet werden<sup>52</sup>.

LC bewegen sich zwischen Keratinozyten, indem sie sehr dünne, langgezogene zytoplasmatische Ausläufer bilden, die sich an den umgebenden Keratinozyten verankern; anschließend bohren sie sich mit Hilfe von Pseudopodien durch die Basalmembran, migrieren durch das kollagene Netzwerk der Dermis um schließlich die lymphatischen Gefäße durch Lücken zwischen benachbarten Endothelzellen zu erreichen<sup>52</sup>. DC sekretieren Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die extrazelluläre Matrices verdauen können<sup>53</sup> und ihnen somit das Passieren der Basalmembran und die Migration durch die Dermis erleichtern. Mit Hilfe von MMP kommt es zur Verdauung von Zell-Adhäsion mediiierenden Molekülen<sup>54</sup>. MMP-Breitspektrum-Inhibitoren und monoklonale Antikörper gegen MMP-9 und MMP-2 erschweren die LC-Migration aus epidermalen *Sheets*<sup>55</sup>. LC und dermale DC, die zu migrieren begonnen haben, werden durch das *secondary lymphoid tissue*-Chemokin (SLC, auch *chemokine (C-C motif) ligand 21*, CCL21), das von Lymphendothelzellen exprimiert wird, zu den dermalen Lymphgefäßen gezogen<sup>52</sup>. Die Lücken im lymphatischen Endothelium des Menschen<sup>56</sup> scheinen groß genug, um von DC passiert zu werden.

Eine reifende LC zeigt charakteristische morphologische Veränderungen. Reifung und Migration der LC können *in vitro* in Organkultur<sup>57</sup> und *in vivo* durch subkutane Injektion von TNF- $\alpha$ <sup>58</sup> oder durch mechanisches Trauma wie Tape stripping induziert werden<sup>59</sup>. Mikrobiotische Produkte, Entzündungsmediatoren und andere Gefahrensignale führen zu folgenden koordinierten Veränderungen:

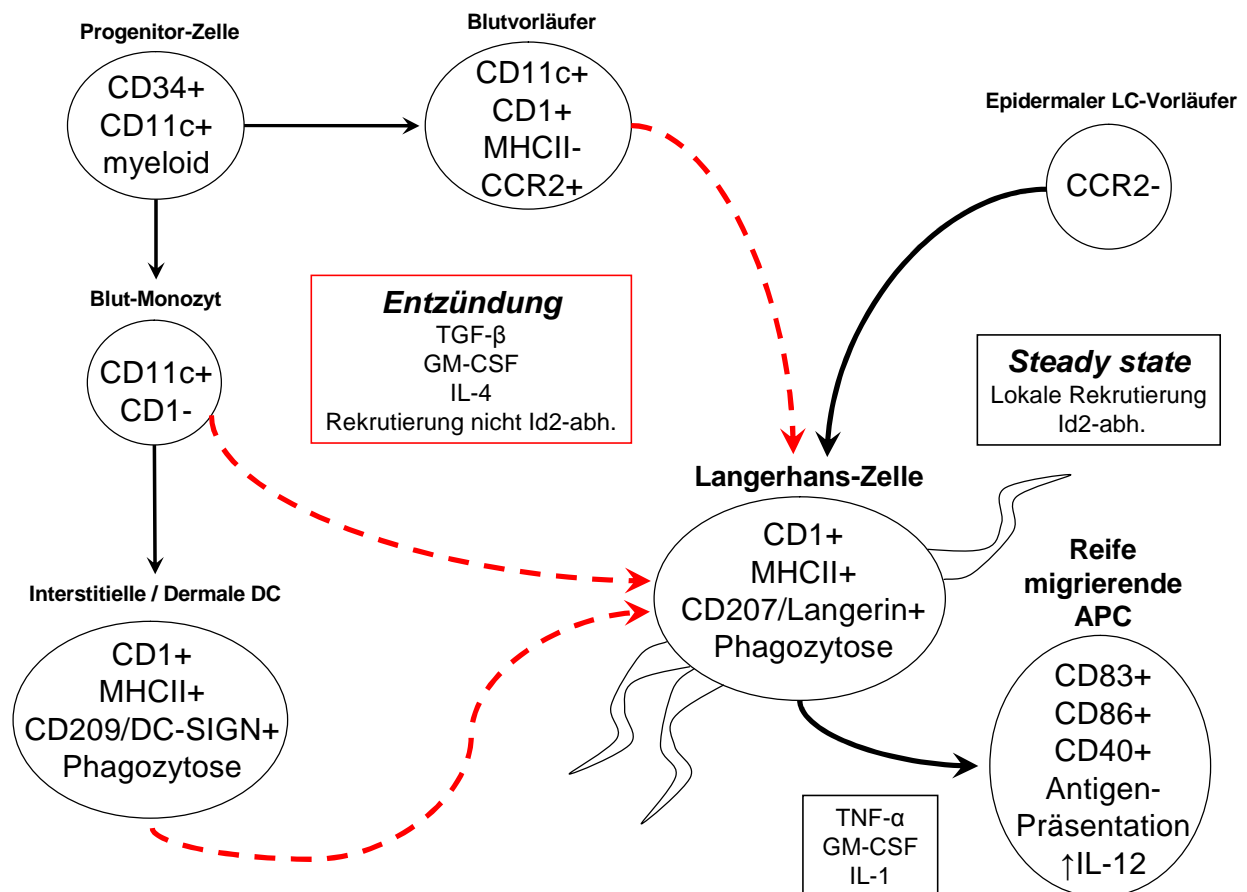
- § Größenzunahme
- § Hyper-Elongation der dendritischen Fortsätze
- § erhöhte Expression von MHC-II-Molekülen, kostimulierenden Molekülen und spezifischen Chemokin-Rezeptoren
- § Erlangung der Fähigkeit zur Induktion kraftvoller T-Zell-Stimulation
- § Sekretion vieler Zytokine und Chemokine
- § Mobilisation<sup>16, 60, 61</sup>

In einem Haut-Kultursystem zeigen LC innerhalb von 4h eine starke Vergrößerung und eine erhöhte MHC-II-Expression unter Beibehaltung der suprabasalen Position in der Epidermis. Nach 24 bis 48h bewegen sie sich zur dermo-epidermalen Junctionszone, um anschließend innerhalb von 72h in lymphatischen Gefäßen zu akkumulieren<sup>62</sup>.

#### 1.2.4.2 Herkunft, Reifung und Funktion

Nachdem die Reifungsprozesse von DC im Allgemeinen erläutert wurden, sollen hier zusätzlich spezifische Verhaltensmuster der zu den DC gehörigen LC beleuchtet werden. Die verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsschritte der LC von den hämatopoetischen Ursprüngen im Knochenmark<sup>63</sup> zur Epidermis wurden allerdings noch nicht vollständig verstanden.

LC-ähnliche Zellen können sowohl über einen myeloiden Entwicklungsweg<sup>64</sup> als auch über lymphoide Vorläuferzellen<sup>65</sup> entstehen. Larregina *et al.* beschrieben die Existenz von hautständigen LC-Vorläuferzellen<sup>66</sup>. Diese erhielten Fähigkeiten von LC, nachdem sie mit TGF- $\beta$  in Kultur gezüchtet wurden. Dagegen zeigten vorherige Studien *in vitro*, dass eine Differenzierung zu LC schon frühzeitig in der Ontogenese auf der Ebene der zirkulierenden DC-Vorläufer stattfindet<sup>67</sup>. Die Mechanismen der Besiedlung der Epidermis durch LC wurden in der Maus studiert. Die Ergebnisse zeigen, dass LC unter *steady state*-Bedingungen lokal gebunden bleiben und sich in der Epidermis replizieren. Jedoch führen Entzündungsprozesse zur Ersetzung der LC durch aus dem Blut stammende Vorläuferzellen (Abb. 2)<sup>68</sup>. Zu den von Keratinozyten sezernierten proinflammatorischen Zytokinen gehören IL-1 und TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  wird nach Aktivierung durch physikochemische Stimuli wie z.B. Kontaktallergene oder Bakterien freigesetzt und bewirkt die Produktion einer Reihe sekundärer Mediatoren. Zusammen mit IL-1 und anderen Zytokinen führt TNF- $\alpha$  zur Reifung und Migration kutaner DC in die regionären Lymphknoten sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen an Keratinozyten und Endothelzellen. Der Granulozyten/Makrophagen-stimulierende Faktor (GM-CSF) wird neben weiteren CSF ebenfalls von Keratinozyten produziert und bewirkt es u.a. die Aktivierung von LC<sup>69</sup>. Ein weiterer Wachstumsfaktor, der *Transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), wirkt als Chemotaxin für Neutrophile, Monozyten und LC-Vorläufer, hemmt aber gleichzeitig die T-Zell-Proliferation und wirkt demnach teilweise als antagonistisch zu IL-1. Interessanterweise besitzen TGF- $\beta$ -knock-out-Mäuse keine epidermalen LC<sup>70</sup>.



**Abb. 2 Die Ontogenese und Reifung der LC**

Merad *et al* postulieren, dass LC sich ein Leben lang lokal erneuern und dass nur nach Verletzungen, die zu einem vollständigen Verlust der lokalen LC-Vorläufer führen, myeloide Vorläufer benötigt werden <sup>68</sup>. Diese Vorläufer myeloiden Ursprungs scheinen vor allem Monozyten zu sein <sup>71</sup>. Der DNA-Bindungs-Inhibitor 2 (Id2) wird durch TGF-β induziert. Mäuse, denen Id2 fehlt, haben auch keine LC <sup>72</sup>. Lokale LC-Induktion im *steady state* ist Id2-abhängig, die inflammatorisch bedingte systemische Rekrutierung jedoch nicht <sup>73</sup>.

LC überwachen dauerhaft das epidermale Mikromilieu, indem sie Antigen aufnehmen und es in Fragmente prozessieren, die durch Effektorzellen des erworbenen Immunsystems erkannt werden können. LC und interstitielle DC können beide im unreifen Stadium nach *steady state*-Migration in den Lymphknoten Selbstantigene von apoptotischen Zellen präsentieren <sup>74</sup>. Die dort induzierten regulatorischen T-Zellen vermitteln bei Präsentation des Antigens Toleranz (Abb. 1). Nach ihrer Aktivierung durch Infektion und Entzündung produzieren die LC zunächst große Mengen an Zytokinen. Bevor LC mit Wächterfunktion nach Antigenkontakt aus der Epidermis emigrieren und zu den regionalen Lymphknoten wandern können, müssen sie mobilisiert werden. Dieser Prozess wird durch die Freisetzung epidermaler Zytokine eingeleitet <sup>75</sup>. Über die

Abregulation des E-Cadherin-Moleküls durch IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wird die Adhäsion der LC an die Keratinozyten gelöst <sup>76</sup>. Cumberbatch *et al.* zeigten bei Mäusen, dass LC nach intradermaler Applikation von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Epidermis verlassen <sup>77</sup>. Als reife LC wandern sie unmittelbar nach Fremdartigen-Aufnahme in die drainierenden Lymphknoten, um dort primäre und sekundäre Immunreaktionen auslösen <sup>16</sup>. Sind die nun zu APC herangereiften LC in den regionären Lymphknoten angekommen, können sie zirkulierende naive T-Zellen zu Effektor-T-Zellen differenzieren lassen und zur Proliferation bringen.

Die Reifung der LC zu APC hat entscheidenden Einfluss auf das gesamte Immunsystem. Über die LC-Aktivität wird neben der Aktivierung und Reifung naiver T-Zellen auch der Typ der Immunantwort wesentlich mitbestimmt. Während der initialen Interaktion haben APC die Fähigkeit, die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zu T<sub>H</sub>1-oder T<sub>H</sub>2-Zellen zu induzieren und dadurch die zelluläre oder humorale Immunität zu fördern. Zusätzlich sind humane epidermale LC, nicht jedoch dermale DC, in der Lage CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, welche zytotoxische Funktionen besitzen und damit infizierte Gewebe oder Tumorzellen eliminieren können (vgl. Abb. 1). Die Präsentation von Antigen auf einer reifen APC führt zu Immunität. Präsentation auf unreifen Zellen führt zu Toleranz, insbesondere durch Induktion von regulatorischen T-Zellen.

### **1.2.4.3 Verteilung und Migrationsmuster**

Um LC gezielt zu stimulieren, sind Kenntnisse über ihre Verteilung in der Haut essentiell. Die Wirkung einer auf LC-Stimulierung zielenden Behandlung lässt sich sowohl anhand ihres Einfluss auf die Morphologie und Expression von Reifungsmarkern auf LC untersuchen, als auch anhand von Änderungen im Migrationsverhalten der LC.

LC gehören zu den am besten charakterisierten DC. Epidermalen LC zeichnen sich durch die Expression von CD207/Langerin und durch das Fehlen von Makrophagenmarkern wie F4/80 aus. Sie werden von den dermalen DC unterschieden, die im Menschen durch DC-SIGN/CD208 charakterisiert sind. Zunächst exprimieren LC CD45 und die Myeloidmarker CD33 und CD13. LC zeigen CD1a, Adhäsionsmoleküle wie  $\beta$ 1-Integrine, CD44, CD54, CD15s, *cutaneous associated protein* (CLA), und E-cadherin <sup>76, 78</sup>. Das CD1a-Antigen wird auf kortikalen Thymozyten und weiteren antigenpräsentierenden Zellen wie LC und interdigerierenden dendritischen Zellen stark exprimiert. CD1a fehlt auf reifen T-Zellen des peripheren Blutes und auf frühen Thymozyten, allerdings wurde auf aktivierten Thymozyten eine intrazytoplasmatische

Expression nachgewiesen<sup>79, 80</sup>. CD1-Moleküle bestehen aus glykolisierten Polypeptid- $\alpha$ -Ketten, die die Zellmembran umspannen und nicht kovalent mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin verbunden sind<sup>81</sup>. Die erste und die zweite Domäne der schweren  $\alpha$ -Kette bilden eine enge, tiefe Bindungsgrube für hydrophobe Wechselwirkungen. Das LC-spezifische Langerin/CD207 ist ein C-Typ Lektin<sup>82</sup>. Gemäß ihrer Aufgaben im Immunsystem exprimieren die gereiften APC Klasse-II/HLA-DR Moleküle.

Die Präsenz von LC in der Epidermis außerhalb des *steady state* und damit unter inflammatorischen Bedingungen ist Fluktuationen unterworfen. Es wird angenommen, dass die Rekrutierung von LC unter *steady state*-Bedingungen wahrscheinlich lokal erfolgt (s.o.)<sup>83</sup>. In einem entzündlichen Milieu geht man von einer extraepidermalen Rekrutierung aus. So nahmen schon Streilein, Lonsberry und Bergstresser an, dass nach Tape stripping erscheinende LC dem systemischen Kreislauf entstammen<sup>59</sup>. Eine Immigration von LC-Vorläuferzellen in die Epidermis findet wahrscheinlich nur bei vorausgegangener Emigration von LC und unter Vermittlung von CCL20/ *macrophage inflammatory protein* (MIP) -3 $\alpha$  statt<sup>84, 85</sup>. Ab Mitte der 60er Jahre wurde beobachtet, dass direkt nach Tape stripping, dem eine entzündliche Wirkung zugeschrieben wird, LC in der Epidermis von Meerschweinchen bis nach 24h nicht mehr nachweisbar sind<sup>86, 87</sup>. Mittlerweile scheint sich der Konsens herauszubilden, Impfstoffapplikationen 24h nach Tape stripping durchzuführen<sup>88, 89</sup>.

### **1.3 Die Impfung als gezielte Immunmodulation**

Der heute im englischsprachigen Raum für Impfung gebräuchliche Begriff *vaccination* verweist direkt auf die erste in der westlichen Welt dokumentierte mutwillige Inokulation von Pathogenen zur Induktion eines Schutzes vor Krankheit. Edward Jenner experimentierte erfolgreich 1796 mit Kuhpocken (lateinisch: vacca = die Kuh). Seit Louis Pasteur wird als Vakzination eine Impfung mit lebenden oder inaktivierten Erregern bzw. Toxoiden oder Teilstücken der Oberflächenstruktur von Erregern bezeichnet. Schutzimpfungen sollen eine Immunität zur Vorbeugung gegen Infektionskrankheiten erzeugen. Impfstoffe für eine aktive Immunisierung lassen sich in fünf Gruppen teilen: Toxoide, Spaltvakzine, Totimpfstoffe, Kombinationsimpfstoffe und Lebendimpfstoffe. Der Impfstofftyp ist von den Eigenschaften des Krankheitserregers abhängig<sup>30</sup>.

Ein guter Impfstoff unterliegt hohen Anforderungen: Im Empfänger soll eine schützende Immunität aufgebaut werden, die Nebenwirkungen und Risiken müssen dabei aber so gering wie

möglich sein. Der aufgebaute Schutz gegenüber dem Erreger sollte möglichst lange erhalten bleiben. Da Impfungen bei Teilnahme großer Bevölkerungsgruppen wirksame Mittel zur Unterbrechung von Infektionsketten sind, sollten sie auch möglichst günstig herzustellen sein. Dabei wäre eine gute Haltbarkeit und Verfügbarkeit wünschenswert<sup>90</sup>.

Da gegen zahlreiche Erreger wie Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*) und parasitäre Erkrankungen wie Malaria oder Leishmaniose bisher keine oder nur unzureichende Impfstoffe entwickelt worden sind, wird zur Zeit u.a. nach Möglichkeiten gesucht, gentechnische Verfahren für die Entwicklung neuer Impfstoffe nutzbar zu machen<sup>30</sup>. In neuerer Zeit wird intensiv an Konzepten zur Tumor-Immuntherapie nach dem Prinzip der Vakzinierung geforscht, bei denen sich LC als unverzichtbar herausstellten<sup>91, 92</sup>. Auch werden Projekte zur *Gene gun*-Immunisierung, d.h. Bombardierung der Haut mit DNA-Partikeln, durchgeführt. Allerdings zeigte sich hierbei, dass LC für eine transkutane Immunisierung nicht benötigt werden<sup>93</sup>. Neu entwickelte Methoden der Vakzinierung, die den Impfstoff direkt in die Umgebung der dermalen Immunzellen bringen, benutzen die natürlichen Schutzfunktionen der Haut und könnten die Wirksamkeit von Vakzinen deutlich verbessern.

### **1.3.1 Strategien zur transkutanen Vakzinierung**

Erst in jüngerer Zeit ist die Schlüsselrolle der DC für die Induktion von Immunantworten erkannt worden<sup>94</sup>. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DC in der Initiierung der primären Immunantwort weit mehr involviert sind als andere Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie B-Zellen und Makrophagen und auch als Vakzinträger potente Immunantworten induzieren<sup>95</sup>. Im Vergleich zum Skelettmuskel, der üblicherweise als Impfstoffdepot genutzt wird, verfügt die Haut über eine deutlich höhere Dichte an APC<sup>23</sup>. Zusätzlich reichen im Unterschied zu anderen Phagozyten für DC nano-bis picomolare Antigen-Konzentrationen für eine effiziente Präsentation aus<sup>33</sup>. Die über kutane Vakzinierung erreichte Induktion einer robusten Immunität über die Haut dürfte zu Dosisersparungen bei bisher etablierten Impfungen führen wie die Ergebnisse von Kenney *et al.* erwarten lassen<sup>96</sup>.

Durch transkutane Immunisierung (*Transcutaneous immunization* - TCI) konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wirksame humorale und zelluläre Immunantworten gegen Proteine und DNA erzielt werden<sup>97, 98</sup>. Interessanterweise führt topische Applikation von Proteinen zu einer T<sub>H</sub>2-gewichtete Antigen-spezifische Immunität<sup>89, 99</sup>. Diese Ergebnisse wurden an gestrippter Haut bestätigt<sup>89</sup>. Auf Grund ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation ermöglichen kutane DC die



Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunantworten, welche zur Prävention und Therapie von Tumor- oder Infektionskrankheiten nötig sind<sup>61</sup>. Gezielte intradermale Antigen-Injektionen wurden z.B. mit L31 durchgeführt. Dieser Antikörper gegen den Lektinrezeptor CD205 und Langerin/CD207 erreicht LC, nicht aber CD8<sup>+</sup> Langerin<sup>niedrige</sup> DC in den Lymphknoten<sup>73</sup>.

Qualität und Dauer der humoralen und zellulären Antworten sind abhängig von einem angemessenen Erreichen der Zellzielgruppe, der Impfstoffdosis, dem Applikationsweg und dem benutzten Adjuvans. Häufig müssen heutzutage Impfstoffe mehrfach gegeben werden. Um dies zukünftig zu vermeiden, wird u.a. an so genannten Boostern, d.h. molekularen Adjuvantien geforscht. Ein Adjuvans besitzt selbst keine Antigen-Qualitäten. Die Immunogenität wird also durch die Verbindung von Antigen und Adjuvans erreicht. Beispiele für klassische Adjuvantien sind Mineralsalze und Ölemulsionen. Zur Vermittlung von zellvermittelter Immunität wird eine Reihe molekularer Adjuvantien beschrieben. Dazu zählen u.a. Mitglieder der TNF- $\alpha$ -Superfamilie, hitzelabiles Enterotoxin von *Escherichia coli* und Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG)-Motive (Sequenzen bakterieller DNA, die APC direkt stimulieren)<sup>100</sup>. Vor allem die nicht-spezifischen Adjuvantien zeigen potentiell eine Reihe von Nebenwirkungen<sup>4</sup>.

Auch mechanische Reizung, wie sie z.B. bei Durchführung von Tape stripping beobachtet wird, birgt in seiner inflammatorischen Wirkung adjuvante Qualitäten<sup>101</sup>. Generell scheint das epikutane Milieu die Induktion von T<sub>H</sub>2-Antworten zu unterstützen<sup>102, 103</sup>. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe zur transkutanen Vakzinierung gegen ein Influenza-Protein mittels CSSS zeigte jedoch einen signifikanten Anstieg von IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen, was für eine T<sub>H</sub>1-Antwort spricht. Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden induziert, während bei der Vergleichsgruppe mit intramuskulären Injektionen nur CD4-Antworten erreicht wurden. Möglicherweise ist die Art der T<sub>H</sub>-Antwort auch Vakzin-abhängig. Somit bleiben für eine gezielte Beeinflussung der Immunantwort weitere Arbeiten notwendig.

Der C-Typ-Lektin-Rezeptor Langerin ist einer der auf LC exprimierten *pattern recognition*-Rezeptoren (PRR), der näher auf seine Rolle bei der Erzeugung viraler Immunität hin untersucht wurde. Zum Beispiel wird der HI-Virus über Langerin aufgenommen und in der Birbeck-Granula zerstört, während DC-SIGN auf dermalen DC HIV bevorzugt CD4<sup>+</sup> Zellen zu präsentieren scheint. Allerdings erleichtert HSV durch die Herabregulation von Langerin die HIV-Übertragung auf CD4<sup>+</sup> Zellen<sup>104</sup>. Diese und ähnliche Ergebnisse müssen Anlass verstärkter Forschung werden, um LC-medierte Therapieoptionen gesichert anwenden zu können.

## 1.4 Die Haut und der Haarfollikel im Kontext der perkutanen Penetration

### 1.4.1 Aufbau und Funktion der Haut

Um ein Verständnis für die Vorgänge zu erlangen, die zur Stimulation und Reifung kutaner APC durch körperfremde Stoffe führen, ist die Kenntnis des Aufbaus der Haut von grundlegender Bedeutung. Die Haut ist das größte Organ des Menschen, Träger zahlreicher Funktionen und von komplexem Aufbau. Die Haut des Erwachsenen umfasst durchschnittlich 2 m<sup>2</sup> und ist ohne Fettgewebe 1,4 bis 4 mm dick.

Das Hautorgan erfüllt Sinnesfunktionen, die über Rezeptoren für Wärme, Schmerz und Tastreize vermittelt werden und weitere vielfältige Schutzfunktionen. Dazu gehören die Temperaturregulation, der Schutz vor UV-Licht, der mechanischer Schutz und die Barrierefunktion, die den Stoffaustausch zwischen Organismus und Umwelt weitgehend unterbindet. Diese wesentliche Aufgabe leistet das Stratum corneum, das die Haut nach außen hin abdichtet. Dadurch verhindert die Hornhaut Austrocknung und Eindringen körperfremder Substanzen. Anflugkeime werden aber auch durch die Symbiose des trockenen und sauren Milieus der Hautoberfläche und der darauf gedeihenden Hautflora abgewehrt. Als integralen Bestandteil des Immunsystems besitzt die Haut eigene APC und ständig aktive Gedächtnis-Lymphozyten. Man spricht in diesem Zusammenhang vom *skin associated lymphoid tissue* (SALT). Ferner wird sekretorisches IgA durch die Drüsen in den Oberflächenfilm der Haut abgegeben<sup>69</sup>.

Die Haut besteht aus drei Schichten:

- § Die oberflächlichste Schicht der Haut, die Epidermis, bildet eine erste Schutzschicht gegenüber dem Eindringen fremder Stoffe in den Körper.
- § Darunter gewährleistet die Dermis die Thermoregulation und versorgt die avaskuläre Epidermis mit Nährstoffen.
- § Die Subkutis ist ein Fettgewebepolster, das in der Tiefe den Faszien aufruhrt.

Zu den Adnexorganen gehören neben Nägeln, Schweiß- und Talgdrüsen auch die Haarfollikel, die eingebettet in der Epidermis und Dermis liegen und eine Art natürlichen Kanal durch die Haut bilden, der selbst an das Gefäßnetz angeschlossen ist.

Die Epidermis besteht aus mehrschichtigem, verhornendem Plattenepithel und ist je nach Körperregion 0,04 bis 1,5 mm dick. Von innen nach außen lassen sich folgende vier Schichten von einander abgrenzen:

§ Stratum basale: die Matrixschicht

§ Stratum spinosum: die Stachelzellschicht, in der eine Zunahme des Zellvolumens und eine horizontale Umorientierung stattfindet

§ Stratum granulosum: die Körnerschicht, deren Keratohyalinkörper die Vorläufer der Keratinmatrix bilden

§ Stratum corneum

Wie bereits angedeutet, bildet das Stratum corneum die äußere Grenze zwischen Organismus und Umwelt. Je nach Hautregion misst es 10 bis 29  $\mu\text{m}$  Dicke und besteht aus etwa 15 bis 20 Zelllagen<sup>105</sup>. Die Zellen sind in eine Lipid-Doppelschicht eingebettet, die sich aus Cholesterol, freien Fettsäuren, Cholesterolestern und Ceramiden bildet<sup>106</sup>. Die Korneozyten sind kernlos und mit Keratin ausgefüllt. Der chemisch widerstandsfähigste Teil wird durch eine Hülle gebildet, die sich an die Innenseite der Zellmembran anlegt. Diese etwa 15 nm dicke Hülle stellt eine aus mehreren vernetzten Proteinen (Involukrin, Loricrin, Keratolinin u.a.) und Lipiden bestehende Verdichtung dar. Sie wird als *cornified envelope* bezeichnet und beginnt bereits im oberen Stratum granulosum sich mit Hilfe der Transglutaminase auszubilden. Im oberen Stratum granulosum findet auch die Synthese der Odland-Körperchen statt, die reichlich Glykosylceramide, Sterolester und Phospholipide enthalten. Diese Barrierelipide werden am Übergang zum Stratum corneum durch Exozytose in den Interzellularraum ausgestoßen. Sie sind zusammen mit den Desmosomen verantwortlich für die Kohärenz der Hornschicht<sup>69</sup>. Die Beschaffenheit der Keratinozyten und die Zusammensetzung der interzellulären Lipide sind zusammen mit dem Hydratationszustand des Stratum corneum für die kutane Permeabilitätsbarriere verantwortlich<sup>107, 108</sup>. Neben Keratinozyten kommen in der Epidermis noch die Merkelzellen als neuroendokrine Mechanorezeptoren, die Pigment produzierenden Melanozyten, wenige CLA<sup>+</sup> Gedächtniszellen und die weiter unten ausführlich behandelten LC vor.

