

Funktionelle Charakterisierung dendritischer Zellen unter entzündlichen Bedingungen *in vitro* und Integration in humane Vollhautäquivalente

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
André Said
aus Berlin

Berlin, 10. November 2014

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Günther Weindl

am Institut für Pharmakologie und Toxikologie

des Instituts für Pharmazie

der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Günther Weindl
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Tag der Disputation: 30. Oktober 2014

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Günther Weindl für die Vergabe des hochinteressanten Promotionsthemas sowie für die hervorragende Betreuung und ausgezeichnete wissenschaftliche Unterstützung im Verlauf der Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch für die Förderung meiner aktiven Teilnahme an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen und damit der Möglichkeit zur Diskussion der eigenen Forschungsergebnisse mit internationalem Fachpublikum. Zudem hat seine stete Gesprächsbereitschaft und umfassende Kompetenz auf dem Gebiet der Immunologie allgemein und der dendritischen Zellen im Besonderen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus gilt mein aufrichtiger Dank Frau Professor Dr. Schäfer-Korting für die großzügige Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie für die umfangreiche Betreuung und Unterstützung, vor allem zu Beginn meiner Promotionsarbeit.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens möchte ich mich zudem bei Herrn Professor Dr. Matthias F. Melzig recht herzlich bedanken.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Professor Dr. Weindl, Frau Professor Dr. Schäfer-Korting sowie Frau Dr. Sarah Kuchler danke ich für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima. Besonderer Dank geht dabei an:

- Frau Stephanie Bock für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit innerhalb sowie außerhalb des Labores, die überaus lustigen und denkwürdigen Abende im Rahmen der Verarbeitung großer Mengen menschlicher Abdominalhaut sowie für die Mühe des gewissenhaften Korrekturlesens der Arbeit.
- Herrn Christian Zoschke für die immerwährenden rhetorischen Motivationsschübe im Rahmen der Integration unreifer MoLC in organotypische Vollhautäquivalente und seine steten Bemühungen zur Optimierung des Versuchsaufbaus sowie für die Mithilfe bei der vorbereitenden Zellkultur für die Praktikumsstationen Immunfluoreszenz I und II.

Mein Dank gilt auch dem Deutschen Rotes Kreuz (DRK) Blutspendedienst Ost, Berlin für die stete Bereitstellung von humanen Blutkonserven und Herrn Uwe Webers für die stets unkomplizierte Abholung der Spenden.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) danke ich für den Erhalt eines Reisestipendiums zum 13th International Workshop on Langerhans Cells, Amsterdam, Niederlande.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für die ausdauernde und vielseitige Unterstützung sowie den nötigen Rückhalt während des Promotionsvorhabens bedanken.

Originalarbeiten

Said A, Bock S, Müller G, Weindl G: Inflammatory conditions distinctively alter immunological functions of Langerhans-like cells and dendritic cells *in vitro*. Immunology. doi: 10.1111/imm.12363

Said A, Bock S, Lajqi T, Müller G, Weindl G: Chloroquine Promotes IL-17 Production by CD4⁺ T Cells via p38-Dependent IL-23 Release by Monocyte-Derived Langerhans-like Cells. The Journal of Immunology. doi: 10.4049/jimmunol.1303276

Vorträge

Said A, Weindl G: Chloroquine induces IL-23 secretion in monocyte-derived Langerhans-like cells. International PHD Students Meeting of the German Pharmaceutical Society, Wuppertal, Deutschland (2014)

Said A, Weindl G: Autophagy restricts IL-23 secretion in monocyte-derived Langerhans-like cells. 13th International Workshop on Langerhans Cells, Amsterdam, Niederlande (2013)

Poster

Said A, Bock S, Lajqi T, Müller G, Weindl G: Chloroquine induces IL-23 release in monocyte-derived Langerhans-like cells and subsequent IL-17 production by naïve CD4⁺ T cells. Tag der Pharmazie (DPhG), Berlin, Deutschland (2014)

Said A, Weindl G: Inflammatory conditions distinctively alter immunological functions of Langerhans-like cells and dendritic cells *in vitro*. Tag der Pharmazie (DPhG), Berlin, Deutschland (2014)

Bock S, **Said A**, Weindl G: MUTZ-3-derived Langerhans-like cells as a model system to study cytokine- and TLR2-induced dendritic cell activation. Tag der Pharmazie (DPhG), Berlin, Deutschland (2014)

Said A, Schäfer-Korting M, Weindl G: Poly(I:C) induces Th1 cytokines and IFN- β in monocyte-derived Langerhans-like cells through TLR3. 13th International Workshop on Langerhans Cells, Amsterdam, Niederlande (2013)

Bock S, **Said A**, Weindl G: MUTZ-3-derived Langerhans-like cells as a model system to study cytokine- and TLR2-induced dendritic cell activation. 13th International Workshop on Langerhans Cells, Amsterdam, Niederlande (2013)

Said A, Schäfer-Korting M, Weindl G: Human Langerhans cells potently induce Th1 cytokines in the presence of poly(I:C), but are less responsive than dendritic cells towards bacterial stimuli. International Investigative Dermatology, Edinburgh, Großbritannien/ Schottland (2013)

Bock S, **Said A**, Weindl G: Impaired CCR7-mediated migration of MUTZ-3-derived Langerhans-like cells in response to pro-inflammatory stimuli. International Investigative Dermatology, Edinburgh, Großbritannien/ Schottland (2013)

Said A, Schäfer-Korting M, Weindl G: Langerhans cells are less responsive than dendritic cells towards different bacterial and non-bacterial stimuli and show lower migratory capacity in a CCR7-dependent manner. The 12th International Symposium on Dendritic Cells, Daegu, Südkorea (2012)

Bock S, **Said A**, Weindl G: MUTZ-3-derived Langerhans-like cells from human CD34+ hematopoietic progenitors as in vitro model for dendritic cell migration. The 12th International Symposium on Dendritic Cells, Daegu, Südkorea (2012)

Said A, Schäfer-Korting M, Weindl G: Langerhans cells are less responsive than dendritic cells towards bacterial TLR ligands. Tag der Pharmazie (DPhG), Berlin, Deutschland (2012)

Bock S, **Said A**, Weindl G: MUTZ-3-derived Langerhans-like cells as *in vitro* model for dendritic cell development from human CD34⁺ hematopoietic progenitors. Tag der Pharmazie (DPhG), Berlin, Deutschland (2012)

Preise

Posterpreis („Best Poster Award“) für **Said A**, Schäfer-Korting M, Weindl G: Langerhans cells are less responsive than dendritic cells towards different bacterial and non-bacterial stimuli and show lower migratory capacity in a CCR7-dependent manner. The 12th International Symposium on Dendritic Cells, Daegu, Südkorea (2012)

Stipendien

Reisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für die Teilnahme am 13th International Workshop on Langerhans Cells, Amsterdam, Niederlande (2013)

1. Einleitung	1
1.1 Dendritische Zellen	2
1.1.1 Ontogenese und Subtypen	3
1.1.2 Beteiligung am angeborenen Immunsystem:.....	6
1.1.2.1 Antigenerkennung und Detektion von Gefahrensignalen.....	6
1.1.2.2 Zytokin- und Chemokinfreisetzung.....	9
1.1.3 Beteiligung am adaptiven Immunsystem	9
1.1.3.1 Antigenprozessierung und -präsentation	10
1.1.3.2 Maturation und Migration	11
1.1.3.3 Stimulation einer effektorischen T-Zell-Antwort	13
1.1.3.4 Regulation der Immuntoleranz.....	17
1.1.4 Methoden zur funktionellen Charakterisierung von DC	19
1.2 Autophagie	20
1.2.1 Zelluläre und molekulare Regulatoren der Autophagie	22
1.2.2 Autophagie in Infektabwehr und Immunität	25
1.2.3 Modulatoren der Autophagie und deren Anwendung	27
1.3 <i>In vitro</i> Methoden zur Bewertung von Sensibilisierungspotentialen.....	29
1.3.1 Alternative Testsysteme auf Basis humaner DC Funktionen	30
1.3.2 Integration immunkompetenter Zellen in <i>in vitro</i> generierte Hautmodelle	33
1.4 Zielsetzung	34
2. Material und Methoden	36
2.1 Material	37
2.1.1 Geräte.....	37
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	38
2.1.3 Software	45
2.1.4 Verwendete Lösungen	46
2.1.4.1 Lösungen zur Zellkultivierung	46
2.1.4.2 Lösungen zur Isolation unreifer LC aus humaner Epidermis.....	48
2.1.4.3 Lösungen zur Isolation von NHK und NHDF aus juveniler Vorhaut	50
2.1.4.4 Lösungen zur Konstruktion <i>in vitro</i> generierter humaner Vollhautäquivalente	50
2.1.4.5 Lösungen zur Immunassay-Analytik.....	52
2.1.4.6 Lösungen zur RNA Analytik	57
2.2 Methoden.....	59
2.2.1 Methoden zur Gewinnung und Kultivierung der Zellen.....	59

2.2.1.1	Zellisolierung aus humaner Haut.....	59
2.2.1.2	Zellisolierung aus humanem Blut	62
2.2.1.3	Generierung von DC und LC aus Monozyten	63
2.2.1.4	Zellisolierung naiver CD4 ⁺ T-Lymphozyten aus nicht-adhärenenten PBMC ..	65
2.2.2	Methoden der Zellaktivierung	65
2.2.2.1	Stimulation unreifer DC-Typen	66
2.2.2.2	Modulation zellulärer- und Rezeptor-abhängiger Prozesse.....	66
2.2.2.3	Kokultivierung aktivierter MoLC und naiver CD4 ⁺ T-Zellen.....	67
2.2.3	Methoden zur Integration immunkompetenter Zellen in Vollhautmodelle.....	68
2.2.3.1	Isolierung und Kultivierung der NHK.....	69
2.2.3.2	Isolierung und Kultivierung der NHDF	69
2.2.3.3	Passagierung.....	69
2.2.3.4	Erstellung in vitro generierter humaner Dermisäquivalente	70
2.2.3.5	Aussaat der NHK und Integration unreifer MoLC	70
2.2.4	Methoden zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung.....	72
2.2.4.1	Durchflusszytometrie.....	73
2.2.4.2	Immunhistochemie (IHC).....	78
2.2.4.3	ELISA Analytik.....	83
2.2.4.4	PCR Analytik.....	85
2.2.5	Statistik.....	89
3.	Ergebnisse.....	90
3.1	Immunogene Diversität in Abhängigkeit inflammatorischer Einflüsse	91
3.1.1	<i>Ex vivo</i> generierte Zellen exprimieren typische Differenzierungsmarker humaner DC	91
3.1.2	Inflammatorische Zytokine modulieren den phänotypischen Reifegrad in Anwesenheit mikrobieller Antigene.....	95
3.1.3	TNF- α und IL-1 β regulieren die Produktion und Sekretion immunregulatorischer Zytokine nach Antigenkontakt	97
3.1.4	MoDC und MoLC zeigen Unterschiede in der CCR7-abhängigen Migration...	102
3.1.5	Poly(I:C) induziert die Genexpression anti-viraler Typ 1 Interferone.....	104
3.2	Chloroquin induziert die Sekretion von IL-23 in aktivierten MoLC.....	106
3.2.1	3-MA und Chloroquin verändern die molekularen Prozesse der Autophagie ..	107
3.2.2	Chloroquin vermindert die Stimulation einer Th1-abhängigen Immunantwort durch MoLC	108
3.2.3	Inhibitoren später Prozesse der Autophagie erhöhen die Sekretion von IL-23.....	109

3.2.4	Unterschiede in der Genregulation spezifischer Untereinheiten der IL-12 Zytokinfamilie	112
3.2.5	Die Stimulation des IL-1Rezeptors ist entscheidend für die Erhöhung der IL-23 Sekretion durch Chloroquin	113
3.2.6	Chloroquin erhöht die TLR2/1-abhängige Sekretion von IL-6 und IL-23	115
3.3	Die <i>in vitro</i> Generierung von Hautmodellen mit integrierten MoLC	117
3.3.1	Integration <i>ex vivo</i> differenzierter MoLC in humane Vollhautmodelle	118
3.3.2	Verteilung der integrierten MoLC nach physiologischem Vorbild	120
4.	Diskussion	123
4.1	Inflammatorische Einflüsse modulieren die immunologische Funktionalität <i>ex vivo</i> generierter DC Populationen	124
4.1.1	Bakterielle Stimuli induzieren Unterschiede im Reifungsgrad von DC Subtypen.....	125
4.1.2	TNF- α und IL-1 β erhöhen die Reaktivität von LC gegenüber LPS	126
4.1.3	DC als Initiatoren primärer Immunantworten in regionalen Lymphknoten	127
4.1.4	Die CD40L/CD40-Interaktion als Regulator peripherer Toleranz und Immunität	129
4.1.5	DC vermitteln angeborene und adaptive Prozesse der anti-viralen Immunität	131
4.1.6	Zusammenfassende Interpretation der Beobachtungen und Ausblick	133
4.2	Chloroquin moduliert die Zytokinsekretion <i>ex vivo</i> generierter MoDC und MoLC ..	134
4.2.1	Inhibitoren der autolysosomalen Proteolyse erhöhen die IL-23 Sekretion in MoLC	135
4.2.2	Die erhöhte IL-23 Sekretion durch MoLC verschiebt die primäre Differenzierung naiver T-Zellen	137
4.2.3	IL-1 Rezeptoren und TLR als wichtige Regulatoren der Autophagie-abhängigen Immunmodulation	139
4.2.4	Zusammenfassende Interpretation der Beobachtungen und Ausblick	142
4.3	Die Integration unreifer MoLC in humane Hautmodelle ermöglicht die Entwicklung immunkompetenter Alternativmethoden	144
4.3.1	Das etablierte Testsystem besitzt physiologische Charakteristika humaner Vollhaut	145
4.3.2	Zusammenfassende Interpretation der Beobachtungen und Ausblick	146
5.	Zusammenfassung	148
5.1	Zusammenfassung.....	149
5.2	Summary	153
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	157
7.	Literaturverzeichnis.....	165

Paul Langerhans (1847 - 1888)

„Sie besitzen einen rundlichen, oft mehr oder weniger oblongen Leib, in dem die dunkle Goldfärbung nur selten einen Kern deutlich wahrzunehmen gestattet. Von diesem Leibe aus entsenden sie eine wechselnde Zahl zierlicher Ausläufer, von denen einer nach abwärts gerichtet ist, während alle übrigen dem Stratum corneum zugewandt sind und entweder sofort, oder nachdem sie eine kurze Strecke der Hautoberfläche parallel gelaufen sind, fast senkrecht in die Höhe streben.“ [1]

1. Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

Aufgrund ihrer bemerkenswerten Fähigkeit die Aktivierung sowie Differenzierung naiver T-Zellen zu stimulieren, gelten dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) als wichtige Regulatoren einer primären Immunantwort. So außergewöhnlich ihre Bedeutung in der Induktion einer zielgerichteten und spezifischen Immunreaktion ist, so einzigartig ist auch ihre Entdeckungsgeschichte, welche bereits im Jahre 1868 ihren Anfang nahm.

Als „dunkle Körper [...] höchst auffallender Gestalt“ bezeichnete der damalige Medizinstudent Paul Langerhans die nach ihm benannten Zellen in intraepidermalen, zumeist suprabasalen Schichten menschlicher Haut, nachdem diese mittels Goldchlorid-Färbung sichtbar gemacht wurden [1]. Diese Technik diente in der damaligen Zeit üblicherweise der Identifizierung von Nervenzellen und als solche wurden sie seitdem fälschlicherweise auch betrachtet. Es dauerte über 100 Jahre bis Langerhans Zellen (*Langerhans cell*, LC) als Subpopulation dendritischer Zellen angesehen wurden [2, 3]. Diese wurden erstmals 1973 von Ralph M. Steinman beschrieben und als Zellen mit auffallend baumartigen Ausläufern charakterisiert, die ein verzweigtes Zellnetzwerk auszubilden vermögen [4]. DC stellen eine morphologisch als auch funktionell heterogene Population professioneller antigenpräsentierender Zellen (*antigen presenting cell*, APC) dar und agieren als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität [5]. Zwar werden T- und B-Lymphozyten als die eigentlichen Effektoren des Immunsystems angesehen, jedoch werden diese selten direkt durch pathogene Keime aktiviert. Hierzu bedarf es professioneller APC, welche eingedrungene Erreger erkennen und internalisieren, die prozessierten Antigenfragmente anschließend T-Zellen präsentieren und diese dann über die Expression kostimulatorischer Moleküle aktivieren [6]. Anders als Makrophagen oder Monozyten besitzen DC die Fähigkeit mit naiven T-Zellen zu interagieren, um eine zielgerichtete primäre Immunantwort zu initiieren. Im selben Maße nehmen DC auch eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der zentralen und peripheren Toleranz ein, indem sie den programmierten Zelltod autoreaktiver Lymphozyten vermitteln bzw. diese in Anergie versetzen und die Entwicklung regulatorischer T-Zellen induzieren [7, 8].

Die posthume Verleihung des Nobelpreises für Medizin an Ralph M. Steinman im Jahr 2011 begründete das Komitee mit der „Entdeckung dendritischer Zellen und ihre Bedeutung in der adaptiven Immunantwort“ [9] und bestätigte somit die Wichtigkeit dieser speziellen Zellpopulation für die heutige Medizin, sind sie doch essentielle Regulatoren einer Vielzahl immunologischer Prozesse. DC stehen in zentraler Position neuartiger therapeutischer Targets, da eine Dysregulation ihrer Funktionalität die Ausbildung autoimmun-basierter Erkrankungen beeinflusst oder durch Toleranz entarteter Zellen das Tumorstadium

begünstigt. Die gezielte funktionelle Modulation der DC stellt einen vielversprechenden Ansatz dar um zukünftig das körpereigene Immunsystem in die Therapie miteinzubeziehen [10]. Voraussetzung hierfür ist jedoch das detaillierte Verständnis der Vermittlung von Immunität und Toleranz sowie der damit einhergehenden Prozesse des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

1.1.1 Ontogenese und Subtypen

Eine erste Einteilung unterscheidet plasmazytoide DC (*plasmacytoid DC*, pDC) sowie konventionelle DC (*classical DC* oder *conventional DC*, cDC), wobei cDC zahlenmäßig überwiegen und nochmals in migratorische und stationäre DC unterschieden werden [11, 12]. Die Gewinnung einzelner humaner DC Populationen geschieht heutzutage entweder aus dem Blut oder der menschlichen Haut [13]. Peripheres Blut enthält pDC, welche insbesondere virale Antigene erkennen und insgesamt zwei Subtypen konventioneller DC, die sich über die Expression entsprechender Oberflächenproteine unterscheiden lassen: CD1c⁺ sowie CD141⁺ cDC [14, 15]. Darüber hinaus sind pDC sowie cDC ebenfalls in primären sowie sekundären lymphoiden Organen zu finden [16, 17].

In nicht-lymphoiden Organen, speziell der Haut, konnten bisher drei Populationen migratorischer DC identifiziert werden: epidermale LC sowie CD1a⁺CD14⁻ und CD1a⁻CD14⁺ interstitielle DC (iDC) bzw. dermale DC (DDC) [18-20]. LC machen etwa 1 - 3% aller kernhaltigen Zellen der Epidermis aus und wurden auch im mehrschichtigen Plattenepithel der Bronchien, der Mund- sowie Vaginalschleimhaut beschrieben [21-24]. LC weisen sich durch das Vorhandensein typischer intrazellulärer Zellorganellen aus (Birbeck granules, BG), der Expression des C-Typ Lektin Rezeptors Langerin (CD207) sowie des Ca²⁺-abhängigen Glykoproteins E-Cadherin (CD324), wodurch die Verankerung in epidermalen Schichten durch Zellkontakt zu umgebenden Keratinozyten vermittelt wird [2, 25]. Speziell für epidermale LC sind seit einiger Zeit weitere Differenzierungsmarker wie die onkogene Rezeptor-Tyrosinkinase Axl sowie das Oberflächenprotein TROP-2 (*tumor associated calcium signal transducer 2*) beschrieben worden [26, 27].

Neueste Studien identifizierten zudem weitere Subtypen, welche vor allem in entzündlichen Geweben zu finden sind. Hierzu gehören slanDC, welche Träger eines namensgebenden Glykoproteins (6-sulfo N-acetyllactosamin) sind und besonders auf inflammatorische Reize reagieren, sowie TipDC (*TNF and iNOS-producing DC*). Letztere generieren nach Aktivierung hohe Mengen an TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) bzw. iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) und kommen vornehmlich bei Atopikern sowie in psoriatischen Hautarealen

vor [28, 29]. Beide Subtypen unterscheiden sich jedoch von sog. inflammatorischen epidermalen DC (*inflammatory dendritic epidermal cells*, IDEC), die bisher bei atopischen Hauterkrankungen gefunden wurden, deren Beteiligung an der Pathogenese bisher jedoch noch nicht geklärt ist [30, 31].

Die Abstammung und Ontogenese der diversen Subtypen ist seit längerem Gegenstand umfangreicher Untersuchungen (*Abb.: 1-1*) [32-34]. DC entstammen ursprünglich den pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (*hematopoietic stem cell*, HSC). Entscheidende Wachstumsfaktoren sind hierbei der Flt3 Ligand (*fms-like-tyrosinkinase-3 ligand*, Flt3L) sowie der Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierende Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) [35]. Murine pDC, cDC sowie Monozyten finden ihren gemeinsamen Ursprung in einer kürzlich beschriebenen Vorläuferzelle (*monocyte/macrophage and DC precursor*, MDP), welche aus einem myeloiden Vorläufer (*common myeloid progenitor*, CMP) ausdifferenziert und einen gemeinsamen DC-Vorläufer (*common DC precursor*, CDP) ausbildet aus dem sowohl cDC als auch pDC hervorgehen [34, 36, 37]. Bereits früh wurde angenommen, dass DC entsprechend ihrer funktionellen und phänotypischen Eigenschaften ausschließlich myeloiden Ursprungs seien, jedoch konnte bewiesen werden, dass auch lymphoide Vorläuferzellen zur Ontogenese von DC befähigt sind. [38, 39].

Obwohl im murinen System die Teilung der monozytären und dendritischen Abstammung bereits im Knochenmark erfolgt, konnte ein eigener, gemeinsamer DC Vorläufer im Menschen bisher noch nicht nachgewiesen werden, seine Existenz wird jedoch vermutet [40]. Das bisherige Modell der Ontogenese dendritischer Zellen im humanen Organismus stützt sich auf die Existenz eines Granulozyten-Makrophagen Vorläufer (*colony forming unit granulocyte/monocyte*, CFU-GM), welcher aus CD34⁺ HSC hervorgeht und über die Zwischenstufen Monoblast und Promonozyt schließlich im Blut zu CD14^{hi}CD16⁻ sowie CD14^{lo}CD16⁺ Monozyten ausdifferenziert. Auch ein multilymphoide Vorläufer (*multilymphoid progenitor*, MLP) wird diskutiert [41]. Monozyten zirkulieren im Blutkreislauf und migrieren anschließend in periphere Gewebe wo diese zu Makrophagen, interstitiellen (bzw. dermalen) CD14⁺ DC sowie LC ausdifferenzieren können [42]. Letzteres ist vermutlich abhängig von der Expression diverser Chemokinrezeptoren (*c-c chemokine receptor*, CCR) wie CCR6 und der gerichteten Migration in epidermale Schichten, passiert *in vivo* jedoch ausschließlich unter entzündlichen Bedingungen und vermittelt hier eine nur kurzfristige Neubesiedlung [43, 44]. LC selbst differenzieren in Abhängigkeit vom transformierenden Wachstumsfaktor- β 1 (*transforming growth factor β 1*, TGF- β 1) in gesunder Haut selbständig, d.h. unabhängig von zirkulierenden Vorläuferzellen, aus einem eigenen Pool langlebiger, hämatopoetischer Vorläufer und regulieren somit die Immunhomöostase der Epidermis *in situ* [45-47].

Neue Studien zeigten zudem, dass LC Vorläufer bereits vor Geburt die epidermalen Regionen muriner Haut besiedeln [48]. Die Identität dieser embryonalen Vorläufer in der Maus wurde kürzlich geklärt und diese als Dottersack-Makrophagen sowie Monozyten der fötalen Leber charakterisiert [49, 50].