## 1.4.2 Aufbau und Funktion des Haarfollikels

Die Kenntnis der Struktur und der Physiologie des Haarfollikels (HF) ist für das Verständnis ihrer Bedeutung für Penetrationsvorgänge und Immunreaktionen grundsätzlich erforderlich. Da der HF nicht den raschen Erneuerungsprozessen der Haut unterliegt, bildet er ein Langzeitreservoir für topisch applizierte Substanzen. Regionale Unterschiede HF-Struktur und Dichte spielen zusätzlich für unsere Untersuchungen eine nicht unerhebliche Rolle.

Der Haarschaft steckt in einer Invagination der Epidermis, dem HF. Dieser besteht aus der röhrenförmigen Haarwurzelscheide und dem zwiebelartigen Haarbulbus, der Matrix von Haar und Haarwurzelscheide. Der Haarschaft selbst besteht aus dem Kortex und der Kutikula. Der Kortex besteht aus zu Fibrillen aggregierten Keratinfilamenten. Die Kutikula umgibt den Kortex mit einer einschichtigen Lage dachziegelartig angeordneter Hornzellen und ist der inneren epithelialen Wurzelscheide verzahnt. In Terminalhaaren findet sich zusätzlich ein zentraler lufthaltiger Hohlraum, die Medulla. Am Kapilitium und von Beginn der Pubertät im Scham- und Achselbereich an finden sich diese langen, derben Terminalhaare. Zunächst bildet sich aber an dem 4. Fetalmonat Lanugohaar, nicht länger als 2 cm langes, markloses, nicht pigmentiertes Haar, das seine Wurzel in der Dermis hat. Diese werden perinatal durch Vellushaare ersetzt. Sie sind etwas gröber und nahezu farblos. Unter Einfluss von Androgenen und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wird es durch Terminalhaar ersetzt<sup>109, 110</sup>.

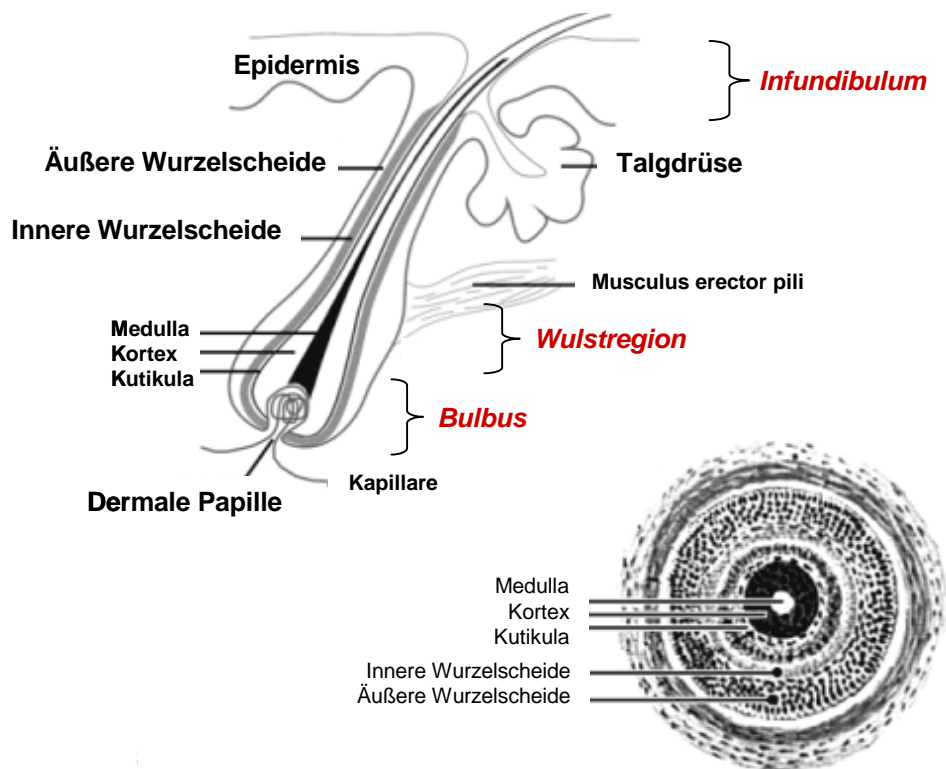
Der Haarfollikel besteht aus einem konstanten und einem variablen Anteil. Die Grenze zwischen beiden verläuft knapp unterhalb des Ansatzpunktes des Musculus arrector pili, auch Bulge- bzw. Wulstregion genannt. Heutzutage wird vermutet, dass diese Wulstregion der äußeren Wurzelscheide follikuläre Stammzellen enthält und den Haarzyklus zusammen mit der dermalen Papille reguliert<sup>111</sup>. Der oberste Teil des HF ist trichterförmig erweitert und wird Infundibulum genannt. In diesen mündet die Talg- und, soweit vorhanden, die apokrine Drüse. Das Epithel des Infundibulums zeigt im oberen Fünftel eine der Epidermis gleichende Verhornung. Dieser obere Teil wird als Akroinfundibulum bezeichnet. Das Epithel gleicht im geschichteten Aufbau der Epidermis. Auch die restlichen, distalen vier Fünftel zeigen ein epidermales Verhornungsmuster. Allerdings finden sich hier kleine, brüchig erscheinende Zellen, die die Penetration nur teilweise verhindern können. Im Infundibulum liegt der Haarschaft frei; es ist mit Drüsensekret und Debris gefüllt und beherbergt die meisten Keime der Hautoberfläche. Da das Infundibulum keine solch abschirmende Hornschicht wie die Epidermis besitzt, sondern gerade eine Unterbrechung des Stratum corneum darstellt, ist das gezielte Eindringen von Fremdstoffen vergleichsweise

leicht <sup>69</sup>. Darum ist die von Paus *et al.* <sup>112</sup> beschriebene hohe Dichte an immunkompetenten Zellen wie LC vor Ort von besonderer Bedeutung.

Die Wurzelscheide ist vielschichtig aufgebaut. Die innere Wurzelscheide hat selbst keine Verbindung zur Epidermis. Sie löst sich knapp unterhalb des Infundibulums auf und ist ein variabler, in der Wachstumsphase zu findender Anteil des HF. Diese epitheliale innere Wurzelscheide des HF gibt keratinhaltig Zellen durch Desquamation in den Haartrichter ab und wird von der Glashaut umgeben, einer dicken Basalmembran. Daran anschließend befindet sich eine bindegewebige Wurzelscheide, die kontinuierlich in die Epidermis übergeht und ein permanenten Strukturanteil des HF darstellt <sup>69</sup>.

Die Haarpapille ist ein spezialisierter Teil des HF. Sie wird von einem glockenförmigen epithelialen Anteil, dem Haarbulbus, umwölbt, der die Matrixkeratinozyten enthält. Diese wiederum differenzieren zu den Wurzelscheiden. Die Haarpapille besteht aus spezialisierten Fibroblasten, die den Beginn und die einzelnen Abschnitte des Haarzyklus induzieren <sup>69</sup>.

### Längsschnitt



### Querschnitt

Abb. 3 Aufbau des Terminalhaarfollikels

Bis auf wenige Ausnahmen in der Mundschleimhaut und im Genitalbereich sind die holokrinen Talgdrüsen an de Haarfollikel gebunden. Daher spricht man in diesem Zusammenhang auch von der *pilosebaceous unit* (HF-Talgdrüsen-Einheit), zur der auch die *M. arrector pili* gezählt werden. Das von den Talgdrüsen produzierte bakteriostatische Sebum schafft im Infundibulum ein neutrales, unpolares Milieu <sup>113</sup>. Auch die adrenerg innervierten apokrinen Schweißdrüsen sind, anders als die cholinerg innervierten ekkrinen Schweißdrüsen, an das HF-Infundibulum gebunden. Sie kommen v. a. perigenital und axillär vor <sup>69</sup>.

Die für die Evaluation der nachfolgend dargestellten Penetrationsprozesse essentielle HF-Dichte unterliegt großen interindividuellen Unterschieden und ist abhängig vom HF-Typ. Die ca. 50 bis 100 µm dicken Terminalhaare finden sich am Kopf und im Bartbereich, die ca. 30 µm durchmessenden Vellushaare bedecken den restlichen Körper <sup>114</sup>. Otberg *et al.* untersuchten die HF-Dichte und die Größe der HF-Öffnungen an verschiedenen Hautarealen des Menschen (Stirn, Rücken, Bust, Ober- und Unterarm, Oberschenkel und Wade) und fanden Dichten zwischen ca. 20 und 300 HF/cm<sup>2</sup>. Die Stirn (höchste HF-Dichte) und die Wade (größter mittlerer HF-Durchmesser) weisen das höchste infundibuläre Volumen auf, welches dem angenommen Reservoir des Stratum corneum entspräche <sup>115</sup>.

## 1.5 Die perkutane Penetration

Vorteile der parenteralen Gabe von Medikamenten sind die Umgehung des gastrointestinalen Trakts und die Vermeidung von *first-pass*-Effekten in der Leber. Bei der transdermalen Applikation von Medikamenten, welche sich die Mechanismen der perkutanen Penetration zu nutze macht, handelt es sich um eine Spielart der parenteralen Gabe, die die Risiken einer Injektion vermeidet. Probleme können durch mögliche lokale Irritation, allergische Reaktionen oder systemische Toxizität entstehen. Ein zusätzlicher Einflussfaktor ist die Dauer der Stoff-Diffusion durch die Haut, welche die Pharmakodynamik beeinflussen kann <sup>116</sup>.

Man kann drei Wege der perkutanen Penetration unterscheiden:

- 1) die interzelluläre Penetration durch die Lipidschichten des Stratum corneum
- 2) die transzelluläre Penetration durch die Korneozyten
- 3) die follikuläre Penetration <sup>7</sup>

Ursprünglich nahm man an, dass topisch applizierte Substanzen hauptsächlich unter Umgehung der Korneozyten durch die Lipidschichten des Stratum corneum wandern<sup>117, 118</sup>. Dabei war schon früh in Erwägung gezogen worden, dass HF und Schweißdrüsen einen Shunt durch das Stratum corneum darstellen<sup>119</sup>. Mittlerweile konnte die Signifikanz dieser Shunt-Route *in vitro* belegt werden<sup>120</sup>. Zusätzlich zeigten Otberg *et al.* *in vivo*, dass es quantitative Unterschiede zwischen follikulärer und interfollikulärer Penetration gibt<sup>121</sup>.

Mit einer Dichte von knapp mehr als 300 HF/cm<sup>2</sup> auf der Stirn und knapp 30 HF/cm<sup>2</sup> auf dem Rücken<sup>115</sup> stellen HF einen bemerkenswerten, lange unterschätzten Teil der Körperoberfläche dar und sind möglicherweise ein Reservoir für topisch applizierte Substanzen. Es wurde experimentell gezeigt, dass die Implantation von dissoziierten HF in rekonstruierte Haut die Penetration von Substanzen wie Hydrokortison signifikant steigert<sup>122</sup>. Durch intrafollikuläre Penetration topisch applizierter Stoffe können möglicherweise auch die für die Immuntherapie bedeutenden follikulären APC erreicht werden.

### **1.5.1 Aspekte der transfollikulären Penetration - Offene vs. geschlossene HF**

Haarfollikel können „offen“ oder „geschlossen“ sein, letzteres behindert die follikuläre Penetration<sup>123</sup>. Als „offenen“ HF bezeichnet man einen HF mit vorhandener Talkproduktion bzw. Haarwachstum<sup>7</sup>. Dazu passt die Beobachtung, dass die Penetration topisch applizierter Substanzen in die Haarfollikel deutlich schneller stattfindet als die Talgsekretion oder das Haarwachstum<sup>124</sup>. „Geschlossene“ Haarfollikel gelten als ruhend und sind mit Detritus, bestehend aus abgestorbenen Korneozyten und Talgbestandteilen gefüllt<sup>7</sup>. Die höchste Dichte an ruhenden, „geschlossenen“ HF wurde für den Unterarm beschrieben, während die seborrhische Areale Stirn und Rücken eine hohe Anzahl „offener“ HF aufwiesen<sup>7</sup>.

Den effektivsten Weg der Penetration zu kennen, ermöglicht es kutane Vakzinierungsstrategien zu optimieren. Neue perkutane Impfstrategien profitieren von der Entwicklung epikutan aufgetragener Compound-Mikrosphären und Nanopartikeln<sup>10</sup>, die gezielt auf die LC eingesetzt werden.

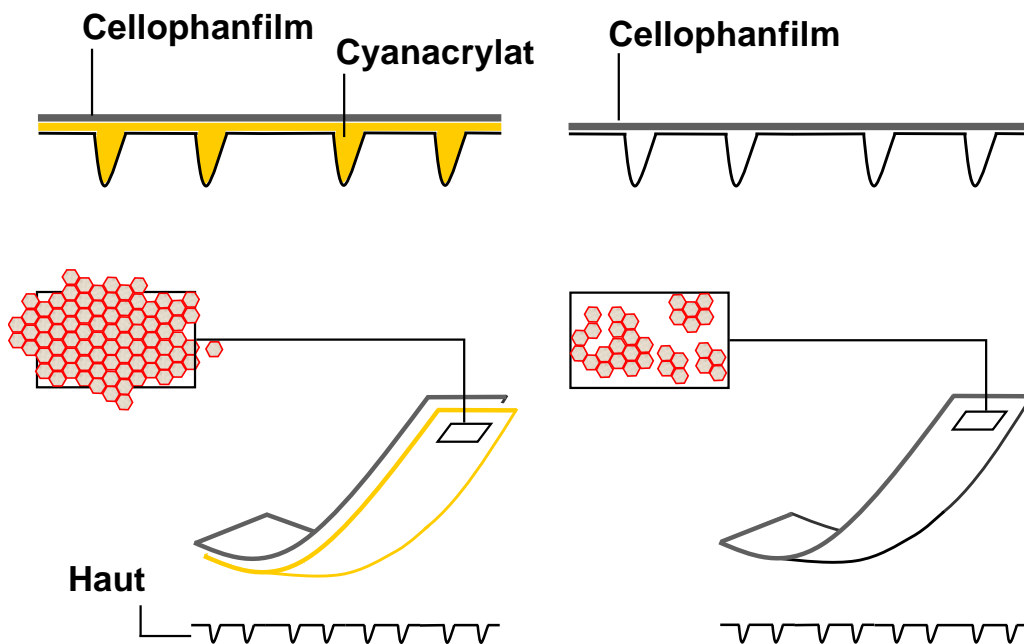
### **1.5.2 Cyanacrylate skin surface stripping: Erleichterung perkutaner Penetration durch mechanische HF-Öffnung**

Tape stripping, eine Art Hautabriss mit Klebefilm, wird im Allgemeinen genutzt, um die epidermale Barriere einzuschränken, um die transdermale Aufnahme von Pharmaka zu erleichtern und um Informationen über Funktionen des Stratum corneum zu erhalten. Tape stripping führt zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen und verstärkt die humoralen und zellulären Immunantworten auf topisch applizierte Peptide, Proteine und DNA-Antigene. Mit den ersten 20 Tape strippings werden ca. 66 % des Stratum corneum entfernt, ca. 95 % des Stratum corneum fehlen nach 50 Tape strippings<sup>125</sup>.

Die beobachteten Wirkungen von Tape stripping auf ortsansässige LC sind vielfältig. Das Ergebnis wird durch die Art des Cellophanfilms und die Anzahl der durchgeführten Abrisse beeinflusst. Entweder werden die LC sofortig mechanisch extrahiert<sup>59, 86, 87</sup> oder die Entzündungsreaktion führt zur Emigration der LC aus der Epidermis<sup>126, 127</sup>. Stripping induziert die Hochregulierung von mRNA für pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in Haut von Mäusen und Menschen<sup>126, 127</sup>. Diese Zytokine sind wichtig für die Migration der LC<sup>77, 78</sup>. Zusätzlich zeigte sich, dass Stripping mRNA für CCL20/MIP-3 $\alpha$  induziert<sup>84</sup>. Dies ist das selektivste bekannte LC-Vorläufer anziehende Chemokin<sup>128</sup>.

Als Weiterentwicklung des klassischen Tape strippings kann das Cyanacrylate Skin Surface Stripping (CSSS) betrachtet werden. Dabei wird Cyanacrylat auf die Haut aufgetragen, im getrockneten Zustand wird es mit Hilfe eines zuvor dem Kleber angedrückten Cellophanfilms ruckartig abgerissen, die Haut mechanisch gereizt. Man erhält einen oberflächlichen Abriss. Ein CSSS entfernt ca. 30 % des Stratum corneum. Anders als beim klassischen Tape stripping werden nicht nur einzelne Kerneozyten mitgenommen, sondern eine zusammenhängende Zellschicht. Zusätzlich füllt sich das Infundibulum mit Cyanacrylat, Haar, Detritus und Talg werden auf diese Weise entfernt<sup>8</sup>. Cyanacrylat wird seit Mitte der 1960iger Jahre auf Haut appliziert, um Abrisse zu erhalten<sup>129</sup>.





**Abb. 4 Vergleich von Cyanacrylate skin surface stripping mit konventionellem Tape stripping**

Links: CSSS – Der Cyanacrylatkleber füllt die Haarfollikel aus und ermöglicht anschließend die zusammenhängende Entnahme der obersten Keratinozytenschichten samt Debris-Entfernung und Haarfollikelbiopsie.

Rechts: Konventionelles Tape stripping – Der Klebestreifen entfernt nur teilweise zusammenhängendes Gewebe.

Durch seine inflammatorische Wirkung besitzt auch das Tape stripping ausgeprägte adjuvante Qualitäten. In der Dermis finden sich nach alleinigem Tape stripping in lymphatische Gefäße LC und dermale DC mit starker MHCII<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Koexpression. Laut Holzman *et al.* sind ungefähr die Hälfte der Zellen in den Lymphgefäßen MHCII<sup>+</sup> Langerin<sup>+</sup> LC, die andere Hälfte MHCII<sup>+</sup> Langerin<sup>-</sup> dermale DC<sup>130</sup>. Allerdings wurden in diesem Mausmodell bis zu 30 Tape strippings durchgeführt, was, abgesehen von der hoch inflammatorischen Wirkung, einen nahezu gänzlichen Verlust des Stratum corneums bedeutet. Strid *et al.* benötigten bei Mäusen fünf bis acht Tape strippings für eine erfolgreiche epikutane Immunisierung gegen Ovalbumin<sup>89</sup>. Kahlon *et al.* immunisierten Mäuse gegen Ovalbumin, setzten gleichzeitig 10 Tape strippings und Cholera-toxin als Adjuvantien ein und erreichten damit in der Tumorthherapie wünschenswerte Antigen-spezifische CTL. Der Versuch nach nur 10 Tape strippings zu immunisieren brachte allerdings keine CTL-Antwort<sup>131</sup>. Yagi *et al.* induzierten therapeutisch relevante Mengen zytotoxischer T-Lymphozyten bei Menschen durch Perkutane Peptid-Immunisierung (PPI). PPI wurde mit Melanoma-assoziierten Peptiden und 3 Strippings durchgeführt<sup>88</sup>.

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die von Vogt *et al.* entwickelte, auf topische Applikation von Impfstoff basierende Impfstrategie<sup>132</sup> beruht u.a. auf der Vorstellung, dass topisch aufgetragene Substanzen die kutanen APC bevorzugt durch den HF erreichen. In der Praxis konnten mit Hilfe dieser Technik schon valide Impfantworten erzielt werden<sup>10</sup>.

Die HF bilden physiologische Unterbrechungen im dichten und ansonsten durchgängigen Stratum corneum. Um Debris und Talgpfropf aus den HF zu entfernen, wurde das CSSS entwickelt. Dabei wird eine dünne Schicht Kleber auf das Stratum corneum aufgetragen und nach Trocknung mit Hilfe von Klebefilm ruckartig entfernt. Im Gegensatz zu einem klassischen Klebefilmabriss, entfernt CSSS eine zusammenhängende Schicht des Stratum corneum (ca. 30 % der Hornhaut)<sup>133</sup>. Somit geöffnete HF können daraufhin aufgetragenes Vakzin zur Stimulation der LC besser aufnehmen. Es zeigte sich desweiteren, dass CSSS sicher durchgeführt werden kann und gut von menschlicher Haut vertragen wird<sup>12</sup>. Da der HF möglicherweise die zu öffnende Tür zur transdermale Vakzination ist, wird es unabdingbar Informationen über Anzahl und Verteilung, Morphologie und Reifungsprozesse der LC in der Haut und speziell im HF unter verschiedensten Bedingungen zu erhalten, damit das Potenzial aktivierbarer Zellen abschätzbar wird.

Daraus ergeben sich folgende Aufgabenstellungen:

- § Entwicklung eines Schemas zur visuellen Auszählung und Dokumentation von LC *in situ* unter dem Mikroskop.
- § Untersuchung der Auswirkung von CSSS auf Dichte und Verteilung, Morphologie und Reife der LC *in situ* an verschiedenen Lokalisationen in der Haut des menschlichen Körpers mittels einer visuell auswertbaren Methode.
- § Untersuchung der Verteilung und des Öffnungszustandes von HF mittels Abriss-Auswertung an den Stellen, wo CSSS durchgeführt wird.
- § Vergleich der Wirkung von CSSS mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$ .

Ausgehend von der Tatsache, dass im HF LC zu finden sind, sollen als Beitrag zur Entwicklung potenter transkutaner Impfstrategien quantitative und qualitative Aussagen zu folgenden Fragestellungen gefunden werden:

- § Wie dicht sind die CD1<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Schichten der Haut und der Hautanhangsorgane unter Kontrollbedingungen, nach CSSS und nach topischer TNF- $\alpha$ -Applikation?
- § Wie verhält sich die Zelloberflächenexpression von CD1a, HLA-DR und den Reifungsmarkern CD83 und CD86 unter Kontrollbedingungen, nach CSSS und nach topischer TNF- $\alpha$ -Applikation?
- § Wie sind die Haarfollikel an den untersuchten Arealen verteilt und wie wirkt sich CSSS auf deren Öffnungszustand aus?

## **2 Methoden**

Für die Untersuchung von Dichte, Morphologie und Verteilung der kutanen LC und deren mögliche Einflussgrößen muss die LC im bestehenden Zellverband einer determinierten Hautpartie eindeutig markiert werden können und einer Hautschicht zu zuordnen sein. Über die gewählten Zellmarker und deren Expressionsstärke sollen Rückschlüsse auf das Reifungs- und Aktivitätsniveau des untersuchten Zelltyps gezogen werden können. Zusätzlich wird mit verschiedenen Methoden der Einfluss des CSSS auf die Dichte der Haare untersucht. Der Haarfollikel (HF) als Struktur der Haut wird somit zusätzlich gesondert betrachtet. Für die Versuchsreihen sind die Formen der mechanischen und chemischen Reizung der Haut protokolliert.

### **2.1 Methoden zur mechanischen und chemischen Reizung der Haut *in vivo* und *in vitro***

#### **2.1.1 Vorbereitung der Brusthaut auf das CSSS und die TNF- $\alpha$ -Applikation**

Direkt nach Ankunft der Haut im Labor wird diese mit Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*; PBS-Dulbecco, Biochrom AG, Berlin) gereinigt und auf ca. 6x3 cm große Stücke zugeschnitten. Unterhautfettgewebe wird in einer Dicke von 0,5 bis 1 cm belassen. Die Hautstücke werden mit Injektionsnadeln (Braun) auf Styropor®-Platten gespannt. Diese wurden zuvor mit Aluminiumfolie und einem Plastikfilm bedeckt.

#### **2.1.2 CSSS**

Das Cyanacrylat skin surface tape stripping (CSSS) hat sich aus der Tape stripping-Methode entwickelt, bei der mit Hilfe eines einfachen Klebestreifens eine Biopsie der obersten Schicht des Stratum corneums entfernt genommen wird. Zusätzlich zum Klebestreifen wird zunächst ein Film Cyanacrylat-Kleber auf die Haut aufgetragen. Da mit Cyanacrylat die oberflächlichen Schichten des Stratum corneums entfernt werden und nicht nur ein einfacher Abguss entsteht, können die gewonnen Hautschichten auf dem Abriss mikroskopisch beurteilt werden. Auch lassen sich HF als Teilbiopsie darstellen. Das Infundibulum füllt sich mit Cyanacrylat und das Haar wird teilweise mit entfernt.

Goldschmidt und Kligman erzeugten bereits Mitte der 60iger Jahre mit Hilfe eines Objektträgers und eines Klebstoffes Oberflächenabdrücke<sup>134</sup>. Marks und Dawber benutzten schon 1971 Cyanacrylat zur Erstellung von Hautoberflächenbiopsien um das oberflächliche Stratum corneum zu beurteilen<sup>135</sup>. Auch Untersuchungen am Vellushaarfollikel unter Nutzung von Cyanacrylat wurden beschrieben<sup>8, 129</sup>.

Auf die Brusthaut werden ca. 25 mg Cyanacrylatkleber (superglue, UHU® GmbH & Co. KG, Buehl/Baden)/cm<sup>2</sup> appliziert und verstrichen. Anschließend wird ein ca. 3 cm langer, 1,9 cm breiter tesa®-Filmstreifen (tesa®-Film Nr. 5529, Beiersdorf, Hamburg) auf den Kleber gegeben und mit einer Rolle fest und gleichmäßig angedrückt. Sobald der Kleber nach ca. 20 min getrocknet ist, wird die Kontur des Klebefilms mit einem Folienstift markiert und der Klebefilm anschließend ruckartig entfernt. Die behandelte Brusthaut wird auf der Styropor®-Platte in eine feuchte, verschlossene Kammer gebracht und anschließend in den Inkubator (HERA cell®, Heraeus GmbH, Hanau) bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> gestellt.

Bei Unterarmepidermis erfolgt ein CSSS *in vivo*. Hierbei wird die gleichmäßige Haftung des Klebefilms dadurch gewährleistet, dass mit einer Rolle zehnmal unter konstantem Druck über den Streifen gerollt wird.

### **2.1.3 TNF- $\alpha$ -Applikation**

Die Antwort der LC auf eine mögliche Stimulation durch das CSSS soll mit einem bekannten LC-Reifungs-Stimulus verglichen werden. Als Positivkontrolle wurde der bekannte Immunmodulator Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gewählt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  unverzichtbar für die Auslösung der LC-Migration ist<sup>136</sup>. Die intradermale Injektion von homologem, rekombinantem TNF- $\alpha$  im Menschen zeigte eine dosisabhängige Reduktion der LC in der Epidermis innerhalb von 2h<sup>137</sup>. Dabei wurden CD1a<sup>+</sup> epidermale Zellen/mm<sup>2</sup> nach Injektion von 50, 200 und 500U TNF- $\alpha$  ausgezählt. Allerdings wurde TNF- $\alpha$  in Studien bisher nie topisch appliziert.

TNF- $\alpha$  ist ein multifunktionaler Signalstoff, ein sogenanntes Zytokin des Immunsystems, welches in lokale und systemische Entzündungen involviert ist. TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Keratinozyten, Mastzellen und LC selbst ausgeschüttet. Seine Hauptfunktion liegt in der Regulation der Aktivität verschiedener Immunzellen. TNF- $\alpha$  kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen<sup>138</sup>.

Anstatt TNF- $\alpha$  zu injizieren, wird das Zytokin topisch appliziert. Dies geschieht in der Vorstellung, dass oberflächlich aufgetragene Substanzen durch das Stratum corneum und die HF penetrieren. Ca. 6 cm<sup>2</sup> messende Hautareale der Brusthaut werden mit einem Folienstift markiert. Pro cm<sup>2</sup> Haut werden 20  $\mu$ l TNF- $\alpha$  (Quelle: E.coli; PeproTech Inc., USA) in Aqua ad injectabilia (Braun® AG, Melsungen) in einer Konzentration von 200 U/ $\mu$ l aufgetragen. Eine gleichmäßige Auftragung auf die Haut wird durch Auftragung von Tröpfchen erreicht. Anschließend werden die Tropfen verstrichen, so dass eine gerade geschlossene Flüssigkeitsdecke entsteht. Die behandelte Brusthaut wird auf der Styropor®-Platte in eine feuchte, verschlossene Kammer gebracht und anschließend in den Inkubator (HERA cell®, Heraeus GmbH, Hanau) bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> gestellt.

## **2.2 Vorbereitung auf die Immunfluoreszenzfärbung: Methoden zur Gewinnung von Hautschnitten und Epidermisplättchen**

### **2.2.1 Stanzen-Probengewinnung**

Aus der vorbehandelten Brusthaut werden Stanzen mit 4 mm Durchmesser gewonnen, wobei es Ziel ist, einen oder mehrere HF pro Kryoschnitt-Stanze zu erhalten. Ein Teil der Stanzen wird zu Kryoschnitten aufgearbeitet, vom anderen Teil werden Epidermisplättchen gewonnen. Die kreisrunde Form der Stanzen ermöglicht später eine leichtere Handhabung der Epidermisplättchen.

### **2.2.2 Dispase-Andau zur Gewinnung der Epidermisplättchen**

Es wurde die 1983 erstmalig von Kitano und Okada beschriebene Methode zum Andau durch Dispase genutzt <sup>139</sup>.

Die frisch gewonnenen Stanzen werden in Dispase (Bacillus polymyxa-Lyophilisat in RPMI-Zellkulturmedium) gegeben und entweder für 2 bis 3h bei 37° C inkubiert oder über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Bei der Trennung von Dermis und Epidermis durch Dispase bleibt der kollagene Teil der Basalmembran, die Lamina densa, auf der dermalen Seite. Die Epidermis wird mit Hilfe einer spitzen Pinzette vorsichtig von der Dermis abgelöst und in ein mit PBS gefülltes Zellkulturschälchen (LabTek® Chamber Slide™) gegeben.

### 2.2.3 Kryoschnitte

Eingebettet in Killik frozen section medium (Bioptica, Mailand, Italien) werden die für den Kryoschnitt vorgesehenen Stanzen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefroren und mit einem Kryostat in 5 mm breite Vertikalschnitte geteilt. Die Schnitte werden so auf Objektträger angeordnet, dass die Schnitte im Gewebe jeweils 20  $\mu\text{m}$  Abstand hatten.

### 2.2.4 Saugblasen

Mittels Vakuumpumpe werden Saugblasen erzeugt, die es ermöglichen, Epidermisplättchen *in vivo* nicht-invasiv zu gewinnen. In der vorliegenden Versuchsreihe wurden die Saugblasen an der Mitte der Beugeseite des Unterarmes erzeugt. Von 1 ml Tuberkulinspritzen (BD® Plastipak™) wird der Spritzenstempel abgezogen und der Spritzenkörper wird mit der Kanülenseite mittels eines Verteilerschlauch an die Vakuumpumpe (Hico Rapidovac 781 Hirtz & Co. KG, Köln; Abb. 5) angeschlossen. Man setzt den Spritzenkörper senkrecht auf dem Unterarm auf; anschließend wird durch die Vakuumpumpe ein Unterdruck zwischen -0,2 und -1 bar aufgebaut (Abb. 5). Nach ungefähr 2h entstehen durch den Unterdruck Blasen (Abb. 5). Das Blasendach wird vorsichtig abgetrennt und die abgetrennte Epidermis in ein mit Phosphatpuffer (PBS-Dulbecco, Biochrom AG, Berlin) gefülltes Zellkulturschälchen (Lab-Tek® Chamber Slide™) gegeben.

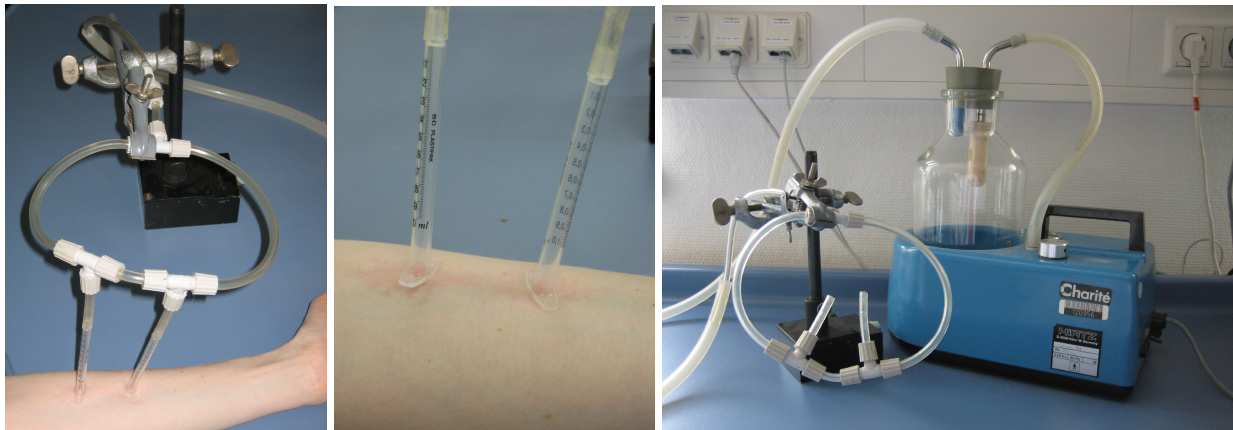


Abb. 5 Erzeugung von Saugblasen mit Hilfe der Hico Rapidovac 781 Vakuumpumpe

## **2.3 Immunfluoreszenzfärbung**

Um bestimmte Bestandteile einer Zelle (Proteine oder andere Makromoleküle) in einer Zelle sichtbar zu machen, werden in der Immunfluoreszenzfärbung fluoreszierende Antikörper (AK) benutzt, die spezifisch an das entsprechende Antigen (AG) binden. Man unterscheidet die direkte von der indirekten Immunfluoreszenzfärbung. Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung bindet ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Primär-AK direkt an das Zell-AG. Bei der hier verwendeten indirekten Methode bindet ein unmarkierter Primär-AK an das AG. Anschließend wird ein markierter Sekundär-AK, der gegen den Primär-AK gerichtet ist, eingesetzt. Zum einen können bei dieser Methode eine Vielzahl von Primär-AK mit den gleichen markierten Zweit-AK kombiniert werden. Zum anderen ist diese Methode deutlich empfindlicher als die direkte Färbung, da mehrere Zweit-AK mit den verschiedenen Epitopen des Primär-AK reagieren können. Die benutzten monoklonalen AK werden von B-Zell-Klonen in Mäusen gebildet. Nachdem in diesen Mäusen eine AG-spezifische Immunantwort erfolgt ist, werden B-Lymphozyten aus der Milz oder den Lymphknoten gewonnen und unter spezifischen Bedingungen mit Maus-Myelomzellen fusioniert. Diese können in Zellkultur unbegrenzt gehalten werden und synthetisieren selbst keine AK mehr.

### **2.3.1 Primär- und Sekundärantikörper**

Die zu markierenden Strukturen auf den LC müssen möglichst Zelltyp-spezifisch sein und bezüglich ihrer allgemeinen Expressionseigenschaften bereits gut definiert sein. Es wurden Oberflächenmerkmale ausgewählt, die während verschiedener Aktivierungs- und Reifungszuständen exprimiert werden. Zur Markierung der CD1a-Moleküle verwenden wir einen monoklonalen Maus Anti-Mensch CD1a-AK (Klon NA1/34, DakoCytomation; Glostrup, Dänemark). Der hier gebrauchte Maus Anti-Mensch HLA-DR-AK (Klon L243, Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA) wurde unter anderem zuvor in Studien zu Unterklassen von Dendritischen Zellen in peripherem Blut und in Lymphgefäßen verwendet<sup>140, 141</sup>. Wir verwenden mit Fluorescein-Isothiocyant (FITC) konjugierte monoklonale Maus Anti-Mensch CD83-AK (Klon HB15a, Immunotech, Marseille, Frankreich) und mit FITC konjugierte monoklonale Maus Anti-Mensch CD86-AK (Klon 2331(FUN-1), Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA). Diese verfügen über freie Epitope, an denen zusätzlich FITC als Sekundär-AK andocken kann.



In dieser Arbeit wurde die Expression von CD1a in Zellen aller Schichten der Brusthaut und in Unterarmepidermis ermittelt. Zusätzlich wurde die Dichte von jeweils HLA-DR<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> oder CD86<sup>+</sup> Zellen in Unterarmepidermis bestimmt.

Um die mit Primär-AK markierten Zellen in der Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar zu machen wird Fluorescein Anti-Maus IgG (Vector Laboratories; Burlingame, USA) verwendet. Dieser AK hat seine maximale Anregung bei einer Wellenlänge von 490-500 nm und sein Emissionsmaximum bei 510-520 nm.

### **2.3.2 Durchführung**

Für die Immunfluoreszenzfärbung werden zunächst die Brusthautschnitte in Aceton (Backer, 8002, Deventer, Niederlande) fixiert. Dadurch sollen folgende Punkte gewährleistet werden:

1. Fixierung des AGs, so dass ein Auswaschen verhindert wird
2. Erhalten des AGs in der Form, die für den AK erkennbar ist
3. Aufrechterhaltung der Zellstruktur.

Aceton löst hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur auf und fällt so die Proteine aus.

Nach Waschung in PBS werden die Schnitte eine Stunde mit DAKO Proteinblock (Vector Labs, X 0909, Burlingame, Kanada) geblockt. Anschließend wird der LC-spezifische Primär-AK verdünnt in Human-AB-Serum (Biotest AG, 805135, Dreieich) aufgetragen. Bei der Kontrolle wird nur AB-Serum aufgetragen. Nach erneuter Waschung in PBS wird für 45min oder alternativ über Nacht im Kühlschrank der Sekundärantikörper Fluorescein Anti-Mouse IgG (Vector Labs, FI-2000, Burlingame, Kanada) verdünnt in Human-AB-Serum aufgetragen.

## **2.4 Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie**

Die klassische Lichtmikroskopie beruht auf dem Prinzip von Reflektion und Transmission von Licht mit Wellenlängen im für das menschliche Auge sichtbaren Bereich. Das verwendete, heute gebräuchliche Auflicht-Fluoreszenzmikroskop ermöglicht neben Aufnahmen in Transmission auch die Detektion von Fluoreszenz in ausgewählten Wellenlängenbereichen. Das Präparat wird von oben durch das Objektiv, das gleichzeitig als Kondensor fungiert, beleuchtet. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Visualisierung von Zellstrukturen, die zuvor mit entsprechenden Stoffen markiert wurden. Durch Licht bestimmter Wellenlänge können diese

fluoreszierenden Stoffe angeregt werden. Dabei werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Unter Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge gelangen die angeregten Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Als Lichtquelle, welche die Anregungswellenlänge des gewählten Fluorochroms enthalten muss, wird eine Quecksilberhöchstdrucklampe (Olympus®, Japan) verwendet. Aus dem gesamten Beleuchtungsspektrum wird zuerst mittels eines Anregungsfilters die anregende Wellenlänge des gewählten Fluorochroms herausgefiltert. Die Anregungsstrahlung gelangt auf einen dichromatischen Tellerspiegel. Dieser reflektiert das Erregerlicht von kleiner Wellenlänge und ist gleichzeitig durchlässig für das längerwellige Licht der Emissionsstrahlung. Die Anregungsstrahlung gelangt durch das Objektiv auf das Präparat und regt das Fluorochrom an, welches daraufhin langwelliges Licht emittiert. Dieses passiert den dichromatischen Tellerspiegel und trifft auf den Emissionsfilter. Dieser filtert die gewünschte Emissionsewellenlänge des Fluorochroms, das eigentliche Fluoreszenzbild. Das Fluoreszenzbild kann entweder durch das Okular betrachtet oder mit einer Fotokamera aufgezeichnet werden.

Für die Detektion des verwendeten Fluorochroms und Zweitantikörpers FITC war eine entsprechende Filterkombination nötig. Der erste Filter erlaubt die Excitation mit Licht von Wellenlängen zwischen 470 und 490 nm, der zweite filtert ungewollte fluoreszierende Signale ab und lässt die spezifische grün fluoreszierende Emission zwischen 520 und 560 nm durch. Die gefärbten Brusthaut- und Gesichtshaut-Kryoschnitte werden durch diesen NIBA-Filter auf ihre LC-Dichte hin untersucht. Die LC werden direkt am Mikroskop in der Epidermis, im Stratum papillare, in der Dermis und im HF-Infundibulum gezählt und für den einzelnen Schnitt dokumentiert.

## **2.5 Fotografie**

Das Programm anaLYSIS® (Soft Imaging System GmbH SIS, Münster) dient zur Erstellung mikroskopischer Aufnahmen und zu deren Vermessung. Jeder Schnitt und jedes Brusthaut- und Unterarmepidermisplättchen wurden durch den NIBA-Filter fotografiert und mit Hilfe des Bildgewinnungsprogrammes in 40-facher Vergrößerung fotografiert, exemplarisch wurden Bilder in 20- und 100-facher Vergrößerung gemacht.

## **2.6 Bildbearbeitung**

Die Bearbeitung der Bilder erfolgt im ersten Schritt mit Adobe® Photoshop 9.0. Die am Fluoreszenzmikroskop bei Raumabdunklung entstandenen Bilder werden bei Tageslicht zu

Erleichterung der Auswertung zurückhaltend aufgehellt und kontrastiert. Mit Hilfe des Programms anaLYSIS® werden anschließend für jeden Schnitt die Epidermis und die vorhandenen Haarfollikel ausgemessen und anschließend die LC/mm Epidermis bzw. HF ausgezählt.

Die LC in Epidermisplättchen werden pro Gesichtsfeld ausgezählt. Um Angaben in LC/mm<sup>2</sup> machen zu können, wurde mit Hilfe von anaLYSIS® ein Gesichtsfeld in mm<sup>2</sup> ausgemessen und als Faktor berücksichtigt. In 40-facher Vergrößerung misst ein Gesichtsfeld 0,3639 mm<sup>2</sup>.

## **2.7 Methoden zur Bestimmung der Follikeldichte**

### **2.7.1 Lichtmikroskopie**

Die Klebefilm-Abrisse werden unter dem Mikroskop betrachtet, nachdem sie wiederum mit Klebefilm (tesa®) auf einen Objektträger fixiert wurden. Mittels der Lichtmikroskopie können auf einem Cyanacrylatabriss die Vellushaare, Teile der Wurzelscheide und der Abguss des Infundibulums beurteilt werden. Bei 10-facher Vergrößerung werden in zuvor ausgemessenen 1x1cm großen Arealen die Haarfollikel ausgezählt. Dabei wird zwischen Haarfollikel mit Haar und ohne Haar unterschieden.

### **2.7.2 Fotografie**

Exemplarisch wurden die Abrisse in 10- und 20-facher Vergrößerung mit anaLYSIS® (Soft Imaging System GmbH SIS, Münster) fotografiert.

### **2.7.3 Phototrichogramm**

Zum Vergleich mit den in den Abrissen ermittelten HF-Dichten wurde die Mitte der Beugeseite des Unterarmes von Probanden, von denen Unterarmabrisse vorlagen, mit der Trichoscan®-Kamera fotografiert, nachdem die ursprünglich farblosen Vellushaare angefärbt wurden. Zur Färbung der Vellushaare wurde das zu fotografierende Hautareal mit Wasser gereinigt und ein handelsübliches Haarfärbemittel (Récital® L'Oréal, Paris, Frankreich) mit einem Pinsel aufgetragen. Nach einer Applikationszeit von 20 min wird der Farbstoff mit Papiertüchern entfernt und die Hautregion mit Wasser abgespült. Die nun kräftig dunkel gefärbten Vellushaare können anschließend optisch pro Gesichtsfeld ausgezählt werden.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Unterstützung und dem Rat des Institutes für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Berlin.

Zur grafischen, nicht parametrischen Darstellung der Verteilung der Ergebnisse wurden in SPSS<sup>®</sup> Boxplots erzeugt. Diese sind wie folgt zu interpretieren: Der breite Balken im Rechteck (Box) stellt den Median dar. Liegen über einem Wert genauso viele Fälle wie unter dem Wert, so wird dieser als Median bezeichnet. 50 % der Fälle insgesamt liegen in der Box. Der obere Rand der Box halbiert wiederum die obere Hälfte der Stichprobe, der Rand liegt also am 75. Perzentil. Entsprechendes gilt für die untere Hälfte: der untere Rand entspricht dem 25. Perzentil. Die dünnen, waagerechten Striche zeigen die höchsten bzw. niedrigsten Werte, die noch keine Ausreißer sind. Die kleinen Kreise zeigen Ausreißer an: Werte, die mehr als 1,5 Box-Längen über bzw. unter dem 75. bzw. 25. Perzentil entfernt liegen. Noch extremere Werte werden als Sternchen dargestellt: Diese liegen mehr als 3 Box-Längen vom 75. bzw. 25. Perzentil entfernt. Die Boxplots können keine Aussage über die Signifikanz eines beobachteten Unterschiedes treffen, stellen jedoch eine wichtige Interpretationshilfe zur Auswertung der Daten dar. In den Werte-Tabellen wurden entsprechend Angaben in Medianen und Interquartilen-Abständen gewählt. Da der Median im Vergleich zum arithmetischen Mittelwert (Summe aller Werte durch die Anzahl der Werte) die Ausreißer weniger berücksichtigt ist er bei kleinen Stichproben von präziserer Aussagekraft. Bei der Interpretation der Ergebnisse werden zur Veranschaulichung tlw. Abnahme und Zunahme von Werten in Prozent angegeben. Diese Prozentangaben wurden anhand der Medianwerte errechnet.

Bei der Auswahl der statistischen Testverfahren mussten folgende Dinge beachtet werden:

- § Da die Probandenzahl in den Versuchsreihen sechs nicht überschreitet, sind Aussagen auf Populationsebene nur äußerst eingeschränkt möglich.
- § Für den speziellen Zeitpunkt einer Untersuchung gilt es mit Hilfe eines nicht-parametrischen Ansatzes die Nullhypothese, das heißt die Wirkungen der verschiedenen Behandlungen unterscheiden sich nicht, zu überprüfen. In diesem Falle wurde der Kruskal-Wallis-Test gewählt. Kommt hier ein p-Wert unter 5 % heraus, heißt das, dass für den Probanden und den Zeitpunkt unterschiedliche Wirkungen der Behandlungen nachgewiesen werden konnten.

## **2.9 Versuch zur Ermittlung der Langerhanszell-Dichte in Kryoschnitten und Epidermisplättchen von Brusthaut**

Die Versuchsreihe wurde zwischen April 2006 und Juni 2007 in dem Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut und der Haare (Clinical research center for hair and skin science, CRC) an der Hautklinik der Charité Berlin durchgeführt. Das Versuchsprotokoll für das CSSS wurde vor Studienbeginn von der Ethikkommission überprüft und akzeptiert. Es wurden zwei verschiedene Färbeprotokolle angewendet. Protokoll 1 wurde an OP-Hautspenden von 5 Probanden, Protokoll 2 wurde an OP-Hautspenden von 4 Probanden durchgeführt.

### **2.9.1 Spenderkollektiv**

Als Untersuchungsmaterial diente Brusthaut, die von Brustreduktionen stammt. Die Brusthaut stammte von neun Frauen kaukasischer Abstammung im Alter zwischen 17 und 56 Jahren, die sich einer Brustreduktion unterzogen hatten. Die Haut traf durchschnittlich 18h post-operativ im Labor ein. Die Hautspenderinnen wurden über den wissenschaftlichen Verwendungszweck ausführlich unterrichtet. Jede Spenderin unterzeichnete vor der Operation eine Einverständniserklärung.

### **2.9.2 Versuchsdurchführung**

#### **2.9.2.1 Protokoll 1 - Ermittlung der Dichte von CD1a<sup>+</sup> Zellen**

Dieses Protokoll wurde bei den Proben 1-5 verwendet.

##### **1. Vorbereitung der Brusthaut auf das CSSS und die TNF- $\alpha$ -Applikation**

Die vier Hautstücke einer Probe werden folgendermaßen präpariert:

- a. Eine Negativkontrolle
  - b. Eine mit einem CSSS behandelnde Probe
  - c. Eine mit zwei CSSS zu behandelnde Probe
  - d. Eine mit topisch aufgetragenem TNF- $\alpha$  zu behandelnde Probe
2. Durchführung des CSSS auf den dafür vorgesehen Hautstücken und Aufbewahrung der Abrisse
  3. Markierung der gestrippten Haut
  4. Auftragung des TNF- $\alpha$  auf das dafür vorgesehene Hautstück
  5. Inkubation der Haut
    - a. Probe 1: 24 und 32h (keine 0h-Kontrolle, kein Behandlung c)
    - b. Probe 2: 24 (nur EP) und 40h

- c. Probe 3: 12, 24 und 32h
- d. Proben 4 und 5: 24h
- 6. Stanzengewinnung
- 7. Gewinnung von Kryoschnitten aus Hautstanzen
  - a. Einfrieren von Stanzen
  - b. Schneiden der Stanzen
- 8. Gewinnung von Epidermisplättchen aus Hautstanzen
  - a. Dispase-Andau
- 9. Immunfluoreszenzfärbung der Epidermisplättchen und der Kryoschnitte mit CD1a-AK als Primär-AK und FITC als Sekundär-AK, Kontrollfärbung ohne CD1a-AK
- 10. Betrachtung der Kryoschnitte und Epidermisplättchen und Auszählung der Kryoschnitte am Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop
- 11. Fotografie der Kryoschnitte und der Epidermisplättchen
 

Von den Epidermisplättchen wurden pro Behandlungsstufe mindestens 6 Gesichtsfelder aufgenommen.
- 12. Bearbeitung der Bilder mit Photoshop®
- 13. Auszählung der Epidermisplättchen am Bild
- 14. Ausmessung der Länge der Epidermis und der Haarfollikel der Kryoschnitte am Bild mittels analySIS®

### **2.9.2.2 Protokoll 2 – Beurteilung von Aktivierungsmustern mittels Ermittlung der Dichte von CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen**

Für die Proben 6-11 wird Protokoll 2 angewendet. Der Versuchablauf ist weitgehend deckungsgleich mit Protokoll 2. Schwerpunkt ist die Beurteilung die Expression zum Zeitpunkt 0 und 24h von CD83, CD86 und HLA-DR in LC von Epidermisplättchen.

Behandlung der Haut

- a. Proben 6 und 7: Behandlung a und d
- b. Proben 8 bis 11: Behandlung a bis d

### **2.10 Versuch zur Ermittlung der Langerhanszell-Dichte *in vivo* in Unterarmepidermis-Saugblasen von gesunden Probanden**

Die Versuchsreihe wurde zwischen Juni und November 2006 in dem Bereich für Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut und der Haare an der Hautklinik der Charité Berlin

durchgeführt. Das Versuchsprotokoll für das Erstellen von Saugblasen war vor Studienbeginn von der Ethikkommission überprüft und akzeptiert worden. Die Versuche zur Ermittlung der LC-Dichte in Unterarmepidermis wurden an freiwilligen 8 Probanden durchgeführt.

### **2.10.1 Probandenkollektiv**

Saugblasen wurden *in vivo* an der Haut des Unterarms von fünf Frauen und drei Männern kaukasischer Abstammung im Alter zwischen 23 und 31 Jahren gewonnen. Die Probanden befanden sich in einem guten Gesundheitszustand und litten weder unter Hautkrankheiten, noch unter Adipositas oder hormoneller Dysregulation. Die Probanden wurden über die Fragestellung und Zielsetzung des Versuchsprotokolls sowie über mögliche unerwünschte Reaktionen ausführlich unterrichtet.

### **2.10.2 Versuchsdurchführung**

#### **2.10.2.1 Vorbereitung der Unterarmhaut auf das CSSS**

Der Unterarm wird in entspannter Haltung auf eine plane, horizontale Arbeitsfläche gelegt. Es wird gewährleistet, dass die Haut der Unterarminnenseite nicht verunreinigt ist und nicht innerhalb der 24h vor Versuchsbeginn mechanisch beansprucht wurde.

1. Durchführung des CSSS auf der Unterarminnenseite und Aufbewahrung des Abrisses
2. Markierung der gestrippten Haut
3. Erzeugung von Saugblasen
  - a. Eine Saugblase auf unbehandelter Haut (8 Probanden)
  - b. Eine Saugblase 2,5h nach dem CSSS auf gestrippter Haut (7 Probanden)
  - c. Eine Saugblase 6h nach dem CSSS auf gestrippter Haut (6 Probanden)
4. Immunfluoreszenzfärbung der *in vivo* gewonnenen Epidermisplättchen  
Analog zum Färbeprotokoll der Hautschnitte werden die Epidermisplättchen in Zellkulturschälchen mit CD1a-AK als Primär-AK und FITC als Sekundär-AK gefärbt.
5. Fotografie der Unterarmepidermis am Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop  
Jede Behandlungsstufe wurde mit mindestens 6 Gesichtsfeldern dokumentiert.
6. Auswertung der Bilder mit Photoshop®

## **2.11 Versuch zur Ermittlung der Follikeldichte in Brust- und Unterarmhaut**

### **2.11.1 Probandenkollektiv**

Es wurden die CSSS-Abrisse der in Protokoll 1 genannten Probanden und der Saugblasenspender verwendet.

### **2.11.2 Follikeldichtebestimmung**

Zur Bestimmung der Follikeldichte werden auf die Rückseite jedes Cyanacrylatabrisses mit einem dünnen Folienstift zwei 1x1 cm große Felder umrandet. Die Tinte des Folienstiftes ist durch das durchsichtige Cyanacrylat erkennbar, somit ist ein Quadratzentimeter als Untersuchungsfläche festgelegt.

#### **2.11.2.1 Lichtmikroskopie**

Die Abrisse wurden lichtmikroskopisch untersucht, innerhalb eines Quadratzentimeters wurden die Haarfollikel ausgezählt, wobei zwischen Follikeln mit oder ohne Haar unterschieden wurde.

#### **2.11.2.2 Phototrichogramm**

Exemplarisch wurde an 3 Saugblasenspendern die Unterarmhaut nach CSSS mittels Trichoscan®-Kamera fotografiert und optisch ausgezählt.



### 3 Ergebnisse

Vergleichende Untersuchung von Verteilung und Morphologie der CD1a<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen unterschiedlich behandelter Brusthautproben in Kryoschnitten und Epidermisplättchen sowie Saugblasen *in situ*. Bestimmung der Haarfollikeldichte in Brust- und Unterarmhaut.

#### 3.1 Epidermisplättchen

Anhand der Epidermisplättchen, die uns eine horizontale Aufsicht ermöglichen, wurden zunächst Dichte und Morphologie von CD1a<sup>+</sup> Zellen untersucht. Nach Ergebnissen früherer Arbeiten wurde eine Inkubationszeit von 24h für die Wirkung von CSSS bzw. TNF- $\alpha$  gewählt<sup>50, 51, 62</sup>.