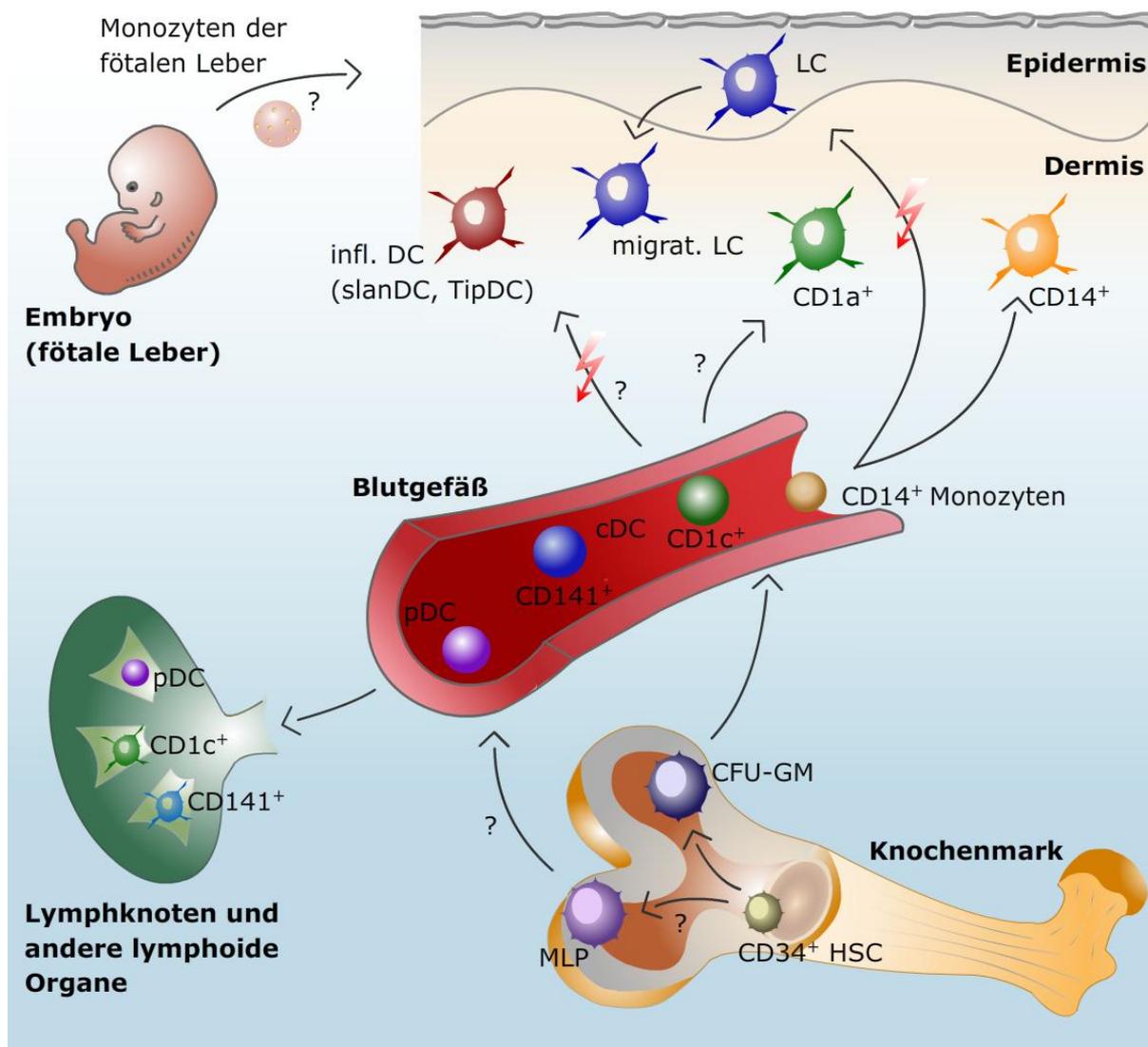


Abbildung 1-1: Übersicht der Entwicklungswege humaner DC Populationen. Aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich Granulozyten-Makrophagen Vorläufer (CFU-GM), welche als direkte Vorläuferzellen der im Blutkreislauf zirkulierenden Monozyten gelten. Diese migrieren in periphere Gewebe und differenzieren hier zu CD14⁺ DC. Ein multilymphoider Vorläufer (MLP) sowie ein direkter Vorläufer humaner cDC Populationen konnten bisher noch nicht identifiziert werden (siehe „?“). CD1c⁺ sowie CD141⁺ DC zirkulieren im Blut und finden sich in lymphoiden sowie in nicht-lymphoiden Geweben. LC differenzieren selbst aus langlebigen hämatopoetischen Vorläufern aus, welche sich vermutlich (siehe „?“) aus Monozyten der fötalen Leber entwickelt haben. Ausschließlich unter entzündlichen Bedingungen (siehe „Blitz“) sind CD14⁺ Monozyten an der kurzfristigen Neubesiedlung der Epidermis mit LC beteiligt. Der Ursprung weiterer DC Subtypen in entzündetem Gewebe ist bisher noch nicht geklärt.

1.1.2 Beteiligung am angeborenen Immunsystem:

DC nehmen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Aktivierung naiver T-Zellen eine zentrale Rolle in der Regulation der adaptiven Immunantwort ein. Doch auch in die genetisch festgelegten Mechanismen der angeborenen Immunität sind DC involviert [5, 51]. Diese sind durch eine schnelle, jedoch unspezifische Reaktion auf eine Vielzahl von Stimuli inklusive mikrobieller Pathogene, entarteter körpereigener Zellen sowie Autoantigenen charakterisiert, wobei die Erkennungsmechanismen bereits konstitutiv vorhanden sind.

1.1.2.1 Antigenerkennung und Detektion von Gefahrensignalen

Ausgehend von der weitreichenden Verteilung der unterschiedlichen Populationen im menschlichen Organismus, vornehmlich in peripheren Grenzflächenorganen, sind DC prädestiniert frühzeitig auf eingedrungene Pathogene zu reagieren [52, 53]. DC verfügen hierfür über unterschiedliche Methoden die invasiven Fremdantigene endozytotisch aufzunehmen. Dazu zählen Makropinozytose, Phagozytose sowie die rezeptorvermittelte Endozytose [54]. Die beiden erstgenannten Mechanismen beschreiben relativ unspezifische Vorgänge, bei der durch Einstülpung der Zellmembran extrazelluläre Flüssigkeiten bzw. feste Partikel in das Zellinnere aufgenommen und prozessiert werden können [55, 56]. Die rezeptorvermittelte Endozytose basiert dagegen auf der spezifischen Erfassung konservierter Strukturen pathogener Organismen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP), die sich in einer Vielzahl von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen finden. Hierzu gehören charakteristische Zuckermoleküle, bakterielle Zellwandbestandteile oder auch mikrobielle Nucleinsäuren. Identifiziert werden diese Strukturen über ein Repertoire unterschiedlicher Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), deren Expressionsprofil in verschiedenen DC Subtypen variieren kann und damit auch zu funktioneller Variabilität einzelner Populationen beiträgt [57].

Toll-like Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR) sind Säugerhomologe des erstmalig Anfang der 1980er Jahre identifizierten Toll-Rezeptors in der „schwarzbäuchigen“ Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), von denen heute zehn funktionelle Typen im Menschen bekannt sind [58, 59]. Innerhalb der Zelle sind die meisten TLR primär auf der Zelloberfläche exprimiert und reagieren selektiv auf unterschiedliche pathogene Muster, wobei der natürliche Ligand für TLR10 noch nicht identifiziert ist (*Tabelle 1*) [60]. TLR3 sowie TLR7 bis TLR9 sind dagegen in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen lokalisiert und detektieren virale sowie bakterielle Nucleinsäuren im Zytosol. Nach Antigenerkennung funktionieren TLR als Homodimere, wobei TLR2 aufgrund struktureller Verwandtschaft zu

TLR1 und TLR6 mit diesen Heterodimere ausbildet [61]. Das Verteilungsmuster in verschiedenen DC Populationen ist uneinheitlich, wobei das jeweilige Expressionsprofil der TLR die Reaktivität einzelner Subtypen gegenüber mikrobiellen Organismen bestimmt [62, 63]. Während humane cDC des Blutes und DDC ein breites Spektrum an TLR exprimieren, fehlen epidermalen LC eine Reihe von Rezeptoren zur Erkennung bakterieller Antigene, was dazu beiträgt die Kontrolle und Integrität der kommensalen Hautflora zu gewährleisten [64-66]. Auch pDC zeigen eine hohe Spezialisierung in der Erkennung viraler Antigene und exprimieren hauptsächlich TLR7 und TLR9, wobei deren Aktivierung die Sekretion hoher Mengen antiviral wirksamer Interferone (IFN) induziert.

Tabelle 1: Übersicht der Mustererkennung humaner TLR nach [67].

Rezeptor	PAMP (Auswahl)	Organismus
TLR 1 (über TLR2)	Triacyl-Lipopeptide	Mykobakterien
TLR 2	Lipopeptide, Lipoproteine Lipoarabinomannan Peptidoglykane Zymosan	gramnegative Bakterien Mykobakterien Bakterien Hefen
TLR 3	Doppelstrang (ds) RNA	Viren
TLR 4	Lipopolysaccharide (Lipid A) Mannan Lipoteichonsäure	gramnegative Bakterien <i>Candida albicans</i> Treponema
TLR 5	Flagellin	geißeltragende Bakterien
TLR 6 (über TLR2)	Diacyl-Lipopeptide	Mykobakterien
TLR 7	Einzelstrang (ss) RNA	Viren
TLR 8	Einzelstrang (ss) RNA	Viren
TLR 9	unmethylierte DNA und CpG-Oligonukleotide	Bakterien, Mykobakterien, Viren
TLR 10	unbekannt	unbekannt

Die Erkennung pathogener Strukturen aktiviert die intrazelluläre TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*) Domäne und mobilisiert hierauf Adaptermoleküle wie MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), welches von fast allen TLR rekrutiert wird, oder TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), dessen Aktivität sowohl TLR3- als auch TLR4-abhängig reguliert werden kann. Die anschließende Modulation Mitogen-

aktivierter Proteinkinasen (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) sowie spezifischer Transkriptionsfaktoren wie dem nukleären Faktor kappa B (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, NFκB) bzw. den Interferon regulierenden Faktoren 3 und 7 (*interferon regulatory factor*, IRF3, IRF7) induziert dann die Produktion pro-inflammatorischer Signalmoleküle sowie direkt antiviral wirksamer Typ 1 Interferone [68, 69].

Eine weitere Gruppe der PRR stellen C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR) dar, welche spezifische Zuckermoleküle wie Mannose- und Fucosyl-Reste auf Oberflächen mikrobieller Pathogene erkennen [70]. MMR (*macrophage mannose receptor*, CD206) und DEC-205 (*lymphocyte antigen 75*, CD205) gehören zu Typ 1 CLR und besitzen pro Rezeptor bis zu 10 Erkennungsdomänen für pathogene Muster (*carbohydrate recognition domains*, CRD). Langerin (CD207), welches beim Menschen ausschließlich auf epidermalen LC exprimiert wird, fördert u.a. die Internalisierung und Degradierung des humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-1 [71] und verhindert die Übertragung des aktiven Virus auf CD4⁺ T-Lymphozyten [51]. DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*, CD209) gehört ebenso wie Langerin zu Typ 2 CLR und erkennt nachweislich eine Vielzahl pathogener Mikroben, darunter das Cytomegalievirus, das Ebola Virus, HIV sowie Leishmanien und *Candida* Arten [72]. Aktivierte CLR vermitteln ihre Signale über ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) -enthaltene Adaptermoleküle und können auch modulierend auf die Aktivität der TLR einwirken [70].

NOD-like Rezeptoren (*nucleotide-binding oligomerization domain receptors*, NLR) erkennen Peptidoglykane (PGN), essentielle Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien [73]. Da auch einige TLR diese Strukturen detektieren, können hierdurch synergistische Effekte induziert werden. Die NLR-Familie umfasst zusätzlich Inflammasomen, zytosolisch lokalisierte Multiproteinkomplexe, welche die enzymatische Konversion inaktiver Formen von IL-1β, IL-18 sowie IL-33 steuern und somit protektive Mechanismen gegen eine Vielzahl infektiöser Agenzien durch die Sekretion biologisch aktiver Zytokine vermitteln [74].

Der Einfluss pathogener Organismen kann jedoch auch direkte Schädigungen im umgebenden Gewebe verursachen und die Freisetzung intrazellulärer Komponenten wie Hitzeschockproteine oder Nukleinsäuren sowie extrazellulärer Matrixmoleküle induzieren, welche dann als Gefahrensignale fungieren und als „Alarmine“ (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) zusammengefasst werden. Spezifische Rezeptoren hierfür wurden bisher noch nicht ausreichend definiert, einige sind jedoch bereits bekannt [75]. Schädigungen des Gewebes sind oftmals charakterisiert durch eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren, wie TNF-α und Interleukin-1 (IL-1), wodurch das allgemeine Entzündungsgeschehen direkt beeinflusst wird. Obwohl DC oftmals selbst Produzenten dieser Signalmoleküle sind, erkennen sie diese über TNF Rezeptoren (TNFR-1 und -2),

wobei anschließend das zytosolische Adaptermolekül TRADD (*tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert sowie über den IL-1 Rezeptor Typ 1, wodurch nach Dimerisierung mit dem akzessorischen Rezeptorprotein (IL-1RAP) auf zytosolischer Seite, ähnlich wie bei TLR, MyD88-abhängige Signalkaskaden stimuliert werden [76, 77].

1.1.2.2 Zytokin- und Chemokinfreisetzung

Das angeborene Immunsystem verfügt über lösliche Proteine bzw. Peptide zur direkten Abwehr von pathogenen Keimen. Hierzu gehören das Mannose-bindende Lektin (*mannose binding lectin*, MBL) als Akute-Phase-Protein, Pentraxine, antimikrobielle Peptide und Defensine sowie das Komplementsystem [78, 79]. Die Erkennung pathogener Muster bzw. die Anwesenheit von Gefahrensignalen führt rezeptorvermittelt zur initialen Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und chemotaktisch aktiver Botenstoffe (Chemokine). DC vermögen es große Mengen an direkt antiviral wirkenden Typ 1 Interferonen sowie IL-12p70 (IL-12) und TNF- α zu sezernieren, mit dem Ziel weitere Zellen des angeborenen Immunsystems zu mobilisieren und zu aktivieren. Hierzu gehören Natürliche Killerzellen (NK Zellen), Natürliche Killer T-Lymphozyten (NKT-Zellen) und γ/δ T-Zellen [80, 81]. Die Aktivierung dieser Lymphozyten resultiert in einer raschen Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) und einer erhöhten zytotoxischen Aktivität gegenüber Fremdorganismen oder entarteten sowie virusinfizierten Zellen. Die Sekretion von IFN- γ verstärkt zudem die Aktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten am Ort der Gewebsverletzung bzw. der Pathogeninvasion und wirkt rückwirkend stimulierend auf die Zytokinsekretion aktivierter DC [82]. Letzteres verstärkt die Aufnahme von Fremddantigenen und forciert die weitere Reifung zu professionellen APC. Diese zeigen nun erhöhtes kostimulatorisches Potential mit dem Ziel der Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen und erweitern somit die primären Effekte des angeborenen Immunsystems um die der adaptiven Immunantwort.

1.1.3 Beteiligung am adaptiven Immunsystem

DC besitzen die Möglichkeit Fremdstrukturen zu erkennen und effizient aufzunehmen, allerdings beschränkt sich dies auf einige wenige Antigene pro Zelle. Daher ist bisher nicht geklärt, inwiefern DC tatsächlich an der „mikrobiellen Clearance“ beteiligt sind. Anders als bei Makrophagen, den eigentlichen Phagozyten des angeborenen Immunsystems, stehen bei DC nicht der intrazelluläre Verdau der aufgenommenen Antigene im Vordergrund, sondern die Mechanismen der adaptiven Immunantwort.

1.1.3.1 Antigenprozessierung und -präsentation

Ihrer Funktion als professionelle APC entsprechend, müssen extrazelluläre Pathogene im Verlauf der Immunantwort internalisiert werden um die aufbereiteten Antigenfragmente über spezielle Oberflächenmoleküle den naiven T-Lymphozyten zu präsentieren. Diese verfügen hierzu über ein spezifisches Repertoire an Rezeptoren (*t cell receptor*, TCR), die für die Erkennung dieser Komponenten zuständig sind.

Zur Aufnahme von Pathogenen vermag die Plasmamembran der DC die erkannten Antigene zu umschließen und als Phagosomen bzw. Endosomen zu internalisieren. Im Gegensatz zu Makrophagen, welche hohe Mengen an schädigenden Fremdanitigenen phagozytieren, inaktivieren DC jedoch im Verlauf ihrer Reifung die rhoGTPase Cdc42 und verringern somit ihre endozytotischen Aktivitäten [83]. Nach Aufnahme der extrazellulären Fremdkörper erfahren die gebildeten frühen Endosomen einen Reifungsprozess zu Endolysosomen bzw. späten Endosomen durch die Fusion mit Lysosomen [84]. Diese enthalten proteolytische Enzyme (saure Hydrolasen) und dienen der Spaltung des Antigens in einzelne Peptidfragmente. Im Gegensatz zu Makrophagen, welche die aufgenommenen Fremdkörper effizient zersetzen können, geschieht die Fragmentierung des Antigens in DC weitaus langsamer. Zurückgeführt wird dies auf einige Besonderheiten, wie einen milderen intralysosomalen pH-Wert sowie eine geringere Anzahl proteolytisch wirksamer Enzyme [85, 86]. In Endolysosomen geschieht die anschließende Beladung der Peptidfragmente auf MHC-2 (*major histocompatibility complex 2*) Moleküle. Darauf folgend wird der Komplex aus Peptidantigen und MHC-2 Molekül über nicht-lysosomale Vesikel zur Zelloberfläche transportiert und steht der Präsentation an CD4⁺ T-Lymphozyten zur Verfügung [87, 88].

Eine besondere Eigenschaft der DC in der Präsentation von Fremdanitigenen ist die sogenannte Kreuzpräsentation, bei der exogene Mikroben auch über MHC-1 Moleküle zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden [89]. Werden üblicherweise körpereigene Peptidfragmente auf MHC-1 Moleküle beladen, kann im Falle der Kreuzpräsentation eine spezifische Abwehr gegen entartete bzw. virusinfizierte Zellen eingeleitet werden. Der Verlauf zur Bindung von Fremdanitigenen an MHC-1 Moleküle ist nicht sicher aufgeklärt, aber eine aktive Alkalisierung in den Phagosomen scheint essentiell um Antigene vor einem zu raschen Verdau zu schützen [90]. Analog zur Prozessierung körpereigener Proteine müssen exogene Antigene das Endosom verlassen und über zytoplasmatische Proteasomen fragmentiert werden. Die degradierten Peptide werden anschließend TAP (*transporter associated with antigen presentation*) -abhängig in das Lumen der Phagosomen transportiert und auf MHC-1 Moleküle geladen [91].

Die Theorie, dass T-Lymphozyten ausschließlich Peptidfragmente erkennen, erscheint veraltet. DC stehen eine Reihe von CD1-Rezeptoren zur Verfügung, mittels derer zelleigene sowie exogene Lipide, Glykolipide sowie Lipopeptide gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert werden können [92]. Die CD1 Familie umfasst insgesamt fünf Rezeptortypen: CD1a - e, deren Verteilungsmuster jedoch auf diversen DC Populationen variiert und auch hier auf Unterschiede in der jeweiligen Funktionalität hindeutet. Während pDC keine CD1 Rezeptoren exprimieren, zeigen epidermale LC hohe Mengen an CD1a sowie mittlere Level an CD1c auf ihrer Oberfläche, jedoch kein CD1b bzw. CD1d. Dermale Subtypen dagegen exprimieren CD1a-d [93-95]. Lymphozyten, welche Antigene auf CD1a - c Molekülen erkennen, scheinen funktionell den adaptiven T Helferzell (*t helper*, Th) 1-Zellen sowie zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen zuzugehören [92], wohingegen CD1d gekoppelte Antigene von humanen NKT-Zellen erkannt werden.

1.1.3.2 Maturation und Migration

Die Aufnahme pathogener Organismen sowie das Erkennen von Gefahrensignalen initiiert eine komplexe Differenzierung der zuvor unreifen DC in professionelle APC, die nun ein erhöhtes migratorisches Potential aufweisen um regionale Lymphgewebe zu erreichen. Epidermale LC sind in der äußersten Peripherie lokalisiert und damit einer Vielzahl exogener Stimuli ausgesetzt. Sobald pathogene Erreger erkannt werden, vermitteln LC gemäß der Mechanismen der angeborenen Immunantwort die Ausschüttung pro-inflammatorischer Signalmoleküle, welche als Gefahrensignal auf direkt umgebende Keratinozyten einwirken und die Sekretion von TNF- α induzieren (*Abb.: 1-2*) [96]. Unter Einfluss dieser Zytokine verringern LC die Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin und lösen sich aus dem epidermalen Zellverband. Keratinozyten sind selbst Produzenten des Chemokinliganden CCL20 (*CC chemokine ligand*, CCL), welches unter physiologischen Bedingungen als endogener Ligand des Rezeptors CCR6 den Verbleib unreifer LC in suprabasalen Schichten vermittelt. Ähnlich wie E-Cadherin, verringert sich auch die Expression von CCR6 auf der Oberfläche reifender LC und erleichtert deren Migration aus der Epidermis. Das Auswandern in tiefere Gewebsschichten verläuft im Falle aktivierter LC vermutlich in einem Zweischrittmodell, wobei die initiale Migration in die Dermis abhängig ist von der gesteigerten Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 (*stromal cell derived factor 1 receptor*), dessen Ligand CXCL12 (*stromal cell derived factor 1*, SDF-1) unter Einfluss von TNF- α vermehrt von dermalen Fibroblasten produziert und sezerniert wird. Ebenso wird die erhöhte Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) auf der Oberfläche reifender LC diskutiert, um die Basalmembran der Epidermis zu durchdringen [97-99]. Das primäre Verweilen reifer LC in dermalen Schichten dient möglicherweise der Übertragung der aufgenommenen

Antigenfragmente auf dermale DC, womit die induzierte Immunantwort amplifiziert werden würde [100, 101]. Die anschließende Migration in lymphoide Organe ist nachweislich abhängig von der Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Vornehmlich Stromazellen regionaler Lymphknoten sezernieren dessen Liganden CCL19 sowie CCL21, wodurch die unmittelbare Lokalisation der DC zu T-Zellen dirigiert wird [102]. Hierzu erhöhen sich ebenfalls die Level des Integrins LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen-1*) auf der Oberfläche aktivierter DC, dessen Ligand ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) deren Adhäsion auf Endothelzellen lymphoider Gewebe vermittelt [103].

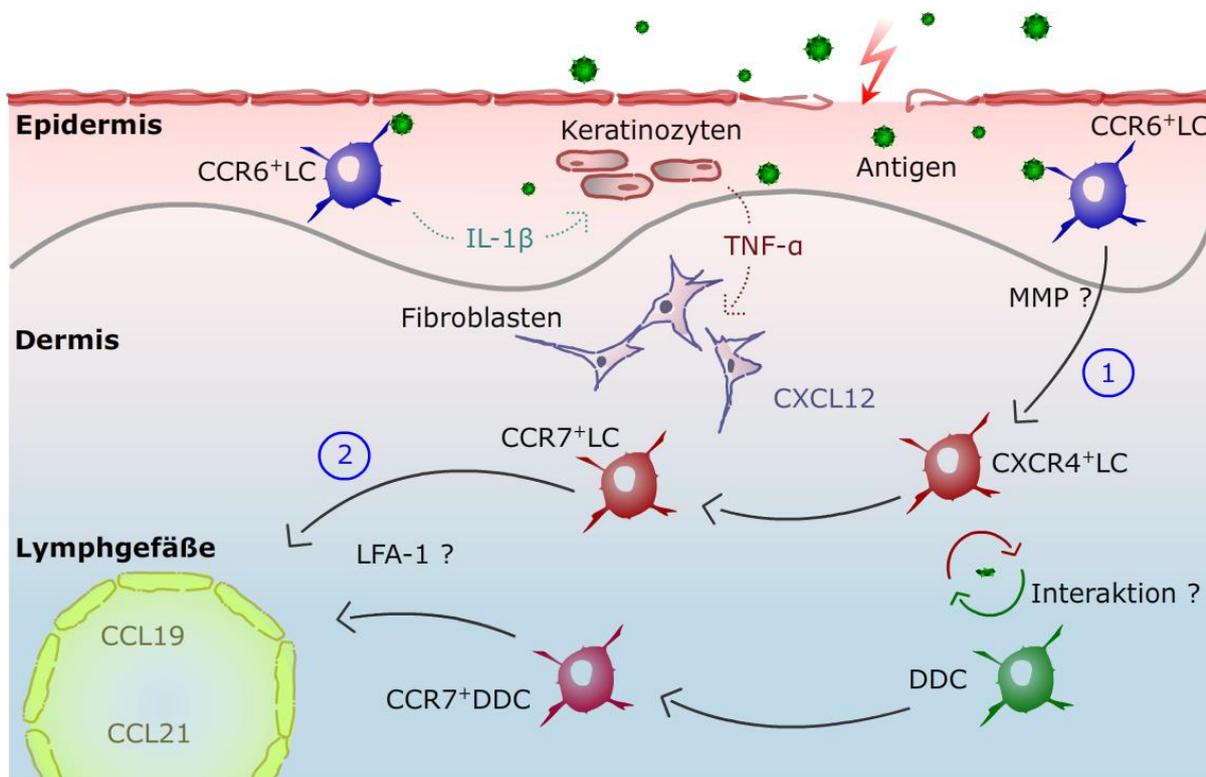


Abbildung 1-2: Zweischnitt-Migrationsmodell epidermaler LC-Populationen nach Pathogenerkennung. Die Invasion mikrobieller Keime sowie ein entzündliches Hautmilieu induzieren die Freisetzung von Zytokinen (TNF- α , IL-1 β). Diese wirken auto- bzw. parakrin auf epidermale LC, woraufhin diese mit dem Prozess der Reifung beginnen. (1) Initial vermittelt die Expression von CXCR4 die Migration in die Dermis, wobei stimulierte Fibroblasten für die benötigte Chemokinsekretion sorgen. Eine Übertragung von Antigenfragmenten aktivierter LC auf dermale DC wird diskutiert. (2) Nachfolgend vermittelt CCR7 die Migration in lymphoide Gewebe.