##### 3.1.1 CD1a<sup>+</sup> Zellen

Nach 24h fiel die Zahl der CD1a<sup>+</sup> Zellen bei jeder Behandlungsart. Die Zellzahl beträgt bei der höchsten mechanischen Reizung mit zwei CSSS nur noch 52,45 % der Ausgangszellzahl (Tab. 2 u. Abb. 6).

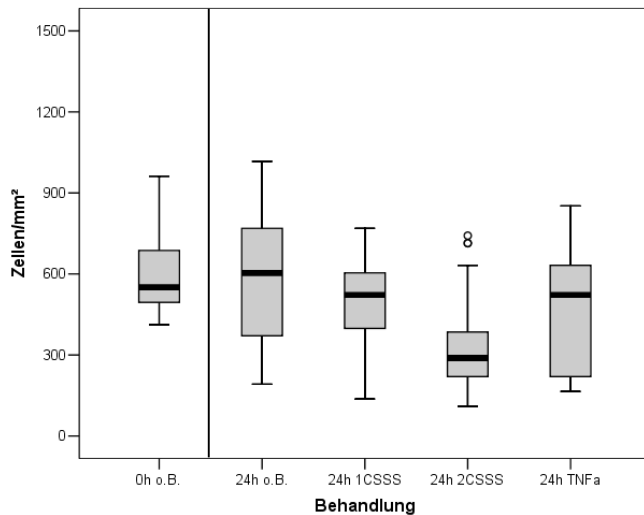
**A**

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Gesichtsfelder)	Zellzahl/mm <sup>2</sup> M (IQA)
0h	Kontrolle	4 (22)	550 (213)
24h	Kontrolle	5 (27)	604 (439)
	1 CSSS	5 (27)	522 (219)
	2 CSSS	4 (22)	288,5 (186)
	TNF- $\alpha$	5 (21)	522 (412)

**B**

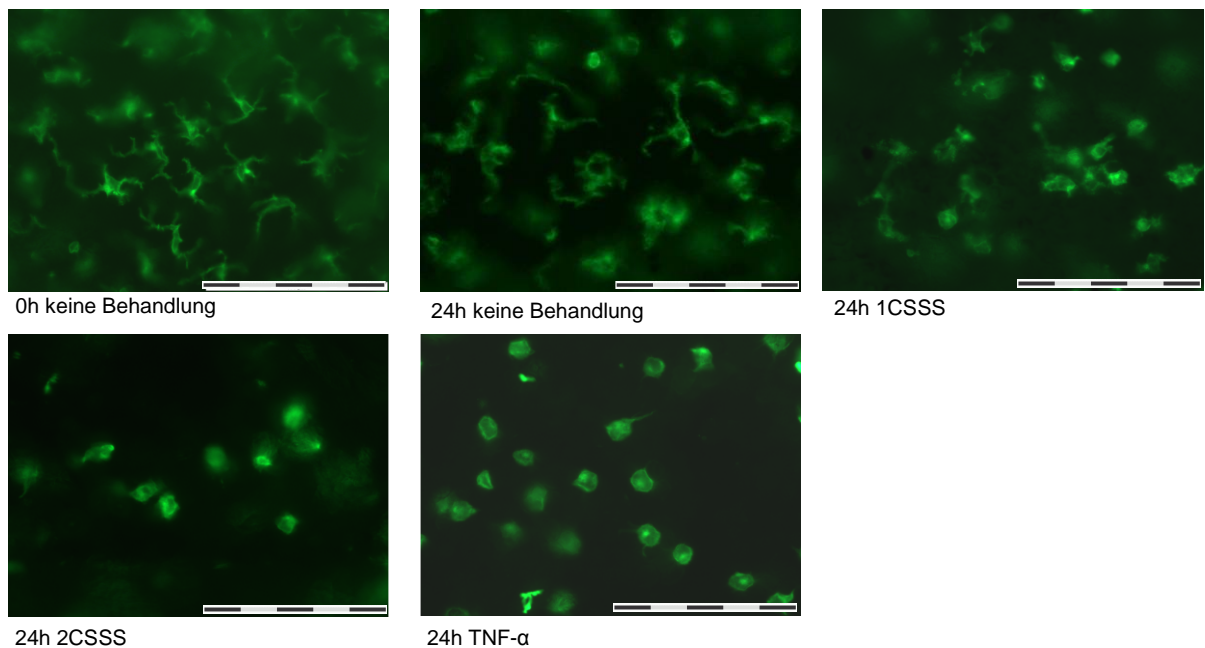
Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Gesichtsfelder)	Zellzahl/mm <sup>2</sup> M (IQA)
0h	Kontrolle	4 (22)	0 (21)
24h	Kontrolle	5 (27)	27,48 (82)
	1 CSSS	5 (27)	109,91 (165)
	2 CSSS	4 (22)	82,43 (137)
	TNF- $\alpha$	5 (21)	164,86 (179)

**Tab. 2 A: CD1a<sup>+</sup> Zellen/ mm<sup>2</sup> in Brustepidermis, B: abgerundete CD1a<sup>+</sup> Zellen/ mm<sup>2</sup> in Brustepidermis**  
M: Median, IQA: Interquartilenabstand



**Abb. 6 CD1a+ Zellen in Brustepidermis**

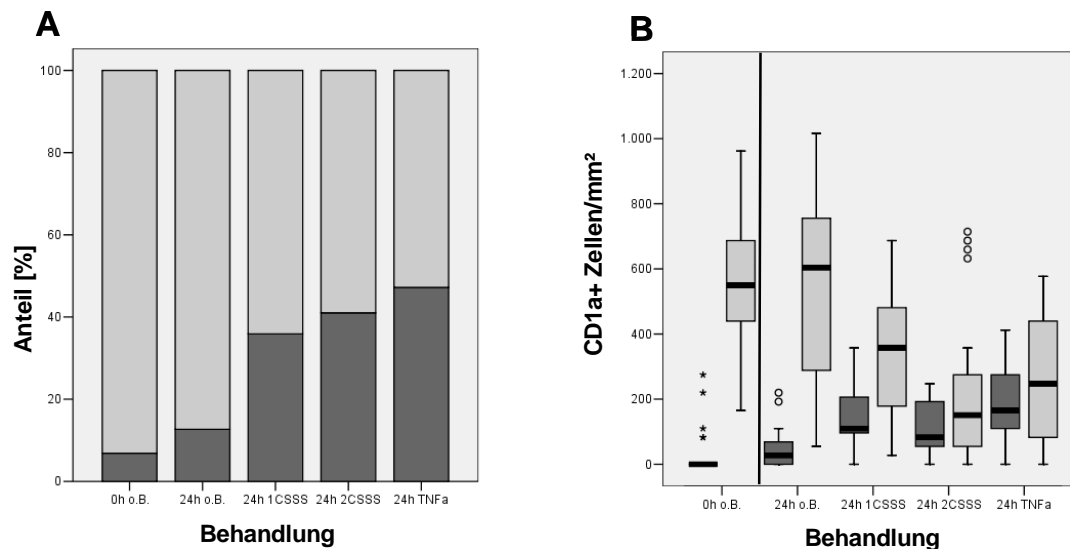
Die Anzahl CD1a<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach 2CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von 6 Gesichtsfeldern/n



**Abb. 7 CD1a+ Zellen in Epidermisplättchen**

CD1a<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation in 40-fach Vergrößerung (Maßstab: 100 $\mu$ m), fotografiert mit Hilfe von anaLYSIS®. Beginnende Abrundung der Zellen nach einem CSSS, deutliche Abrundung der Zellen nach zwei CSSS und nach TNF- $\alpha$ -Applikation.

Der Anteil an morphologisch abgerundeten, aktivierten Zellen nahm bei Intensivierung der Behandlung stetig zu. Beträgt der Anteil an abgerundeten CD1a<sup>+</sup> Zellen an der Gesamtzellzahl zunächst 0 %, ging er nach 24h Inkubation auf 4,54 %, zusätzlich eines CSSS auf 21,05 %, bei zwei CSSS lag der Anteil bei 28,57 % und bei Behandlung mit TNF- $\alpha$  lag der Prozentsatz bei 31,58 % (Tab. 2 u. Abb. 8). Das Chemokin TNF- $\alpha$  stellte bei der morphologischen Aktivierung den potentesten Reiz dar.



**Abb. 8 Verhältnis von dendritischen zu abgerundeten CD1a<sup>+</sup> Zellen in Brustepidermis**

A: CD1<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation in %; Auszählung von 6 Gesichtsfeldern/n; hellgrau: dendritische CD1a<sup>+</sup>Zellen, dunkelgrau: abgerundete CD1a<sup>+</sup> Zellen

B: CD1<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von 6 Gesichtsfeldern/n; hellgrau: dendritische CD1a<sup>+</sup> Zellen, dunkelgrau: abgerundete CD1a<sup>+</sup> Zellen

### 3.1.2 HLA-DR<sup>+</sup> Zellen

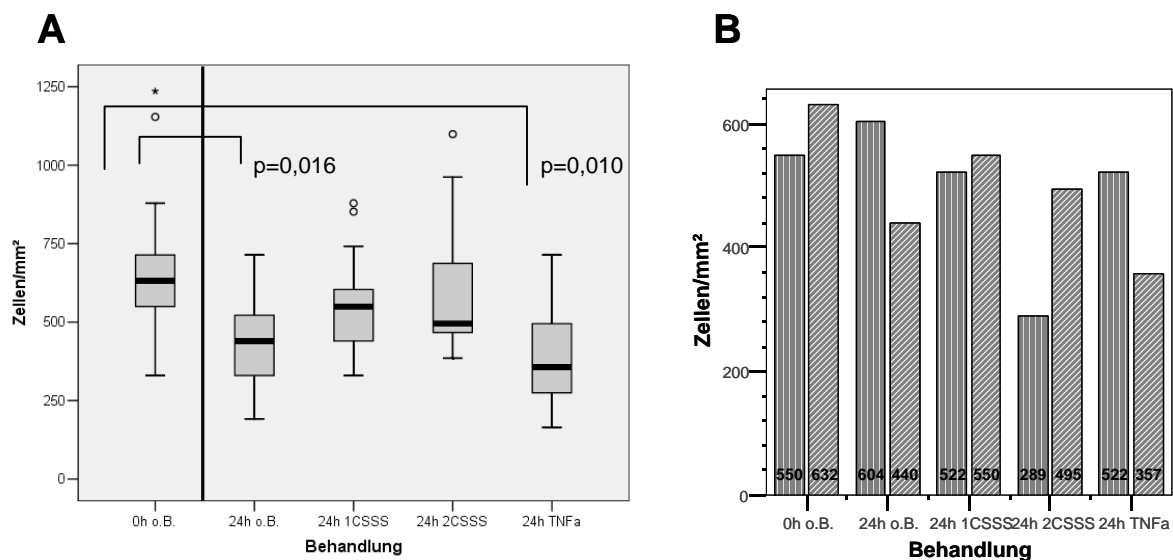
Die Zahl der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen und damit der MHC-Klasse-II-Moleküle exprimierenden Zellen steigt nicht nach Behandlung an. Eine Abnahme der Zellzahl ist nach 24h auf allen vier Behandlungsstufen zu beobachten. Nach 24h Inkubation ohne Behandlung und TNF- $\alpha$ -Applikation ist diese sogar signifikant ( $p=0,016$ ;  $p=0,01$ ; Tab. 3 u. Abb. 9). Allerdings bleibt die Zellzahl nach einem CSSS annähernd konstant, der Abfall der Zellzahl fällt nach zwei CSSS vergleichsweise gering aus. Diese Entwicklung ist methodologisch zu diskutieren. Denkbar ist ein frühzeitiger Anstieg der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen auf Grund unerwünschter Manipulation der Haut

während der operativen Entnahme und des Transportes mit einer Normalisierung nach 24h oder aber eine Abnahme der absoluten Zahl HLA-DR<sup>+</sup> Zellen durch Emigration nach 24h Inkubation.

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Gesichtsfelder)	Zellzahl/mm <sup>2</sup> M (IQA)
0h	Kontrolle	6 (42)	632 (171)
24h	Kontrolle	6 (60)	440 (192)
	1 CSSS	4 (33)	550 (164)
	2 CSSS	4 (19)	495 (275)
	TNF- $\alpha$	6 (43)	357 (220)

**Tab. 3 HLA-DR<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> in Brustepidermis**

M: Median; IQA: Interquartilenabstand



**Abb. 9 A: HLA-DR<sup>+</sup> Zellen in Brustepidermis, B: Mediane CD1a<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>**

A: Die Anzahl HLA-DR<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von 6 Gesichtsfeldern/n

B: Balkendiagramm. Balken: Median Zellen/mm<sup>2</sup> je Behandlung (Zahlenwert auf Balken mit angegeben); vertikal schraffiert: CD1a<sup>+</sup> Zellen, schräg schraffiert: HLA-DR<sup>+</sup> Zellen

Vergleicht man die Anzahl der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen und der CD1a<sup>+</sup> Zellen, fällt zunächst auf, dass die Zelldichten sich zum Zeitpunkt 0h nicht grob von einander unterscheiden (Abb. 9). Da auch die HLA-DR<sup>+</sup> Zellen morphologisch zunächst ausgeprägte Dendritenstrukturen zeigen (Abb. 12), kann die Koexpression beider Zelloberflächen-Antigene durch denselben Zelltyp angenommen werden. 24h nach zwei CSSS sehen wir eine Abnahme der CD1a<sup>+</sup> Zellen bei

ähnlich hohen HLA-DR<sup>+</sup> Zellzahlniveau wie bei den Ausgangswerten. Erklärbar ist diese Beobachtung durch die Annahme, dass ein Teil der unreifen CD1a<sup>+</sup> Langerhanszellen sich 24h nach zwei CSSS in CD1a<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> APC verwandelt.

Betrachtet man die morphologischen Veränderungen der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen 24h nach einem und zwei CSSS bzw. nach TNF- $\alpha$ -Applikation, fällt eine ähnliche Abrundungstendenz auf wie sie bei CD1a<sup>+</sup> beobachtet wurde. Das Expressionsniveau von HLA-DR<sup>+</sup>, interpretiert über Leuchtkraft des fluoreszierenden Sekundärantikörpers, ist ähnlich hoch wie das von CD1a<sup>+</sup> Zellen.

### 3.1.3 CD83<sup>+</sup> Zellen

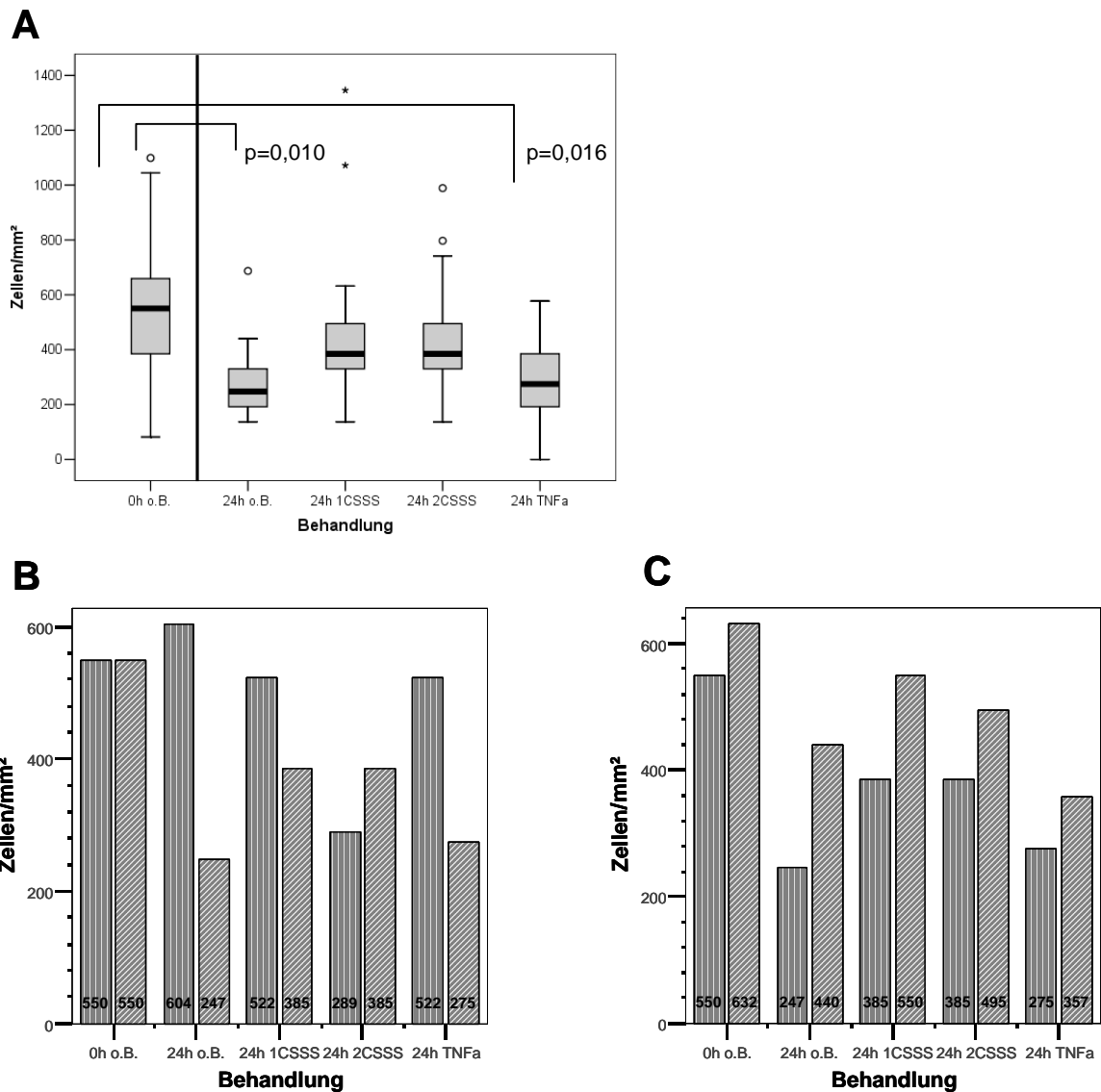
CD83<sup>+</sup> gilt als früher Reifungsmarker. Bemerkenswert bei den CD83<sup>+</sup> Zellen ist die stark dem Verhalten der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen ähnelnde Entwicklung der Zelldichten. Auch hier fallen die Zelldichten von einem vergleichsweise hohen Ausgangsniveau nach 24h generell, ohne Behandlung und nach TNF- $\alpha$ -Applikation allerdings wesentlich deutlicher als nach ein bis zwei CSSS (Tab. 4 u. Abb. 10). Die Varianz der ermittelten Werte, die zum Zeitpunkt 0h erheblich ist, nimmt hier nach 24h Inkubation in allen Fällen ab (Abb. 10A).

Mit dem Wissen, dass CD83<sup>+</sup> Zellen verglichen mit anderen Leukozytenlinien MHC-Klasse-II Moleküle auf hohem Niveau koexprimieren<sup>41</sup>, können wir annehmen, dass die CD83<sup>+</sup> Zellen in einem hohen Maße zugleich HLA-DR<sup>+</sup> sind. Die Mediane der CD83<sup>+</sup> Zellen betragen zwischen 56,14 % (24h Inkubation, ohne Behandlung) und 87,03 % (0h Inkubation, ohne Behandlung) der Mediane der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen. Im Durchschnitt liegt die Zahl der CD83<sup>+</sup> Zellen 26,4 % unter der der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen (Abb. 10C). Wie bei den HLA-DR<sup>+</sup> Zellen sind auch hier die Ergebnisse methodologisch zu diskutieren.

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Gesichtsfelder)	Zellzahl/mm <sup>2</sup> M (IQA)
0h	Kontrolle	6 (38)	550 (274)
24h	Kontrolle	6 (48)	247 (138)
	1 CSSS	4 (25)	385 (193)
	2 CSSS	4 (33)	385 (165)
	TNF- $\alpha$	6 (44)	275 (193)

**Tab. 4** CD83<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> in Brustepidermis

M: Median; IQA: Interquartilenabstand



**Abb. 10 A: CD83<sup>+</sup> Zellen in Brustepidermis, B: Mediane CD1a<sup>+</sup> und CD83<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>, C: Mediane CD83<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>**

A: Die Anzahl CD83<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von 6 Gesichtsfeldern/n

B: Balkendiagramm. Balken: Median Zellen/mm<sup>2</sup> je Behandlung (Zahlenwert auf Balken mit angegeben); vertikal schraffiert: CD1a<sup>+</sup> Zellen, schräg schraffiert: CD83<sup>+</sup> Zellen

C: Balkendiagramm. Balken: Median Zellen/mm<sup>2</sup> je Behandlung (Zahlenwert auf Balken mit angegeben), vertikal schraffiert: CD83<sup>+</sup> Zellen, schräg schraffiert: HLA-DR<sup>+</sup> Zellen

Morphologisch betrachtet runden sich die CD83<sup>+</sup> Zellen nach 24h Inkubation deutlich ab. Das Expressionsniveau von CD83 erscheint vor allem nach einem CSSS erhöht (Abb. 12).

### 3.1.4 CD86<sup>+</sup> Zellen

Erfahrungsgemäß wird der Kostimulator CD86 zusammen mit CD83 während der DC-Reifung hochreguliert<sup>142</sup>. Der Annahme entsprechend, dass CSSS und TNF- $\alpha$  Reifungsstimuli darstellen, steigen die Dichten der CD86<sup>+</sup> Zellen verglichen zum Ausgangswert nach zwei CSSS und nach TNF- $\alpha$ -Applikation signifikant ( $p=0,002$ ) um nahezu 40 %. Nach einem CSSS steigt die Zahl sogar um nahezu 45 % (Tab. 5 u. Abb. 11). Zu beachten ist dabei jedoch die teilweise erhebliche Varianz der ermittelten Werte (Abb. 11), die sich auch aus der niedrigen Probandenzahl heraus erklärt. Erklärbar wäre die Diskrepanz der Zelldichten nach einem und zwei CSSS mit vergleichsweise verstärkter Migration der CD86<sup>+</sup> Zellen nach zwei CSSS.

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Gesichtsfelder)	Zellzahl/mm <sup>2</sup> M (IQA)
0h	Kontrolle	6 (43)	247 (165)
24h	Kontrolle	6 (47)	192 (139)
	1 CSSS	4 (23)	357 (220)
	2 CSSS	4 (25)	247 (303)
	TNF- $\alpha$	6 (43)	330 (192)

Tab. 5 CD86<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> in Brustepidermis

M: Median; IQA: Interquartilenabstand

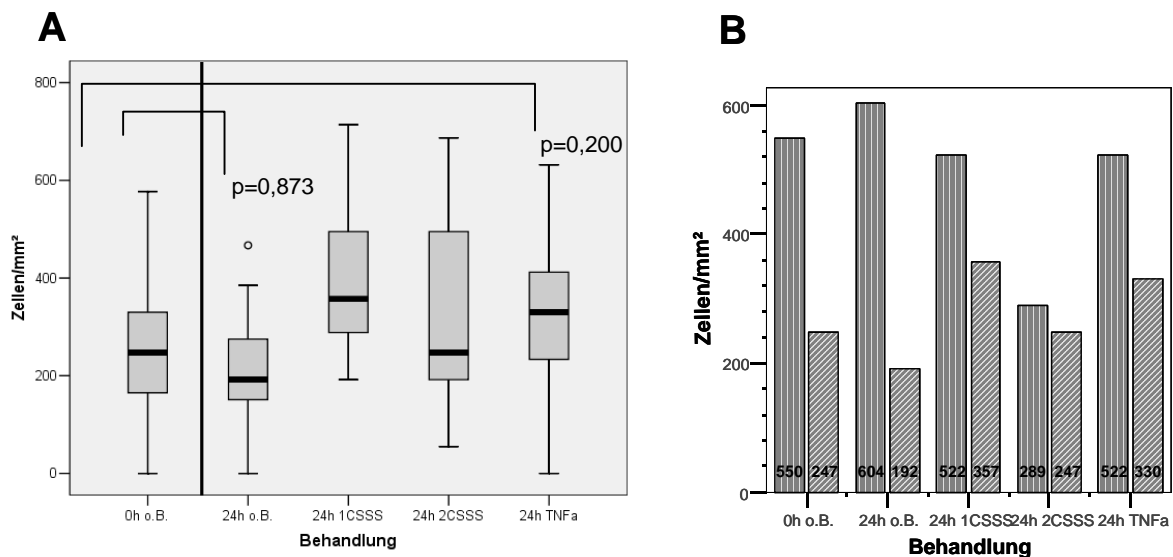


Abb. 11 A: CD86<sup>+</sup> Zellen in Brustepidermis, B: Mittelwerte CD1a<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>

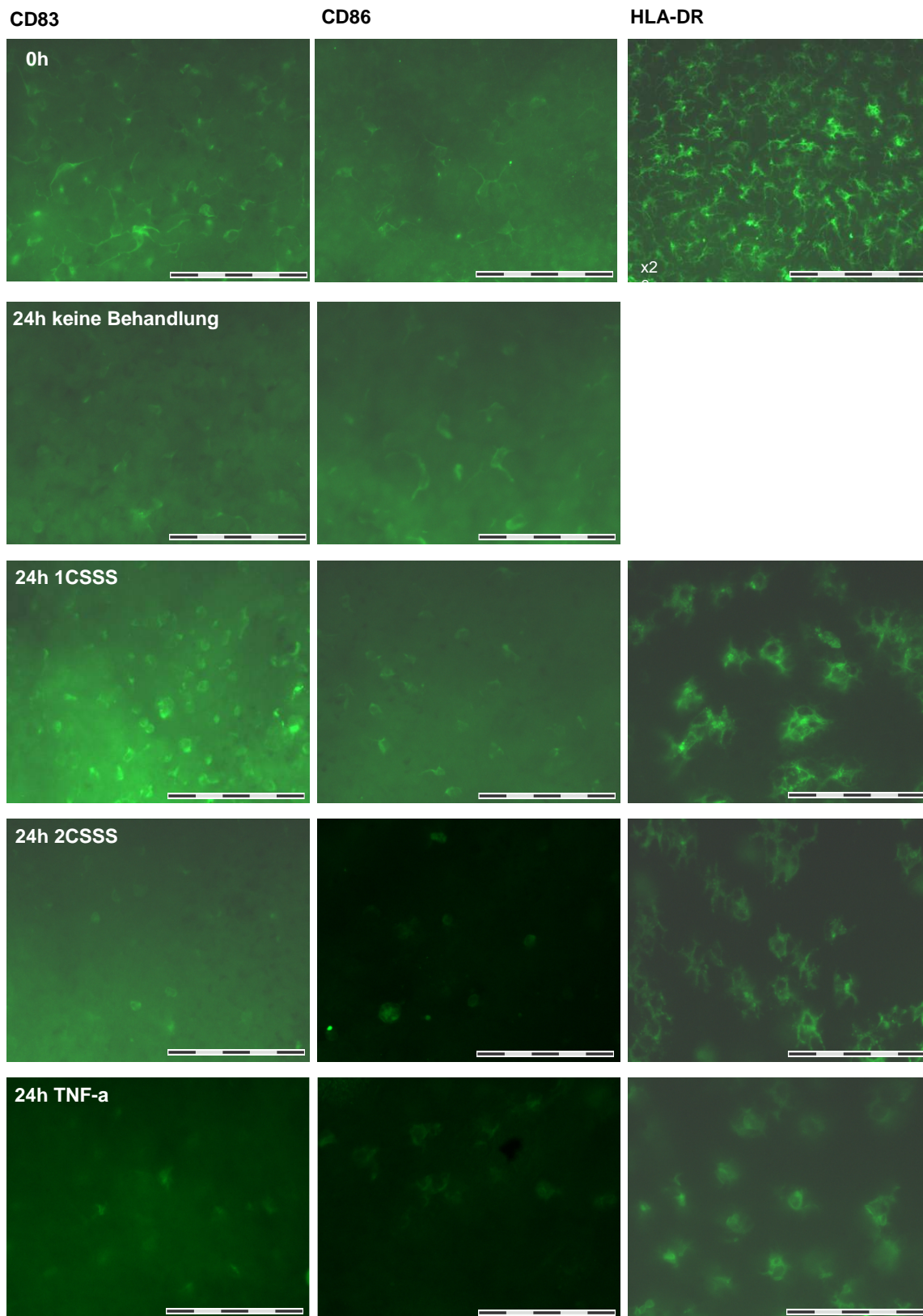
A: Die Anzahl CD86<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von 6 Gesichtsfeldern/n

B: Balkendiagramm. Balken: Median Zellen/mm<sup>2</sup> je Behandlung (Zahlenwert auf Balken mit angegeben), vertikal schraffiert: CD1a<sup>+</sup> Zellen, schräg schraffiert: CD86<sup>+</sup> Zellen

Vergleicht man die Entwicklung der Expression von CD86 und CD1a, wird die gegenläufige Entwicklung der Expression beider Zelloberflächen-Antigene deutlich. Die Zahl unreifer, CD1a exprimierender LC nimmt nach einem CSSS und nach TNF- $\alpha$ -Applikation vergleichbar ab, deutlich höher noch nach zwei CSSS. Dem entgegen wird der Reifungsmarker für DC CD86 nach einem bzw. nach zwei CSSS und nach TNF- $\alpha$ -Applikation deutlich häufiger exprimiert (Abb. 11). Wir beobachten somit zeitgleich eine Abnahme unreifer LC und eine Zunahme reifer DC nach einem und nach zwei CSSS. Diese Entwicklung nach CSSS entspricht dem Expressionsverhalten der Zelloberflächen-Antigene nach TNF- $\alpha$ -Applikation.

Morphologisch betrachtet kann man auch bei CD86<sup>+</sup> Zellen Dendritenstrukturen zu den Zeitpunkten 0 und 24h ohne Behandlung erkennen. Die CD86<sup>+</sup> Zellen beginnen nach einem CSSS im Sinne einer Aktivierung abzurunden. Nach Behandlung mit zwei CSSS bzw. nach TNF- $\alpha$ -Applikation verstärkt sich die Zellabrundung. Insgesamt fällt das Expressionsniveau von CD86 vergleichsweise niedrig aus (Abb. 12).





**Abb. 12 CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen**

CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation in 40-fach Vergrößerung (Maßstab: 100  $\mu$ m), 20-fach Vergrößerung (Maßstab: 200  $\mu$ m)

## 3.2 Kryoschnitte

Bei der Auswertung der Kryovertikalschnitte von Brusthaut lag der Beurteilungsschwerpunkt auf der Dichte und dem histologischen Verteilungsmuster von CD1a<sup>+</sup> Zellen. Da der HF eine herausragende Rolle für die Penetration topisch applizierter Stoffe spielt, sollte untersucht werden, ob und wie sich die Verteilung und die Reaktion auf CSSS bzw. TNF- $\alpha$  von follikulären und interfollikulären CD1a<sup>+</sup> Zellen von einander unterscheidet.

### 3.2.1 Quantitative Auswertung

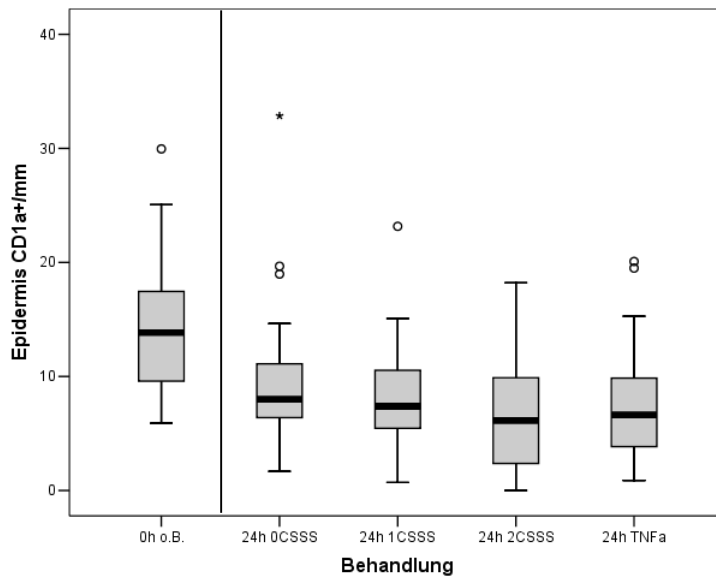
#### 3.2.1.1 Epidermis

In der Epidermis zeigte sich eine Abnahme der CD1a<sup>+</sup> Zellen über die Zeit. Nach 24 und 32h Inkubation ergaben sich in der Zelldichte signifikante Unterschiede zum Ausgangswert, allerdings hielten sich die Zelldichten trotz unterschiedlicher Behandlung (keine Behandlung; ein CSSS; zwei CSSS; TNF- $\alpha$ ) innerhalb einer Behandlungszeitstufe auf ähnlichem Niveau (Abb. 13 u. Abb. 16A). Nach 24h Inkubation ohne Behandlung und nach zwei CSSS zeigten sich die CD1a<sup>+</sup> Zelldichten in der Epidermis kaum verschieden. Auch zeigt sich die Varianz der ermittelten Werte nach zwei CSSS erhöht.

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Kryoschnitte)	Zellzahl/mm M (IQA)
0h	Kontrolle	4 (91)	13,85 (8)
12h	Kontrolle	1 (20)	14,08 (10)
	1 CSSS	1 (32)	11,39 (6)
	2 CSSS	1 (21)	12,16 (4)
	TNF- $\alpha$	1 (20)	11,18 (5)
24h	Kontrolle	3 (63)	7,99 (5)
	1 CSSS	3 (66)	7,4 (5)
	2 CSSS	3 (55)	6,15 (5)
	TNF- $\alpha$	3 (59)	6,62 (6)
32h	Kontrolle	1 (22)	8,53 (4)
	1 CSSS	1 (30)	9,31 (5)
	2 CSSS	1 (19)	9,25 (3)
	TNF- $\alpha$	1 (20)	7,21 (4)

**Tab. 6 CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm in Brustepidermis**

M: Median; IQA: Interquartilenabstand



**Abb. 13 CD1a<sup>+</sup> Zellen in Brustepidermis**

Die Anzahl CD1a<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis in Kryoschnitten von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS)

### 3.2.1.2 Stratum papillare der Dermis

Der Zellzahl-Durchschnitt im Stratum papillare der Dermis unbehandelte Haut lag deutlich unter dem in der Epidermis. Nach 24h Inkubation fanden sich in unbehandelte Haut noch etwa halb so viele Zellen. CD1a<sup>+</sup> Zellen waren nahezu konstant im Stratum papillare zu finden. Nach 32h Inkubation war ein Wiederanstieg der Zelldichte zu beobachten, der aber noch nicht das Ausgangsniveau erreichte Tab. 7 u. Abb. 16B). In der restlichen Dermis ließen sich nur vereinzelt CD1a<sup>+</sup> Zellen sehen.

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Kryoschnitte)	Zellzahl/mm M (IQA)
0h	Kontrolle	4 (91)	1,41 (2)
12h	Kontrolle	1 (20)	0 (0)
	1 CSSS	1 (32)	0 (1)
	2 CSSS	1 (21)	0 (0)
	TNF- $\alpha$	1 (20)	0 (1)

24h	Kontrolle	3 (63)	0 (1)
	1 CSSS	3 (66)	0 (1)
	2 CSSS	3 (55)	0 (3)
	TNF- $\alpha$	3 (59)	0 (1)
32h	Kontrolle	1 (22)	0,48 (1)
	1 CSSS	1 (30)	0,65 (1)
	2 CSSS	1 (19)	0,43 (1)
	TNF- $\alpha$	1 (20)	0,79 (2)

**Tab. 7 CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm im Stratum papillare der Brusthaut**

M: Median; IQA: Interquartilenabstand

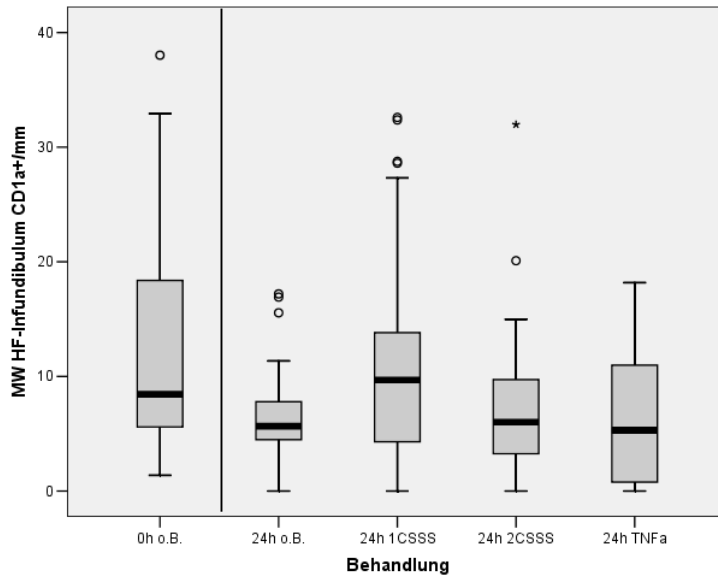
### 3.2.1.3 Infundibulum des Haarfollikels

In den Haarinfundibula fanden wir sehr heterogene Zelldichten, dies ist methodisch zu diskutieren (Tab. 8 u. Abb. 14). Im restlichen HF ließen sich nur vereinzelt CD1a<sup>+</sup> Zellen sehen.

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl n Probanden (ausgezählte Kryoschnitte)	Zellzahl/mm M (IQA)
0h	Kontrolle	4 (32)	8,42 (13)
12h	Kontrolle	1 (0)	
	1 CSSS	1 (15)	5,06 (9)
	2 CSSS	1 (5)	16,3 (7)
	TNF- $\alpha$	1 (9)	13,56 (28)
24h	Kontrolle	3 (31)	5,66 (4)
	1 CSSS	3 (29)	9,68 (11)
	2 CSSS	3 (23)	6 (7)
	TNF- $\alpha$	3 (36)	5,3 (11)
32h	Kontrolle	1 (10)	3,67 (3)
	1 CSSS	1 (7)	14,63 (12)
	2 CSSS	1 (15)	3,65 (7)
	TNF- $\alpha$	1 (0)	

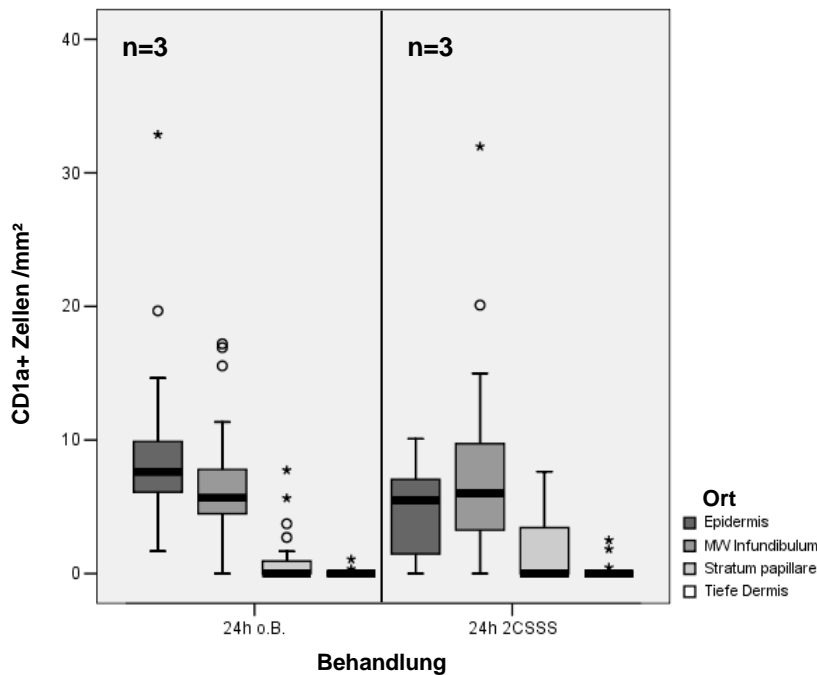
**Tab. 8 CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm in Haarinfundibula der Brusthaut**

M: Median; IQA: Interquartilenabstand



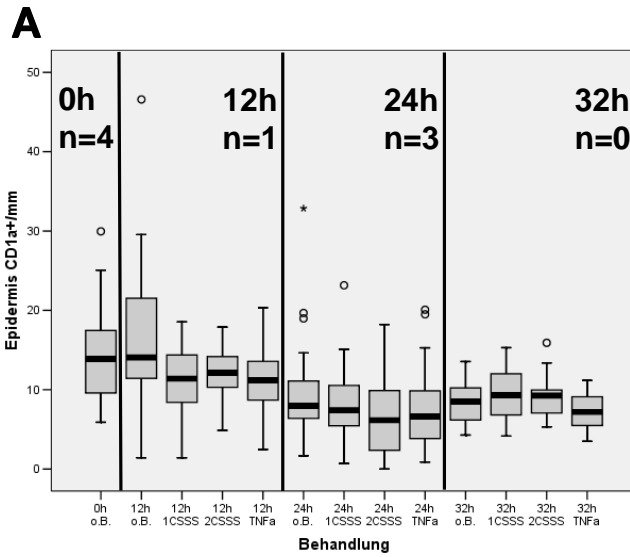
**Abb. 14 CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm in Haarfollikel-Infundibula von Brusthaut**

Die Anzahl CD1a<sup>+</sup> Zellen in Haarfollikel-Infundibula in Kryoschnitten von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS), errechnet mit Hilfe der Mittelwerte der CD1a<sup>+</sup> Zellen/Infundibulum je Kryoschnitt



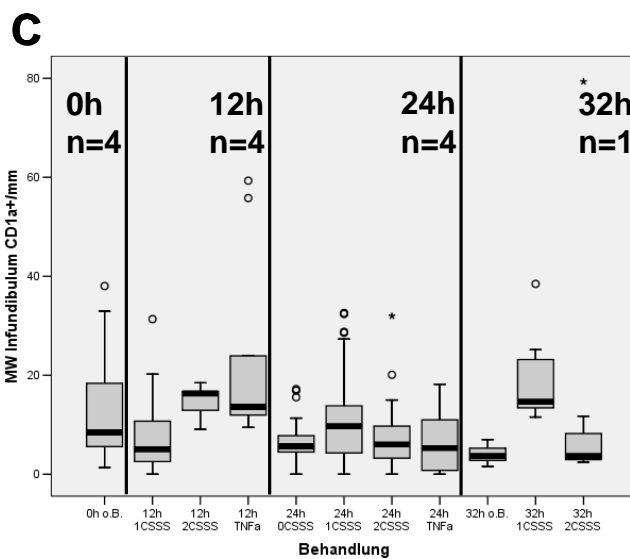
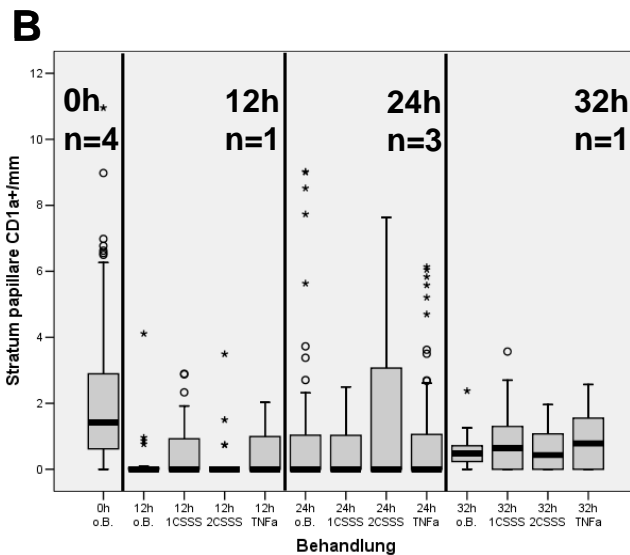
**Abb. 15 Vergleich der Dichte CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> in verschiedenen Bereichen der Haut**

Die Anzahl CD1a<sup>+</sup> Zellen in vertikalen Kryoschnitten von Brusthaut nach 24h Inkubation ohne Behandlung bzw. nach zwei CSSS unterschieden nach folgenden Lokalisationen: Epidermis; Stratum papillare der Dermis, tiefe Dermis, HF-Infundibulum (Mittelwerte der CD1a<sup>+</sup> Zellen/Infundibulum/Schnitt); dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von 20  $\pm$  2 Kryoschnitten/n



**Abb. 16 CD1a<sup>+</sup> Zellen, (A) in der Epidermis, (B) im Stratum papillare und (C) in HF-Infundibula von Brusthaut**

Die Anzahl CD1a<sup>+</sup> Zellen in vertikalen Kryoschnitten von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h, 12h, 24h und 32h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von  $20 \pm 2$  Kryoschnitten/n, bei C Datengrundlage: MW der CD1a<sup>+</sup> Zellen/Infundibulum/ Schnitt

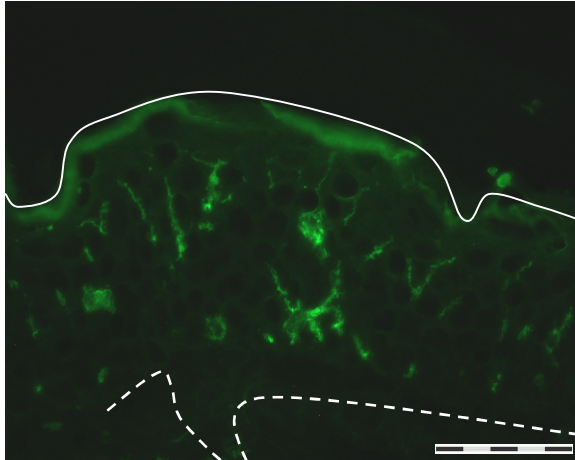


### **3.2.2 Morphologische Auswertung**

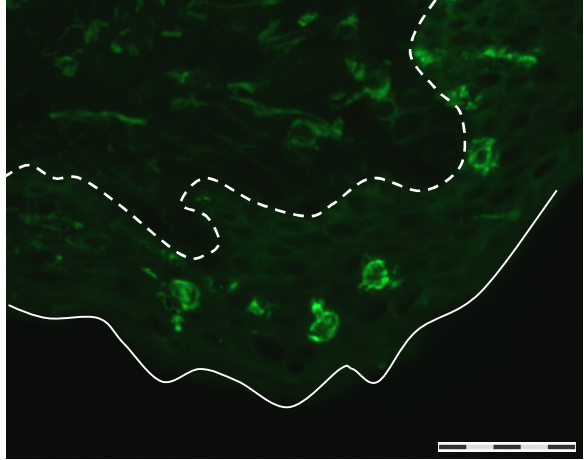
Bei der Untersuchung der Brusthaut-Kryoschnitte auf morphologische Veränderungen von CD1a<sup>+</sup> Zellen sahen wir eine Abkugelung der Zellen und eine Verkürzung bzw. Einziehung der Dendriten 24h nach Behandlung mit CSSS bzw. TNF- $\alpha$ -Applikation (Abb. 17). Dies ist photographisch für die Epidermis, das Stratum papillare der Dermis und für Vellushaarinfundibula dokumentiert. Die genannten morphologischen Umwandlungen sind Zeichen einer immunologischen Aktivierung der Zellen.

Zum Stratum papillare (Abb. 18) ist anzumerken, dass die dort ansässigen CD1<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Zellen der Epidermis des gleichen Schnittes im Allgemeinen stärkere Aktivierungszeichen zeigen. Die CD1a<sup>+</sup> Zellen der Infundibula (Abb. 19) zeichneten sich durch ein stark ausgeprägtes Dendritengeflecht aus. Dies relativiert möglicherweise die geringere Zellkörperdichte in den Infundibula im Vergleich zur Dichte in der Epidermis. Denkbar ist aber auch, dass bei der Zell-Auszählung durch die daraus resultierende Unübersichtlichkeit schon im Vorfeld die Ermittlung der tatsächlichen Zelldichte erschwert wurde.

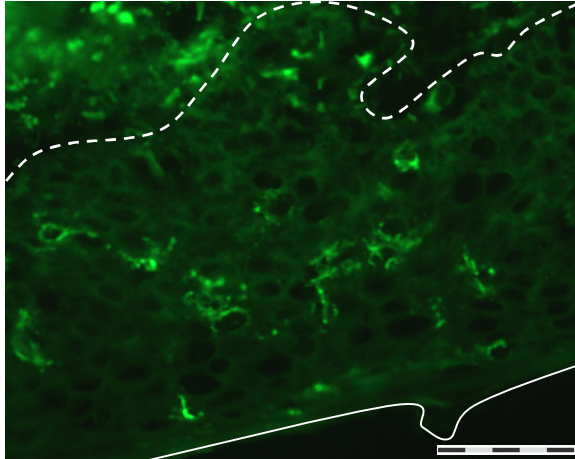
0h keine Behandlung



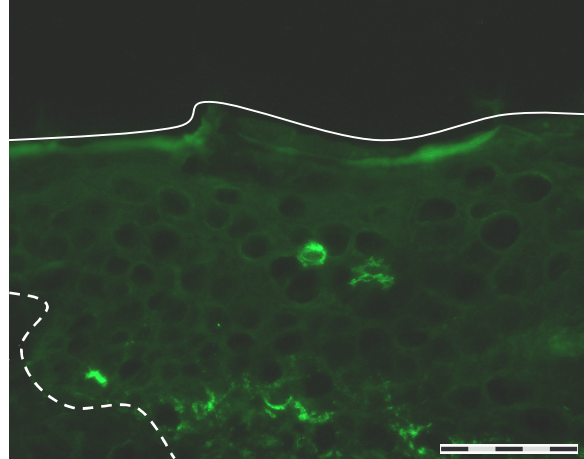
24h 2CSSS



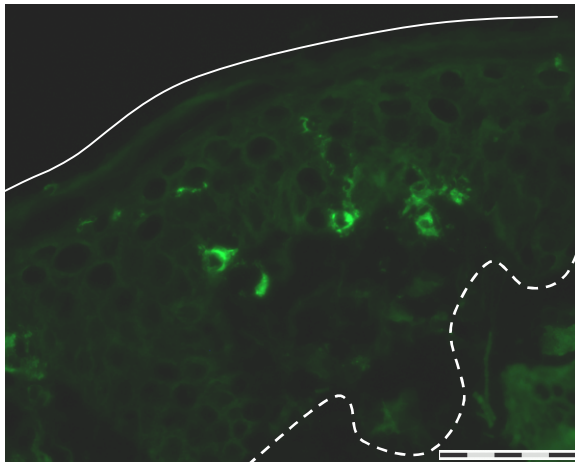
24h keine Behandlung



24h TNF- $\alpha$



24h 1CSSS

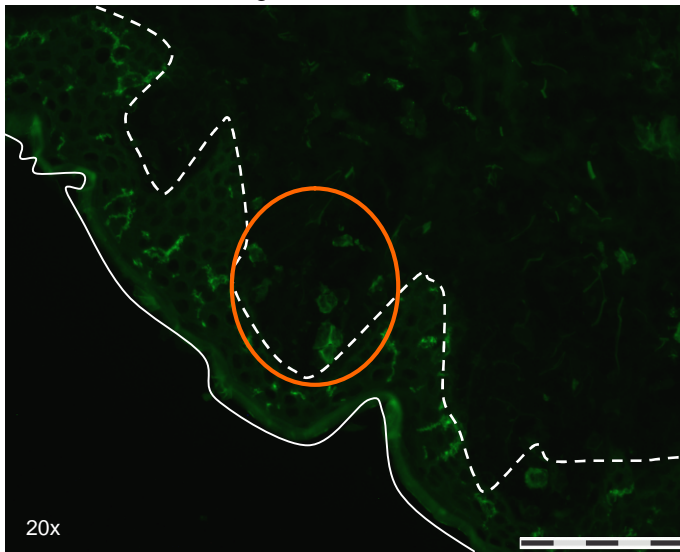


**Abb. 17 CD1a<sup>+</sup> Zellen in Brusthaut-Epidermis**

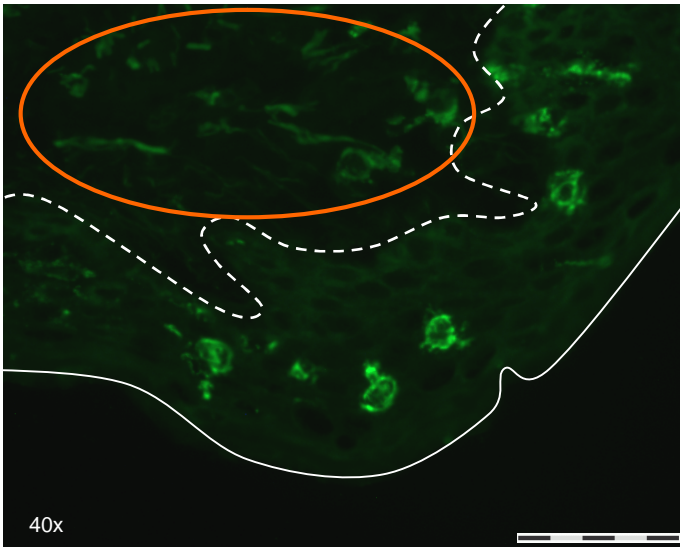
CD1a<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis in vertikalen Kryoschnitten von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation in 40-fach Vergrößerung (Maßstab: 50  $\mu$ m); fotografiert mit Hilfe von anaLYSIS®



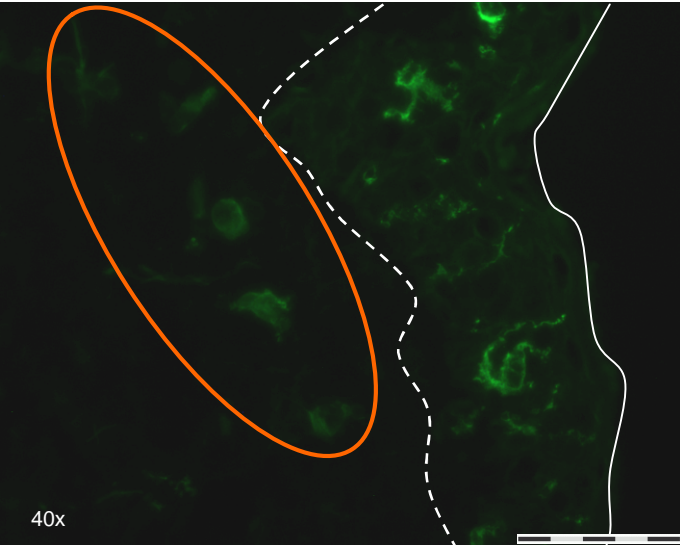
24h keine Behandlung



24h 2CSSS



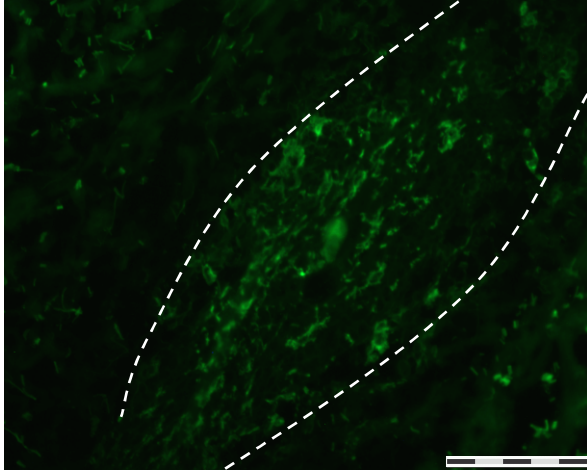
24h TNF- $\alpha$



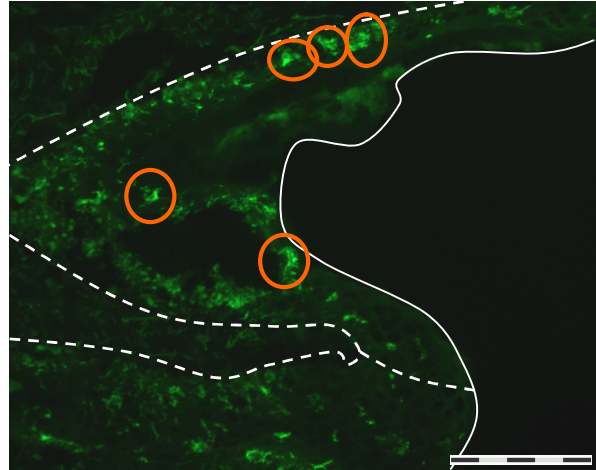
**Abb. 18 CD1a<sup>+</sup> Zellen im Stratum papillare von Brusthaut**