Auf ihrem Weg in regionale Lymphknoten vollziehen aktivierte DC einen Reifungsprozess mit dem Ziel die Differenzierung und Proliferation naiver T-Zellen effektiv modulieren zu können. Die stark erhöhte Expression pathogener Peptidfragmente über MHC-2 Moleküle auf der Zelloberfläche gewährleistet hierbei die optimale Antigenpräsentation an eine Vielzahl naiver

T-Lymphozyten. Für eine effiziente Stimulation bedarf es jedoch noch weiterer Signale, welche im Rahmen des andauernden Reifungsprozesses bereitgestellt werden. Die Liganden CD80 und CD86, zwei Oberflächenproteine aus der Reihe der immunregulatorischen B7-Familie, aktivieren den kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf naiven T-Lymphozyten und werden nachweislich für eine effektive T-Zell-Antwort benötigt [104, 105]. Im Laufe ihrer Reifung erhöhen DC die Expressionsrate von CD80 und CD86, da Transportvesikel, welche den Transit antigenbeladener MHC-2 Proteine an die Zelloberfläche regulieren, zusätzlich kostimulatorische Liganden transportieren und es hierdurch zu einer direkten Gruppierung mit MHC-2 Molekülen auf der Zelloberfläche kommt. [5, 105]. Ebenso dient CD83 als typischer Marker für reife DC, dessen Funktion jedoch lange Zeit unbekannt war. Neuere Studien weisen eher auf eine immunsuppressive Funktion hin [106, 107]. Darüber hinaus zeigt sich, dass reife DC trotz einer effektiven Antigenpräsentation sowie einer erhöhten Oberflächenexpression von CD80 bzw. CD86 nicht zwangsläufig eindeutig immunstimulierende Funktionalität besitzen. Die komplexen immunregulatorischen Mechanismen der Interaktion unreifer bzw. aktivierter DC mit naiven bzw. stimulierten T-Zellen werden daher in nachfolgenden Kapiteln genauer betrachtet.

1.1.3.3 Stimulation einer effektorischen T-Zell-Antwort

Entscheidend für die Funktion dendritischer Zellen als professionelle APC ist die Interaktion mit naiven T-Lymphozyten und der damit einhergehenden Induktion einer primären Immunantwort. Diese Interaktion verläuft bidirektional und umfasst die effektive Präsentation prozessierter Fremdantigene in simultaner Kostimulation von Seiten der DC, welche ihrerseits nun aktivierende Signale von stimulierten T-Lymphozyten empfangen. Vermittelt wird dies über den CD40 Liganden (CD40L), dessen Bindung an den CD40 Oberflächenrezeptor der DC deren kostimulatorische Aktivität erhöht [108]. Auch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wird gefördert, sofern eine vorherige Aktivierung der DC erfolgte [109, 110]. Die Fähigkeit zur Differenzierung verschiedenster antigenspezifischer Th-Subtypen entwickeln DC im Zuge ihres Reifungsprozesses. Die an der Antigenerkennung beteiligten PRR regulieren spezifische Signaltransduktionswege, welche zusammen mit den Signalen des umliegenden Gewebes die weitere Entwicklung reifender DC prägen und die stimulatorische Kapazität gegenüber naiven CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen definieren. Während letztere hauptsächlich zytotoxische Reaktionen gegen virusinfizierte bzw. entartete Zellen vermitteln, zeigen CD4⁺ T-Lymphozyten ein variables Bild der immunologischen Funktionalität [111].

Die Existenz verschiedener Th-Zelltypen wurde erstmals an murinen CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen, die sich *in vitro* durch die Art der sezernierten Zytokine unterschieden [112]. IFN- γ war hierbei das definierende Zytokin der Th1-Population, wohingegen IL-3 und IL-4 den Th2-Typ charakterisierten. Nach Erkenntnis über die Komplexität der heterodimeren IL-12 Zytokinfamilie erweiterte sich das Spektrum um Th17-Zellen, die durch Stimulation mit IL-23 zu IL-17-produzierenden effektorischen T-Zellen differenzierten [113]. Den initialen Studien anschließend hat sich das Bild der unterschiedlichen effektorischen Populationen komplettiert und ist um einige wichtige sekretorische Zytokine erweitert worden (*Tabelle 2*).

Tabelle 2: Übersicht der CD4⁺ Th-Subtypen und deren Sekretionsprofil nach [111].

CD4 ⁺ Th-Subtypen	Sekretionsprofil
Th1	IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α / - β
Th2	IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-25, IL-31
Th9	IL-9, (IL-10, IL-21)
Th17	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, TNF- α , GM-CSF, CCL20
Th22	IL-22, TNF- α , CCL15, CCL17
Tfh	IL-4, IL-12, IL-10, IL-21

Die initiale Aktivierung naiver T-Lymphozyten stimuliert die Produktion von IL-2, dessen Transkription normalerweise durch BLIMP1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) negativ reguliert wird. IL-2 stimuliert autokrin und parakrin die Expression der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptortrimers auf der Oberfläche aktivierter T-Lymphozyten. Während die β - und γ -Untereinheiten auch auf nicht stimulierten Zellen zu finden sind, besitzen diese nur wenig Affinität zum endogenen Liganden. Jedoch erhöht die erfolgte Gruppierung dessen Affinität um das 10-100fache, wodurch IL-2 nun die klonale Expansion aktivierter T-Lymphozyten zu diversen Effektorzellen reguliert [114]. Die primäre Differenzierung wird durch das Sekretionsprofil der Zytokine gesteuert, die von aktivierten DC in selektiver Abhängigkeit der abzuwehrenden Pathogene produziert werden. Diese modulieren rezeptorvermittelt die Aktivität verschiedener Mastertranskriptionsfaktoren, welche wiederum die Freisetzung polarisierender Zytokine steuern und die Expression wichtiger Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen regulieren (*Abb.: 1-3*) [111].

IFN- γ und IL-12 induzieren über STAT1 (*signal transducers and activators of transcription 1*) und STAT4 die Expression der β_2 Kette des IL-12 Rezeptors auf der Oberfläche naiver T-Lymphozyten. Hierdurch erhöht sich deren Empfindlichkeit für IL-12 sowie die Aktivität des

Masterregulators T-bet (T-box transcription factor expressed in T cells) [115, 116]. Th1-Zellen stimulieren über die Sekretion von IFN- γ die Aktivität von Makrophagen und erhöhen somit die mikrobielle Clearance. Darüber hinaus fördern sie die Entwicklung von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen, welche die Abwehr virusinfizierter bzw. entarteter Zellen vermitteln [117]. Eine fehlgeleitete Th1-Antwort ist vermutlich an der Entwicklung einer Vielzahl unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis beteiligt sowie an der Pathogenese der Atopischen Dermatitis des intrinsischen Typs [118-120].

IL-4 vermittelt dagegen inhibitorische Signale gegen eine Polarisation zu Th1-Lymphozyten und gilt als wichtiges Zytokin zur Differenzierung von Th2-Zellen. Diese charakterisieren sich durch die Expression der Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA3. Letzterer gehört zur GATA Familie und bindet ein gemeinsames, namensgebendes DNA-Muster: [5'-(A/T)GATA(A/G)-3']. Stärker noch als die IL-4 induzierten Signalwege scheint jedoch die IL-2-abhängige Aktivität von STAT5 die Th2-Antwort zu stimulieren [121]. Th2-Zellen dirigieren durch primäre B-Zell-Aktivierung die Antikörpersekretion gegen extrazelluläre Erreger und regulieren über IL-4 und IL-5 den Isotypenswitch von IgM zu IgA, IgE bzw. IgG. [122]. Th2-Zellen stimulieren bzw. rekrutieren Mastzellen sowie eosinophile Granulozyten zum Infektionsherd bzw. zum Ort der Allergen- oder Toxinexposition. Eine pathologisch erhöhte Th2-abhängige Immunantwort scheint daher an der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale und der extrinsischen Form der Atopischen Dermatitis beteiligt zu sein [120, 123].

Th17-Zellen entwickeln sich unabhängig von Th1- und Th2-typischen Signaltransduktoren, jedoch existieren diesbezüglich widersprüchliche Daten zu den tatsächlich essentiellen Differenzierungsfaktoren. TGF- β 1, IL-21, IL-1 β und IL-6 wurden beschrieben die Th17-Antwort zu stimulieren, wobei IL-23 wohl die Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung und Expansion einer bereits induzierten Th17-Antwort vermittelt [124]. Th17-Zellen sind u.a. durch die Produktion von IL-17A und IL17F sowie IL-22 charakterisiert, wobei RORC (*retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C*) und STAT3 als kritische Transkriptionsfaktoren gelten. Th17-Zellen sind wichtige Regulatoren der Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien, Parasiten und Pilze, vermutlich jedoch weniger aktiv gegen intrazelluläre Erreger [125]. Die sezernierten Zytokine mobilisieren u.a. neutrophile Granulozyten und erhöhen die Sekretion antimikrobieller Peptide wie Reg3 α durch epidermale Keratinozyten. Th17-Zellen nehmen hierdurch direkten Einfluss auf deren Proliferation und Differenzierung und sind vermutlich an der Pathogenese inflammatorischer Hauterkrankungen wie Psoriasis vulgaris beteiligt, welche durch Hyperproliferation und abnormale Differenzierung epidermaler Keratinozyten charakterisiert ist [126].

TNF- α und IL-6 gelten als kritische Zytokine für die Differenzierung zu Th22-Zellen, wobei der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) als möglicher Masterregulator diskutiert wird [127]. Die Expression von CCR4, CCR6 bzw. CCR10 vermittelt dabei die Einwanderung in entzündete Hautareale, wo die Sekretion von IL-22 protektiven Einfluss auf die Wundheilung in Haut, Lunge und Darm zeigt [128, 129]. Darüber hinaus spielen Th22-Zellen vermutlich eine Rolle in der Pathogenese verschiedenster chronisch-entzündlicher Erkrankungen [130-132]. IL-4 und TGF- β bedingen die Entwicklung von Th9-Zellen, einer erst kürzlich beschriebenen Population, welche sich durch die Sekretion von IL-9 sowie IL-10 und IL-21 charakterisiert [133]. Zwar gestaltete sich die exakte Charakterisierung der immunologischen Relevanz von Th9-Zellen über lange Zeit schwierig, jedoch wird heute deren Beteiligung an der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen sowie allergischen Asthmas diskutiert [133]. Unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors Bcl6 (*b cell CLL/lymphoma 6*) differenzieren T-Lymphozyten zu Zellen, die aufgrund ihrer Lokalisation in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe und ihrer Fähigkeit die durch B-Zellen induzierte Sekretion von Immunglobulinen zu steuern, als folliculäre T-Helferzellen (Tfh) bezeichnet werden.

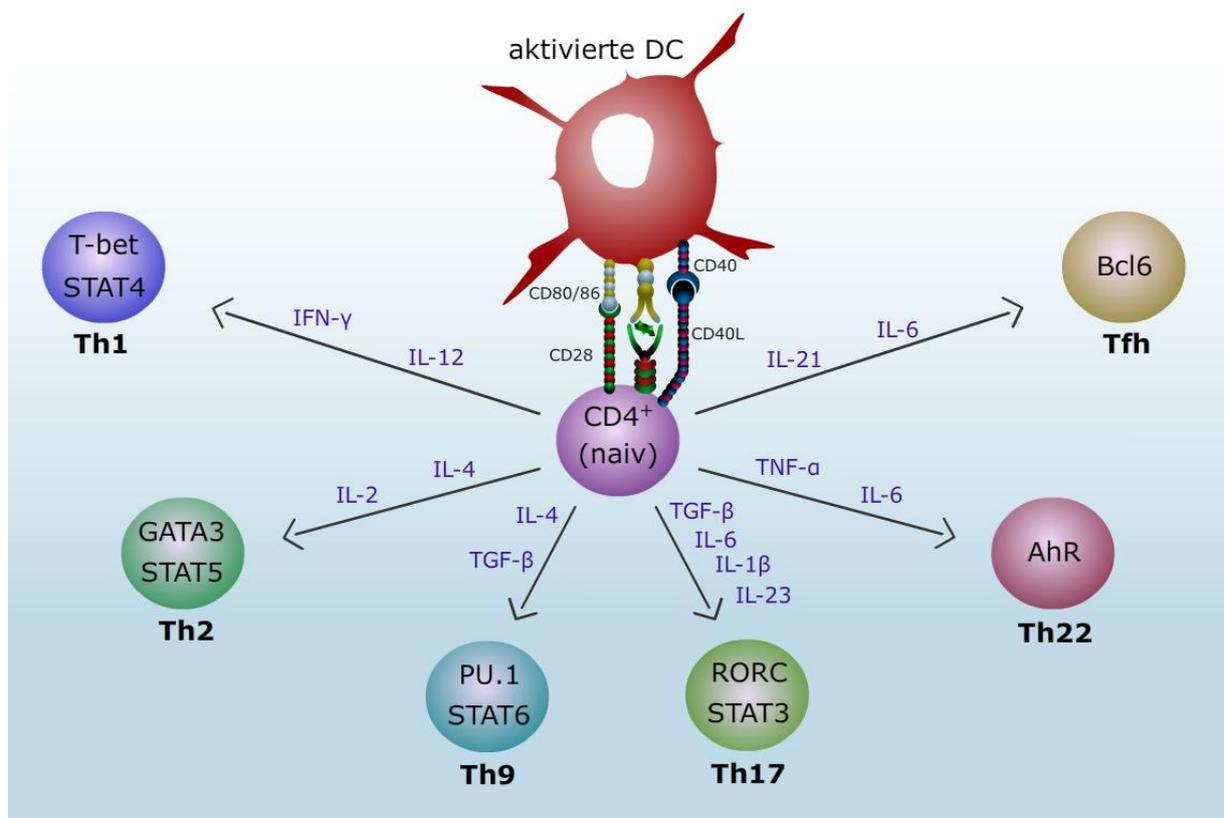


Abbildung 1-3: Induktion der primären adaptiven Immunantwort. Aktivierte DC stimulieren naive CD4⁺ T-Lymphozyten über effektive Antigenpräsentation und simultane Kostimulation. Als drittes Signal fungiert die spezifische Sekretion immunregulatorischer Zytokine, welche die klonale Expansion und terminale Differenzierung in unterschiedliche effektorische Th-Populationen induzieren.

1.1.3.4 Regulation der Immuntoleranz

Eine weitere Hauptaufgabe des Immunsystems besteht darin Nahrungsbestandteile, harmlose Fremdantigene sowie körpereigene Strukturen von pathogenen Mustern zu unterscheiden und diese zu tolerieren. Die Funktionalität der DC umfasst daher auch die Aufrechterhaltung immunregulatorischer Toleranzmechanismen, um die Entwicklung fehlgeleiteter Immunreaktionen zu unterbinden und eine überschießende Pathogenabwehr zu verhindern [134].

Die Mechanismen der zentralen Toleranz verhindern durch rezeptorvermittelte Apoptose die Entwicklung autoreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im Zuge der T-Zell Selektion im Thymus. Daran beteiligt sind spezialisierte medulläre Thymusepithelzellen (*medullary thymus epithelial cells*, mTEC) sowie stationäre cDC [135, 136]. Diese präsentieren den sich entwickelnden T-Lymphozyten gewebsspezifische Antigene mittels MHC-Rezeptoren. Dabei kommt es bereits in frühen Phasen der Reifung zur Elimination dysfunktionaler T-Zellen sowie von solchen Lymphozyten, die eine zu hohe Affinität zu körpereigenen Antigenen aufweisen [137]. Neuere Studien zeigten auch, dass migratorische DC im unreifen Zustand periphere Antigene in das Thymusgewebe transportieren können und somit das Spektrum an präsentierten Strukturen erweitern. Die negative Selektion autoreaktiver T-Lymphozyten erklärt jedoch nicht vollständig das komplexe Spektrum der immunologischen Selbsttoleranz. Hierzu kontrollieren DC durch die Sekretion von IL-2 und TGF- β die Entwicklung natürlich vorkommender regulatorischer T-Zellen (nTreg). Diese besitzen ein polyklonales TCR Repertoire und differenzieren im Thymus aus naiven CD4⁺ T-Lymphozyten, wobei Foxp3 (*forkhead box protein 3*) als kritischer Transkriptionsfaktor gilt [138]. nTreg sind immunologisch anerg und können nach Stimulation über supprimierende Eigenschaften die Proliferation und Zytokinproduktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie von NK Zellen inhibieren, wobei dies jeweils einen direkten Zellkontakt voraussetzt [139].

Obwohl die zentrale Toleranz die Elimination autoreaktiver T-Lymphozyten induziert ist nicht auszuschließen, dass einige dieser T-Zellen den Selektionsprozess überleben. DC sind daher in der Lage durch Vermittlung von Deletion bzw. Anergie die Einwirkung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie zu verhindern (*Abb.: 1-4*) [140]. Dort zeigen DC im unreifen Zustand nur moderate Level an MHC-2 Molekülen sowie eine sehr geringe Expressionsrate an CD80 und CD86. CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen, welche aufgrund ihres autoreaktiven TCR Repertoires mit unreifen DC interagieren, empfangen demnach kaum kostimulatorische Signale, was in einer verringerten klonalen Expansion sowie der Vermittlung von Deletion oder Anergie resultiert [141, 142]. In letzterem Zustand erhöhen T-Lymphozyten die Expression von PD-1 (*programmed cell death protein 1*) und CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte*

antigen 4), die durch Bindung der entsprechenden Liganden auf APC ein repressorisches Signal für die Produktion von IL-2 induzieren und dies die Zellen unempfindlich macht für weitere stimulatorische Einflüsse [143-145]. Darüber hinaus können auch reife DC durch Vermittlung von Deletion bzw. Anergie die Aktivität effektorischer T-Zellen inhibieren und hierdurch eine überschießende Immunantwort verhindern. Neben der bereits erwähnten Interaktion über PD-1 bzw. CTLA-4 wird hierbei die Expression des Fas-Rezeptors (Fas, CD95) auf der Oberfläche langanhaltend stimulierter autoreaktiver T-Zellen gezählt. Durch Bindung des Liganden (FasL) wird ein Apoptoseprogramm (*activation-induced cell death*, AICD) nach Trimerisierung des Rezeptors induziert und die Aktivität der Caspase 8 erhöht, sodass der programmierte Zelltod erfolgt [146]. Weiterhin gilt die Expression des Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) in spezifischen Subpopulation dendritischer Zellen als weiterer möglicher Mechanismus die Deletion autoreaktiver T-Lymphozyten zu induzieren, da hierdurch die für die Proliferation essentielle Aminosäure Tryptophan selektiv gespalten und über dessen Metabolite eine zytotoxische Wirkung erzielt wird [147].

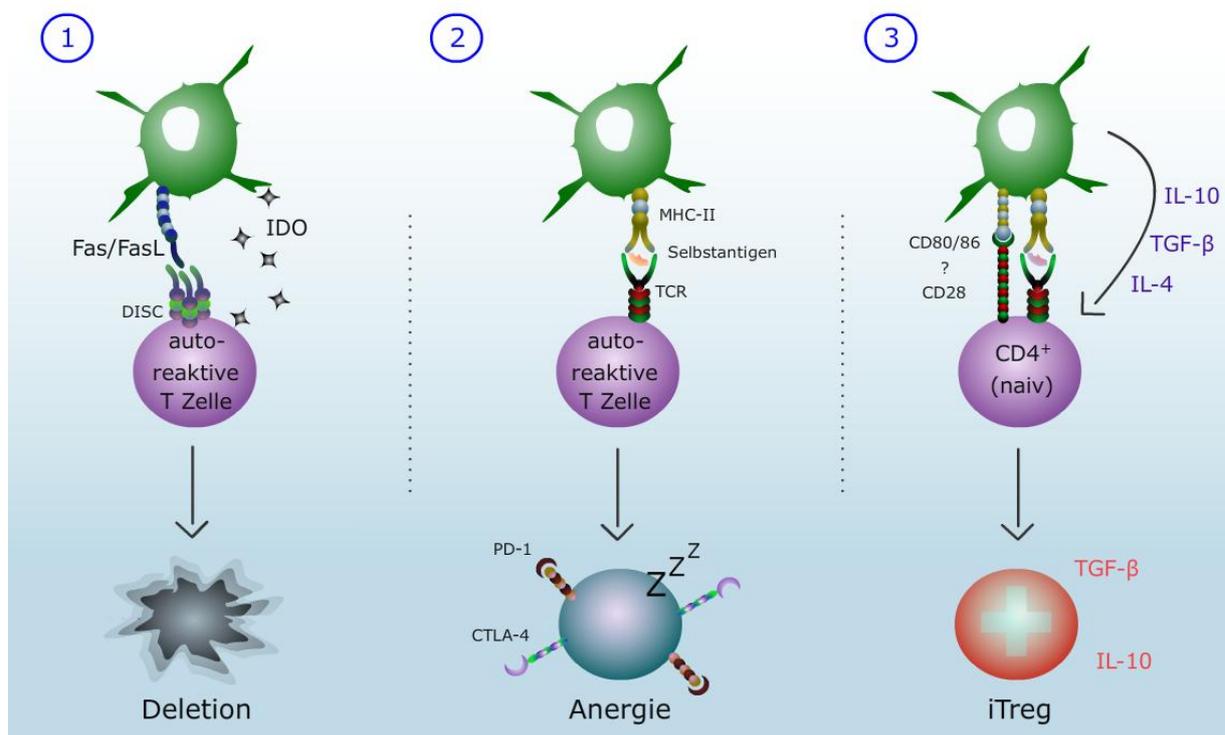


Abbildung 1-4: Mechanismen zur Vermittlung der Deletion bzw. Anergie autoreaktiver T-Zellen sowie die Induktion der Differenzierung CD4⁺ iTreg. (1) DC initiieren über Fas/FasL-Interaktion den rezeptorvermittelten Zelltod autoreaktiver T-Zellen. Auch die Expression von IDO resultiert in Apoptose. (2) Die Präsentation von Peptidfragmenten ohne simultane Kostimulation vermittelt die Induktion von Anergie. Negativ immunregulatorische Rezeptoren wie PD-1 und CTLA-4 werden vermehrt exprimiert und unterbinden eine erneute Aktivierung. (3) DC vermitteln die Ausreifung von iTreg. Diese supprimieren die Aktivität autoreaktiver oder effektorischer T-Zellen und verhindern somit eine überschießende bzw. fehlgesteuerte Immunantwort.

Als weitere Möglichkeit autoreaktive T-Lymphozyten zu inaktivieren zählt die Induktion regulatorischer T-Zellen (iTreg) in der Peripherie [148]. Diese stellen eine heterogene Zellpopulation dar und unterscheiden sich in den jeweiligen Mechanismen der Immunsuppression. Zwei der CD4⁺ iTreg-Subtypen wurden bisher am besten charakterisiert: Foxp3⁺ Th3-Lymphozyten, die vermutlich durch TGF- β , IL-4, IL-10 unter gleichzeitigem Ausschluss von IL-12 differenzieren sowie Foxp3⁻ Typ-1 regulatorische T-Lymphozyten (Tr1) [149-151]. Anders als nTreg, üben diese ihre suppressive Wirkung nicht über direkten Zellkontakt aus, sondern durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β , welche den Stillstand des Zellzyklus autoreaktiver T-Lymphozyten sowie deren Zelltod durch Apoptose induzieren [152-154]. Die Präsenz von iTreg fördert darüber hinaus die Expression von PD-L1 auf der Oberfläche von DC, sodass deren inhibitorischer Einfluss verstärkt wird [155]. Neuere Studien relativierten zudem die bisherige Ansicht, dass ausschließlich unreife DC an der Differenzierung regulatorischer T-Zellen beteiligt wären, obwohl eine zu starke Stimulation von CD28 dieser Entwicklung entgegenwirkt [156, 157].