CD1a<sup>+</sup> Zellen im Stratum papillare der Dermis in vertikalen Kryoschnitten von Brusthaut zum Zeitpunkt 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation in 20-fach Vergrößerung (Maßstab: 100 $\mu$ m) bzw. 40-fach Vergrößerung (Maßstab: 50 $\mu$ m); fotografiert mit Hilfe von anaLYSIS®

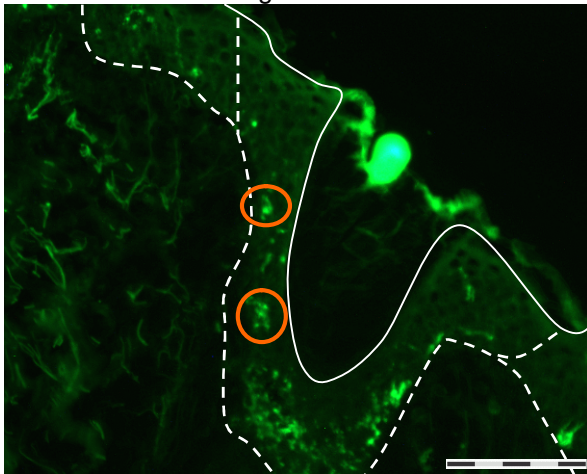
0h keine Behandlung



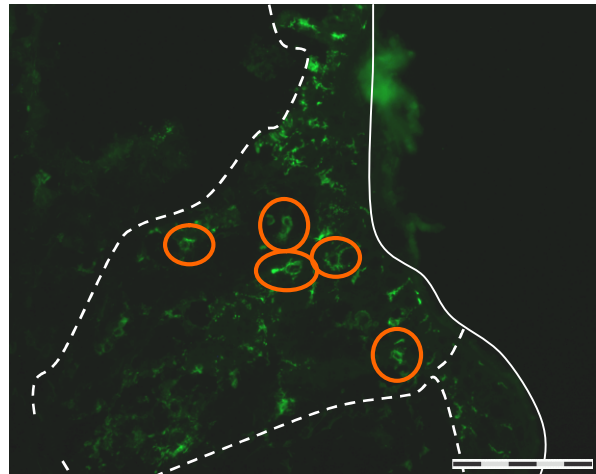
24h 2CSSS



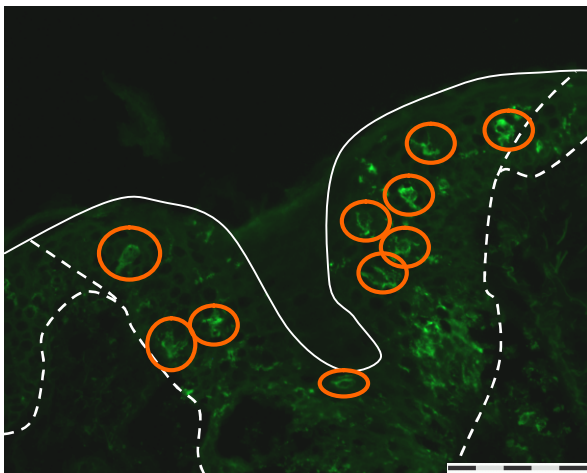
24h keine Behandlung



24h TNF- $\alpha$



24h 1CSSS



**Abb. 19 CD1a<sup>+</sup> Zellen in Haarinfundibula von Brusthaut**

CD1a<sup>+</sup> Zellen im Infundibulum in vertikalen Kryoschnitten von Brusthaut zu den Zeitpunkten 0h und 24h nach Inkubation ohne Behandlung, nach einem CSSS, nach zwei CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation in 20-fach Vergrößerung (Maßstab: 100  $\mu$ m); fotografiert mit Hilfe von anaLYSIS®

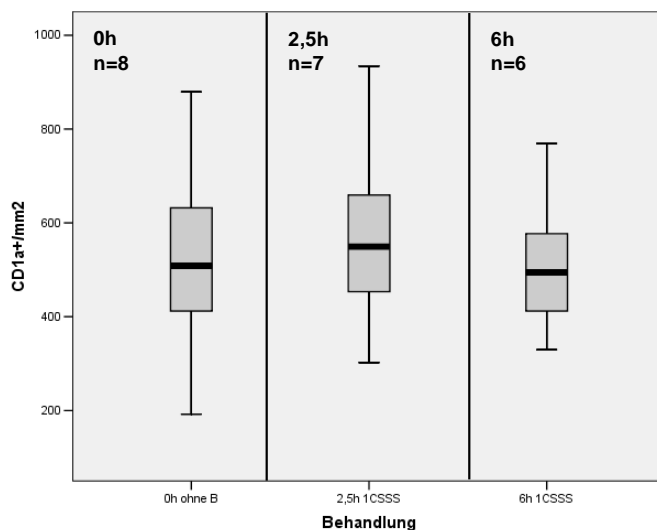
### 3.3 Saugblasen

In Saugblasen-Epidermis blieb die Dichte an CD1a<sup>+</sup> Zellen bis 6h nach einem CSSS nahezu gleich zum Ausgangswert (Tab. 9 u. Abb. 20). Die Morphologie zeigte zu allen Zeitpunkten ähnliche dendritische Zellen (Abb. 21). Es ist zu diskutieren, inwiefern der konstante Befund Teil eines *turnover*-Prozesses in vivo ist. Die Saugblasentechnik ermöglicht die Gewinnung von Epidermis, die sich für die Immunfluoreszenz und den Erhalt von hervorragendem Bildmaterial eignet.

Zeitpunkt	Behandlung	Anzahl Probanden (ausgezählte Gesichtsfelder)	Zellzahl/mm <sup>2</sup> M (IQA)
0h	Kontrolle	8 (50)	508,31 (220)
2,5h	1 CSSS	7 (44)	549,53 (213)
6h	1 CSSS	6 (36)	494,57 (165)

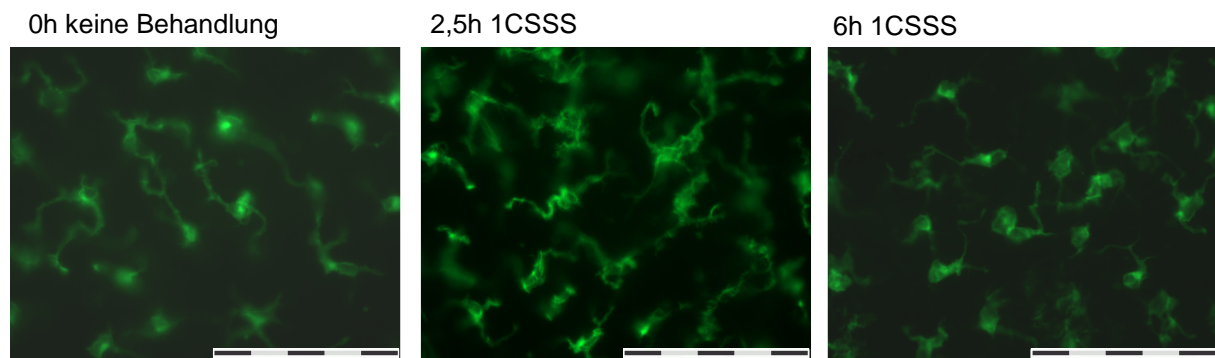
**Tab. 9** CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> in Saugblasendach-Epidermis vom Unterarm

M: Median; IQA: Interquartilenabstand



**Abb. 20** CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> in Unterarmepidermis

Die Anzahl CD1a<sup>+</sup> Zellen in Saugblasendächern des Unterarms zu den Zeitpunkten 0h, 2,5h und 6h; 0h ohne Behandlung, 2,5h und 6h Inkubation nach einem CSSS dargestellt in Boxplots (SPSS); Auszählung von 6 Gesichtsfeldern/n



**Abb. 21 CD1a<sup>+</sup> Zellen in Unterarmepidermis**

CD1a<sup>+</sup> Zellen in Saugblasendächern von Unterarmhaut zu den Zeitpunkten 0h, 2,5h und 6h; nach 0h Inkubation ohne Behandlung, nach 2,5 und 6h Inkubation nach einem CSSS in 40-fach Vergrößerung (Maßstab: 100 µm); fotografiert mit Hilfe von anaLYSIS®

### 3.4 Follikeldichte auf Unterarm- und auf Brusthaut

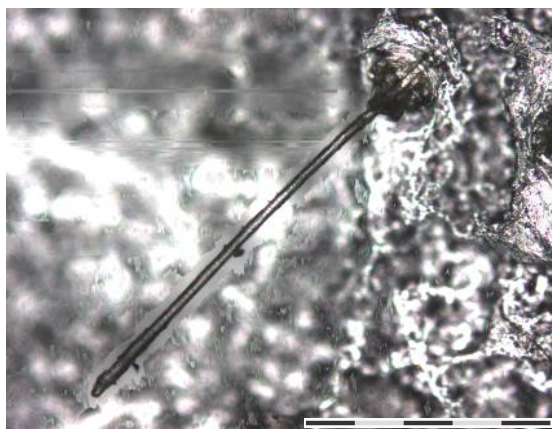
Die CSSS-Abrisse von Unterarmhaut (Saugblasen *in vivo*) und von Brusthaut (Kryoschnitte von exzidiierter Brusthaut) sind auf die HF-Dichte hin ausgewertet worden. Dabei wurde unterschieden, ob der Haarschaft mit ausgerissen wurde oder nicht. Zurzeit ist noch unbekannt, ob das Ausreißen des Haarschaftes durch CSSS, zusätzlich zur Debris-Entfernung, zu einer weiteren Penetrationsverbesserung führt oder ob es im Gegenteil dadurch zu einem Kollaps der HF-Struktur und damit zu einer Reduzierung der penetrationsverbessernden Eigenschaften des CSSS kommt.

An der Unterarminnenseite finden sich viermal mehr HF als auf exzidiierter Brusthaut. Der prozentuale Anteil an mit herausgerissenen Haarschaften liegt *ex vivo* bei 37,93 %, während *in vivo* nur ca. 21,93 % der HF mit Haarschaft vorliegen. Vergleicht man die ermittelten Werte vom ersten und vom zweiten Abriss auf Brusthaut, unterscheidet sich die ermittelte Gesamtfollikeldichte nicht nennenswert. Dafür reduziert sich der Anteil an herausgerissenen Haarschaften vom ersten zum zweiten Abriss von 37,93 % auf 17,64 %.

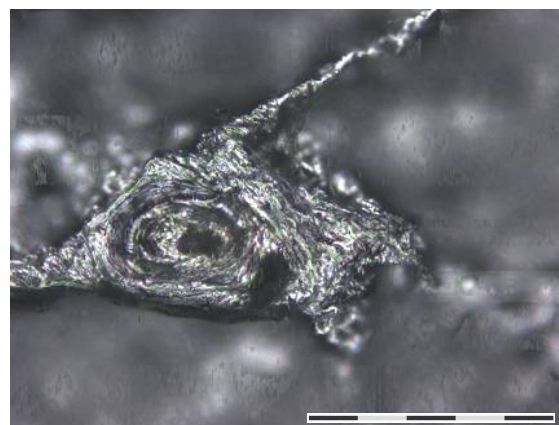
Hautareal und Gewinnungstyp	Anzahl Proben/ Probanden	Follikel/cm <sup>2</sup> mit Haar M (IQA)	Follikel/cm <sup>2</sup> ohne Haar M (IQA)	Follikel/cm <sup>2</sup> insgesamt M
Unterarm <i>in vivo</i> 1. Abriss	6	6,67 (5,13)	23,75 (4,79)	30,42
Brust <i>ex vivo</i> 1. Abriss	5	2,75 (4,23)	4,5 (2,48)	7,25
Brust <i>ex vivo</i> 2. Abriss	5	1 (6,67)	5,67 (3,75)	7,67

**Tab. 10 Vellushaarfollikeldichte an Unterarm *in vivo* und Brust *ex vivo*.**

Es wurden maximal 4 cm<sup>2</sup> pro Probe/Proband ausgezählt. Für jede Probe/ jeden Probanden wurde für die Ermittlung der Follikeldichte ein Mittelwert aus den ausgezählten Quadratzentimetern gebildet (vgl. <sup>115</sup> 18 VHF/cm<sup>2</sup> am Unterarm, 22 VHF/cm<sup>2</sup> auf Brusthaut).



1CSSS 10x



2CSSS 20x

**Abb. 22 Cyanoacrylat-Abrisse mit Haarfollikel-Teilbiopsie**

Links: HF mit Haarschaft (Maßstab: 25 µm), rechts: HF ohne Haarschaft (Maßstab: 50 µm)

### 3.5 CSSS und digitale Fotografie Zwei Methoden zur Ermittlung der Follikeldichte im Vergleich

Um die Methode der HF-Dichte-Ermittlung mittels CSSS-Abriss-Auswertung zu validieren, wurden diese mit der Trichoscan-Digitalfotografie verglichen. An drei Probanden wurden vor dem CSSS-Abriss die Vellushaare gefärbt. Anschließend wurde das für den CSSS-Abriss

vormarkierte Hautareal mit einer Trichoscan-Kamera abfotografiert. Die anschließend durchgeführten Abrisse wurden auf ihre HF-Dichte hin direkt mit den Digitalbildern verglichen.

Die Dichte an HF mit Haarschaften auf der Unterarmhaut und anschließend auf dem Abriss ist auffällig ähnlich und lässt vermuten, dass nahezu alle sichtbaren, über der Hautoberfläche liegenden Haarschaften durch das anschließende CSSS entfernt werden.

Probe	Hautareal	TrichoScan Digitale Fotografie HF mit Haar/cm <sup>2</sup>	CSSS-Abriss HF mit Haar/cm <sup>2</sup>
3	A	6	7
	B	6	8
4	A	4,5	5
	B	1	1
5	A	7,6	10
	B	3	2
MW (SD)		<b>4,68</b> (±2,77)	<b>5,5</b> (±3,5)

Tab. 11 Follikeldichte in Unterarmhaut (Innenseite) (Proben 3-5)

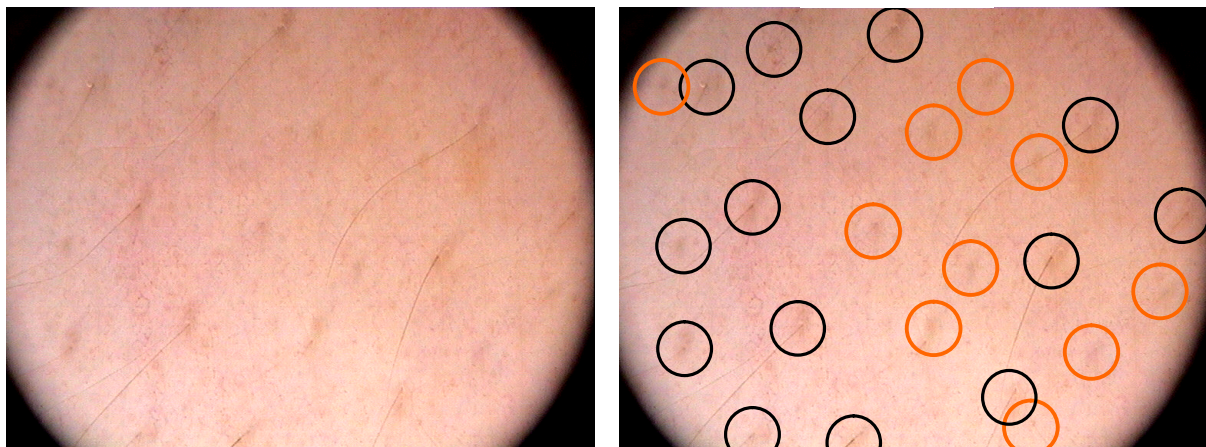


Abb. 23 Trichoscan-Bild: Unterarm (Innenseite)

Haare zuvor mit Récital® gefärbt, ca. 4,6 cm<sup>2</sup> Hautfläche

Rechts: schwarz markiert: HF mit Haarschaft, orange markiert: HF ohne Haarschaft

## 4 Diskussion

### 4.1 LC-Verteilung und das Immunprivileg des Haarfollikels

Die in der vorliegenden Arbeit *in vivo* am Unterarm und an exzidiierter Brusthaut des Menschen ermittelten Dichten epidermaler CD1a<sup>+</sup> Zellen (508 bzw. 550/mm<sup>2</sup>, vgl. Tab. 2 u. Abb. 20) gleichen vorbeschriebenen Werten für LC. Chen *et al.* fanden bei menschlichen Probanden 640 +/- 40.95/mm<sup>2</sup> ATPase-positive LC in der Haut von Armen und Beinen und 740 +/- 28.97/mm<sup>2</sup> LC in Rumpfhaut<sup>143</sup>. Yu *et al.* geben für menschliche Epidermis eine durchschnittliche CD1a<sup>+</sup> LC-Dichte von 582/mm<sup>2</sup> (95% KI= 233-940) an<sup>47</sup>. Interessanterweise fanden Thomas *et al.* eine ähnlich hohe LC-Dichte in Brustepidermis (MW 593,8 HTA-1<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>), allerdings signifikant niedrigere Werte am Unterarm (MW 164,8 HTA-1<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>)<sup>144</sup>. Möglicherweise war die Unterarmhaut der Probanden dieser Studie am Unterarm unkontrolliert Licht exponiert, was durch die Wirkung des UVB-Licht die Emigration von LC bewirkt<sup>145</sup>. Dieser Effekt wurde in unserer Arbeit durch die Durchführung der Unterarmepidermis-Gewinnung im Spätherbst vermieden.

#### *Das Immunprivileg des Haarfollikels*

In Kryoschnitten von exzidiierter Brusthaut zeigten sich in der vorliegenden Arbeit CD1a<sup>+</sup> Zellen vergleichbar häufig in der Epidermis und im HF-Infundibulum (13,85/mm bzw. 8,42/mm), in den unteren Abschnitten des HF fanden sich so gut wie keine LC (vgl. Tab. 6 u. Tab. 8).

Schon 1963 beobachtete Breatnach in menschlicher Haut die Abwesenheit von LC in den Schweißdrüsen und den Abschnitten unterhalb der Bulge-Region, d.h. dem Ansatzpunktes der Musculi arrector pili. In der äußeren Wurzelscheide des Infundibulum (also der Zellschicht, in die direkt die Epidermis übergeht) und in den Ausführungsgängen der Talgdrüsen waren LC so wie in unseren Untersuchungen dagegen konstant vertreten<sup>146</sup>. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen wurde interessanterweise noch die mögliche Abstammung der LC von Melanozyten diskutiert. Auch Paus *et al.* beobachten im HF, dass Immunzellen wie CD1a<sup>+</sup> LC und T-Zellen sich hauptsächlich im distalen HF-Epithel befinden. Der anagene proximale HF wird als annähernd frei von Immunzellen beschrieben und wird dem entsprechend als immunprivilegierte Region bezeichnet. Der Verlust des Immunprivilegs mag dem zufolge ein möglicher Mechanismus der Pathogenese der Alopezia areata sein. Die quantitative Analyse vom Moresi und Horn ergibt für das Infundibulum einschließlich Bulge-Region 16,16 CD1a<sup>+</sup> Zellen/mm und somit eine doppelt so hohe Dichte wie in unserer Arbeit. Allerdings ist der

ermittelte Wert nur beschränkt vergleichbar, den es wurden von 10 Probanden die verschiedenste Körperregionen ausgezählt und daraus der Durchschnitt gebildet. Im proximalen HF-Abschnitt fanden auch sie nur selten LC (1,06/mm)<sup>14</sup>. Das Phänomen des Immunprivilegs im proximalen HF ist somit ein gut dokumentierter Sachverhalt, der sich wiederum mit unseren Daten deckt.

Bisher am umfassendsten stellten Thomas *et al.* bei ihrem Vergleich von interfollikulärer, behaarter und unbehaarter Epidermis menschlicher Haut *post mortem* zunächst fest, dass sich in ersterer allgemein signifikant mehr LC befinden, was sich ebenfalls mit unseren Ergebnissen deckt. Zusätzlich untersuchten auch sie Hautanhangsgebilde, insbesondere die im Vergleich zu Vellus-HF deutlich größeren Terminal-HF der Kopfhaut. Ohne allerdings die makroskopische anatomische Situation näher zu präzisieren, unterteilte die Arbeitsgruppe den HF in einen oberen, mittleren und unteren Teil und stellte superfiziell eine Dichte von 545 HTA-1<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> fest, im mittleren Bereich 135/mm<sup>2</sup> und tief 4/mm<sup>2</sup> (MW). Ähnlich wie bei Breathnach werden wenige LC in den peripheren Abschnitten der Talgdrüsen beschrieben. Dabei wurde problematisiert, dass es durch die tangentielle Schnittführung durch den Haarfollikel zum Eindruck einer höheren Zelldichte komme und daher die Darstellung pro Quadratmillimeter bevorzugt wurde. Thomas *et al.* fanden oberflächlich in den Haarfollikeln der Kopfhaut nur knapp niedrigere LC-Dichten als in Brusthautepidermis (dort 593,8/mm<sup>2</sup> bzw. 16,2/mm). Die Vergleichbarkeit der von uns in der Epidermis und im Haarfollikel bestimmten Werte mit vorangegangenen Arbeiten unterstreicht die Stimmigkeit unserer Methodik der Zelldichte-Ermittlung.

## 4.2 Aktivierungs- und Migrationsmuster von LC

### *Morphologie*

Durch Larsen *et al.* wurde die Abkuglung und Vergrößerung der Zellen und die Verkürzung bzw. Einziehung der Dendriten in einem aufwendigen Haut-Organ-Kultursystem als ein nach 4h einsetzender Prozess beschrieben.<sup>62</sup> Wir konnten in exidierter menschlicher Haut Abkuglung, Vergrößerung der Zellen und die Verkürzung bzw. Einziehung der Dendriten 24h nach Behandlung mit mildem CSSS bzw. TNF- $\alpha$ -Applikation bestätigen (Abb. 17). Der bereits intensiv untersuchte Immunstimulator TNF- $\alpha$  wurde in unserer Versuchsreihe als positive Kontrolle gewählt. In bisherigen Untersuchungen wurde TNF- $\alpha$  u.a. zur LC-Stimulation intrakutan injiziert. Erstaunlicherweise führte die in unseren Untersuchungen erstmalig topisch durchgeführte Applikation zu einer reproduzierbaren morphologisch sichtbaren Aktivierung der LC. Dabei wurden an Nishibu *et al.* angelehnte Dosen an TNF- $\alpha$  verwendet, obwohl im Vorfeld



angenommen werden konnte, dass die tatsächlich intrakutan wirksam werdene TNF- $\alpha$ -Menge wegen der vorangehenden Penetrationsprozesse geringer ausfallen würde als bei direkter intrakutaner Injektion. Anders als zuvor dokumentiert, konnte keine Hyperelongation der Dendriten während der Reifung beobachtet werden. Stattdessen kam es zu direktem, deutlichen Abkugeln der Zellen, welches wir als Ausdruck der Effektivität der Stimulation durch CSSS bzw. TNF- $\alpha$  werten. Dies ist photographisch für die Epidermis, das Stratum papillare der Dermis und für Vellushaar-Infundibula dokumentiert. Auch Kissenpfennig *et al.* beobachteten 16 bis 24h nach konventionellem Tape stripping nach Tigelaar gerundete Zellkörper und weniger, dickere, unverzweigte Dendriten <sup>147</sup>. Desweiteren bestätigten sie die Beobachtungen von Yu *et al.*, dass die LC sich meist auf einer Ebene befinden und dokumentierten, dass es ohne exogene Reifungssignale kaum direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen *enhanced green fluorescent-protein* (EGFP)<sup>+</sup> LC gibt. Nach Haut-Organ-Kultur bzw. TNF- $\alpha$ -Injektion gab es jedoch auffällige Überlappungen von Dendriten zwei oder sogar drei benachbarter Zellen <sup>50</sup>, die auch wir mittels CSSS beobachten konnten. Für die praktische Anwendung aufschlussreich ist die Tatsache, dass in Epidermisplättchen bereits ein CSSS eine morphologisch immunostimulatorische Wirkung vergleichbar mit der hier erstmalig erfolgten topischen Applikation von TNF- $\alpha$  entfaltet. Recht wahrscheinlich wird die Aktivierung über CSSS sekundär auch durch TNF- $\alpha$  mediiert. Der chemische Reiz durch das TNF- $\alpha$  wäre also unmittelbarer vergleichbar mit dem physikalischen Reiz durch das CSSS.

Zum Stratum papillare (Abb. 18) ist anzumerken, dass die dort ansässigen CD1<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Zellen der Epidermis des gleichen Schnittes im Allgemeinen stärkere Aktivierungszeichen zeigen. Das wird verständlich, wenn man beachtet, dass LC gerade nach Aktivierung ihre Kontakte mit den epidermalen Keratinozyten verlieren und die Basalmembran überqueren, um zunächst in das Stratum papillare der Dermis zu gelangen <sup>52, 55</sup>. In vorherigen Untersuchungen ergab intravitale konfokale Mikroskopie eine erhöhte Mobilität 24h nach Tape stripping, mit verschiedenen Dendriten-Verhaltenstypen (Extension, Retraktion, transientes Verhalten). Dabei zeigten die wenigen in der Nähe von HF oder am Dermis/Epidermis-Übergang dokumentierten LC wie gezogen wirkende Bewegungen <sup>147</sup>. Da unsere Daten ebenso wie zuvor veröffentlichte Ergebnisse zeigen, dass die meisten LC über 16h brauchen, um deutliche Aktivierungszeichen zu zeigen, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Beweglichkeit sekundär durch Produktion von Entzündungsmediatoren durch mechanisch gereizte Keratinozyten erlangt wird. Dem entsprechend zeigten Nickoloff und Naidu zuvor, dass konventionelles Tape stripping die IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Produktion auf Keratinozyten induziert <sup>127</sup>. Dass ein CSSS von seiner

Epidermisentfernung her zehn konventionellen Tape strippings entspricht, erklärt bei vergleichbar minimalem Aufwand die deutlich immanentere immunmodulatorische Wirkung von CSSS. Diese beobachteten Zeichen einer immunologischen Aktivierung sind fundamental für die Anwendung von CSSS als Adjuvans zur topischen Vakzinierung.

Analog zu uns fanden auch Holzmann *et al.* nur vereinzelt MHCII<sup>+</sup> Langerin<sup>+</sup> Zellen in der Dermis<sup>130</sup>. Dass die CD1a<sup>+</sup> Zellen der Infundibula (Abb. 19) in der vorliegenden Arbeit ein im Vergleich zu interfollikulären CD1a<sup>+</sup> Zellen hier erstmalig beschriebenes besonders stark ausgeprägtes Dendritengeflecht zeigen, hat u.U. methodische Ursachen. So können HF tangential angeschnitten werden. Dadurch wird statt eines Vertikalbilds nahezu eine Aufsicht ähnlich einem horizontalem Schnitt durch die Epidermis erzeugt<sup>144</sup>. Da die Dendriten horizontal parallel zur Hautoberfläche ausgerichtet sind<sup>47</sup>, sind diese in der Aufsicht annähernd vollständig zu erkennen. Weil durchgeschnittene HF in unserer Arbeit nicht ausgewertet wurden, relativiert dieser Verzerrungseffekt nur ansatzweise unsere Beobachtung. Vielmehr ist es möglich, dass die LC in den HF eine höhere Aufnahmebereitschaft für mögliche Pathogene zeigen, da sie penetrierenden Substanzen deutlich stärker exponiert sind als interfollikuläre LC. Eventuell ist das erleichterte „Abfangen“ von Antigenen auch ein Aspekt des Immunprivilegs des HF. Anders als in vorherigen Arbeiten<sup>50</sup>, können hier Überschneidungen von Dendriten zum Zeitpunkt 0h nicht ausgeschlossen werden. Die beobachtete geringere Zellkörperdichte in den Infundibula im Vergleich zur Dichte in der Epidermis ist methodologisch eventuell durch das stark fluoreszierende dichte Dendritengeflecht zu erklären, das einen Teil der Zellkörper verdeckt haben mag. Die nahezu vollständige Abwesenheit von LC in den restlichen HF-Arealen deckt sich u.a. mit den Beobachtungen von Paus *et al.*, der die stark herabgesetzte LC-Dichte im Bulbusbereich als Komponente des Immunprivilegs des HF wertet<sup>112</sup>.

#### *Migration von CD1a<sup>+</sup> Zellen*

In dieser Arbeit erfolgte die Durchführung von CSSS sowohl an exzidiertem Haut als auch *in vivo*. Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens der LC ist dieser Unterschied bedeutend, da nur *in vivo* eine eventuelle systemische Rekrutierung von LC-Vorläufern möglich ist.

Anders als im *steady state* gilt im entzündlichen Milieu die Einwanderung von extraepidermalen LC-Vorläufern als essentiell<sup>59, 84, 85</sup>. An exzidiertem Haut, wo keine Repopulation möglich ist, zeigte sich in unserem Modell entsprechend 12, 24 und 32h nach CSSS eine kontinuierliche Abnahme von LC in der Epidermis. *In vivo* in einem wesentlich kürzeren Zeitfenster von 6h nach CSSS veränderte sich die Anzahl an LC allerdings kaum. Kissenpennig *et al.* beobachteten

ebenfalls, allerdings bei Mäusen, dass die meisten LC im *steady state* innerhalb einer Stunde sesshaft sind; 5h nach Tape stripping waren die meisten LC und Dendriten verglichen zur Kontrolle weiterhin unverändert<sup>147</sup>. Im Gegensatz dazu hatten Lessard *et al.* beobachtet, dass LC in der Epidermis von Meerschweinchen bis 24h nach Tape stripping nicht mehr nachweisbar seien<sup>86, 87</sup>. Allerdings wurde die Abwesenheit der LC mit der exzessiven Durchführung von Tape strippings und der daraus resultierenden Abtragung der Epidermis begründet. Strid *et al.* wiederum zeigten anhand ihres Mausmodells, dass es zusätzlich zu Tape stripping einer Applikation von Antigen bedürfe um die LC überhaupt zur Migration zu bewegen. Innerhalb von 2h nach Tape stripping und epikutaner Antigenauftragung sei die Mehrheit der LC aus der Epidermis verschwunden. Eine alleinige Auftragung von Ovalbumin ohne vorheriges Tape stripping brachte interessanterweise keine Emigration der LC in die Lymphknoten<sup>89</sup>. Eine ähnliche Zeitdynamik mit einer kompletten *in vivo* Leerung der Haut von Langerin<sup>+</sup> DC 24h nach Behandlung erreichten Kissenfennig *et al.* wiederum bei Mäusen durch Applikation von TRITC. Erst nach 14 Tagen kam es zu spärlichen Zell-Anhäufungen, die Ausgangsdichte wurde nach ungefähr 6 Wochen erreicht<sup>147</sup>.

Bei diesen widersprüchlichen Aussagen fällt neben dem Aspekt der epikutanen Antigenauftragung auf, dass in den vorgestellten Arbeiten die Menge der durchgeführten Tape strippings erheblich variiert. Tatsächlich war es das Ziel früherer Arbeiten mittels Tape stripping das Stratum corneum gänzlich zu entfernen<sup>59, 87</sup>. Verständlicherweise birgt die Anwendung von 15 Tape strippings und mehr eine erheblichen inflammatorische Wirkung in sich, die anscheinend ausreicht um LC annähernd vollständig aus der Epidermis emigrieren zu lassen bzw. mechanisch zu entfernen. Holzmann *et al.* zeigten, dass 12 Tape strippings *in vivo* eine deutliche Entzündungsreaktion mit erhöhter Expression von TNF- $\alpha$  induzieren, ohne dass die LC mechanisch entfernt werden. 30 min nach dem Strippen blieb aber auch hier eine nennenswerte Abnahme von LC aus. Die LC-Abnahme erreichte erst nach einer knappen Woche ihren Höhepunkt. Bei Strid *et al.* reichten 5 bis 8 Tape strippings aus um eine vollständige Entfernung des Stratum corneums zu erreichen. Nach zusätzlicher Antigenauftragung folgte die Emigration der LC mit Repopulation nach 14h<sup>89</sup>. Allerdings werden laut Ossadnik schon bei einem CSSS ca. 30 % des Stratum corneum entfernt<sup>133</sup>.

#### *Weitere methodologische Überlegungen*

Die Dichte in unbehandelten Epidermisplättchen von Brusthaut blieb nach 24h nahezu konstant, zeigte aber eine größere Variationsbreite. In Kryoschnitten exzidiertter Brusthaut nahm die

Dichte an CD1a<sup>+</sup> Zellen nach 24h allerdings ohne weitere Behandlung um 57,69 % ab. Mittlerweile konnte die These, dass die meisten LC unter *steady state*-Bedingungen sesshaft seien und Hautentzündung zu Bewegung und Emigration der LC in die Lymphknoten führe mehrfach bestätigt werden <sup>89, 147</sup>.

Bei Brusthautexzidat wurde als Zeitpunkt 0h der Moment nach Behandlung der Hautprobe direkt nach Eintreffen der Hautprobe definiert. Möglicherweise erklärt sich aber die in unserer Arbeit ohne voraus gegangene Behandlung im Labor beobachtete Zell-Abnahme in Kryoschnitt-Epidermis durch Manipulation der Haut. Es wird postuliert, dass LC tolerogen seien, wenn sie Antigen unter *steady state*-Bedingungen präsentieren (vgl. Abb. 2). Erst nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren komme es zu Reifung und Induktion der Effektor-T-Zell-Antworten <sup>148, 149</sup>. Allerdings berichten Mayerova *et al.* auch, dass bei hoher Anzahl an Antigen-spezifischen T-Zellen *steady state*-LC fähig dazu zu sein scheinen, naiven T-Zellen Keratinocyten-exprimierte Eigen-Antigene auf immonogene Art zu präsentieren <sup>150</sup>. Die Exzision der Haut selbst bringt eine gewisse, nicht unwesentliche Traumatisierung mit sich, die über Zytokinausschüttung zu einer Voraktivierung der LC geführt haben mag, und die Abnahme von CD1a<sup>+</sup> Zellen nach 24h ohne vorherige Behandlung im Labor erklären kann. In diesem Zusammenhang ist auch unsere Beobachtung interessant, dass die Epidermis in Schnittrandnähe auffällig LC-arm war. Auch Nishibu *et al.* werteten die beobachtete Grundaktivität *ex vivo* bei einer großen Mehrheit der LC als Ausdruck einer beschleunigten Reifung durch die unvermeidbare Freisetzung von mit der Gewebeentnahme vom lebenden Tier verbundener Entzündungssignale mit einer anschließender Aussetzung des Gewebes an eine *in vitro* Umgebung <sup>50</sup>.

Die Abnahme der Gesamtzahl an CD1a<sup>+</sup> Zellen in Epidermisplättchen war 24h nach zwei CSSS mit ca. 47 % verglichen zum Zeitpunkt 0h stärker als nach einem CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation (vgl. Abb. 6 und Tab. 2). Anders als in Epidermisplättchen nahm in Kryoschnitt-Epidermis die CD1a<sup>+</sup>-Zelldichte nach TNF- $\alpha$ -Applikation mit 52,21% ähnlich ab wie nach 2 CSSS mit 55,6 % (vgl. Tab. 6). Nishibu *et al.* beobachteten ihrerseits nach Injektion von TNF- $\alpha$  28% Abnahme der Flächendichte von EGFP<sup>+</sup> LC <sup>50</sup>. Die Abnahme der CD1a<sup>+</sup> Zellen nach CSSS war im Infundibulum interessanterweise geringer als in der Epidermis. Dieser Aspekt ist im Hinblick auf eine ausgedehnte Aufnahme von Antigen bei topischer Vakzinapplikation von Vorteil.

### *Expression verschiedener CD als Ausdruck der Aktivierung*

In der vorgestellten Arbeit wurde der Oberflächenmarker CD1a als Marker für LC verwendet. In der Epidermis, wo der Hauptteil der Untersuchungen durchgeführt wurde, ist CD1a hoch spezifisch für LC<sup>151</sup>. Eine weitere CD1a<sup>+</sup> Zellpopulation ist dort nicht bekannt. Für Untersuchung dermalen dendritischer Zellen ist dieser Marker jedoch umstritten. Mittels Flow Cytometry von Brusthaut Zellsuspensionen unterschieden sie drei Klassen von MHCII<sup>+</sup> APC in der Dermis: CD1a<sup>high</sup> CD207<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> dermale LC; CD1a<sup>mid</sup> CD207<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup>, also dermale CD1a<sup>+</sup> von LC verschiedene APC und CD14<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>CD207<sup>-</sup> dermale APC. Es zeigte sich, dass sowohl CD14<sup>+</sup> als auch CD1a<sup>+</sup> dermale APC naive CD4<sup>+</sup> Zellen stimulieren können, wobei die CD1a<sup>+</sup> Zellen allerdings potenter sind. Auch die Marker CD40, CD80 und CD86 wurden jeweils stärker exprimiert; die HLA-DR-Level waren vergleichbar hoch. Für die Nomenklatur der eigenen Arbeit ist vor allem von Bedeutung, dass bei Angel *et al.* alle CD1a<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis CD207<sup>+</sup> waren, die Mehrheit der CD1a<sup>+</sup> APC in der Dermis jedoch CD207<sup>-</sup>, was soviel bedeutet wie, dass korrekterweise nicht alle CD1a<sup>+</sup> Zellen in Stratum papillare als LC zu bezeichnen sind. Diese CD1a<sup>+</sup> dermalen APC, die sich von LC unterscheiden, die chemotaktisch auf CCR7-Liganden antworten und fähig sind eine große Bandbreite naiver T-Zellen zu stimulieren, fanden sich nur im Stratum papillare (*upper dermis*), der einzigen Schicht der Dermis, die auch in der vorliegenden Arbeit nennenswerte Dichten an CD1a<sup>+</sup> aufweist<sup>152</sup>. Andere Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass LC selbst unter Zuhilfenahme verschiedener Marker nicht einwandfrei von dermalen DC zu unterscheiden seien: LC zeigten sich CD11b<sup>low to high</sup> CD205<sup>inter to high</sup>; interstitielle und dermale DC dagegen CD11b<sup>high</sup> CD205<sup>low to inter</sup><sup>153, 154</sup>.

24h nach CSSS zeigten sich in der vorgelegten Arbeit CD1a<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> sowie CD86<sup>+</sup> Zellen mit deutlichen morphologischen Aktivierungszeichen vergleichbar mit der Wirkung von TNF- $\alpha$  (vgl. Abb. 7 u. Abb. 12). HLA-DR<sup>+</sup> (somit MHCII<sup>+</sup>) Zellen waren unter Kontrollbedingungen vergleichbar häufig wie CD1a<sup>+</sup> Zellen (vgl. Abb. 9). 24h nach zwei CSSS reduzierte sich die Anzahl HLA-DR<sup>+</sup> Zellen um nur ca. 22 % verglichen zur 0h-Kontrolle (vgl. Tab. 3). Die Abnahme fiel damit deutlich geringer aus als bei CD1a<sup>+</sup> Zellen. CD83<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen korrelierten unter den verschiedenen Behandlungen in ihrem Expressionsverhalten (Abb. 10), wobei im Durchschnitt etwa ¼ weniger CD83<sup>+</sup> Zellen als HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen zu finden waren. Das als Reifungsmarker geltende Oberflächenantigen CD86 wurde 24h nach CSSS in vergleichbarer Weise wie nach TNF $\alpha$ -Applikation hochreguliert, während CD1a in seiner Expression deutlich abnahm (vgl. Abb. 11). Die Arbeitsgruppe um Kissenpfennig konnte wiederum ein ähnliches Expressionsniveau kostimulierender Moleküle im *steady state* wie nach Entzündung

feststellen. Zur intradermalen Injektion bestimmte, aus dem Knochenmark stämmige LC-Vorläufer (BMDC) exprimierten dort in  $10,5 \pm 1,9$  % der Fälle CD86 ohne jegliche Zugabe von Reifungsstimuli<sup>147</sup>. In unserer Arbeit fanden sich zum Zeitpunkt 0h bereits halb so viele CD86<sup>+</sup> Zellen wie CD1<sup>+</sup> Zellen in Saugblasenepidermis. Betrachtet man Studien, die die LC-Reifung nach Antigen-Auftragung untersuchen, stellt man fest, dass der Höhepunkt als maximale Expression von Reifungsmarkern durchschnittlich in der gleichen Zeit erreicht wird wie nach alleinigem Setzen von Entzündungsreizen und die phänotypische Ausprägung der Reifung ähnlich hoch oder höher ist. Nishibu *et al.* dokumentierten den Höhepunkt der Reifung 24-30h nach 2,4-Dinitro-1-Fluorobenzen (DNFB)-Applikation<sup>50</sup>.

Bei Stoitzner *et al.* führte Hapten-Applikation zu einer über zehnfachen Steigerung der Anzahl Langerin-exprimierender Zellen in Haut-drainierenden Lymphknoten und zu phänotypischer und funktionaler Reifung<sup>52</sup>. LC, die unter entzündlichen Bedingungen den Lymphknoten erreichen, zeigen keine reifere Oberfläche bezüglich CD80, CD86, CD40 und MHCII als solche nach Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat (TRITC)-Applikation<sup>147</sup>. Spörri und Reis e Sousa demonstrierten ihrerseits, dass indirekt *in trans* durch Nachbarzellen (Keratinocyten) aktivierte LC MHCII und kostimulierenden Molekülen hochregulieren. Im Gegensatz zu *in cis* über TLR aktivierte DC fehlt diesen aber die Fähigkeit IL-12 zu produzieren und CD4-T-Zellen zu Effektorzellen machen<sup>155</sup>. Daraus ergibt sich, dass ein reifer Phänotyp, definiert durch ein hohes Expressionsniveau von MHCII und kostimulierenden Molekülen, nicht zwangsläufig gleichzeitig für funktionelle Reife, definiert als Fähigkeit Effektor-T-Zellen zu induzieren, spricht. Ausschlaggebend wäre somit die Antigen-Beladung. Der sterile Trigger, der zur beobachteten *steady state* Migration benötigt wird, muss allerdings noch bestimmt werden.

Das Ausmaß der epikutanen Antigen-Auftragung und die Stärke des mechanischen Reizes in Form der Anzahl durchgeführter Tape strippings scheinen die beiden entscheidenden Einflussgrößen für den Umfang der Aktivierung und Migration der LC zu sein. Warum in der vorliegenden Arbeit zwar die Morphologie der LC eindeutig Aktivierungszeichen nach CSSS aufweisen, die Emigration der LC jedoch nur zurückhaltend stattfindet, mag schlichtweg an der fehlenden Antigen-Exposition liegen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein bis zwei CSSS reichen, um LC adäquat zu aktivieren, ohne dass diese in erheblichen Mengen als reife APC emigrieren. Dabei bleibt das Stratum corneum, im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten, zum großen Teil intakt.

### 4.3 Penetrationserleichterung durch HF-Öffnung

CSSS hatte sich zunächst als Haarfollikelbiopsie etabliert und wurde als Methode zur Penetrationsverbesserung weiter entwickelt (<sup>156</sup>, *in vitro*<sup>10</sup>, *in vivo*<sup>12</sup>). Zurzeit ist noch unbekannt, ob das Ausreißen des Haarschaftes durch CSSS, zusätzlich zur Debris-Entfernung, zu einer weiteren Penetrationsverbesserung führt oder ob es im Gegenteil dadurch zu einem Kollaps der HF-Struktur und damit zu einer Reduzierung der penetrationsverbessernden Eigenschaften des CSSS kommt.

Unsere Daten ergeben eine viermal höhere HF-Dichte an der Unterarm-Innenseite als auf exzidierte Brusthaut (30,42 HF/cm<sup>2</sup> bzw. 7,25 HF/cm<sup>2</sup>). Otberg *et al.* ermittelten dagegen anhand von Cyanacrylatabriss-Biopsien für Unterarm und Brust sehr ähnliche HF-Dichten (18 HF/cm<sup>2</sup> bzw. 22 HF/cm<sup>2</sup>, <sup>115</sup>). Die von uns verwendete Brusthaut von Mastektomien ist allerdings präoperativ meist stark überdehnt, was die in unserer Arbeit ermittelte geringere HF-Dichte in Brusthaut erklären mag. Der prozentuale Anteil an mit herausgerissenen Haarschaften liegt *ex vivo* bei 37,93 %, während *in vivo* nur ca. 21,93 % der HF mit Haarschaft vorliegen. Anders gesagt werden *in vivo* wesentlich geringere Anteile an Haarschaften mit herausgerissen. In OP-Haut setzen eventuell schon erste Zersetzungsprozesse statt, die den Haarschaft mobiler machen. Unterstützt man die Theorie des HF-Kollapses nach CSSS, verschließen sich auf diesem Wege *in vivo* ungefähr ein Fünftel der HF durch ein CSSS erst. Allerdings konnte in vorangehenden Studien vielfältig gezeigt werden, dass die penetrationsfördernde Wirkung von CSSS stark überwiegt <sup>157</sup>.

Vergleicht man die ermittelten Werte vom ersten und vom zweiten Abriss auf Brusthaut, unterscheidet sich die ermittelte Gesamtfollikeldichte nicht nennenswert was, neben dem hier durchgeführten Prinzip des *double countings*, ein Indiz für die Korrektheit der Auswertung ist. Der Anteil an herausgerissenen Haarschaften reduzierte sich vom ersten zum zweiten Abriss von 37,93 % auf 17,64 %. Die erst beim zweiten CSSS herausgerissenen HF sind zum größten Teil wahrscheinlich durch das erste CSSS schon vormobilisiert worden. Die Dichte an HF mit Haarschaften auf den Trichoscan®-Bildern auf der Unterarmhaut und anschließend auf dem Abriss ist auffällig ähnlich und lässt vermuten, dass nahezu alle sichtbaren, über der Hautoberfläche liegenden Haarschaften durch das anschließende CSSS entfernt werden.

Wie unsere Daten zeigen bleibt die anatomische Struktur des HF-Infundibulums samt Haarschaft *in vivo* nach CSSS größten Teils erhalten. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass CSSS bei seiner hier neu vorgestellten ausgeprägten immunstimulierenden Wirkung eine milde, wenig

traumatisierende Stripping-Technik ist. Desweiteren stellte sich exzidierte menschliche Haut als probates, vielfältig einsetzbares *ex vivo*-Modell zur Erforschung der Wirkung von CSSS dar.

#### 4.4 CSSS als Adjuvans

In vorausgehenden Arbeiten wurde beschrieben, dass CSSS, anders als konventionelle Tape stripping-Methoden, neben einer vergleichsweise milden interfollikulären Barriere-Disruption zusätzlich die Öffnung von HF durch Debris-Entfernung bewirkt<sup>156</sup>. Infolge dessen kommt es zu einer Erleichterung der perkutanen Penetration.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD1a<sup>+</sup> LC sich im oberen Teil des HF in ähnlicher Menge und vor allem mit ausgeprägterem Dendritennetz als in der Epidermis befinden. Sallusto und Lanzavecchia berichteten bereits, dass die Menge der LC im HF ausreichend für Vakzinierungen sei<sup>33</sup>. Nur wenige hundert hautstämmige DC genügen laut Stock *et al.* in Lymphknoten (FITC-Labeling) für robuste CTL-Antworten<sup>158</sup>. Das würde heißen, dass bei einer perkutanen Impfstoffpenetration immer noch eine Menge an DC stimuliert wird, die der Dichte an vergleichbaren Zellen im Skelettmuskel weit überlegen ist. Damit wäre es möglich Impfstoffe, bei denen die intramuskuläre Injektion nur zu einer unzureichenden Immunisierung geführt hat, weiterzuentwickeln und auf ihren Applikationsweg hin neu zu testen. Es konnte schließlich bereits gezeigt werden, dass Partikel bevorzugt im HF akkumulieren<sup>10</sup>.

Zuvor veröffentlichte Daten zeigen, dass eine Aktivierung von LC sowohl durch chemische als auch durch mechanische transkutane Stimuli möglich ist. Schon 1966 beobachtete Mishima, dass 18-24h nach Tape stripping durch Birbeck-Granula definierte epidermale LC Melanosomen über phagozytische Vakuolen aufgenommen hatten, nicht aber die Kontrolle<sup>51</sup>. CSSS hatte sich zunächst als Haarfollikelbiopsie etabliert und wurde als Methode zur Penetrationsverbesserung weiter entwickelt (<sup>156</sup>, *in vitro*<sup>10</sup>, *in vivo*<sup>12</sup>). Mittlerweile ist es Teil eines innovativen Systems zur transkutanen Vakzinierung (SOP). In der Pilotstudie erwies sich die Vakzinierung mit Hilfe von CSSS als sicher und effizient<sup>12</sup>. Dieses Ergebnis kann nun über die hier erstmalig gesicherte kräftig immunstimulatorische Wirkung von CSSS begründet werden. Wir stellten fest, dass CSSS vor allem zu einer morphologisch erkennbaren Aktivierung von CD1a<sup>+</sup> Zellen führt. CSSS bietet sich als Impfstoff-Adjuvans somit hervorragend für die Entwicklung topischer Vakzinapplikation an. Die LC werden aktiviert, bleiben aber am Ort, um die zusätzlich epikutan aufgetragenen Impfpartikel aufzunehmen. Praktisch wäre ein erstes CSSS zur Aktivierung der



LC denkbar, ein zweites könnte entsprechend vorrausgegangener Beobachtungen 24h im Anschluss zum Zwecke der Impfstoffapplikation durchgeführt werden<sup>88, 89</sup>.

#### 4.5 Entwicklung der transkutanen Vakzinierung – Ein Ausblick

Für die Zukunft ist eine weitere Konzentration auf transkutane Vakzinierungsstrategien zu erwarten. Die zentrale Rolle APC der Haut als hoch immunogenes Ziel zur Vakzin-Weitergabe wurde eingangs ausführlich erläutert<sup>61, 159</sup>. Die Vorteile, welche der hohe Besatz an Immunzellen in der Haut bietet, sind vielfältig. Hinweise auf die Wirksamkeit und Spezifität transkutaner Vakzinierung sind zahlreich: Bei Belshe *et al.* zeigte sich z.B. eine protein-basierte Schnupfen-Impfung bei Kindern intradermal signifikant immunogener als intramuskulär<sup>160</sup>. Kenney *et al.* brauchten beim Menschen intradermal nur ein Fünftel der i.m. üblichen Impfstoffdosen zu injizieren, um ein effizientes Ergebnis zu erzielen<sup>96</sup>. Bei transkutaner Vakzinierung am Menschen konnte, anders als bei i.m. Injektionen, beobachtet werden, dass sowohl CD4- als auch CD8-Antworten induzierbar sind<sup>12</sup>. Dabei mag der hier erstmalig belegte immunstimulatorische Effekt des CSSS als mechanisches Adjuvans eine entscheidende Rolle spielen. Bisher wurden verschiedenste Methoden der dermalen oder transkutanen Vakzinierung entwickelt. Dauer und Qualität der humoralen und zellulären Immunantwort sind dabei entscheidend abhängig von der Impfdosis, der Applikationsform, des Einsatzes von Adjuvantien und damit letztendlich von der adäquaten Stimulation der APC. Tatsächlich wird verstärkt an Vakzinen geforscht, die mittels hautstämmiger DC eine gezielt CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität erzeugen sollen<sup>161</sup>. Bei der „genetischen Immunisierung“ findet Antigen-Präsentation entweder über *in vivo*-Transfektion von DC<sup>162</sup> oder *in vivo*-Transfektion von APC-fremden Zellen wie z.B. Keratinozyten, die daraufhin große Mengen an trangen Antigen produzieren, welche entweder sekretiert oder kreuzpräsentiert werden<sup>163</sup>. Virale Vektoren und Plasmid-DNA können dabei als potente Adjuvantien dienen ohne die Funktionen von DC zu beschädigen. Mittels der sogenannten *Gene gun* werden Mäusen bei He *et al.* nach Rasur mit Plasmid-DNA bemantelte Kugeln appliziert. Allerdings konnte nur durch die adjuvante Wirkung von Lentiviren-Antigen-spezifische lytische Aktivität registriert werden<sup>164</sup>.

Allan *et al.* beobachteten bei Mäusen nach Inokulation mit Herpes simplex-Virus die Aktivierung von CTL. Dafür wird die MHC I-Präsentation durch nicht wandernde, Lymphknoten-ständige CD8<sup>+</sup> DC statt durch hautstämmige DC benötigt<sup>165</sup>. Diese migratorischen DC transferieren Antigene möglicherweise direkt auf Lymphknoten-ständige DC-Populationen, die exogenes Antigen kreuzpräsentieren können<sup>166</sup>. Erwägt man Antigen-Transfer zwischen DC

während der Migration in die Lymphknoten ist die Verstärkung einer kleinen Antigen-Menge durch „Verstreuung“ über eine größere Lymphknoten-ständige DC-Population denkbar <sup>167</sup>. Dies erklärt zum Teil, warum die intrakutan eine Reduktion der i.m. üblichen Vakzinmengen möglich ist. Wie bereits erwähnt, konnten Vogt *et al.* in einer Pilotstudie beim Menschen mittels topischer Applikation von Impfstoff nach CSSS sowohl CD4- als auch CD8-Antworten induzieren <sup>12</sup>. Dabei wird der hier erstmalig belegte immunstimulatorische Effekt des CSSS als mechanisches Adjuvans eine entscheidende Rolle gespielt haben.