1.1.4 Methoden zur funktionellen Charakterisierung von DC

Die wissenschaftliche Forschung an verschiedenen Populationen dendritischer Zellen etablierte in den letzten Jahren eine Vielzahl an Methoden zur Untersuchung und Charakterisierung der immunregulatorischen Funktionen menschlicher sowie muriner Subtypen. Die Beschreibung und Analyse dieser Faktoren *in vivo* geschieht vornehmlich an diversen Mausstämmen, die im Vergleich zu den genetisch unveränderten Tieren (wild type, WT) selektiv dezimierte bzw. funktionell modifizierte DC Populationen besitzen. Durch die gezielte Modifikation von Zielgenen werden Mausstämme erhalten, die eine genetische Ablation bzw. funktionale Veränderung definierter Subtypen erfahren, da entweder die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren, die Produktion essentieller Zytokine oder die Synthese der entsprechenden Zytokinrezeptoren inhibiert wird [158-160]. Eine Methode der rezeptorvermittelten Deletion bestimmter Zielzellen beruht auf der Diphtherie-Toxin (DT) Technologie [161]. Die zytotoxischen Eigenschaften des von *Corynebacterium diphtheriae* produzierten Toxins sind abhängig von dessen rezeptorvermittelter Endozytose und anschließender Freisetzung der DT-A Untereinheit [162]. Der DT-Rezeptor (DTR) bindet das Toxin dabei über die DT-B Untereinheit, wobei der murine Rezeptor um den Faktor 10⁵ geringer auf das Toxin reagiert, als der humane DTR. Diese Tatsache macht es nun möglich einen induzierbaren DC Knockout zu vermitteln. Abhängig davon, welche Promotorsequenz ausgewählt ist, gelingt hier eine spezifische Ablation von DC Populationen nachdem das Gen des menschlichen DTR in die murine Gen-Sequenz transferiert und anschließend das Toxin appliziert wird [163, 164].

In vivo Studien zur immunregulatorischen Funktionalität einzelner DC Populationen am Menschen sind aufgrund ethischer Aspekte weitaus seltener zu finden und konzentrieren sich oftmals auf die jeweilige Untersuchung pathologisch veränderter bzw. inflammatorischer Gewebeproben [19, 165, 166]. Der Großteil der Studien zu DC humanem Ursprungs basiert auf der *ex vivo* Differenzierung von DC Populationen aus frisch isolierten Vorläuferzellen und anschließender Analyse der funktionalen Diversität *in vitro* sowie ihrer selektiven Reifung und Beladung mit spenderabhängigen Antigenen zur Etablierung neuartiger Verfahren DC-basierter Immuntherapien [167, 168]. Hierzu werden CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen aus humanem Nabelschnur- oder Vollblut isoliert und in Gegenwart der Zytokine GM-CSF und TNF- α in unreife DC ausdifferenziert. Auch CD14⁺ Monozyten gelten als physiologische Vorläufer humaner DC Populationen und können unter Einfluss von GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen (*monocyte-derived dendritic cells*, MoDC) kultiviert werden. Beiden Verfahren gemeinsam ist, dass die *ex vivo* generierten DC typische Differenzierungsmarker von CD1a⁺CD14⁻ DDC exprimieren und das vollständige Potential der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation zeigen [169, 170]. Nachdem durch Verwendung von Tgfb1^{-/-} Mäusen erstmals bewiesen wurde, dass der genetische Knock-down von TGF- β 1 zur Ablation epidermaler LC führte, wurden diese Erkenntnisse direkt für die *ex vivo* Kultivierung aus humanen Vorläuferzellen genutzt. Auch hier fördert die Zugabe des Zytokins TGF- β die Differenzierung von CD14⁺ Monozyten und CD34⁺ Vorläuferzellen in DC Populationen, welche phänotypische sowie funktionelle Charakteristika CD207⁺ LC aufweisen (*monocyte-derived Langerhans-like cells*, MoLC) [65, 171, 172].

Darüber hinaus sind einige Zelllinien lymphoiden sowie myeloiden Ursprungs auf ihr Potential hin untersucht worden unter definierten *in vitro* Bedingungen in Zellen mit phänotypischen und funktionellen Charakteristika humaner DC zu differenzieren. Hierzu gehören sowohl monozytäre Vorläufer wie THP-1 (*human monocytic leukemia cell line*), die Lymphomzelllinie U-937 (*human histiocytic lymphoma cell line*) sowie Vertreter myeloischen Ursprungs: KG-1 (*human bone marrow-derived acute myelogenous leukemia cell line*) und MUTZ-3 (*CD34⁺ human acute myeloid leukemia cell line*) [173-176].

1.2 Autophagie

Die Autophagie bzw. Autophagozytose beschreibt hoch konservierte zelluläre Prozesse in eukaryotischen Organismen, die dem Abbau zelleigener Bestandteile dienen [177]. Dies geschieht ähnlich dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches den koordinierten Abbau zelleigener, kurzlebiger Proteine während der Zellteilung, Signaltransduktion, oder Endozytose vermittelt, nachdem diese im Anschluss ihrer physiologischen Aufgabe in einem

mehrstufigen enzymatischen Prozess durch Polyubiquitinierung markiert wurden. Über die Mechanismen der Autophagie werden hingegen ältere Zellorganellen abgebaut sowie langlebige, aber auch dysfunktionale Proteine, die durch Fehlfaltung, Oxidation und Mutationen charakterisiert sind [178]. Zwar dient auch das UPS der posttranslationalen Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine, jedoch vermittelt die Autophagozytose den Abbau von Strukturen, die zu groß sind um mittels Proteasomen abgebaut zu werden.

Der Prozess der Autophagie dient dem Gleichgewicht zwischen Neusynthese integraler Zellbestandteile und dem Abbau nicht essentieller Strukturen und vermittelt dabei die Fortführung überlebenswichtiger Prozesse unter Hungerbedingungen, da die Bereitstellung wichtiger Aminosäuren unter Nährstoffmangel der zellulären Energieversorgung dient [179]. Weiterhin schützt ein gut funktionierendes Autophagiesystem die Zelle vor toxischen Einflüssen und verhindert dadurch den programmierten Zelltod durch Apoptose. Als Mechanismus wird u.a. der Abbau geschädigter Mitochondrien angesehen, wodurch die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C verhindert wird und die Formation der katalytisch aktiven Caspase 9 unterbleibt [180]. Demgegenüber kann die Autophagozytose aber auch den programmierten Zelltod Typ 2 vermitteln, ein Prozess der von anderen Mechanismen wie Apoptose oder Nekrose zu unterscheiden ist [181]. Als Ursache wird v.a. die Freisetzung großer Menge an reaktiver Sauerstoffspezies diskutiert, die beim Abbau von Katalasen anfallen [182].

Die dynamischen Prozesse der Autophagozytose stehen mit einer Vielzahl anderer zellulärer Mechanismen in direkter Abhängigkeit und Wechselwirkung. Obwohl die komplexe molekulare Regulation der Autophagie in den letzten Jahren besser verstanden wurde, sind die bisherigen Ergebnisse oftmals noch widersprüchlich [183]. Die Dysfunktion essentieller, die Aktivität der Autophagozytose regulierender Proteine, resultiert in einer gestörten zellulären Kommunikation sowie der Akkumulation beschädigter oder fehlerhafter Proteine bzw. Proteinaggregate. Die Prozesse der Autophagie stehen daher vermutlich mit der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen in direktem Zusammenhang. Die Autophagie vermittelt protektive Einflüsse auf die Entwicklung neurodegenerativer Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit und Morbus Parkinson [184]. Eine Dysfunktion von ATG16L (*autophagy-related 16 like 1*) korreliert darüber hinaus mit der Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn [185, 186]. Beclin-1 (*B cell lymphoma 2 interacting protein 1*), ebenfalls ein Protein aus der Familie der ATG (*autophagy-related genes*) besitzt möglicherweise tumorsuppressive Eigenschaften, da in einer Vielzahl an Brust-, Eierstock- sowie Prostatakarzinomen eine Mutation dieses Proteins vorliegt [187]. Dennoch verbleibt es umstritten, ob die Autophagie die Tumorgenese nun eindeutig suppressiv beeinflusst, oder sogar onkogenes Potential besitzt, da trotz induzierter

Stressbedingungen das Überleben der Zelle gefördert wird. Auch die Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität scheint durch Autophagie moduliert, da die Produktion und Sekretion immunregulatorischer Zytokine, die effektive Präsentation von Antigenen sowie die Regulation verschiedenster Rezeptor-abhängiger Signaltransduktionen beeinflusst werden [188, 189].

1.2.1 Zelluläre und molekulare Regulatoren der Autophagie

Insgesamt sind drei Formen der Autophagozytose bekannt. Hierzu zählen einerseits die Makro- und Mikroautophagie, welche in der Lage sind größere Strukturen über selektive sowie nicht selektive Mechanismen abzubauen, als auch die Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperone-mediated autophagy*, CMA). Im Falle der Mikroautophagie werden die im Zytosol lokalisierten Proteine bzw. Proteinkomplexe direkt von Lysosomen aufgenommen. Die CMA erfolgt dagegen in einem Komplex mit Hsc-70 Chaperonproteinen, wobei Zielstrukturen über einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Lysosomen (*lysosomal-associated membrane protein 2A*, LAMP-2A) erkannt und anschließend in das innere der Lysosomen verlagert werden [190]. Die Makroautophagie beginnt dagegen mit einem isolierten Membranteil, dem Phagophor, welcher sich verlängert und dabei die für den Abbau markierten Strukturen umschließt. Das so gebildete Autophagosom fusioniert anschließend mit Lysosomen zu Autolysosomen, wodurch der enzymatische Abbau der eingeschlossenen Proteine und Organellen beginnt.

Die molekularen Regulationsmechanismen zur Bildung solcher Autophagosomen wurden hauptsächlich in Hefen untersucht. Die Formation der Phagophoren passiert hier um eine prä-autophagosomale Struktur, welche jedoch noch nicht in Säugetierzellen nachgewiesen werden konnte [191]. Hier scheinen diese Strukturen hauptsächlich dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zu entstammen, wobei auch die spontane de novo Formation aus zytosolischen Lipiden nicht ausgeschlossen wird [192, 193]. In Hefen sind bisher 32 unterschiedliche ATG bekannt, wobei die ATG1-Kinase, zusammen mit ATG13 und ATG17 an der Formation des Phagophors beteiligt ist (*Abb.: 1-5*). Vermutlich wird hierdurch das transmembranäre Atg9 in die sich entwickelnde Struktur eingebaut und die Einlagerung von Lipiden vermittelt, wodurch sich das Phagophor ausdehnt [194]. ULK-1 (*Unc-51-like kinase 1*) und ULK-2 sind womöglich Säugerhomologe des ATG1, jedoch ist deren genaue Funktion für die Formation des Phagophors noch unbekannt [183]. Darüber hinaus scheint insbesondere die Klasse 3 Phosphatidylinositol (PhI) -3 Kinase Vps34 (*vesicular protein sorting 34*) sowie dessen Bindungspartner Beclin-1, dem Säugerhomolog des ATG6, an der Bildung des Phagophors beteiligt [195], da hierdurch die Synthese von PhI-triphosphat

(Phl3P) katalysiert wird. Phl3P ist für die Ausdehnung des wachsenden Phagophors essentiell sowie für die anschließende Einlagerung weiterer ATG in die Membran [196].

Weiterhin sind zwei Mechanismen entscheidend, welche die anschließende Formation des Autophagosoms vermitteln. Einerseits fördert ATG7 durch ATP-abhängige Bindung an carboxyterminale Glycinreste von ATG12 dessen Aktivierung, wodurch ATG12 auf ATG10 überführt wird und anschließend mit ATG5 komplexiert. Hieran bindet nachfolgend ATG16L, woraufhin der Komplex aus Atg12, Atg5 und Atg16L mit dem sich formierenden Phagophor assoziiert [183]. Als Folge hiervon krümmt sich die Membran, da es zu einer asymmetrischen Einlagerung von Mikrotubuli-assoziiertem LC3B-2 (*light-chain 3B-2*) kommt. Letzteres ist das Produkt des zweiten Systems, welches die Ausbildung der Autophagosomen beeinflusst. LC3, das Säugerhomologe des ATG8, umfasst insgesamt 5 Proteine: LC3A-1, LC3A-2, LC3B-1, LC3B-2 und LC3C [197, 198]. LC3B selbst wird von der Zelle als zytosolisches Protein synthetisiert und nach Induktion der Autophagie durch ATG4 proteolytisch zu LC3B-1 gespalten. Dieses wird ähnlich dem ATG12 durch ATG7 an carboxyterminalen Glycinresten ATP-abhängig aktiviert und anschließend mit dem Carrierprotein ATG3 komplexiert, wodurch die Konjugation von Phosphatidylethanolamin (PhE) an die aktivierten Glycinreste des LC3B-1 vermittelt wird [199]. Das so gebildete LC3B-2 wird wie bereits erwähnt über den Komplex aus ATG12, ATG5 und ATG16L in das sich formierende Phagophor eingelagert und findet sich membrangebunden sowohl außerhalb, als auch innerhalb des entstehenden Autophagosoms und reguliert hier die Hemifusion der Membranen sowie den selektiven Einschluss geschädigter Organellen bzw. fehlerhafter Proteine und Proteinkomplexe [200].

Tatsächlich wurde die Autophagie über lange Zeit als eher zufälliger Prozess angesehen, bei dem wahllos beschädigte sowie ältere Zellorganellen und Proteine verdaut wurden [201]. Neuere Studien zeigten jedoch, dass die Interaktion von LC3B-2 mit entsprechenden Adaptermolekülen auf Zielorganellen, wie p62/SQSTM1 (*sequestome 1*) den direkten und selektiven Einschluss von ubiquitinierten Proteinaggregaten in das sich formierende Autophagosom vermittelt [202]. Nachdem sich letzteres vollends ausgebildet hat, schließt sich die Fusion mit Lysosomen an, wodurch die enzymatische Proteolyse der Zellproteine durch saure Hydrolasen beginnt. Nach Ausbildung der Autolysosomen dissoziiert das an der äußeren Seite gebundene LC3 Protein von der Membran und wird in das Zytosol freigesetzt oder wird ebenfalls verdaut, sofern es an der luminalen Seite verankert ist [203]. Durch Abbau der eingeschlossenen Proteine werden die einzelnen Aminosäuren mittels lysosomaler Transporter in das Zytoplasma freigegeben, wo diese erneut zur Synthese zellulärer Strukturen dienen [204].

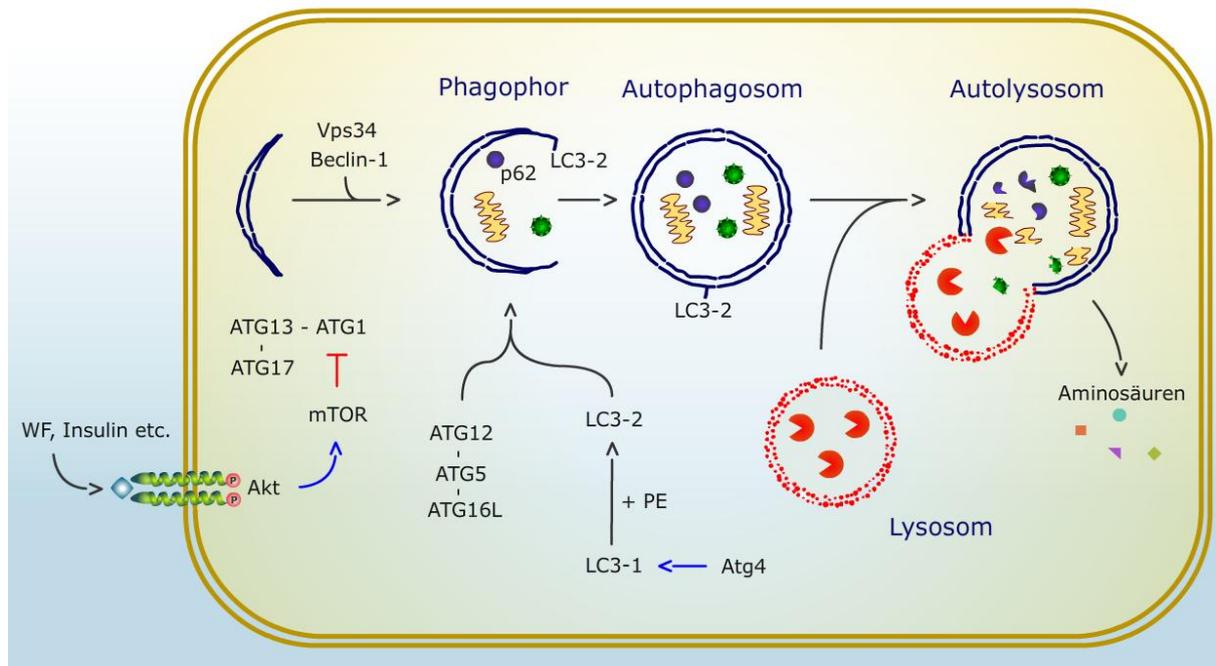


Abbildung 1-5: Regulation und Verlauf der Makroautophagie: Wachstumsfaktoren regulieren über Akt die Aktivität von mTOR und somit die Prozesse der Autophagozytose. Ein isolierter Membranteil formiert sich unter Einfluss von Vps34 und Beclin-1 zu einem wachsenden Phagophor. Ältere bzw. fehlerhafte Organellen und Proteine werden teilweise über p62 markiert und in das Autophagosom aufgenommen. Die Einlagerung von LC3-2 in die Membran ist hierfür entscheidend und abhängig vom Komplex aus ATG12, ATG5 und ATG16L. Nach Fusion zum Autolysosom erfolgt der enzymatische Abbau der Organellen und Proteine über Proteasen. Die hierdurch vermittelte Gewinnung von Aminosäuren dient u.a. dem zellulären Recycling unter Nährstoffmangel.

Die Aktivität der Autophagozytose verläuft zunächst auf Basalniveau um die Integrität intrazellulärer Proteine bzw. Organellen zu gewährleisten, jedoch sind die Mechanismen der Autophagie stark abhängig von den vorherrschenden äußeren Bedingungen. Das Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen bereitet ein wichtiges regulatorisches Signal um die Aktivität der Autophagie dem Bedarf der Zelle anzupassen [205]. Hierbei kommt mTOR (*mammalian target of rapamycin*), die katalytische Komponente zweier Multiproteinkomplexe mTORC1 (*mTOR complex 1*) und mTORC2, eine wichtige Schlüsselfunktion zu [206]. mTOR ist zentraler Regulator von Wachstumsprozessen, der Zellentwicklung und -alterung sowie der Zelladaptation auf Sauerstoffmangel [207].

Wachstumsfaktoren vermitteln ihre Signale über die spezifische Rezeptor-abhängige Proteinkinase Akt, welche mTOR stimuliert und dadurch die Aktivität von ATG1 bzw. den Säugerhomologen ULK1 und ULK2 inhibiert [208, 209]. Auch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an ATP und Sauerstoff verringert die Rate an Autophagozytose. Dagegen hemmen Konditionen eines Nährstoffentzugs bzw. ein Mangel an Aminosäuren und Sauerstoff die Aktivität von mTOR [210]. Die Aktivierung der durch Adenosin-5-

Monophosphat (AMP) induzierten Proteinkinase (AMPK) als Antwort auf zu geringe intrazelluläre Konzentrationen an ATP verstärkt die inhibitorische Funktion der Tumorsuppressorproteine TSC1 (*tuberous sclerosis 1*) und TSC2 auf das GTP bindende Protein RHEB (Ras homolog enriched in brain), welches für die Aktivität von mTOR benötigt wird [211]. Auch eine Akkumulation fehlerhafter Proteine resultiert in einer erhöhten Aktivität der Autophagozytose durch negative Regulation der AKT/TSC/mTOR Signalwege [212]. Die hierdurch erhöhte Rate an Autophagie vermindert dementsprechend das Wachstum der Zellen und erhöht deren katabole Aktivität, um die essentielle Energiegewinnung über Recycling zelleigener Proteine zu erzielen.

1.2.2 Autophagie in Infektabwehr und Immunität

Die Mechanismen der Adaption zellulärer Stoffwechselprozesse in Abhängigkeit der Konditionen des Nährstoffangebots sind teilweise mit denen der Kontrolle der Immunantwort sowie Entzündungsreaktion verknüpft. Die Signalwege und Regulatoren der Autophagie stehen in wechselseitiger Beziehung zu denen der zellulären Immunität und sind daher auch an der Abwehr und Degradierung invasiver Mikroorganismen beteiligt [213]. Heutzutage werden mehrere Mechanismen diskutiert, wodurch die Prozesse der Autophagie mit der intrazellulären Verarbeitung von zytosolischen bzw. phagozytierten Mikroben interagieren. In Makrophagen und DC verläuft die Fusion von Lysosomen und Phagosomen, welche Fremdorganismen oder apoptotische Zellfragmente enthalten und für die Kopplung an MHC-2 Moleküle vorgesehen sind, abhängig von ATG5 [214, 215]. Auch die Aufnahme von Endosomen und Phagosomen in Autophagosomen und deren anschließende Fusion zu Autolysosomen wird diskutiert [188]. Darüber hinaus kann ähnlich der selektiven Degradierung markierter Organellen und Proteinkomplexe mittels LC3B-2 auch die autolysosomale Abwehr von Mikroorganismen spezifisch verlaufen. Intrazelluläre Mikroben wie Salmonellen, Shigellen und Listerien, die dem initialen Phagosom entkommen und sich intrazellulär vermehren, werden mittels ubiquitin-abhängiger Assoziation an p62 für die selektive Aufnahme in Autophagosomen markiert [216].

Einige pathogene Erreger haben daher Mechanismen entwickelt um die zellspezifischen Prozesse der Autophagozytose zu umgehen bzw. zu unterdrücken. Hierzu gehören einige Virusstämme wie Epstein Barr oder Retroviren, die negative Regulatoren wie mTOR selektiv induzieren, oder eine direkte Inhibition von Beclin-1 vermitteln [217]. Demgegenüber erhöht das Bakterium *Yersinia pseudotuberculosis* die Aktivität der intrazellulären Autophagozytose und induziert die vermehrte Bildung von Autophagosomen, verhindert jedoch deren Azidifizierung und nutzt diese Kompartimente als Nährstoffquelle und Ort der

Vermehrung [218]. Auch das Bakterium *Listeria monocytogenes* entkommt der autolysosomalen Degradierung durch Verhüllung der Bakterienoberfläche mittels ActA (*Actin assembly-inducing protein*), wodurch die Bindung von p62 verhindert wird und die spezifische Antigenerkennung unterbleibt [219].

Neben der Beteiligung am intrazellulären Verdau pathogener Mikroorganismen, funktionieren die zellulären Regulatoren der Autophagozytose auch als Modulatoren weiterer Mechanismen des angeborenen Immunsystems [220]. Die Signalwege der Autophagie vermitteln den Transport viraler Nukleinsäuren zu endosomal lokalisierten TLR und sind damit direkt an der Produktion von IFN- γ durch aktivierte pDC beteiligt. Gegensätzliche Ergebnisse sind dagegen für die Sekretion von Typ 1 IFN beschrieben worden. Deren Sekretion scheint abhängig von Atg5 zu verlaufen, dennoch wurden erhöhte Werte an IFN- α und IFN- β ebenso in Atg5^{-/-} Mäusen beschrieben [221, 222]. Die Autophagozytose steht darüber hinaus in komplexer Wechselwirkung mit einer Vielzahl an immunregulatorischen Zytokinen. Einerseits inhibieren Th2-typische Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 die Aktivität der Autophagie, wohingegen IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 und TGF- β diese zu erhöhen scheinen. Auf der anderen Seite sind die zellulären Regulatoren der Autophagie selbst an der Produktion und Sekretion einiger Zytokine beteiligt [223].

Studien an infizierten Makrophagen konnten zeigen, dass IL-4 und IL-13 die Formation der Autophagosomen hemmen und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* vermitteln [224-226]. Im Gegensatz hierzu erhöht sich unter Einfluss von IFN- γ die Fusionsrate von Phagosomen mit Autophagosomen, mit anschließender lysosomaler Proteolyse von internalisierten Erregern [227]. Darüber hinaus zeigt TGF- β vermutlich einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum von Krebszellen durch Induktion der Autophagosomenbildung [228]. Auch IL-1 α und IL-1 β besitzen induzierende Effekte auf die Aktivität der Autophagie, wobei diese selbst die Produktion und Freisetzung von IL-1 Zytokinen reguliert [229]. Dieser Rückkopplungsmechanismus resultiert vermutlich aufgrund der Beeinflussung von Inflammasomen, einem Multiproteinkomplex u.a. bestehend aus Caspase 1 und dem Adapterprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), welcher unter dem Einfluss intrazellulärer Stimuli wie reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert wird und die Umsetzung von inaktivem pro-IL-1 β in biologisch aktives IL-1 β induziert [230]. Inwiefern diese wechselseitige Regulation verläuft ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Vermutet wird einerseits eine direkte Beeinflussung über ATG7, Beclin-1 oder ATG16L sowie die geringere Konzentration an intrazellulären Gefahrensignalen, welche mit der induzierten Erhöhung der Autophagozytose einhergeht [231]. Im selben Maße ist die Autophagie wohl auch an der Beseitigung apoptotischer Körper im Rahmen entzündlicher Prozesse beteiligt und verhindert hierdurch weitere Schädigungen des Gewebes [232].