Allgemein unterscheidet man bei der transkutanen Wirkstoffapplikation sowohl physikalische (z.B. Abrasion, Tape stripping, Aufweichung des Stratum corneums durch Hydrogel-Pflaster <sup>168</sup>) und chemische Hilfsmittel (z.B. Cholera-Toxin) als auch verschiedene Vektoren wie Virus-Vektoren, Liposomen, Nano- und Mikrobeads. Im Rahmen von Impfstudien konnten, neben der klassischen Injektion, die wenigsten Formen schon am Menschen angewendet werden: Frerichs *et al.* gelang es 2008 über Patchapplikation von E. coli-Toxin nach Abrasion die Induktion von Anti-Toxin-IgG-Antikörpern <sup>169</sup>. An Primaten erfolgen aktuell die ersten Versuche mit Elektroporation. Dabei erhöhen hohe Stromspannungen die Permeabilität des Stratum corneum und wirken somit als Adjuvans bei Immunisierungen <sup>170</sup>. Bereits 2006 wurde die Applikation von Nanopartikeln nach CSSS wurde erfolgreich durch Vogt *et al.* durchgeführt <sup>10</sup>.

In dieser Arbeit wurde erfolgreich an menschlicher exzidierte Haut die Wirkung von CSSS auf LC und HF erarbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass funktionelle Untersuchungen zur Morphologie und Funktionalität sowohl der Haut und Hautanhangsgebilde als auch der verschiedenen Zellpopulationen in diesem gut verfügbaren Modell möglich sind. Die Wirkung von TNF- $\alpha$  als topisch appliziertes Adjuvans wurde hier erstmalig belegt. Dabei sind die ermittelten Daten für die weitere Praxis wesentlich relevanter als Erkenntnisse aus Arbeiten an Mäusen. Auch in Zukunft wird exzidierte menschliche Haut, nicht nur für die Entwicklung von transkutanen Vakzinierungsstrategien, ein gutes Modell für experimentelle und präklinische Untersuchungen sein. CSSS, dessen Wirkung hier auch an exzidierte menschlicher Haut *ex vivo* untersucht wurde, ist dank seiner zweifachen Wirkung als mechanisches immunstimulatorisches Adjuvans und als Penetrationsförderer ein vielversprechendes Werkzeug für die zukünftige Erarbeitung transkutaner Vakzinierungsmethoden.

## 5 Zusammenfassung

Transkutane Vakzinierung ist eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Impfstoffapplikation mittels Injektion, da u.a. die Haut verglichen mit Muskel- und Fettgewebe besonders reich an Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und insbesondere an Langerhanszellen (LC) ist. Verschiedene Techniken zur Überwindung der Hautbarriere wurden bereits vorgeschlagen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein neu entwickeltes Protokoll basierend auf Cyanacrylate Skin Surface Stripping (CSSS), welches die Penetration über den HF erleichtert, sicher ist und darüber hinaus effektiv zelluläre Immunantworten induziert. Dies geschieht möglicherweise über Haarfollikel (HF)-assoziierte LC. Postulierte Wirkmechanismen von CSSS sind sowohl die partielle Überwindung der Hautbarriere als auch mögliche immunstimulatorische Effekte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung von CSSS auf Dichte und Morphologie, das Verteilungsmuster sowie den Aktivierungszustand von LC der menschlichen Haut *in vitro* und *in vivo*. Die Untersuchungen wurden teils an exzidiierter Haut, teils *in vivo* an gesunden Probanden durchgeführt. Mittels Untersuchung des Expressionsverhaltens von Oberflächen-Antigenen wurde erstmalig die Wirkung von einem bzw. zwei CSSS auf LC u.a. im Vergleich zu topisch appliziertem TNF- $\alpha$  über einen Zeitverlauf von 32h dokumentiert (n=6). Die Expression der Oberflächenantigene CD1a (spezifisch für LC), CD83, CD86 (beides Aktivierungsmarker von APC) und HLA-DR wurde nach Immunfluoreszenzfärbung sowohl in Epidermisplättchen als auch in Kryo-Hautquerschnitten dokumentiert und auf ihre Morphologie hin ausgewertet. Zur Validierung und als Referenz zu den in exzidiierter Brusthaut ermittelten Ergebnissen bezüglich Dichte und Morphologie der LC wurden zusätzlich *in vivo* erzeugte Saugblasen-Epidermisplättchen des Unterarms untersucht (n=8).

Aus den Immunfluoreszenzuntersuchungen ergeben sich folgende Aussagen: *In vivo* in Unterarmepidermis zeigte sich eine annähernd identische Dichte an CD1a<sup>+</sup> Zellen wie in exzidiierter Brusthaut (508 bzw. 550/mm<sup>2</sup>), welche *in vivo* bis 6h nach einem CSSS weitestgehend konstant blieb. In Kryoschnitten fanden sich CD1a<sup>+</sup> Zellen vergleichbar häufig in der Epidermis und im HF-Infundibulum (13,85/mm bzw. 8,42/mm). 24h nach zwei CSSS war die Abnahme der CD1a<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis mit ca. 47 % verglichen zum Zeitpunkt 0h stärker als nach einem CSSS oder nach TNF- $\alpha$ -Applikation; im HF-Infundibulum fiel die Abnahme geringer aus. Die deutliche Abnahme von LC ist möglicherweise das Ergebnis von LC-Migration, induziert durch die zellaktivierende Wirkung von CSSS. Während die Anzahl

HF-assoziiertes LC geringer ausfiel als die epidermale LC, zeigten die LC im HF-Infundibulum interessanterweise morphologisch ein wesentlich stärker ausgeprägtes Dendritengeflecht, welches hier erstmalig beschrieben wird. 24h nach CSSS ließ sich eine Zunahme morphologisch aktiviert erscheinender CD1a<sup>+</sup> Zellen dokumentieren, dabei erzielte CSSS und topisch appliziertes TNF- $\alpha$  eine ähnlich starke Wirkung. Der Anteil morphologisch aktiviert erscheinender Zellen wurde am stärksten durch topische Applikation von TNF- $\alpha$  auf 32 % nach 24h Inkubation gesteigert. 24h nach CSSS bzw. TNF- $\alpha$ -Applikation zeigten sich CD1a<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> sowie CD86<sup>+</sup> Zellen mit deutlichen morphologischen Aktivierungszeichen. HLA-DR<sup>+</sup> Zellen waren unter Kontrollbedingungen vergleichbar häufig wie CD1a<sup>+</sup> Zellen. Die Abnahme nach zwei CSSS fiel mit ca. 22 % deutlich geringer aus als bei CD1a<sup>+</sup> Zellen. CD83<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> Zellen korrelierten unter den verschiedenen Behandlungen in ihrem Expressionsverhalten, wobei im Durchschnitt etwa  $\frac{1}{4}$  weniger CD83<sup>+</sup> Zellen als HLA-DR<sup>+</sup>-Zellen zu finden waren. CD86 wurde nach CSSS und TNF- $\alpha$ -Applikation vergleichbar hoch reguliert, während CD1a in seiner Expression deutlich abnahm. Somit konnten für CD83 und CD86 unterschiedliche Expressionsmuster festgestellt werden, die für eine differenzierte Expression bei Zellaktivierung sprechen.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mittels der CSSS-Abrisse die Dichte der HF an Brusthaut (n=5) und Unterarmhaut (n=6) dokumentiert. Dabei wurde die Wirkung von einem und zwei CSSS auf die Mitnahme des Haarschaftes verglichen. An der Unterarminnenseite fanden sich viermal mehr HF als auf exzidierte Brusthaut (30,42 bzw. 7,25 HF/cm<sup>2</sup>). Dabei zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit der HF-Strukturen nach CSSS-Anwendungen intakt bleibt (*in vivo* 78,07 %; *ex vivo* 62,07 %). Die über CSSS-Abrisse ermittelte Haarfollikeldichte ließ sich mit der digitalen Trichoscan®-Fotografie validieren: Beide Herangehensweisen führten zu nahezu deckungsgleichen Ergebnissen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse erstmalig die Schlussfolgerung zu, dass CSSS eine eindeutig immunstimulatorische Wirkung auf LC besitzt. Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse, dass Hautexzidate des Menschen als innovatives *in vitro*-Modell dienen können. Es konnte gezeigt werden, dass diese nicht nur zu Penetrationseigenschaften topisch applizierter Stoffe, sondern auch zu Zellfunktionen höchst relevante Aussagen liefern. CSSS, das nicht invasiv ist und vom Menschen gut toleriert wird, ist dank seiner zweifachen Wirkung als mechanisches immunstimulatorisches Adjuvans und als Penetrationsförderer, somit ein vielversprechendes Werkzeug für die Erarbeitung transkutaner Vakzinierungsmethoden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. From the World Health Organization. State of the World's Vaccines and Immunizations. *Jama* 2002;288(20):2532.
2. Simonsen L, Kane A, Lloyd J, et al. Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. *Bull World Health Organ* 1999;77(10):789-800.
3. Belyakov IM, Wyatt LS, Ahlers JD, et al. Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. *J Virol* 1998;72(10):8264-72.
4. Glenn GM, Taylor DN, Li X, et al. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat Med* 2000;6(12):1403-6.
5. Naito S, Maeyama J, Mizukami T, et al. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine* 2007;25(52):8762-70.
6. Rechtsteiner G, Warger T, Osterloh P, et al. Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *J Immunol* 2005;174(5):2476-80.
7. Lademann J, Otberg N, Richter H, et al. [Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances]. *Hautarzt* 2003;54(4):321-3.
8. Mills OH, Jr., Kligman AM. The follicular biopsy. *Dermatologica* 1983;167(2):57-63.
9. Schaefer H, Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14 Suppl 1:23-7.
10. Vogt A, Combadiere B, Hadam S, et al. 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.
11. Mahe B, Vogt A, Liard C, et al. Nanoparticle-Based Targeting of Vaccine Compounds to Skin Antigen-Presenting Cells By Hair Follicles and their Transport in Mice. *J Invest Dermatol* 2008.
12. Vogt A, Mahe B, Costagliola D, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* 2008;180(3):1482-9.
13. Christoph T, Muller-Rover S, Audring H, et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol* 2000;142(5):862-73.
14. Moresi JM, Horn TD. Distribution of Langerhans cells in human hair follicle. *J Cutan Pathol* 1997;24(10):636-40.

15. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, et al. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 2004;22:181-215.
16. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
17. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, et al. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001;2(7):585-9.
18. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.
19. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86(6):973-83.
20. Krutzik SR, Sieling PA, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr Opin Immunol* 2001;13(1):104-8.
21. Wykes M, MacPherson G. Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunology* 2000;100(1):1-3.
22. Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, et al. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 2002;3(12):1163-8.
23. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
24. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2(12):933-44.
25. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17(4):273-83.
26. Cao T, Ueno H, Glaser C, et al. Both Langerhans cells and interstitial DC cross-present melanoma antigens and efficiently activate antigen-specific CTL. *Eur J Immunol* 2007;37(9):2657-67.
27. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007;219:118-42.
28. Czarniecki CW, Fennie CW, Powers DB, et al. Synergistic antiviral and antiproliferative activities of *Escherichia coli*-derived human alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol* 1984;49(2):490-6.
29. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994;68(12):8056-63.
30. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR. *Taschenatlas der Immunologie*. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2007.

31. Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2002;2(12):982-7.
32. Cella M, Engering A, Pinet V, et al. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388(6644):782-7.
33. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179(4):1109-18.
34. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;188(7):1359-68.
35. Inaba K, Pack M, Inaba M, et al. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997;186(5):665-72.
36. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390(6656):175-9.
37. Rescigno M, Piguat V, Valzasina B, et al. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 2000;192(11):1661-8.
38. Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, et al. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 1997;90(5):1920-6.
39. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *Apms* 2003;111(7-8):675-97.
40. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, et al. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 1992;149(2):735-42.
41. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995;154(8):3821-35.
42. Kawamura T, Furue M. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 expression in Langerhans cells: differential regulation by T helper type 1 and T helper type 2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995;25(7):1913-7.
43. Ohki O, Yokozeki H, Katayama I, et al. Functional CD86 (B7-2/B70) is predominantly expressed on Langerhans cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1997;136(6):838-45.
44. Lampson LA, Levy R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol* 1980;125(1):293-9.
45. Warnke R, Levy R. Detection of T and B cell antigens hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem* 1980;28(8):771-6.

46. Edwards JA, Durant BM, Jones DB, et al. Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen: relationship of HLA-DP, DQ, and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol* 1986;137(2):490-7.
47. Yu RC, Abrams DC, Alaibac M, et al. Morphological and quantitative analyses of normal epidermal Langerhans cells using confocal scanning laser microscopy. *Br J Dermatol* 1994;131(6):843-8.
48. Bauer J, Bahmer FA, Worl J, et al. A strikingly constant ratio exists between Langerhans cells and other epidermal cells in human skin. A stereologic study using the optical disector method and the confocal laser scanning microscope. *J Invest Dermatol* 2001;116(2):313-8.
49. Moody DB, Porcelli SA. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):11-22.
50. Nishibu A, Ward BR, Jester JV, et al. Behavioral responses of epidermal Langerhans cells in situ to local pathological stimuli. *J Invest Dermatol* 2006;126(4):787-96.
51. Mishima Y. Melanosomes in phagocytic vacuoles in Langerhans cells. Electron microscopy of keratin-stripped human epidermis. *J Cell Biol* 1966;30(2):417-23.
52. Stoitzner P, Pfaller K, Stossel H, et al. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol* 2002;118(1):117-25.
53. Kobayashi Y. Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens. *Immunology* 1997;90(4):496-501.
54. Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(5):614-21.
55. Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, et al. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* 2002;168(9):4361-71.
56. Lukas M, Stossel H, Hefel L, et al. Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model. *J Invest Dermatol* 1996;106(6):1293-9.
57. Larsen CP, Austyn JM. Langerhans cells migrate out of skin grafts and cultured skin: a model in which to study the mediators of dendritic leukocyte migration. *Transplant Proc* 1991;23(1 Pt 1):117-9.
58. Cumberbatch M, Kimber I. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* 1992;75(2):257-63.
59. Streilein JW, Lonsberry LW, Bergstresser PR. Depletion of epidermal langerhans cells and Ia immunogenicity from tape-stripped mouse skin. *J Exp Med* 1982;155(3):863-71.
60. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, et al. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *Apmis* 2003;111(7-8):725-40.



61. Larregina AT, Falo LD, Jr. Changing paradigms in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2005;124(1):1-12.
62. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, et al. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990;172(5):1483-93.
63. Frelinger JG, Hood L, Hill S, et al. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 1979;282(5736):321-3.
64. Zhang Y, Zhang YY, Ogata M, et al. Transforming growth factor-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway. *Blood* 1999;93(4):1208-20.
65. Anjuere F, del Hoyo GM, Martin P, et al. Langerhans cells develop from a lymphoid-committed precursor. *Blood* 2000;96(5):1633-7.
66. Larregina AT, Morelli AE, Spencer LA, et al. Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol* 2001;2(12):1151-8.
67. Strunk D, Egger C, Leitner G, et al. A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185(6):1131-6.
68. Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 2002;3(12):1135-41.
69. Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie*. In. 2nd ed. Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer; 2004:6-30.
70. Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, et al. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1996;184(6):2417-22.
71. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 2006;7(3):265-73.
72. Hacker C, Kirsch RD, Ju XS, et al. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* 2003;4(4):380-6.
73. Merad M, Romani N, Randolph G. Langerhans Cells at the Interface of Medicine, Science, and Industry. *J Invest Dermatol* 2008;128(2):251-5.
74. Steinman RM, Turley S, Mellman I, et al. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;191(3):411-6.
75. Wang B, Amerio P, Sauder DN. Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J Leukoc Biol* 1999;66(1):33-9.
76. Tang A, Amagai M, Granger LG, et al. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 1993;361(6407):82-5.

77. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology* 1997;92(3):388-95.
78. Stoitzner P, Zanella M, Ortner U, et al. Migration of langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF-alpha and IL-1beta. *J Leukoc Biol* 1999;66(3):462-70.
79. Leong AS-Y CK, Leong FJM-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. In: Leong AS-Y CK, Leong FJM-M, ed. London: Oxford University Press; 2003:59-60.
80. Turni L SS, Watson B, Mason D. CD Guide. CD1a-e. In: Mason D AP, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editor. *Leucocyte typing VII White cell differentiation antigens*; 2000 2002; Harrogate, United Kingdom: Oxford University Press; 2000. p. 747-8.
81. Fainboim L SM. TC2. CD1 Workshop Panel Report. In: Kishimoto T KH, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editor. *Leucocyte typing VI White cell differentiation antigens*; 1996 1997; Kobe, Japan: Garland Publishing 1996. p. 33-7.
82. Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, et al. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol* 2002;168(2):782-92.
83. Kamath AT, Henri S, Battye F, et al. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 2002;100(5):1734-41.
84. Schmuth M, Neyer S, Rainer C, et al. Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol* 2002;11(2):135-42.
85. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, et al. Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 2002;73(1 Suppl):S7-11.
86. Lessard RJ, Wolff K, Winkelmann RK. Induced "shedding" of the epidermal Langerhans's cells. *Nature* 1966;212(5062):628-9.
87. Lessard RJ, Wolff K, Winkelmann RK. The disappearance and regeneration of Langerhans cells following epidermal injury. *J Invest Dermatol* 1968;50(2):171-9.
88. Yagi H, Hashizume H, Horibe T, et al. Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization. *Cancer Res* 2006;66(20):10136-44.
89. Strid J, Hourihane J, Kimber I, et al. Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. *Eur J Immunol* 2004;34(8):2100-9.
90. Day MJ. Vaccine side effects: fact and fiction. *Vet Microbiol* 2006;117(1):51-8.
91. Burch PA, Croghan GA, Gastineau DA, et al. Immunotherapy (APC8015, Provenge) targeting prostatic acid phosphatase can induce durable remission of metastatic androgen-independent prostate cancer: a Phase 2 trial. *Prostate* 2004;60(3):197-204.

92. Stoitzner P, Green LK, Jung JY, et al. Tumor immunotherapy by epicutaneous immunization requires langerhans cells. *J Immunol* 2008;180(3):1991-8.
93. Stoecklinger A, Grieshuber I, Scheiblhofer S, et al. Epidermal langerhans cells are dispensable for humoral and cell-mediated immunity elicited by gene gun immunization. *J Immunol* 2007;179(2):886-93.
94. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002;2(4):251-62.
95. Warger T, Schild H, Rechtsteiner G. Initiation of adaptive immune responses by transcutaneous immunization. *Immunol Lett* 2007;109(1):13-20.
96. Kenney R, Frech S, Muenz L, et al. Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N Engl J Med* 2004(351):2295-301.
97. Guereña-Burgueno F, Hall ER, Taylor DN, et al. Safety and immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine administered transcutaneously. *Infect Immun* 2002;70(4):1874-80.
98. Fan H, Lin Q, Morrissey GR, et al. Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat Biotechnol* 1999;17(9):870-2.
99. Wang LF, Lin JY, Hsieh KH, et al. Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice. *J Immunol* 1996;156(11):4077-82.
100. Kornbluth RS, Stone GW. Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants. *J Leukoc Biol* 2006;80(5):1084-102.
101. Laouini D, Elkhali A, Yalcindag A, et al. COX-2 inhibition enhances the TH2 immune response to epicutaneous sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(2):390-6.
102. Kondo H, Ichikawa Y, Imokawa G. Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *Eur J Immunol* 1998;28(3):769-79.
103. Herrick CA, Xu L, McKenzie AN, et al. IL-13 is necessary, not simply sufficient, for epicutaneously induced Th2 responses to soluble protein antigen. *J Immunol* 2003;170(5):2488-95.
104. de Witte L, Nabatov A, Geijtenbeek TB. Distinct roles for DC-SIGN(+)-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol Med* 2008;14(1):12-9.
105. Schaefer H, Redelmeier T, eds. *Skin barrier. Principles of Percutaneous Absorption*. Basel, Freiburg, Paris, London, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokio, Sidney: Karger; 1996.
106. Cullander C, Jeske S, Imbert D, et al. A quantitative minimally invasive assay for the detection of metals in the stratum corneum. *J Pharm Biomed Anal* 2000;22(2):265-79.

107. Schreiner V, Gooris GS, Pfeiffer S, et al. Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J Invest Dermatol* 2000;114(4):654-60.
108. Kalia YN, Pirot F, Guy RH. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. *Biophys J* 1996;71(5):2692-700.
109. Schiebler T, Schmidt W. Anatomie. In. 8th ed. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer; 2002:216, 7.
110. Silver AF, Chase HB, Arsenault CT. Early anagen initiated by plucking compared with early sponateous anagen. In: Montagna W, Dobson RL, eds. *Biology of Skin*. 1st ed. Oxford: Pergamon Press; 1975:265-86.
111. Jahoda CA, Reynolds AJ. Dermal-epidermal interactions. Adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatol Clin* 1996;14(4):573-83.
112. Paus R, Christoph T, Muller-Rover S. Immunology of the hair follicle: a short journey into terra incognita. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999;4(3):226-34.
113. Meidan VM, Bonner MC, Michniak BB. Transfollicular drug delivery--is it a reality? *Int J Pharm* 2005;306(1-2):1-14.
114. Vogt A, Blume-Peytavi U. [Biology of the human hair follicle. New knowledge and the clinical significance]. *Hautarzt* 2003;54(8):692-8.
115. Otberg N, Richter H, Schaefer H, et al. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol* 2004;122(1):14-9.
116. Berti JJ, Lipsky JJ. Transcutaneous drug delivery: a practical review. *Mayo Clin Proc* 1995;70(6):581-6.
117. Williams AC, Barry BW. Skin absorption enhancers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1992;9(3-4):305-53.
118. Elias PM, Menon GK, Grayson S, et al. Avian sebokeratocytes and marine mammal lipokeratinocytes: structural, lipid biochemical, and functional considerations. *Am J Anat* 1987;180(2):161-77.
119. Feldmann RJ, Maibach HI. Regional variation in percutaneous penetration of 14C cortisol in man. *J Invest Dermatol* 1967;48(2):181-3.
120. Essa EA, Bonner MC, Barry BW. Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug and liposome delivery. *J Pharm Pharmacol* 2002;54(11):1481-90.
121. Otberg N, Patzelt A, Rasulev U, et al. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65(4):488-92.
122. Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, et al. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35(6):318-26.

123. Lademann J, Otberg N, Richter H, et al. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14 Suppl 1:17-22.
124. Lademann J, Richter H, Otberg N, et al. Application of a dermatological laser scanning confocal microscope for investigation in Skin Physiology. *Las Phys* 2003(13):1-6.
125. Jacobi U, Weigmann HJ, Ulrich J, et al. Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin Res Technol* 2005;11(2):91-6.
126. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, et al. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest* 1992;90(2):482-7.
127. Nickoloff BJ, 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.
128. Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 2000;192(5):705-18.
129. Holmes RL, Williams M, Cunliffe WJ. Pilo-sebaceous duct obstruction and acne. *Br J Dermatol* 1972;87(4):327-32.
130. Holzmann S, Tripp CH, Schmuth M, et al. A model system using tape stripping for characterization of Langerhans cell-precursors in vivo. *J Invest Dermatol* 2004;122(5):1165-74.
131. Kahlon R, Hu Y, Orteu CH, et al. Optimization of epicutaneous immunization for the induction of CTL. *Vaccine* 2003;21(21-22):2890-9.
132. Vogt ASGB-PU. SOP Application of Tetagrip Vaccine. In: *Clinical Research Center for Hair and Skin Physiology; Klinik für Dermatologie VuAC-UB*, ed.; 2005:6.
133. Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, et al. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol* 2005;125(2):264-9.
134. Goldschmidt H, Kligman AM. Exfoliative cytology of human horny layer. Methods of cell removal and microscopic techniques. *Arch Dermatol* 1967;96(5):572-6.
135. Marks R, Dawber RP. Skin surface biopsy: an improved technique for the examination of the horny layer. *Br J Dermatol* 1971;84(2):117-23.
136. Wang B, Kondo S, Shivji GM, et al. Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology* 1996;88(2):284-8.
137. Cumberbatch M, Griffiths CE, Tucker SC, et al. Tumour necrosis factor-alpha induces Langerhans cell migration in humans. *Br J Dermatol* 1999;141(2):192-200.
138. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005;115(1):1-20.

139. Kitano Y, Okada N. Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br J Dermatol* 1983;108(5):555-60.
140. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994;82(3):487-93.
141. Grouard G, Durand I, Filgueira L, et al. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 1996;384(6607):364-7.
142. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(6):2588-92.
143. Chen H, Yuan J, Wang Y, et al. Distribution of ATPase-positive Langerhans cells in normal adult human skin. *Br J Dermatol* 1985;113(6):707-11.
144. Thomas JA, Biggerstaff M, Sloane JP, et al. Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cells in normal human skin. *Histochem J* 1984;16(5):507-19.
145. Duthie MS, Kimber I, Dearman RJ, et al. Differential effects of UVA1 and UVB radiation on Langerhans cell migration in mice. *J Photochem Photobiol B* 2000;57(2-3):123-31.
146. Breathnach AS. The distribution of Langerhans cells within the human hair follicle, and some observations on its staining properties with gold chloride. *J Anat* 1963;97:73-80.
147. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, et al. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005;22(5):643-54.
148. Probst HC, Lagnel J, Kollias G, et al. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* 2003;18(5):713-20.
149. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):351-8.
150. Mayerova D, Parke EA, Bursch LS, et al. Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. *Immunity* 2004;21(3):391-400.
151. Schmitt DA, Bieber T, Cazenave JP, et al. Fc receptors of human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1990;94(6 Suppl):15S-21S.
152. Angel CE, George E, Brooks AE, et al. Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. *J Immunol* 2006;176(10):5730-4.
153. Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 2003;19(1):47-57.
154. Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, et al. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003;102(6):2187-94.

155. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4<sup>+</sup> T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 2005;6(2):163-70.
156. Toll R, Jacobi U, Richter H, et al. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 2004;123(1):168-76.
157. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, et al. Follicular transport route - Research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm* 2008.
158. Stock AT, Mueller SN, van Lint AL, et al. Cutting edge: prolonged antigen presentation after herpes simplex virus-1 skin infection. *J Immunol* 2004;173(4):2241-4.
159. Glenn GM, Kenney RT, Hammond SA, et al. Transcutaneous immunization and immunostimulant strategies. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003;23(4):787-813.
160. Belshe RB, Newman FK, Anderson EL, et al. Evaluation of combined live, attenuated respiratory syncytial virus and parainfluenza 3 virus vaccines in infants and young children. *J Infect Dis* 2004;190(12):2096-103.
161. He Y, Zhang J, Donahue C, et al. Skin-derived dendritic cells induce potent CD8(+) T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* 2006;24(5):643-56.
162. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, et al. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2(10):1122-8.
163. Kurts C, Cannarile M, Klebba I, et al. Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol* 2001;166(3):1439-42.
164. He Y, Falo LD. Induction of T cell immunity by cutaneous genetic immunization with recombinant lentivector. *Immunol Res* 2006;36(1-3):101-17.
165. Allan RS, Waithman J, Bedoui S, et al. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 2006;25(1):153-62.
166. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000;192(12):1685-96.
167. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, et al. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 2004;5(12):1243-50.
168. Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, et al. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release* 2008;131(2):113-20.
169. Frerichs DM, Ellingsworth LR, Frech SA, et al. Controlled, single-step, stratum corneum disruption as a pretreatment for immunization via a patch. *Vaccine* 2008;26(22):2782-7.
170. Dayball K, Millar J, Miller M, et al. Electroporation enables plasmid vaccines to elicit CD8<sup>+</sup> T cell responses in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2003;171(7):3379-84.

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



## **Erklärung**

Ich, Iliane Deckert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Die immunstimulatorische Wirkung von Cyanacrylate Skin Surface Stripping  
auf die Aktivierung und Migration von Langerhanszellen der menschlichen Haut“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den \_\_\_\_\_