1.2.3 Modulatoren der Autophagie und deren Anwendung

Um die vielfältigen Einflüsse in diverse physiologische Prozesse zu evaluieren sind einige Inhibitoren sowie Aktivatoren der Autophagozytose bekannt (*Tabelle 3*), mit deren Hilfe die regulatorischen Mechanismen Autophagie-bedingter Krankheitsprozesse untersucht werden [233]. Um die einzelnen Modulatoren in ihrer Qualität und Quantität ihrer Wirkung besser zu charakterisieren, wird die Autophagozytose prinzipiell in drei unterschiedliche Prozesse eingeteilt: 1) Initiation der Autophagie, 2) Formation des Phagophors sowie der Autophagosomen und 3) Reifung zu Autolysosomen und der anschließenden enzymatischen Proteolyse der eingeschlossenen Proteine, Proteinkomplexe oder Organellen [234].

Tabelle 3: Übersicht der Modulatoren der Autophagie.

Aktivator	Mechanismus
Brefeldin A	Induktion von ER Stress
Tunicamycin	Induktion von ER Stress
Rapamycin (Sirolimus)	mTOR Inhibition
Everolimus	mTOR Inhibition
Temsirolimus	mTOR Inhibition
Trehalose	mTOR-unabhängig
Lithiumchlorid	IMPase Inhibition
N-Acetyl-D-Sphingosin (C₂-Ceramid)	Klasse 1 PhI3K Inhibition
Penitrem A	Ca ²⁺ Kanal Blockade

Inhibitor	Mechanismus
3-Methyladenin (3-MA)	Klasse 3 PhI3K Inhibition
Wortmannin	Klasse 3 PhI3K Inhibition
LY294002	Klasse 3 PhI3K Inhibition
Bafilomycin A1	V-ATPase Inhibition
Chloroquin	Lysosomen-Alkalisierung
Hydroxychloroquin	Lysosomen-Alkalisierung
Leupeptin	Inhibition saurer Proteasen

Aktivatoren der Autophagozytose werden seit einiger Zeit als potentielle Arzneistoffe gegen neurodegenerative Erkrankungen untersucht, da eine verringerte Aktivität der Autophagie als Ursache der Pathogenese angesehen wird [235]. Die hierdurch bedingte Akkumulation von fehlerhaften Proteinen gilt als Hauptursache für die degenerativen Prozesse in Nervenzellen. Das ER fungiert als entscheidende Umgebung für die Reifung zellulärer Proteine und kontrolliert Chaperon-vermittelt deren korrekte Faltung. Eine Anhäufung fehlerhafter Proteine resultiert in sog. ER-Stress, wodurch normalerweise die Akt/TSC/mTOR Signalwege gehemmt und Autophagozytose induziert wird um den programmierten Zelltod durch Apoptose zu verhindern. [212]. Auch Brefeldin A und Tunicamycin inhibieren die post-translationale N-Glykosylierung von Proteinen und bedingen deren fehlerhafte Faltung, gelten daher als potente Induktoren von ER-Stress und erhöhen die Expression von Beclin-1 und LC3-2 [236]. Dagegen sind Rapamycin (Sirolimus) sowie dessen Derivate Everolimus und Temsirolimus direkte Inhibitoren der Kinaseaktivität von mTOR [237-239]. Neuere Studien identifizierten zudem, dass Lithiumchlorid (LiCl) als Inhibitor der Inositol-Monophosphatase (IMPase) sowie das Disaccharid Trehalose die Autophagie über einen mTOR-unabhängigen Mechanismus aktivieren können [240, 241]. Anders als Klasse 3 Phl3K wie Vps34, wirken Klasse 1 Phl3K inhibierend auf die Aktivität der Autophagozytose [242], sodass Hemmstoffe dieser Kinasen, wie das biologisch aktive Ceramid N-Acetyl-D-Sphingosin, ebenfalls die Aktivität der Autophagie erhöhen [243]. Auch Ca^{2+} -Ionen, als wichtige intrazelluläre sekundäre Botenstoffe, inhibieren über Cysteinproteasen die Autophagozytose, sodass Ca^{2+} -Kanal-Inhibitoren wie Penitrem A die Aktivität der Autophagie entsprechend induzieren [244]. Darüber hinaus vermittelt ein nährstoffarmes Milieu eine physiologische Erhöhung der Autophagozytose um das Überleben der Zellen unter Hungerbedingungen zu gewährleisten.

Neben der genetischen Ablation essentieller Regulatoren der Autophagie-abhängigen Mechanismen existieren auch eine Reihe synthetischer Hemmstoffe der Autophagozytose. Nachteilig ist jedoch, dass diese oftmals nicht spezifisch in den Prozess der Autophagie eingreifen, wodurch die Ergebnisse stets differenziert zu betrachten sind [234]. Hierbei wird entweder die Formation von Phagophoren oder Autophagosomen gehemmt, die Reifung zu Autolysosomen reduziert oder die Aktivität lysosomaler Enzyme inhibiert. Studien konnten zeigen, dass die Inhibition der Klasse 3 Phl3K Vps34 durch 3-Methyladenin (3-MA), LY294002 oder Wortmannin die Formation der Autophagosomen unterbindet [245, 246]. Nachteilig ist jedoch, dass dieser Antagonismus oftmals unspezifisch verläuft und dabei auch andere Kinasen inhibiert werden, sodass die beobachteten Effekte nicht zwangsläufig auf die vermittelte Inhibition der Autophagie zurückzuführen sind [247]. H^+ -ATPasen vom V-Typ (*vacuolar-type H^+ -ATPase*, V-ATPase) sind in der Lysosomenmembran zu finden und steuern den pH-Wert dieser Vesikel, regulieren also deren Funktionalität. Bafilomycin A1 ist

ein spezifischer Hemmstoff der V-ATPase, wodurch die Azidifizierung von Lysosomen und die Reifung der Autophagosomen zu Autolysosomen verhindert wird [248]. Trotz der spezifischen Inhibition des Enzyms verläuft die Reaktion nicht selektiv, da die V-ATPase ebenfalls in Endosomen und anderen sekretorischen Vesikeln vorkommt und somit vielfältige zelluläre Prozesse moduliert werden [249]. Dies gilt auch für lysosomal alkalisierende Aminochinoline wie Chloroquin (CHQ) und Hydroxychloroquin (Hydroxy-CHQ), die ebenfalls den intravesikulären pH Wert erhöhen [250]. Beide Substanzen sind strukturell mit dem Alkaloid Chinin verwandt und medizinisch zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis mit geringer Progredienz indiziert. Als Wirkmechanismus wird die Hemmung proteolytisch aktiver Enzyme diskutiert, nachdem sich CHQ bzw. Hydroxy-CHQ aufgrund ihrer Basizität in sauren Zellkompartimenten konzentrieren und die lysosomale Alkalisierung vermitteln. Letzteres ist ebenfalls grundlegend für den therapeutischen Nutzen von CHQ in der Prophylaxe bzw. Therapie verschiedener Formen der Malaria. Nach Akkumulation in der lysosomalen Nahrungsvakuole der Erreger kommt es hier zur Anhäufung zytotoxischer Metabolite, was zum Absterben der Blutschizonten führt [251]. Zudem kann mittels Leupeptin eine direkte Inhibition lysosomaler Proteasen vermittelt werden, wodurch der Abbau geschädigter Proteine und Organellen unterbleibt [252].

Aufgrund der modulierenden Effekte auf die Autophagozytose werden einige Stoffe, wie CHQ bzw. Hydroxy-CHQ seit neuestem auch auf ihre mögliche Wirksamkeit gegen schnell proliferierende Tumorzellen hin untersucht, oder als Leitstruktur für die Etablierung neuartiger Chemotherapeutika verwendet. Die selektive Inhibition Autophagie-abhängiger Prozesse, welche u.a. der Energieversorgung entarteter Zellen dienen, ermöglicht demnach die potentielle Anwendung dieser Arzneistoffe bei Tumorerkrankungen [253, 254].

1.3 *In vitro* Methoden zur Bewertung von Sensibilisierungspotentialen

Allergene stellen grundsätzlich harmlose Substanzen aus unserer Umwelt dar, die durch Kontakt mit dem menschlichen Organismus das Krankheitsbild der Allergie hervorrufen. Neben den Antigenen biologischen Ursprungs wie Pollen, Tierhaare bzw. Pilzsporen, ist der Mensch in der heutigen Zeit auch einer Vielzahl von chemischen Allergenen ausgesetzt. Diese finden sich als Duftstoffe, Konservierungs- oder Reinigungsmittel in diversen Haushaltsprodukten, Kosmetika aber auch Arzneimitteln. Die Exposition mit Kontaktallergenen über die Haut führt zur Ausbildung einer allergischen Kontaktdermatitis (*allergic contact dermatitis*, ACD), einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV, welche die Entwicklung effektorischer T-Lymphozyten voraussetzt [255]. Die Aktivierung des Allergens erfolgt nach Bindung an Hautproteine, welche anschließend die

Sensibilisierung des körpereigenen Immunsystems vermitteln. Eine erneute Exposition resultiert dann in der Symptomatik einer ACD. Obwohl sich diese kaum von denen einer irritativen Kontaktdermatitis (*irritant contact dermatitis*, ICD) unterscheidet, liegen beiden Prozessen verschiedene immunologische Pathomechanismen zu Grunde [256]. Während bei der ICD eine Überbelastung der Haut mit physikalischen und chemischen Reizen eine lokale, unspezifische Immunantwort auslöst, stellt die ACD eine adaptive Immunreaktion dar. Zur Identifizierung sensibilisierender Stoffe und deren Unterscheidung zu irritativen Noxen kommt neben dem „Meerschweinchen-Maximierungstest“ vor allem dem sogenannten „Lokalen Lymphknoten Assay“ (*local lymph node assay*, LLNA) an Mäusen eine bedeutende Rolle zu [257]. Dieser beruht auf der immunologischen Reaktion in der Induktionsphase der Sensibilisierung und erfasst die Proliferation der auricularen Lymphknoten nach Exposition der zu prüfenden Substanz.

Den ethischen Grundsätzen der „3R-Regel“ zu Reduktion (*reduce*), Ersatz (*replace*) und Verbesserung (*refine*) von Tierversuchen entsprechend, gründen sich die wissenschaftlichen Bemühungen darauf, das Leiden sowie die Anzahl von Versuchstieren auf ein Minimum zu beschränken [258]. Dennoch führte 2007 die Implementierung der neuen EU-Chemikalienverordnung REACH (*Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*) zu einem erhöhten Bedarf an Tierversuchen, um die präziseren Anforderungen an die Risikobewertung von etwa 30.000 bereits vor 1981 in der EU vermarkteten Chemikalien zu erreichen [259]. Demgegenüber verbietet die seit 2013 geltende EU-Kosmetik-Verordnung 1223/2009 die Testung jeglicher kosmetischer Fertigprodukte sowie einzelner Inhaltsstoffe bzw. derer Kombinationen an Tieren. Die durch Politik, Wissenschaft und Industrie eingeleiteten regulatorischen Maßnahmen zur Reduktion bzw. zum Ersatz von Tierversuchen forcieren die heutigen Bemühungen zur Entwicklung von *in vitro* Alternativmethoden zu den bereits etablierten *in vivo* Assays.

1.3.1 Alternative Testsysteme auf Basis humaner DC Funktionen

Voraussetzung für die Zulassung solcher Testsysteme sind neben der erforderlichen Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse auch deren zuverlässige Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit [256]. Die *in vitro* Identifizierung sensibilisierender Stoffe sowie deren Unterscheidung zu irritativen Noxen muss demnach die vielseitigen immunologischen Vorgänge, angefangen von der Antigenerkennung und -prozessierung bis hin zur Stimulation einer spezifischen Immunantwort umfassen. DC sind integraler Bestandteil der Vermittlung adaptiver Immunität und daher essentiell für die Entwicklung von *in vitro* Alternativsystemen zur prädiktiven Bewertung sensibilisierender Chemikalien.

Der Komplexität des adaptiven Immunsystems entsprechend ist es unwahrscheinlich ein einziges robustes Alternativsystem zu entwickeln, welches im Vergleich zu den bisher verfügbaren Tierversuchen ähnlich richtige und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Daher existieren derzeit unterschiedliche *in vitro* Methoden, die jeweils einen bestimmten Teilaspekt der Immunantwort beschreiben und somit eine gestaffelte Betrachtung erlauben (Abb.: 1-7).

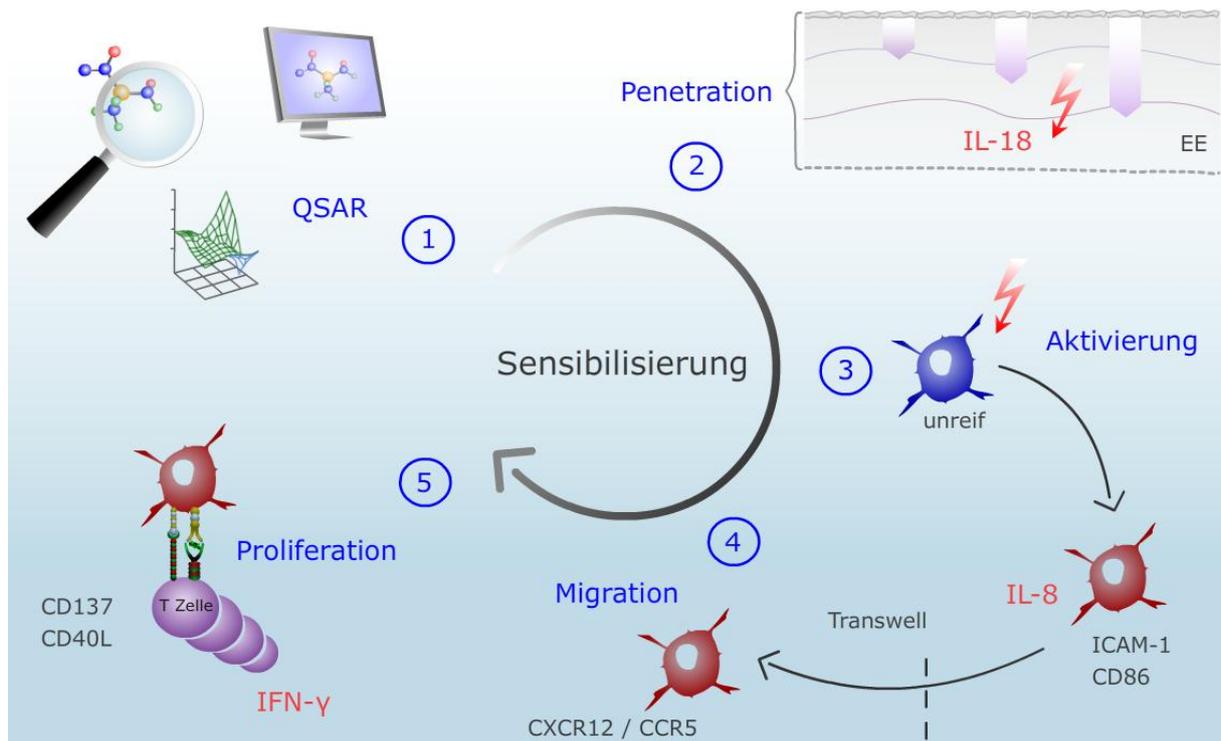


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung einer gestaffelten Analyse potentiell sensibilisierender Chemikalien. (1) Computerunterstützte Voruntersuchung des Proteinbindungsvermögens sowie spezifischer strukturabhängiger Merkmale. (2) Analyse des Penetrationsverhaltens der Substanz und der IL-18 Sekretion nach Exposition. (3, 4) Stimulation generierter DC Populationen mit anschließender Betrachtung der migratorischen Kapazität. (5) Interaktion mit naiven T-Zellen und Analyse der Proliferationsrate sowie anderer Biomarker.

Damit sensibilisierende Allergene als solche erkannt werden, müssen niedermolekulare chemische Moleküle durch Bindung an körpereigene Strukturproteine immunrelevante Epitope bilden. Eine quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung (*quantitative structure activity relationship*, QSAR) definierter chemischer Moleküle auf Basis von computerunterstützten Simulationsmodulen gilt hierbei als akzeptiertes prädiktives Screeningverfahren [260]. Um als sensibilisierendes Allergen im Körper zu wirken, muss zudem die physikalische Hautbarriere überwunden werden. Die valide Charakterisierung des Penetrationsvorganges kann heutzutage bereits mittels *in vitro* generierter rekonstruierter humaner Epidermis-

Äquivalente (*epidermal equivalent cultures*, EE) durchgeführt werden, deren Differenzierungsstatus sämtliche Charakteristika einer voll ausgebildeten Epidermis aufweist, inklusive Basalschicht (S. basale), Stachelzellschicht (S. spinosum), Körnerschicht (S. granulosum), Glanzschicht (S. lucidum) und Hornschicht (S. corneum). Einige EE sind vom ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) bereits als Tierersatzmethode zur Identifizierung des irritativen bzw. zytotoxischen Potentials von Chemikalien akzeptiert, stellen jedoch kein prädiktives Verfahren für sensibilisierende Stoffe dar [261]. Zwar zeigen chemische Allergene oftmals auch irritative Eigenschaften gegenüber epidermalen Keratinozyten, jedoch unterbleibt eine grundlegende Unterscheidung. Neuere Methoden versuchen daher typische Biomarker zu identifizieren, welche nach Exposition als Kriterium für sensibilisierende Stoffen fungieren. Die Erfassung der Sekretion von IL-18, einem wichtigen regulatorischen Zytokin in der Induktionsphase der ACD durch epidermale Keratinozyten ist hierbei womöglich ein erfolgsversprechendes Modell [262, 263].

Epidermalen LC sowie dermalen DC kommt in der Pathogenese der ACD eine entscheidende Rolle zu. Ihrer Funktion als professionelle APC entsprechend, kann der Hapten-Protein-Komplex erkannt, internalisiert und aufbereitet werden, um diesen naiven T-Zellen zu präsentieren und eine spezifische, adaptive Immunantwort auszulösen. Die initiale Aktivierung der DC leitet deren funktionellen Maturierungsprozess ein und erhöht ihre migratorische Kapazität zu regionalen Lymphknoten. Diese phänotypischen und funktionellen Veränderungen dienen einer Vielzahl an *in vitro* Methoden als nötige Biomarker, um die Reaktivität von DC gegenüber chemischen Antigenen abzuschätzen. Humane DC, entweder aus CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ Vorläuferzellen differenziert, zeigen übereinstimmende Charakteristika mit epidermalen LC sowie DDC [170, 172]. Jedoch gestalten der hohe logistische und labortechnische Aufwand, die kontinuierliche Versorgung mit frischen Blutspenden sowie die hohe Spendervariabilität die korrekte Kultivierung und Behandlung dieser Zelltypen höchst anspruchsvoll. Daneben kommen auch DC-ähnliche Zelllinien wie THP-1, U-937, KG-1 sowie MUTZ-3 in Frage. Deren Einsatz hätte trotz der bekannten phänotypischen und funktionellen Unterschiede zu humanen DC Populationen den Vorteil bereits etablierter Kultivierungsprotokolle sowie einer geringen Spendervariabilität und damit einhergehend einer hohen Robustheit der prädiktiven Ergebnisse. Die durch Allergenexposition bedingte Maturation der DC ist mit einer dosisabhängigen Sekretion von IL-8 assoziiert und stellt darüber hinaus ein erforderliches Kriterium dar diese Substanzen von irritativen Stoffen zu unterscheiden. Auch die nach Aktivierung vermehrt exprimierten Oberflächenmoleküle ICAM-1 und CD86 erscheinen hier als selektive Biomarker [256]. Zwei Testsysteme auf Basis humaner Zelllinien: hCLAT (*human cell line activation test*) sowie MUSST (*myeloid U937 skin sensitisation test*) bestätigten bereits die erforderliche

Richtigkeit, Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der Ergebnisse und wurden nun dem Prävalidierungsverfahren der ECVAM vorgeschlagen [264].

Die Migration aktivierter LC geht mit einem verringerten Level an CCR1, CCR3 und CCR5 auf der Zelloberfläche einher sowie der initialen Expression von CXCR4 und der damit verbundenen Wanderung in die Dermis [265]. Die erforderliche Sekretion von CXCL12 durch dermale Fibroblasten erfolgt dabei jedoch nach Stimulation durch TNF- α , wird also durch generelle Stresssignale induziert und ist demnach nicht selektiv für den Einfluss sensibilisierender Noxen. Jedoch scheinen irritative Stimuli eher die Sekretion von CCL5 in dermalen Fibroblasten zu induzieren, was einerseits in der Expression von CCR5 auf der Oberfläche epidermaler LC resultiert und weiterhin mit einer nur moderaten Expression von CXCR4 einhergeht [266]. Neue *in vitro* Testsysteme beziehen sich demnach auf die Expression diverser Chemokinrezeptoren nach Exposition mit sensibilisierenden bzw. irritativen Antigenen und vergleichen die dadurch veränderte Kapazität einer CXCL12- oder CCL5-abhängigen Migration. Erste Methoden basieren auf der Aktivierung *in vitro* generierter LC der MUTZ-3 Zelllinie, welche in einem Transwell-System entlang eines CXCL12- bzw. CCL5-Gradienten wandern, nachdem die Exposition mit sensibilisierenden bzw. irritativen Substanzen erfolgte [267]. Ringversuche bestätigten bereits die Übertragbarkeit der Ergebnisse innerhalb des eigenen, als auch zwischen unterschiedlichen Laboratorien [268].

Die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation effektorischer T-Zellen bedingt die Manifestation einer adaptiven Reaktion gegen sensibilisierende Substanzen. Daher eignet sich eine Stimulation isolierter T-Zellen *in vitro*, entweder über direkte Exposition der Chemikalie oder als Proteinkonjugat bzw. im Anschluss an die Stimulation unreifer DC, als prädiktives Verfahren [269]. Grundsätzlich dient entweder die Proliferationsrate, die Messung charakteristischer Biomarker, wie die Expression von CD137 und CD40L auf der Oberfläche von T-Lymphozyten sowie die induzierte Sekretion von IFN- γ als Kriterium zur Abschätzung der sensibilisierenden Eigenschaft des Antigens [256]. Die Verwendung primärer Zellen in einem autologen System macht es jedoch unwahrscheinlich, dass sich diese Verfahren als Hochdurchsatz-Screening-Methoden etablieren, könnten jedoch in einem mehrstufigen Analysesystem den immunologischen Effekt einzelner Chemikalien weiter präzisieren.

1.3.2 Integration immunkompetenter Zellen in *in vitro* generierte Hautmodelle

Humane Hautbiopsien vereinigen praktisch alle relevanten Teilschritte der primären Sensibilisierung in der Peripherie und gelten als das physiologisch relevanteste Testsystem zur funktionellen Charakterisierung des Immunsystems menschlicher Haut. Der Verwendung

von Humanhaut als Hochdurchsatz-Screening-Methode steht jedoch die generelle Tatsache entgegen, dass hierfür große Mengen an menschlichem Material benötigt werden und die Bereitstellung mit hohem logistischem Aufwand sowie großer Spendervariabilität verbunden ist. Alternativ sind *in vitro* generierte, rekonstruierte humane Vollhautäquivalente durch die Integration epidermaler LC bzw. DDC, gewonnen aus allogenen Quellen bzw. aus entsprechenden Zelllinien, in der Lage als Ersatzsysteme zu dienen. Einige Versuche realisierten bereits die Integration sowohl *in vitro* generierter LC der MUTZ-3 Zelllinie, als auch solcher Subtypen die *ex vivo* aus CD14⁺ Monozyten oder CD34⁺ Vorläuferzellen differenzierten [270-272]. Bisher konnte jedoch ausschließlich ersteres auch immunologische Funktionalität beweisen und die Reifung sowie Migration integrierter MUTZ-LC nach Allergenexposition nachstellen. Die Interaktion mit T-Zellen wurde im Rahmen rekonstruierter Vollhautmodelle bisher noch nicht untersucht, könnte sich aber zukünftig ebenfalls realisieren lassen. Die Entwicklung *in vitro* generierter Hautmodelle mit integrierten Immunzellen als Alternativsystem ist jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht weit fortgeschritten, sodass bisher nicht abzuschätzen ist inwiefern diese Methodik zukünftig die bereits etablierten Verfahren ergänzen oder sogar ersetzen kann.

1.4 Zielsetzung

DC agieren als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität und regulieren somit die effektive Immunantwort gegen pathogene Noxen. DC der menschlichen Haut kommt dabei eine besondere Stellung zu, da diese in der äußersten Peripherie des Organismus mit einer Vielzahl an potentiell schädigenden Einflüssen konfrontiert werden. Die selektive Aktivität epidermaler LC und DDC gegenüber mikrobiellen Stimuli gewährleistet hierbei die Integrität der kommensalen Hautflora und den Schutz des menschlichen Organismus, ist jedoch neben der individuellen Expression essentieller PRR ebenso von den jeweiligen Bedingungen des umliegenden Gewebes abhängig. Ein chronisch entzündliches Hautmilieu geht mit einer gestörten bzw. abnormalen Barrierefunktion der Haut sowie mit einer vermehrten Expression von TNF- α und IL-1 β einher, welche ihrerseits als potentielle Stimulatoren anwesender DC fungieren. Daher ist eine gesonderte Betrachtung der funktionellen Charakteristika epidermaler und dermaler Subtypen essentiell, um die jeweilige immunregulatorische Aktivität unter entzündlichen bzw. nicht-entzündlichen Bedingungen zu verstehen. In diesem Zusammenhang überrascht es nicht, dass trotz der vielfältigen Funktionalität epidermaler LC und DDC ihre spezifische Beteiligung an der Pathogenese entzündlicher Hautkrankheiten wie Atopische Dermatitis bzw. Psoriasis vulgaris bis heute nicht eindeutig geklärt ist. Letztere Erkrankung zeichnet sich durch eine erhöhte Präsenz

effektorischer Th1- und Th17-Lymphozyten aus und bedarf daher einer initialen Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch reife DC. Die hierbei notwendige Sekretion immunregulatorischer Zytokine, welche u.a. die Differenzierung in verschiedene Th-Subtypen steuert, steht seit neueren Erkenntnissen auch in komplexer Wechselwirkung mit den konservierten Prozessen der Autophagozytose. Als logische Konsequenz führt die Modulation Autophagie-abhängiger Mechanismen zur veränderten Produktion und Sekretion immunregulatorischer Zytokine und damit zu einer potentiellen Beeinflussung der adaptiven Immunantwort, wobei die zu Grunde liegenden Mechanismen weiterhin nicht vollständig geklärt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die immunologische Reaktivität humaner DC Populationen der Haut anhand *ex vivo* generierter Subtypen untersucht werden. Hierzu erfolgte zunächst die Etablierung verschiedener Kultivierungsprotokolle, welche die Differenzierung primärer Monozyten aus humanen Blutspenden durch die Zugabe definierter Zytokine in MoDC bzw. MoLC garantieren sollten. Nach umfassender Analyse morphologischer und phänotypischer Merkmale erfolgte die funktionelle Charakterisierung der DC mittels selektiver TLR-Agonisten in An- bzw. Abwesenheit von TNF- α und IL-1 β . Die simultane Aktivierung generierter MoDC und MoLC mit mikrobiellen sowie inflammatorischen Stimuli diente dabei der Simulation eines akuten Entzündungsgeschehens, wobei die komplexe Vermittlung angeborener und adaptiver Immunität jeweils vergleichend betrachtet wurde. Die Analyse der zellspezifischen Regulation immunologischer Prozesse erweitert somit das genauere Verständnis der Funktionalität humaner DC Populationen der Haut.

Darüber hinaus erfolgte nach Verwendung diverser Hemmstoffe der Autophagozytose die Verifizierung einer möglichen Modulation des Aktivierungsprozesses stimulierter MoDC und MoLC. Hierzu galt es die Inhibition definierter Prozesse der Autophagozytose zu bestätigen und anschließend den Einfluss auf die Freisetzung Th1- bzw. Th17-abhängiger Zytokine zu untersuchen. Darüber hinaus diente der Einsatz spezifischer Inhibitoren Rezeptor-abhängiger Signalkaskaden der näherungsweise Analyse der zu Grunde liegenden regulativen Mechanismen, um die pathophysiologischen Grundlagen diverser Erkrankungen nach Dysfunktion Autophagie-assoziierter Proteine zu evaluieren.

Nach umfassender phänotypischer und funktioneller Charakterisierung der generierten DC Subtypen diente letztlich die Integration unreifer MoLC in ein *in vitro* generiertes Vollhautmodell der Entwicklung einer immunkompetenten Alternativmethode zur prädiktiven Identifizierung sensibilisierender Substanzen. Hierzu bedurfte es der homogenen Lokalisation der Zellen in suprabasalen Schichten des Epidermisäquivalents gemäß der physiologischen Verteilung humaner LC. Zukünftig soll die Funktionalität des Testsystems analysiert und bezüglich der Richtigkeit, Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der Ergebnisse evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Mettler XS 205	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Autoklav Systec V-95	Systec GmbH, Wettenberg
Brutschrank HeraCell 240i	Thermo Scientific Inc, Langenselbold
Dermatom Acculan® 3Ti	B.Braun AG, Melsungen
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg
Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Gefrierschrank (-80 °C) Hera freeze	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Geldokumentationssystem BioDocAnalyse	Biometra GmbH, Göttingen
Gelektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen
Kryostat Leica CM 1510S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Magnethalter MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer IKAMAG® RH	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Multimode Mikroplatten-Leser FLUOstar Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Neubauer Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Carl Zeiss AG, Jena
Permanentmagnet Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
pH Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Jena
Pinzetten (anatomisch/chirurgisch)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Eppendorf EasyPet®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Eppendorf Research® (Multikanal)	Eppendorf AG, Hamburg
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Plattformschüttler Swip mit Inkubationshaube TH10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Präzisionswaage Mettler AK160	Mettler Toledo GmbH, Gießen

qPCR System LightCycler® 480	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
Reinstwasseranlage LaboStar™ 2-DI/-UV	SG-Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Spannungsquelle PowerPack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Stanzeisen (Rundloch, 15 mm)	Bauhaus AG, Zug, CH
Sterilarbeitsbank Hera Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Meter WPA Biowave DNA	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Vortex-Gerät Genie™ 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wippschüttler WT16	Biometra GmbH, Göttingen
Zentrifuge Heraeus pico 17	Thermo Scientific Inc, Langenselbold
Zentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz / Verbrauchsmaterial	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
3-Methyladenin (3-MA)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aceton	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Alexa Fluor 488 Anti-Axl Antikörper (Klon 108724), Maus anti-human	R&D Systems Inc, Wiesbaden
Alexa Fluor 488 Isotypenkontrolle, Maus	R&D Systems Inc, Wiesbaden
Anti-CD1a MicroBeads (Klon: HI149), Maus anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Ascorbinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Aurion BSA-c™ (10%)	Aurion, Wageningen, NL

Bafilomycin A1	Tocris Bioscience, Bristol, UK
BD Perm/Wash (10x)	BD Bioscience, Heidelberg
Biosphere® Filter Tip (20, 100, 1000)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Blutspende, Human (Buffy Coat)	DRK-Blutspendedienst Ost, Berlin
Borsäure	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA), Proteasefrei	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Brefeldin A	Biolegend Inc, London, UK
Calciumchlorid	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
CellTracker™ Green, 5-chlormethylfluoresceindiacetat (CMFDA)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Chloroquin-Diphosphat	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Cryomold Standard (25 x 20 x 5 mm)	Sakura Finetek GmbH, Staufen
Cryomold Intermediate (15 x 15 x 5 mm)	Sakura Finetek GmbH, Staufen
Deckgläser (24x50 mm)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dermatomklingen	B.Braun AG, Melsungen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dispase II	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
DMSO	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNase I	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
DNase I, Amplification grade	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) + GlutaMax	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) / F-12	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 10x	Biochrom GmbH, Berlin
DyLight488 F(ab) ₂ Anti-Maus Antikörper IgG, Ziege	Dianova GmbH, Hamburg
DyLight488 F(ab) ₂ Anti-Kaninchen Antikörper IgG, Ziege	Dianova GmbH, Hamburg
DyLight594 F(ab) ₂ Anti-Maus Antikörper IgG, Ziege	Dianova GmbH, Hamburg

DyLight594 F(ab) ₂ Anti-Kaninchen Antikörper IgG, Ziege	Dianova GmbH, Hamburg
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Einmalküvetten	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol Absolut	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumsalz	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
FACS Clean	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Flow	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Rinse	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Röhrchen mit Rundboden (75x12 mm)	BD Bioscience, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin
FITC (Fluoresceinisothiocyanat) Anti-CD1a Antikörper (Klon HI149), Maus anti-human	eBioscience Inc, Frankfurt
FITC Anti-CD196 Antikörper (Klon R6H1), Maus anti-human	Biolegend Inc, London, UK
FITC Anti-CD282 Antikörper (Klon T2.5), Maus anti-human	Biolegend Inc, London, UK
FITC Anti-CD324 Antikörper (Klon 67A4), Maus anti-human	Biolegend Inc, London, UK
FITC Anti-CD45RA Antikörper (Klon T6D11), Maus anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
FITC Anti-CD80 Antikörper (Klon 2D10.4), Maus anti-human	eBioscience Inc, Frankfurt
FITC Anti-CD86 Antikörper (Klon FM95), Maus anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
FITC Anti-IL-6 Antikörper (Klon MQ2-13A5), Ratte anti-human	Biolegend Inc, London, UK
FITC IgG1 Isotypkontrolle, Maus	eBioscience Inc, Frankfurt
FITC recombinantes Annexin-V-Fusionsprotein, Human	Enzo Life Sciences Inc, Lörrach
Flüssigstickstoff	Air Liquide GmbH, Berlin
Gefriermedium	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Gelred TM Nucleic Acid Stain	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor, Rekombinant-Human (rh-GM-CSF)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Human Exodus-2, Recombinant-Human (rh-CCL-21)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Hydrocinnamoyl-L-valyl pyrrolidin, kompetitiver Antagonist des IL-1 Rezeptors, (IL-1RA)	Merck KGaA, Darmstadt
Hydroxychloroquin-Sulfat (Hydroxy-CHQ)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure (HEPES) - Puffer	Biochrom GmbH, Berlin
IFN- γ DuoSet [®] , Human	R&D Systems Inc, Wiesbaden
IFN- γ ELISA-Ready Set Go [®] , Human	eBioscience Inc, Frankfurt
IL-1 β , Rekombinant-Human (rh-IL-1 β)	eBioscience Inc, Frankfurt
IL-1 α , Rekombinant-Human (rh-IL-1 α)	Biolegend Inc, London, UK
IL-6 DuoSet [®] , Human	R&D Systems Inc, Wiesbaden
IL-23 DuoSet [®] , Human	R&D Systems Inc, Wiesbaden
IL-12p70 DuoSet [®] , Human	R&D Systems Inc, Wiesbaden
IL-4 ELISA-Ready Set Go [®] , Human	eBioscience Inc, Frankfurt
IL-17A ELISA-Ready Set Go [®] , Human	eBioscience Inc, Frankfurt
IL-22 ELISA-Ready Set Go [®] , Human	eBioscience Inc, Frankfurt
IL-4, Rekombinant-Human (rh-IL-4)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
ImmunoSelect Antifading Mounting Medium DAPI	Dianova GmbH, Hamburg
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Kaliumhydroxid	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Keratinocyten-Wachstumsmedium (<i>keratinocyte growth medium</i> , KGM)	Lonza Group AG, Basel, CH
Kollagen G (aus Kalbserum; ≥ 95 % Kollagen Typ I, < 5 %: Typ III, IV, V)	Biochrom GmbH, Berlin
L-Glutamin	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
LightCycler [®] 480 96-Loch Mikrotiterplatte klar (inkl. Folien)	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
Lipopolysaccharid von E. coli - Ultrapur (LPS-EB)	InvivoGen, Toulouse, FR
Löslicher CD40 Ligand, Rekombinant-Human (rh-CD40L)	eBioscience Inc, Frankfurt

LY364947, kompetitiver Inhibitor des TGF- β Rezeptors1	Tocris Bioscience, Bristol, UK
MACS Separationssäulen (LS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MaxPoly-Two™ Plus Polymer HRP Detection Kit, Maus und Kaninchen	Dianova GmbH, Hamburg
Membraneinsatz (für 24-Loch Platten, Porengröße 8 μ m)	BD Bioscience, Heidelberg
Membraneinsatz (für 6-Loch Platten, Porengröße 0,4 μ m)	BD Bioscience, Heidelberg
Messerklingen, für Kryostat Leica CM 1510S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Monensin	Biolegend Inc, London, UK
Naïve human CD4 ⁺ T-Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Natriumazid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Normales Ziegen Serum	Dianova GmbH, Hamburg
Normales Ziegen Serum, hitzeinaktiviert (Reagent Additive 1 für ELISA)	R&D Systems Inc, Wiesbaden
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NycoPrep™ 1.077 Dichtelösung	Axis-Shield plc, Oslo, NO
Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet)	Thermo Scientific Inc, Langenselbold
Orange G	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pam ₃ CysSerLys ₄ , Pam ₃ CSK ₄ , synthetisches triacyliertes Lipopeptid	InvivoGen, Toulouse, FR
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PCR Reaktionsgefäße mit Deckelstreifen	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PE (Phycoerythrin) Anti-CD184 Antikörper (Klon 12G5), Maus anti-human	eBioscience Inc, Frankfurt
PE Anti-CD197 Antikörper (Klon 150503), Maus anti-human	BD Bioscience, Heidelberg
PE Anti-CD207 Antikörper (Klon 10E2), Maus anti-human	Biolegend Inc, London, UK

PE Anti-CD209 Antikörper (Klon DCN47.5), Maus anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PE Anti-CD284 Antikörper (Klon HTA125), Maus anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PE Anti-CD4 Antikörper (Klon VIT4), Maus anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PE Anti-CD83 Antikörper (Klon HB15e), Maus anti-human	Biolegend Inc, London, UK
PE Anti-IL-10 Antikörper (Klon JES3-9D7), Ratte anti-human	BD Bioscience, Heidelberg
PE Anti-IL-12p40 Antikörper (Klon HP40), Maus anti-human	eBioscience Inc, Frankfurt
PE F(ab) ₂ Anti-Maus IgG1 (polyklonal), Ziege	R&D Systems Inc, Wiesbaden
PE IgG1 Isotypenkontrolle, Maus	eBioscience Inc, Frankfurt
Penicillin	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
PerCP (Peridinin-Chlorophyll) Anti-CD14 Antikörper (Klon TÜK4), Maus anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PerCP IgG1 Isotypenkontrolle, Maus	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Phosphatgepufferte Kochsalzlosung (PBS), ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , pH 7,4	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Pipettenspitzen (10, 100, 300 und 1000 µL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polyinosin:Polycitidylsäure, Poly(I:C), synthetisches Analogon doppelsträngiger Nukleinsäure	InvivoGen, Toulouse, FR
Primer	TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Prostaglandin E ₂	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Rapamycin	Merck KGaA, Darmstadt
Reaktionspuffr für DNase (10x)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe-Lock (Biopur, 1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße Safe-Lock (1,5 und 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße schwarz (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RPMI (roswell park memorial institute) 1640 Medium	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Rührfisch	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Salzsäure (konzentriert)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Serologische Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Skalpells No.11	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Skalpells No.24	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spritzen (5, 10 und 20 ml)	B.Braun AG, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter, Filtropur S 0,2	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SteriClin® Bogenverpackung Krepp grün	RMP-med Steffen Roßberg Medizinische Produkte e.K., Freital
Stop Lösung für DNase	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Streptomycin	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
Transformierender Wachstumsfaktor β 1, Rekombinant-Human (rh-TGF- β 1)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Triton X 100	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio USA
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin
Tumornekrosefaktor- α , Rekombinant-Human (rh-TNF- α)	eBioscience Inc, Frankfurt
Tween 20	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Unkonjugierte Anti-CD1a Antikörper (Klon O10), Maus anti-human	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg
Unkonjugierte Anti-CD1a Antikörper (Klon 7A7), Kaninchen anti-human	Abcam plc, Cambridge, UK
Unkonjugierte Anti-CD324 Antikörper (Klon EP700Y), Kaninchen anti-human	Abcam plc, Cambridge, UK
Unkonjugierte Anti-CD207 Antikörper (Klon DCGM4/122D5), Maus anti-human	Dendritics, Dardilly, FR
Unkonjugierte Anti-LC3A Antikörper (Klon D50G8), Kaninchen anti-human	Cell Signaling Technology Europe, B.V., Leiden, NL
Unkonjugierte Anti-LC3B Antikörper (polyklonal), Kaninchen anti-human	Cell Signaling Technology Europe, B.V., Leiden, NL
Unkonjugierte Anti-TROP-2 Antikörper (Klon 162-46), Maus anti-human	BD Bioscience, Heidelberg

Unkonjugierte Isotypenkontrolle, Maus	eBioscience Inc, Frankfurt
Wasser (steril, pyrogenfrei)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (konzentriert)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zellkulturplatten 6-Loch, Flachboden	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturplatten mit 6 tiefen Mulden (Deep-6-well-plate)	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturplatten 24-Loch, Flachboden	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturplatten 24-Loch, Flachboden (Insert Companion Plate) für Membraneinsätze	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturplatten 96-Loch, Flachboden (MaxiSorp Immuno plate F96)	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturplatten 96-Loch, Rundboden	Corning Inc, Corning, New York, USA
Zellkulturschalen (60 und 100 mm)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zellschaber S	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zellsiebe (40 µm, 70 µm, 100 µm)	BD Bioscience, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zitronensäure	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen

2.1.3 Software

Programm	Anbieter
WinMDI Version 2.8	Joe Trotter, Salk Institute, La Jolla, USA
CellQuest™ Version 3.1f	BD Bioscience, Heidelberg
BZ Observation Application und Analysis Application	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Dotcount Version 1.2	Dr. Martin Reuter, Charlestown, USA
Optima 2.20R2	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
LightCycler 480 1.5.0	QIAGEN GmbH, Hilden
GraphPad Prism® 5.03 für Windows	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

2.1.4 Verwendete Lösungen

2.1.4.1 Lösungen zur Zellkultivierung

Die Kultivierung isolierter Monozyten aus humanem Blut (Buffy Coat) erfolgte in RPMI 1640 mit Hydrogencarbonat-Puffer, wobei Phenolrot als Indikator diente. Eine optimale Zellkultivierung wurde erreicht, nachdem das RPMI 1640 durch die folgenden Zusätze komplettiert wurde:

Komplettiertes RPMI 1640	
10 %	Fetales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert
2 mM	L-Glutamin
100 U/mL	Penicillin
100 µg/mL	Streptomycin

Dabei dient das Serum als Lieferant wichtiger Wachstumsfaktoren, Spurenelemente und Hormone. Eine Hitzeinaktivierung fand durch Inkubation bei 56 °C für mindestens 25 min statt und diente der Inaktivierung der Komplementbindungskapazität, sodass keine Zell-Lyse durch Antikörper erfolgt.

MoLC-Differenzierungsmedien

Die Differenzierung zu MoLC erfolgte in zwei Schritten. Der primäre Ansatz wurde in **komplettiertem RPMI 1640** kultiviert, welches mit rh-GM-CSF, rh-IL-4 sowie rh-TGF-β1 supplementiert wurde:

MoLC-Differenzierungsmedium 1		
800 IU/mL	≥ 100 ng/mL	rh-GM-CSF
200 IU/mL	≥ 20 ng/mL	rh-IL-4
300 U/mL	≥ 20 ng/mL	rh-TGF-β1

Nachfolgend wurde die Differenzierung unter Verwendung des **komplettierten RPMI 1640** mit veränderter Zusammensetzung der Zytokine forciert:

MoLC-Differenzierungsmedium 2		
800 IU/mL	≥ 100 ng/mL	rh-GM-CSF
300 U/mL	≥ 20 ng/mL	rh-TGF-β1

MoDC-Differenzierungsmedium

Zur Differenzierung isolierter Monozyten in MoDC wurde das **komplettierte RPMI 1640** mit folgenden Zytokinen supplementiert:

MoDC-Differenzierungsmedium		
800 IU/mL	≥ 100 ng/mL	rh-GM-CSF
200 IU/mL	≥ 20 ng/mL	rh-IL-4

Die lyophilisierten Zytokine wurden dabei analog den Herstellerangaben in Wasser (steril, pyrogenfrei) rekonstituiert und in sterile sowie auf Endotoxingehalt-geprüfte Reaktionsgefäße Safe-Lock (Biopur, 1,5 ml) aliquotiert. Die optimale Verwendung der Zytokine erfolgte stets chargenspezifisch gemäß der jeweiligen biologischen Aktivität, wobei letztere direkt beim Hersteller angefragt wurde. Die Konzentration der Zytokine sowie die Kulturdauer der einzelnen Subtypen orientierten sich dabei an Literaturangaben und wurden den eigenen Laborbedingungen angepasst.

T-Zell-Wachstumsmedium

Die Kultivierung isolierter naiver CD4⁺ T-Zellen aus humanem Blut (Buffy Coat) erfolgte in RPMI 1640, welches durch folgende Zusätze komplettiert wurde:

T-Zell-Wachstumsmedium	
10 %	FKS, hitzeinaktiviert
2 mM	L-Glutamin

Fibroblasten-Wachstumsmedium

Die Kultivierung isolierter Fibroblasten aus juveniler Vorhaut erfolgte in DMEM, welches durch folgende Zusätze supplementiert wurde:

Fibroblasten-Wachstumsmedium	
10 %	FKS
2 mM	L-Glutamin
100 U/mL	Penicillin
100 µg/mL	Streptomycin

Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

Die während der Zellisolierung und -kultivierung verwendete phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) nach Dulbecco wurde herstellerspezifisch auf Endotoxine getestet und für die Benutzung nachfolgend supplementiert:

PBS mit EDTA	
2 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumsalz

Isolierungspuffer

Die magnetische Separation verlief unter Verwendung von bovinem Serumalbumin in **PBS mit EDTA**, welches anschließend sterilfiltriert und 5 min im Ultraschallbad entgast wurde:

Isolierungspuffer	
0,5 %	Bovines Serumalbumin (BSA)

2.1.4.2 Lösungen zur Isolation unreifer LC aus humaner Epidermis

Trypsin-Lösung 1

Trypsin, EDTA Natriumsalz sowie DNase I wurden in **PBS** gelöst und sterilfiltriert:

Trypsin-Lösung 1		
1,67 mg/mL	Trypsin	
0,67 mg/mL	EDTA	
10 IU/mL	= 0,5 mg/mL	DNase I

Dispase-Lösung

Lyophilisierte Dispase wurde in destilliertem Wasser gelöst, anschließend sterilfiltriert und aliquotiert:

Dispase		
10 IU/mL	= 10 mg/mL	Dispase

Phosphatgepufferte Salzlösung, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Folgende Salze wurden in destilliertem Wasser gelöst, anschließend mit Natriumhydroxid bzw. Salzsäure (1 M) auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt und autoklaviert:

PBS	
0,20 g/L	KCl
8,00 g/L	NaCl
0,20 g/L	KH_2PO_4
1,14 g/L	Na_2HPO_4

Stop-Medium 1

Um das Einwirken von Trypsin zu beenden, wurde RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen supplementiert:

Stop-Medium 1	
10 %	FKS
100 U/mL	Penicillin
100 $\mu\text{g/mL}$	Streptomycin

Trypanblau-Lösung

Die Viabilität der Zellen wurde mittels Trypanblau in **PBS** indiziert:

Trypanblau-Lösung	
4 mg/mL	Trypanblau

2.1.4.3 Lösungen zur Isolation von NHK und NHDF aus juveniler Vorhaut

Transportmedium

Die juvenile Vorhaut wurde in DMEM mit folgenden Zusätzen transportiert:

Transportmedium	
100 U/mL	Penicillin
100 µg/mL	Streptomycin

Trypsin-Lösung 2

In **PBS** wurden Trypsin und EDTA-Natriumsalz gelöst und anschließend sterilfiltriert:

Trypsin-Lösung 2	
1,67 mg/mL	Trypsin
0,67 mg/mL	EDTA

Stop-Medium 2

Um das enzymatische Einwirken von Trypsin zu beenden, diente DMEM als Stop-Medium, nachdem dieses mit FKS supplementiert wurde:

Stop-Medium 2	
10 %	FKS

2.1.4.4 Lösungen zur Konstruktion *in vitro* generierter humaner Vollhautäquivalente

NHDF-Kollagenmischung

Für jedes *in vitro* generierte Dermisäquivalent wurden drei Zusätze zum Einstellen des korrekten pH-Wertes ($7,90 \leq \text{pH} \leq 8,05$) sowie Kollagen G und eine Suspension von NHDF (Passage 3) in **Fibroblasten-Wachstumsmedium** verwendet:

NHDF-Kollagenmischung	
1,2 mL	Kollagen G
75 µL	DMEM (10x)
38 µL	HEPES Puffer
37 µL	0,7 M Natriumhydroxid-Lösung
10 ⁶ Zellen	NHDF (Passage 3)
150 µL	Fibroblasten-Wachstumsmedium

Xmix⁻ Medium

Die Kultivierung der Dermisäquivalente erfolgte in einem Kulturmedium auf Basis von Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) + GlutaMax und Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) / F-12 im Verhältnis 1:1, welches durch definierte Zusätze komplettiert wurde [273].

Xmix⁺ Medium

Die terminale Differenzierung der Keratinozyten des humanen Epidermisäquivalents an der Luft-Flüssigkeits-Grenze erfolgte unter Verwendung des kompletten Xmix⁻ Mediums, welches durch den Zusatz definierter Mengen an Ascorbinsäure und Calciumchlorid ergänzt wurde.

CellTracker™ Lösung

Lyophilisierte Aliquots von CellTracker™ wurden in DMSO (steril) rekonstituiert:

CellTracker™ Lösung	
10 mM	CellTracker™ Green oder Red

Inkubationsmedium CellTracker™

Die Inkubation mit CellTracker™ erfolgte in RPMI 1640, welches mit folgenden Zusätzen supplementiert wurde:

Inkubationsmedium CellTracker™	
0,1 %	CellTracker™ Lösung
2 mM	L-Glutamin
100 U/mL	Penicillin
100 µg/mL	Streptomycin

2.1.4.5 Lösungen zur Immunassay-Analytik

2.1.4.5.1 Lösungen zur Durchflusszytometrie Analytik

FACS-Puffer

Die zu vermessenen Zellen wurden in **PBS mit EDTA** mit folgendem Zusatz aufgenommen:

FACS-Puffer	
0,5 %	Bovines Serumalbumin (BSA)

Annexin-Bindungspuffer

Die Messung mit Annexin-V erfolgte in destilliertem Wasser mit folgenden Zusätzen:

Annexin-Bindungspuffer	
2,5 mM	Calciumchlorid
10 mM	HEPES
140 mM	Natriumchlorid

Fixierlösung

PFA wurde bei 58-60 °C in **PBS** gelöst und mit Natriumhydroxid auf pH 7,4 eingestellt:

Fixierlösung	
40 g/L	Paraformaldehyd (PFA)

Permeabilisierungslösung

Die Durchlässigkeit von Zellmembranen wurde durch die Verwendung von BD Perm/Wash (10x) in destilliertem Wasser erzielt:

Permeabilisierungslösung	
10 %	BD Perm/Wash (10x)

Migrationsmedium

Migrationsstudien an aktivierten MoDC und MoLC erfolgten unter Verwendung von **komplettiertem RPMI 1640**, wobei eine gerichtete Wanderung über das Chemokin CCL-21 vermittelt wurde [274]:

Migrationsmedium 1	
1 μ M	Prostaglandin E ₂

Migrationsmedium 2	
100 ng/mL	rh-CCL-21

2.1.4.5.2 Lösungen zur ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) Analytik

Verwendung fanden unterschiedliche ELISA-Kits. Die ReadySetGo[®]-Systeme beinhalteten bereits gebrauchsfertige Reagenzien, sodass die Herstellung weiterer Lösungen unterblieb.

Verdünnungsreagenz

Im Fall der DuoSet[®] ELISA-Kits für IFN- γ wurde destilliertes Wasser mit folgenden Zusätzen ergänzt und zur Rekonstitution bzw. Verdünnung der vorgesehenen Reagenzien verwendet:

Verdünnungsreagenz für IFN- γ	
0,10 %	BSA, Proteasefrei
0,05 %	Tween 20
20 mM	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)
150 mM	NaCl

Im Fall der DuoSet® ELISA-Kits für IL-6, IL-12p70 und IL-23 erfolgte die Rekonstitution bzw. Verdünnung der vorgesehenen Reagenzien mit **PBS** und folgenden Zusätzen:

Verdünnungsreagenz für IL-6 und IL-23	
1 %	BSA, Proteasefrei

Verdünnungsreagenz für IL12-p70	
1 %	BSA, Proteasefrei
2 %	Normales Ziegenserum, hitzeinaktiviert

Waschlösung für ELISA

Für beide ELISA-Kits wurde **PBS** mit oberflächenaktivem Tween 20 versetzt und als Waschlösung verwendet:

Waschlösung für ELISA	
0,05 %	Tween 20

Blockierungslösung

Im Fall der DuoSet® ELISA-Kits wurde **PBS** mit folgenden Zusätzen ergänzt und zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen eingesetzt:

Blockierungslösung für IFN-γ	
1 %	BSA, Proteasefrei
0,05 %	Natriumazid

Blockierungslösung für IL-6, IL12-p70 und IL-23	
1 %	BSA, Proteasefrei

TMB-Lösung

Im Fall der DuoSet® ELISA-Kits wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in einer Mischung aus Ethanol absolut und DMSO (1:1) eingesetzt und aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Substrats in schwarze Reaktionsgefäße (1,5 ml) aliquotiert:

TMB-Lösung	
20 mg/mL	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)

Citratpuffer

Im Fall der DuoSet® ELISA-Kits wurde Zitronensäure in destilliertem Wasser gelöst und mit Kaliumhydroxid auf einen pH von 3,95 eingestellt:

Citratpuffer	
42 g/L	Zitronensäure

Substratlösung für ELISA

Im Fall der DuoSet® ELISA-Kits wurde folgende Lösung als Substratlösung verwendet:

Substratlösung für ELISA	
11 mL	Citratpuffer
110 µL	TMB-Lösung
3,3 µL	Wasserstoffperoxid (konzentriert)

2.1.4.5.3 Lösungen zur immunhistochemischen (IHC) Analytik

Fixierlösung

Als Fixierlösung diente Aceton (-20°C) bzw. **PFA-Lösung**.

Triton X-Lösung

Als Permeabilisierungsreagenz diente das nichtionische Tensid Triton X 100 in **PBS**:

Triton X-Lösung	
0,5 %	Triton X 100

Blockierungslösung für Proteine

Als Lösung wurde Ziegenserum in **PBS** eingesetzt:

Blockierungslösung für Proteine	
5 %	Normales Ziegenserum

Waschlösung für Immunhistochemie (IHC)

PBS wurde mit folgenden Zusätzen versetzt und als Waschlösung verwendet:

Waschlösung für IHC	
0,0025 %	Aurion BSA-c™
0,025 %	Tween 20

Blockierungslösung für endogene Enzymaktivität

Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde durch Wasserstoffperoxid in **PBS** blockiert:

Blockierungslösung für endogene Enzymaktivität	
0,3 %	Wasserstoffperoxid (konzentriert)

DAB-Lösung

Als Chromogen diente 3,3' Diaminobenzidin (DAB) in destilliertem Wasser:

DAB-Lösung	
1 %	3,3' Diaminobenzidin (DAB)

Substratlösung für IHC

Folgende Lösung wurde als Substratlösung verwendet und anschließend mit Natriumhydroxid auf einen pH von 7,0 - 7,6 eingestellt:

Substratlösung für IHC	
5 mL	PBS
250 µL	DAB-Lösung
250 µL	Blockierungslösung für endogene Enzymaktivität

2.1.4.6 Lösungen zur RNA Analytik

Lyse-Puffer

Die zu untersuchenden Zellen wurden im Reagent Additive 1 (RA1) des NucleoSpin® RNA II Kit aufgenommen und 2-Mercaptoethanol zugesetzt:

Lyse-Puffer	
10 µL/mL	2-Mercaptoethanol

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat wurde über Nacht in destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert:

DEPC-Wasser	
0,1 %	Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Tris-Puffer 150mM

Tris-base wurde in **DEPC-Wasser** gelöst und mit Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt:

Tris-Puffer 150mM	
18,17 mg/mL	Tris-Base

Quantifizierungslösung Tris-HCl

Tris-Base in **DEPC-Wasser** wurde mit Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt:

Quantifizierungslösung Tris-HCl	
0,30285 g	Tris-Base
250 mL	DEPC-Wasser

EDTA-Lösung pH 8

EDTA wurde in **DEPC-Wasser** gelöst und mit Natriumhydroxid auf pH 8 eingestellt,

EDTA-Lösung pH 8	
186,12 mg/mL	EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat

TBE-Puffer (5x)

In destilliertem Wasser wurden folgende Zusätze gelöst und bei Bedarf 1:5 verdünnt:

TBE-Puffer (5x)	
108 g	Tris-Base
55 g	Borsäure
20 mL/L	EDTA-Lösung pH 8

Agarosegel

Agarose wurde in **TBE-Puffer (1x)** durch Erhitzen gelöst:

Agarosegel (1%)	
1 %	Agarose

Agarosegel (2%)	
2 %	Agarose

Ladepuffer (6x)

Die Elektrophorese wurde unter Anwendung von **Tris-Puffer 150mM** als Ladepuffer mit folgenden Zusätzen durchgeführt:

Ladepuffer (6x)	
3,6 mg/mL	Orange G
0,6 g/mL	Glycerol

Gel-Färbelösung

Um die Nukleinsäuren zu detektieren wurde Gelred™ Nucleic Acid Stain in destilliertem Wasser gelöst und als Färbelösung verwendet:

Gel-Färbelösung	
0,02 %	Gelred™ Nucleic Acid Stain

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Gewinnung und Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung menschlicher Zellen im Brutschrank geschah stets bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte, wobei die Isolation und Bearbeitung unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilarbeitsbank sowie unter Verwendung endotoxinfreier Biosphere[®] Filter Tips erfolgte. Die folgenden Primärzellen wurden für die nachstehenden Versuche verwendet:

Zellart	Bezugsquelle
Epidermale LC aus menschlicher Haut	HELIOS Klinikum Emil von Behring, Berlin Operativ entfernte Abdominalhaut (auch Mammareduktion) nach Einverständnis des Patienten und Erlaubnis der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin.
Monozyten sowie naive CD4⁺ T-Zellen	Deutsches Rotes Kreuz (DRK) Blutspendedienst Ost, Berlin Humane Blutkonserven (Buffy Coat) von gesunden Spendern nach Erlaubnis der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

2.2.1.1 Zellisolierung aus humaner Haut

Humane LC umfassen etwa 1 - 3 % aller in der Epidermis vorkommenden Zellen, was in einer ungefähren Verteilung von 460 Zellen pro mm² Haut resultiert [24]. Dabei sind LC auch anatomisch unterschiedlich verteilt und zeigen eine höhere Zelldichte an Kopf, Nacken und Oberkörper, wohingegen Genitalien und Fußsohlen geringere Zellzahlen aufweisen.

Die chirurgisch entfernte Brust- bzw. Bauchhaut wurde stets direkt am Ort der Operation mit Hilfe von Skalpell und anatomischen Pinzetten von anhaftendem Fettgewebe getrennt, anschließend in SteriClean[®] Bogenkrepp verpackt und unter Kühlung transportiert. Analog bereits vorhandener Literatur wurde die Isolation epidermaler LC innerhalb der darauf folgenden 24 h durchgeführt, wobei eine genügend große Menge an unversehrter Biopsie als Voraussetzung für eine ausreichende Quantität an LC galt [275]. Nach sorgfältiger Reinigung der Haut mit PBS wurde ein mind. 50 x 100 mm großes Segment mittels Dermatom auf eine Dicke von 500 µm reduziert, anschließend in ca. 5 x 5 mm kleine Stücke geschnitten und diese in einer Zellkulturschale (100 mm) über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken auf einem Wippschüttler in Dispase (1:10 in PBS) inkubiert. Dies vermittelte die enzymatische Trennung der dermoepidermalen Verbindung und ermöglichte die vorsichtige Entfernung der

Epidermis am nächsten Tag, wobei diese in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) gesammelt wurde [276]. Nachdem die Epidermis mit 15 ml Trypsin-Lösung versetzt und im Wasserbad bei 37 °C für 10 - 15 min inkubiert wurde, unterbrach die Zugabe von 35 ml Stop-Medium 1 die enzymatische Reaktion durch hierin enthaltene Proteaseinhibitoren. Als Indikator für die Effektivität der Vereinzelnung diente hierbei die Trübung der Lösung, wobei anschließend das Herauslösen der Zellen durch gründliches auf- und abpipettieren mittels serologischer Pipetten (anfänglich 10 ml, dann 5 ml) forciert wurde. Die Zellsuspension wurde daraufhin über ein Zellsieb (70 µm) von Epidermisresten und größeren Zellverbänden getrennt, hiernach bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert und erneut in 10 mL PBS resuspendiert.

2.2.1.1.1 Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation epidermaler Zellen

Obwohl die isopyknische Dichtegradientenzentrifugation ursprünglich der Isolierung von Leukozyten sowie anderen PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) aus menschlichem Blut diente, kann aufgrund der Dichtediversität der epidermalen Zellfraktion auch hier eine erste Aufreinigung vorgenommen werden. Die Verwendung einer NycoPrep® 1.077 Dichtelösung auf Basis von Nycodenz®, einem iodierten Isophthalamid-Derivat als Alternative zu Polysaccharid-haltigen Lösungen, besitzt dabei eine geringere Tendenz der Maskierung von zellulären Oberflächenproteinen während der Zentrifugation [277].

Die Zellsuspension wurde hierfür in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) vorsichtig auf 5 ml NycoPrep® 1.077 Dichtelösung überschichtet und bei 2300 Umdrehungen/min (900 g) für 25 min bei 20°C zentrifugiert, wobei das Ausrotieren ohne Bremse verlief und die Integrität der entstandenen Zellschichten garantierte. Die Auftrennung der isolierten Zellen anhand ihrer Dichtediversität beließ die LC in der Interphase zwischen Dichtelösung und Puffer, wobei sich die Mehrzahl der Keratinozyten als Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens sammelte.

2.2.1.1.2 Quantifizierung und Charakterisierung der Zellviabilität

Nachdem die LC quantitativ aus der Interphase entnommen wurden, erfolgte die Analyse ihrer Viabilität mittels Neubauer Zählkammer (Hämozytometer). Hierzu wurde ein geeignetes Deckglas unter Ausbildung konzentrischer Hell-Dunkel-Zonen (Newtonsche Ringe) aufgesetzt, sodass sich hierdurch ein Zwischenraum definierter Größe ausbildete. Die Zellen

der Interphase wurden in einem Gesamtvolumen von 5 mL PBS aufgenommen, wobei 10 μ L des Homogenisats der anschließenden Bestimmung der Viabilität und Zellmenge diente. Diese Menge wurde darauf hin mit 10 μ L Trypanblau-Lösung vereint, wodurch der Farbstoff nun in abgestorbene bzw. perforierte Zellen eindringen konnte. Zeitnah wurden 10 μ L dieser Suspension in das Hämocytometer pipettiert und die viablen (nicht gefärbten) Zellen in vier Eckquadranten der Zählkammer am Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Nach Errechnung des Mittelwerts wurde der Verdünnungsfaktor mit einbezogen, wonach die Multiplikation mit 10^4 schließlich die Zellzahl pro mL ergab. Der Vergleich gefärbter und nicht gefärbter Zellen gab darüber hinaus Auskunft über die Gesamtviabilität der isolierten Zellfraktion.

2.2.1.1.3 Aufreinigung CD1a⁺ Zellpopulationen durch magnetische Sortierung

Die primäre Fraktionierung der vereinzelt epidermalen Zellen entsprechend ihrer Dichte führte jedoch nicht zu einer ausreichenden Reinheit der LC in der Interphase (max. 5 %). Daher schloss sich hieran eine Selektion CD1a⁺ LC von CD1a⁻ Zellpopulationen sowie kontaminierenden Zellfragmenten und toten Zellen durch magnetische Sortierung (*magnetic cell sorting*, MACS Technologie) an. Diese basiert auf der Zurückhaltung von Zellen in einem magnetischen Feld aufgrund der Bindung von paramagnetischen Nanopartikeln [278]. Letztere sind hierfür kovalent an monoklonale Anti-CD1a Antikörper gekoppelt (MicroBeads), was die spezifische Markierung gewünschter Zellpopulationen erlaubt. Hierzu wurde die isolierte Zellfraktion der in einer Konzentration von max. 10^7 Zellen/80 μ L Isolierungspuffer aufgenommen und mit der entsprechenden Menge (20 μ L/ 10^7 Zellen) an Anti-CD1a Microbeads für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zugabe von 2 mL PBS mit EDTA beendete die Inkubationsphase durch Verdünnung, wobei nach anschließender Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 4 °C die nun vorbereitete Zellpopulation in 500 μ L Isolierungspuffer resuspendiert wurde. Die darauf folgende Positivselektion geschah unter Verwendung von MACS-Separationssäulen (*large scale*, LS), deren Kapazität eine konstante Passagegeschwindigkeit für maximal 10^9 Zellen erlaubt. Die ferromagnetische Matrix besteht hierbei aus dicht gepackten Stahlkugeln auf die innerhalb der Pole des Permanentmagneten (Midi MACS Separator) hohe magnetische Induktionskräfte ausgeübt werden. Nachdem am Magnethalter MACS Multistand die Separationssäule im Permanentmagneten positioniert und mit 3 mL Isolierungspuffer vorgespült wurde, konnte diese mit der markierten Zellsuspension beladen werden. Die Fraktion, welche im magnetischen Feld nicht zurückgehalten wurde, sammelte sich direkt in einem Zentrifugenröhrchen (15 mL), wobei sich hierauf ein dreimaliges Nachspülen mit je 3 mL Isolierungspuffer anschloss. Die hierdurch erhaltene Population aus CD1a⁻ Zellen,

Zellfragmenten und toten Zellen wurde letztlich verworfen. Nachdem die Separationssäule anschließend aus dem Einsatz des Magneten entnommen wurde, konnte diese auf ein weiteres Zentrifugenröhrchen (15 mL) positioniert und die gewünschte Zellfraktion in 5 mL Isolierungspuffer mittels Spritzenkolben heraus eluiert werden. Analog dieser Prozedur, schloss sich daraufhin eine erneute Isolierung über eine weitere Separationssäule an, wobei die nun zweifach aufgereinigte CD1a⁺ Zellpopulation nochmals quantifiziert und auf Viabilität geprüft wurde, ehe die Zellen für nachfolgende Analysen zur Verfügung standen.

2.2.1.2 Zellisolierung aus humanem Blut

Aufgrund der geringen Anteile dendritischer Zellen im peripheren Blut (13 - 37 DC/ μ L) wurde alternativ die Isolierung von Vorläuferzellen gewählt (*Abb.: 2-1*) [279]. Die Gewinnung von Monozyten und naiven CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgte aus sog. Buffy Coat, welches die Leukozyten- bzw. Thrombozyten-reiche Grenzschicht aus CPDA (*citrate-phosphate-dextrose solution with adenine*) stabilisiertem Vollblut darstellt und sich nach Zentrifugation zwischen Plasma und Erythrozyten bildet. Buffy Coat enthält neben Leukozyten und Thrombozyten auch einen Anteil der Erythrozyten und Plasma, wobei sich jedoch das Gesamtvolumen von anfänglich ca. 400 - 600 mL auf dann 70 - 100 mL reduziert. Buffy Coat Blutkonserven von gesunden Spendern wurden einen Tag nach Blutentnahme vom Blutspendedienst Ost des DRK Berlin, bezogen.

2.2.1.2.1 Isolierung von PBMC durch isopyknische Dichtezentrifugation

Sowohl Monozyten als auch Lymphozyten sind als mononukleäre Zellen Teil der PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) Fraktion des menschlichen Blutes bzw. Buffy Coats. Aufgrund der Dichtediversität der unterschiedlichen Zellpopulationen kann unter Verwendung der NycoPrep[®] 1.077 Dichtelösung die Isolierung von PBMC aus kontaminierenden Zellen erzielt werden. Diese trennt die zellulären Komponenten in Fraktionen mit gleicher Dichte auf, wobei PBMC und Thrombozyten anschließend eine schmale Grenzschicht zwischen Plasma und Dichtelösung ausmachen.

Hierfür wurden die Buffy Coat Blutspenden entsprechen ihres Gesamtvolumens mittels vorgewärmtem PBS mit EDTA um das 2,5-fache Volumen verdünnt, anschließend in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml) auf 15 ml NycoPrep[®] 1.077 Dichtelösung überschichtet und bei 1400 Umdrehungen/min (400 g) für 45 min bei 20°C zentrifugiert, wobei das Ausrotieren ohne Bremse verlief. Die Interphase aus PBMC und Thrombozyten wurde quantitativ in ein

separates Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt, anschließend dreimal mit je 50 ml kaltem PBS mit EDTA (4 °C) resuspendiert und nun bei 1000 Umdrehungen/min (200 g) für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Aufgrund der veränderten Geschwindigkeit verblieben die Thrombozyten nun hauptsächlich im Überstand und wurden nahezu quantitativ entfernt, sodass sich hieran die Bestimmung der Zellmenge und Viabilität der PBMC Fraktion anschloss, welche analog der Quantifizierung epidermaler LC aus humaner Haut verlief.

2.2.1.2.2 Isolierung von Monozyten durch Adhärenz

Die isopyknische Dichtegradientenzentrifugation diente der Auftrennung der Zellpopulationen entsprechend ihrer spezifischen Dichte. Die hierdurch gewonnene PBMC-Fraktion besteht zu etwa 70 % aus Lymphozyten, 10 % aus Monozyten sowie zu 20 % aus kontaminierenden Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten. Die nachfolgende Isolierung von Monozyten kann hierbei aufgrund ihrer Kapazität der Adhärenz auf nicht-physiologischen Oberflächen erfolgen. Dazu wurden die PBMC in einer Konzentration von 10^7 Zellen/mL in insgesamt 20 mL vorgewärmten komplettiertem RPMI 1640 aufgenommen und anschließend zu je 10 mL in Zellkulturflaschen (75 cm²) eingesät. Nach einer Inkubationsphase von 35 min im Brutschrank wurde der Überstand entnommen und in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL) gesammelt, die Zellkulturflasche anschließend mit 10 mL vorgewärmtem PBS mit EDTA (37 °C) unter leichtem Schwenken gewaschen und die Waschlösung mit dem Überstand vereint. Diese Prozedur diente der Separation adhärenter Monozyten von kontaminierenden Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten sowie von den nicht-adhärenen Lymphozyten, die im Überstand verblieben. Während letztere Fraktion für die anschließende Isolierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten mittels Naïve human CD4⁺ T-Cell Isolation Kit II verwendet wurde, dienten Monozyten als Vorläuferzellen für die nun folgende Differenzierung zu MoDC bzw. MoLC.

2.2.1.3 Generierung von DC und LC aus Monozyten

Die *ex vivo* Differenzierung frisch isolierter CD14⁺ Monozyten des peripheren Blutes in MoDC bzw. MoLC kann durch Zugabe definierter Zytokine erreicht werden. Analog der etablierten Literatur wurden die adhärenen Zellen in 10 mL MoDC-Differenzierungsmedium kultiviert um diese über 6 Tage zu MoDC ausdifferenzieren, wobei an Tag 2 und 4 jeweils die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt wurde [170].

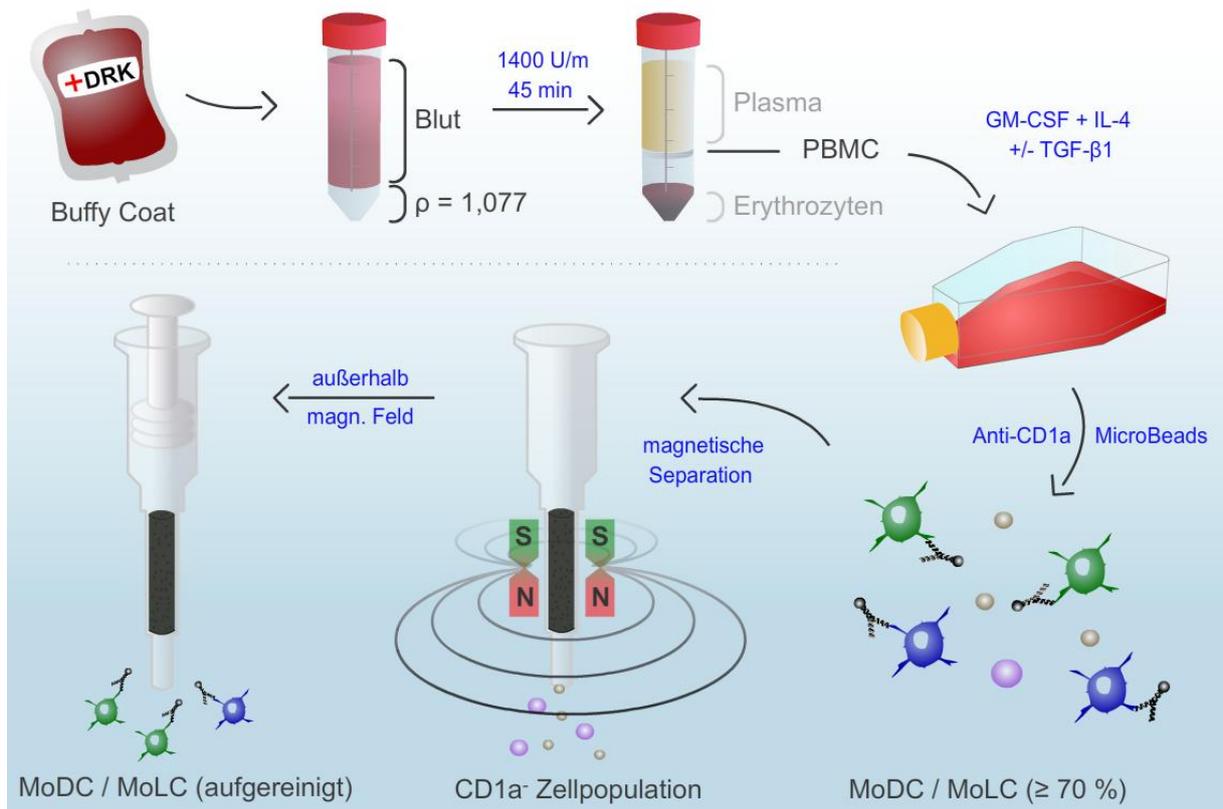


Abbildung 2-1: Methodik der ex vivo Differenzierung von MoDC und MoLC aus humanem Blut. Die PBMC werden mittels isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation von anderen zellulären Bestandteilen des Buffy Coats getrennt und nach Adhärenz über 7 Tage in Gegenwart definierter Zytokine kultiviert. Eine finale Aufreinigung durch magnetische Separation erfolgt mittels Anti-CD1a MicroBeads.

Andererseits initiierte die Kultur der Monozyten in MoLC-Differenzierungsmedium 1 die Generierung von MoLC. Nachdem an Tag 2 und 4 die Hälfte des Mediums durch MoLC-Differenzierungsmedium 2 ersetzt wurde, forcierte der veränderte Gehalt an IL-4 und TGF-β1 im Kulturmedium die Differenzierung zu MoLC [172]. Die Konversion der Monozyten in MoDC bzw. MoLC ging mit dem Verlust der Adhärenz sowie einer verringerten Expression des CD14 Antigens einher, wohingegen sich der Oberflächenmarker CD1a erhöhte. Nachdem die Zellen ausreichend hohe Expressionsraten an CD1a aufwiesen, erfolgte die Positivselektion mittels Anti-CD1a MicroBeads, um die viablen MoDC bzw. MoLC von Zellfragmenten, toten Zellen sowie nicht ausreichend differenzierten Monozyten und kontaminierenden Lymphozyten zu isolieren. Die Separation und nachfolgende Bestimmung der Zellmenge und Viabilität erfolgte dabei analog der Isolation epidermaler LC aus humaner Haut. Aufgrund der weitaus höheren Anteile CD1a⁺ Zellen an der Gesamtkultur (≥ 70 %) konnten diese jedoch durch eine bereits einmalige Passage ausreichend aufgereinigt werden, sodass die Population viabler CD1a⁺ Zellen stets eine reproduzierbare Reinheit von ≥ 95 % aufwies.

2.2.1.4 Zellisolierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten aus nicht-adhärenen PBMC

Während die adhärenente Population der PBMC für die Differenzierung zu MoDC und MoLC verwendet wurde, diente die nicht adhärenente Fraktion der Isolierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten, nachdem diese in einer Konzentration von max. 10⁷ Zellen/40 µL in Isolierungspuffer aufgenommen wurde. Anders als die bereits verwendeten Anti-CD1a MicroBeads, stellt das verwendete Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II ein Verfahren der Negativselektion dar. Die hierin enthaltene Mischung folgender Biotin-gekoppelter Antikörper dient der Markierung von Gedächtniszellen sowie weiteren PBMC, weist jedoch keine Affinität zu naiven CD4⁺ T-Lymphozyten auf: Anti-CD8-, -CD14-, -CD15-, -CD16-, -CD19-, -CD25-, -CD34-, -CD36-, -CD45RO-, -CD56-, -CD123-, -TCR_{V α} -, HLA-DR- und CD235a-Antikörper. Nachdem die Antikörpermischung in einer Konzentration von 10 µL/10⁷ Zellen zugegeben wurde und für 10 min bei 4 °C inkubiert, beendete die Zugabe von 2 mL/10⁷ Zellen PBS mit EDTA die Reaktion durch Verdünnung. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 4 °C und die Aufnahme des entstandenen Zellpellets in Isolierungspuffer in einer Konzentration von max. 10⁷ Zellen/80 µL. Daraufhin begann die Inkubation mit Anti-Biotin MicroBeads (20 µL/10⁷ Zellen) für weitere 15 min bei 4 °C, wodurch die vorher markierten Zellen nun indirekt mit paramagnetischen Nanopartikeln beladen wurden. Erneut wurde mit 2 mL/10⁷ Zellen PBS mit EDTA gewaschen, nachfolgend bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die nun vorbereiteten Zellen in einer Konzentration von max. 10⁸ Zellen/500 µL in Isolierungspuffer aufgenommen. Nachdem die Separationsäule (LC) im Permanentmagneten positioniert und diese mit 3 mL Isolierungspuffer vorgespült wurde, konnte die Säule nun mit der Zellsuspension beladen werden. Hierbei passierten nun ausschließlich naive CD4⁺ T-Zellen das magnetische Feld und sammelten sich direkt in einem Zentrifugenröhrchen (15 mL), wobei sich hierauf ein dreimaliges Nachspülen mit je 3 mL Isolierungspuffer anschloss und die Separationssäule samt restlicher PBMC verworfen wurde. Der passiven Isolierung folgte anschließend die Ermittlung der Zellmenge sowie die Bestimmung derer Viabilität. Diese verlief analog der Quantifizierung epidermaler LC aus humaner Haut und bestätigte die geforderte Mindestreinheit von ≥ 95 %.

2.2.2 Methoden der Zellaktivierung

Die Bestimmung der funktionellen Charakteristika generierter MoDC bzw. MoLC wurde direkt nach Beendigung der Differenzierung durchgeführt und fand unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilarbeitsbank und unter Verwendung endotoxinfreier Biosphere[®] Filter Tips

statt. Nachdem die Zellen über 6 Tage kultiviert, aufgereinigt und quantifiziert wurden, folgte die Aussaat der Zellen in Zellkulturplatten (24-Loch, Flachboden) in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/500 μ L komplettiertem RPMI 1640, wobei die Dauer der Aktivierung zwischen 24 und 48 Stunden variierte und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte erfolgte.

2.2.2.1 Stimulation unreifer DC-Typen

Die folgende Tabelle listet die verwendeten Testsubstanzen in der jeweiligen Konzentration der Stammlösung auf. Die in den Experimenten verwendete Arbeitskonzentration, einzeln oder in Kombination, wurde durch Supplementierung des komplettierten RPMI 1640 stets unmittelbar vor Testbeginn hergestellt und orientierte sich dabei an verfügbaren Studien und Herstellerempfehlungen:

Testsubstanz	Arbeitskonzentration	Stammlösung
LPS-EB Ultrapur	1 μ g/mL	5 mg/mL in Wasser (steril, pyrogenfrei)
Pam₃CSK₄	1 μ g/mL	1 mg/mL in Wasser (steril, pyrogenfrei)
Poly(I:C)	1 μ g/mL	1 mg/mL in Wasser (steril, pyrogenfrei)
rh-CD40L	500 ng/mL	0,1 mg/mL in PBS, 1 % BSA
rh-IL-1α	5 ng/mL	200 μ g/mL in 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl
rh-IL-1β	30 ng/mL	100 μ g/ml in PBS, 150 mM NaCl, 1 % BSA
rh-TNF-α	20 ng/mL	100 μ g/mL in 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 0,5 % BSA

Nach der Stimulation wurde der Kulturüberstand entnommen, bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert, das zellfreie Medium für die spätere Analyse im ELISA in Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 mL) überführt und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden dagegen für die jeweils anschließende Analytik unterschiedlich aufbereitet.

2.2.2.2 Modulation zellulärer- und Rezeptor-abhängiger Prozesse

Neben der Stimulation unreifer MoDC und MoLC bedurfte die nähere Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften einer gleichzeitigen Inhibition verschiedener zellulärer Vorgänge.

Dabei resultierte die Gegenwart von Brefeldin A bzw. Monensin in der intrazellulären Akkumulation produzierter Zytokine durch Hemmung des vesikulären Transports [280]. Die Modulation Autophagie-abhängiger Prozesse wurde dagegen durch Hemmstoffe der frühen sowie späten Phase der Autophagozytose erzielt, wobei auch ein Inhibitor von mTOR eingesetzt wurde und sich hierdurch die Aktivität der Autophagie erhöhte. Darüber hinaus diente die Verwendung spezifischer Inhibitoren Rezeptor-abhängiger Signalkaskaden der genaueren Charakterisierung Zytokin-induzierter Effekte während der Stimulation. Die folgende Tabelle listet die verwendeten Modulatoren in der jeweiligen Konzentration der Stammlösung. Die Inkubationsdauer sowie die verwendeten Arbeitskonzentrationen orientierten sich an Herstellerempfehlungen und verfügbaren Studien, wobei die einzelnen Modulatoren dem supplementierten Medium zur Stimulation zugesetzt wurden:

Testsubstanz	Arbeitskonzentration	Stammlösung	Dauer
3-Methyladenin	10 mM	Keine (direkt gelöst und sterilfiltriert)	24 h
Bafilomycin A1	1 μ M	1 mM in DMSO	24 h
Brefeldin A	5 μ g/mL	5 mg/mL in DMSO	\leq 18 h
Chloroquin-Diphosphat	0,2 - 200 μ M Base	20 mM in Wasser (steril, pyrogenfrei)	24 h
Hydroxychloroquin-Sulfat	20 μ M Base	20 mM in Wasser (pyrogenfrei)	24 h
Hydrocinnamoyl-L-valyl pyrrolidin	10 - 100 μ g/mL	5 mg/mL in DMSO	24 h
LY364947	5 μ M	100 mM in DMSO	24 h
Monensin	2 μ M	2 mM in Ethanol 70 %	\leq 18 h
Rapamycin	10 nM	10 μ M in DMSO	24 h

Nach 24 Stunden wurde der Kulturüberstand entnommen, bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert, das zellfreie Medium für die spätere Analyse im ELISA in Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 mL) überführt und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden dagegen für die jeweils anschließende Analytik unterschiedlich aufbereitet.

2.2.2.3 Kokultivierung aktivierter MoLC und naiver CD4⁺ T-Zellen

Der initialen Aktivierung folgend schloss sich die Erfassung einer potentiellen Stimulation der primären T-Zell-Antwort an. Hierzu wurden frisch isolierte naive CD4⁺ T-Lymphozyten in

einer Konzentration von 10^5 Zellen/100 μ L T-Zell-Wachstumsmedium in eine Zellkulturplatte (96-Loch, Rundboden) eingesät. Ebenso wurden MoLC nach 24-stündiger Stimulationsphase quantitativ aus der Zellkulturplatte (24 Loch, Flachboden) entnommen, in 5 mL PBS mit EDTA bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert und die Zellzahl mittels Hämozytometer quantifiziert. Hiernach folgte die Einsaat von 10^4 MoLC/ 10^5 T-Lymphozyten in die vorbereiteten Vertiefungen der Zellkulturplatte (96-Loch, Rundboden) in zweifacher Ausführung (Dublikate). Nach 5 Tagen in Kokultur wurde der Kulturüberstand entnommen, bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert, das zellfreie Medium für die spätere Analyse im ELISA in Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 mL) überführt und im Gefrierschrank (-80 °C) gelagert. Die Zellen wurden dagegen für die jeweils anschließende Analytik unterschiedlich aufbereitet.

2.2.3 Methoden zur Integration immunkompetenter Zellen in Vollhautmodelle

Die langjährige Erfahrung und Expertise der Arbeitsgruppe erlaubte die Konstruktion *in vitro* generierter Hautmodelle mit integrierten Immunzellen analog bereits etablierter Arbeitsanweisungen zur Entwicklung eines dreidimensionalen Hautäquivalents [273]. Die Kultivierung menschlicher Zellen im Brutschrank geschah stets bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte, wobei die Isolierung und Kultivierung unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilarbeitsbank erfolgte. Die folgenden Zellpopulationen wurden für die nachstehenden Versuche verwendet:

Zellart	Bezugsquelle
Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) und humane Keratinozyten (NHK) Passage 3, Einzelspender	Verschiedene Kliniken und Praxen Aus operativ entfernter juveniler Vorhaut (\leq 8 Jahre) nach Einverständnis des Patienten und Erlaubnis der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Unreife CD1a⁺ MoLC	Deutsches Rotes Kreuz (DRK) Blutspendedienst Ost, Berlin Humane Blutkonserven (Buffy Coat) von gesunden Spendern nach Erlaubnis der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Die Isolierung der NHDF und NHK aus juveniler Vorhaut sowie die anschließende Kultivierung und Passagierung wurde von Herrn Christian Zoschke, Doktorand in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schäfer-Korting, durchgeführt und erfolgte gemäß standardisierter Arbeitsanweisung [281].

2.2.3.1 Isolierung und Kultivierung der NHK

Innerhalb 36 Stunden nach Entnahme der Vorhaut wurde diese aus dem Transportmedium entnommen, zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mittels Skalpell von subkutanem Fettgewebe getrennt und anschließend in ca. 3 mm breite Stücke geschnitten. Diese wurden in eine Zellkulturschale (60 mm) überführt und für 20 Stunden bei 4 °C in Dispase (1:10 in PBS) inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung von Epidermis und Dermis, wobei erstere in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL) gesammelt und mit 4 mL Trypsin-Lösung 2 in 12 mL PBS für ca. 20 min bei 37 °C inkubiert wurde. Durch Zugabe von 10 mL Stop-Medium 2 wurde die enzymatische Vereinzelnung der Zellen durch Proteaseinhibitoren unterbrochen und die entstandene Suspension bei 1000 Umdrehungen/min (200 g) für 5 min zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet in 10 mL PBS resuspendiert und durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert wurde, folgte erneut die Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen/min (200 g) für 5 min und anschließende Bestimmung der Zellzahl mittels Hämozytometer. Nach Aufnahme von 2×10^6 Zellen in 13 mL Keratinozyten-Wachstumsmedium erfolgte die Einsaat in Zellkulturflaschen (75 cm²), worauf sich die Kultivierung im Brutschrank anschloss und das verwendete Medium dreimal wöchentlich mittels Pasteurpipetten komplett entfernt und nach einmaligem Waschen in 10 mL PBS mit frischem Wachstumsmedium erneuert wurde.

2.2.3.2 Isolierung und Kultivierung der NHDF

Die Isolierung der NHDF erfolgte zeitgleich mit der Gewinnung epidermaler Keratinozyten und garantierte somit die Verwendung spenderkonformer Zelltypen für die Konstruktion der Hautmodelle. Hierzu wurde je ein Dermisstück nach Entfernung der epidermalen Schichten mit der apikalen Seite in die Vertiefung einer Zellkulturplatte (6-Loch, Flachboden) gelegt und für mind. 30 min auf der Oberfläche anhaften gelassen. Anschließend erfolgte die Kultivierung in 1,5 mL Fibroblasten-Wachstumsmedium im Brutschrank, wobei die Dermis an Tag 7 entfernt, das Medium zweimal wöchentlich mittels Pasteurpipetten komplett abgesaugt und nach einmaligem Waschen in 2 mL PBS mit frischem Medium erneuert wurde.

2.2.3.3 Passagierung

Nachdem die Zellen einen Konfluenzgrad von 80 - 90 % erreichten, wurden diese mit 10 mL (Zellkulturflasche) bzw. 2 mL (Zellkulturplatte) PBS gewaschen und nach Entfernung der

Waschlösung mit 1,5 mL bzw. 0,5 mL Trypsin-Lösung 2 für 3 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem der Erfolg der enzymatischen Zellablösung mikroskopisch kontrolliert wurde, beendete die Zugabe der mind. doppelten Menge an Stop-Medium 2 die Reaktivität von Trypsin. Die entstandene Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführt wurde, anschließend bei 1000 Umdrehungen/min (200 g) für 5 min zentrifugiert und nach Aufnahme in 10 mL PBS mittels Hämozytometer quantifiziert bzw. auf Viabilität geprüft. Hiernach erfolgte die Aufnahme der NHK in Keratinozyten-Wachstumsmedium bzw. der NHDF in Fibroblasten-Wachstumsmedium und die Einsaat in Zellkulturflaschen (75 cm²) bzw. Zellkulturplatten (6-Loch, Flachboden) in einer Konzentration von 10⁴ Zellen/cm² Wachstumsfläche.

2.2.3.4 Erstellung *in vitro* generierter humaner Dermisäquivalente

Organotypische Vollhautmodelle bestehen aus einer rekonstruierten Epidermis, welche einer polymerisierten Kollagenmatrix mit integrierten NHDF aufsitzt (Abb.: 2-2). Nachdem die Anzahl der zu generierenden Hautmodelle bestimmt wurde, übernahm Herr Christian Zoschke die Konstruktion der Dermisäquivalente mittels NHDF-Kollagenmischung. Hierzu wurde für jedes Hautäquivalent in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL) eine Mischung aus DMEM (10x), HEPES Puffer und einer 0,7 molaren Natriumhydroxid-Lösung unter leichter Bewegung mit Kollagen G vermengt und anschließend die aus der Zellkulturflasche (75 cm²) isolierten und quantifizierten NHDF in Fibroblasten-Wachstumsmedium unter kontinuierlicher Bewegung hinzugegeben. Die pH-abhängige Kollagen-Polymerisation geschah zeitnah nach Überführung in vorbereitete Membraneinsätze (0,4 µm Porengröße) in einer Zellkulturplatte mit 6 tiefen Mulden über 24 h im Brutschrank. Nach erfolgter Aushärtung der Kollagenmatrix wurde der Membraneinsatz mit 2,5 mL und die Vertiefung der Zellkulturplatte mit 10 mL Xmix⁺ Medium befüllt [273]. Dieses wurde zweimal wöchentlich mittels Pasteurpipetten abgesaugt und durch frisches Kulturmedium erneuert.

2.2.3.5 Aussaat der NHK und Integration unreifer MoLC

Nachdem das Dermisäquivalent über einen Zeitraum von 8 Tagen kultiviert wurde, folgte die gleichzeitige Aussaat basaler, undifferenzierter NHK sowie *ex vivo* differenzierter MoLC im Verhältnis (3:1). Hierzu wurde das Xmix⁺ Medium innerhalb des Membraneinsatzes vollständig entfernt, 2 x 10⁶ Zellen der mittels Hämozytometer quantifizierten NHK in 50 µL Keratinozyten-Wachstumsmedium auf das vorbereitete Dermisäquivalent pipettiert und diese

anschließend für 30 min im Brutschrank kultiviert. Gleichzeitig wurden die mittels Anti-CD1a MicroBeads ausreichend separierten MoLC quantifiziert sowie auf Viabilität geprüft und entweder direkt für die Aussaat auf die Dermisäquivalente vorbereitet, oder in einem Zentrifugenröhrchen (15 mL) in einer Konzentration von 10^6 Zellen/mL Inkubationsmedium CellTracker™ für 45 min bei 37 °C unter leichter Rotation auf dem Plattformschüttler Swip mit Inkubationshaube TH10 inkubiert. Der fluoreszierende Farbstoff passiert hierbei die Zellmembran und wird durch intrazellulär lokalisierte Esterasen gespalten, also hydrophilisiert, was zu einer zytosolischen Anreicherung des Farbstoffes führt. Aufgrund dieser Prozedur verblieb der Farbstoff über längere Zeit innerhalb der MoLC und machte diese somit für fluoreszenzbasierte Analysen zugänglich. Nachdem die Zellen anschließend bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert wurden, diente das zweimalige Waschen mit 10 mL PBS mit EDTA der vollständigen Entfernung freier Fluoreszenzfarbstoffes. Nachdem die nun aufbereiteten MoLC in einer Konzentration von 10^6 Zellen/20 µL Keratinozyten-Wachstumsmedium resuspendiert wurden, schloss sich daraufhin die Aussaat auf die vorbereiteten Dermisäquivalente an. Nach der 30-minütigen Kultivierung der NHK auf der Kollagenmatrix, folgte die Zugabe der unmarkierten bzw. mit CellTracker™ behandelten MoLC auf die basale Schicht aus Keratinozyten. Nach einer weiteren Inkubationsdauer von 60 min im Brutschrank erfolgte nun die vorsichtige Zugabe der restlichen 10^6 NHK in 50 µL Keratinozyten-Wachstumsmedium auf das Dermisäquivalent. Die schichtweise Einbettung der MoLC diente der optimalen Einsaat nach physiologischem Vorbild, wonach sich LC ausschließlich in suprabasalen Schichten der Epidermis finden [47].

Darüber hinaus wurde das Xmix⁻ Kulturmedium außerhalb der Membraneinsätze mittels Pasteurpipetten vollständig entfernt und durch 9,3 mL Xmix⁺ Differenzierungsmedium ersetzt. Die Trockenlegung der apikalen Modelloberfläche durch Entfernung des Zellkulturüberstandes im Membraneinsatz sowie die Verwendung des durch definierte Zusätze erweiterten Xmix⁺ Mediums in einem Volumen < 10 mL, führen zu einer Verschiebung der epidermalen Schichten an die Luft-Flüssigkeits-Grenze (*air-liquid-interface*, Airlift) und induziert somit die terminale Differenzierung der NHK. Die weitere Kultur des Vollhautäquivalents über 10 Tage sowie der dreimal wöchentliche Austausch des Xmix⁺ Mediums dienten der Ausbildung epidermaler Differenzierungsschichten inkl. einer abschließenden Hornschicht (S. corneum).

2.2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beschreibt ein leistungsfähiges Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Oberflächenproteinen sowie intrazellulären Strukturen und dient der Analyse der Viabilität, Funktionalität und Phänotypisierung einzelner Zellen. Hierzu wird die aufbereitete Einzelzellsuspension über einen laminaren Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert und trifft über eine Quarzküvette auf monochromatisches Licht eines Argonionenlasers (488 nm), wobei das entstehende Streulicht über entsprechende Photodioden detektiert wird. Dabei ist das im 180° Winkel zum einfallenden Lichtstrahl durch Beugung detektierte Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FCS) ein Maß für die Größe der Zelle, wohingegen das Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC), im 90° Winkel gemessen, mit der Komplexität und Granularität der Zelle korreliert. Darüber hinaus können die Zellen direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen, bzw. über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper markiert werden, sodass die Absorption energiereichen Laserlichts in der Emission spezifischer, energieärmerer Wellenlängen resultiert und deren Detektion eine Auskunft über das Expressionsprofil definierter Oberflächenmoleküle, die Integrität der Zellmembran sowie Funktionalität und Viabilität der vermessenen Zellpopulation gibt. Die Signalstärke des Emissionslichts ist dabei proportional zu der Menge an gebundenem bzw. inkorporiertem Fluoreszenzfarbstoff, wobei bei Verwendung mehrerer Fluorochrome auf ausreichende Unterscheidbarkeit der jeweiligen Anregungs- und Emissionsmaxima zu achten ist, um eine simultane Detektion zu ermöglichen. Die Tabelle listet die verwendeten Fluorochrome sowie deren spektrale Eigenschaften auf:

Fluorochrom	Ex. Max	Em. Max	Em. Farbe
Alexa Fluor 488 (FITC-Derivat)	495 nm	519 nm	Cyan-Grün
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495 nm	519 nm	Cyan-Grün
Phycoerythrin (PE)	496 nm	575 nm	Gelb
Propidiumiodid (PI)	488 nm	590 nm	Gelb/Orange
Peridinin-Chlorophyll (PerCP)	472 nm	677 nm	Rot

Darüber hinaus beruht das optionale Prinzip des FACS (*fluorescence activated cell sorting*) auf einem elektrostatischen Sortiermechanismus, mit dessen Hilfe die vermessene Probe innerhalb eines elektrischen Feldes in unterschiedliche Fraktionen aufgeteilt und entsprechend der gewünschten Signalstärke gruppiert wird. Da der Begriff FACS lediglich eingetragenes Warenzeichen der Firma Becton Dickinson ist, besitzt das hier eingesetzte Gerät BD FACSCalibur™ entgegen seiner Namensgebung keine Sortierfunktion.

2.2.4.1.1 Bestimmung der zellulären Oberflächenmoleküle

Die Analyse des Expressionsprofils verschiedener Oberflächemoleküle diente einerseits der Überprüfung phänotypischer Charakteristika frisch isolierter Zellen bzw. *ex vivo* generierter MoDC und MoLC sowie der Analyse des Reifungsgrades nach Stimulation.

Hierzu wurden die Zellen nach Beendigung der Isolierung, Differenzierung bzw. Stimulation in FACS-Röhrchen mit Rundboden (75x12 mm) überführt, mit 5 mL PBS mit EDTA gewaschen und nach Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C in einer Konzentration von 10^5 Zellen/100 μ L FACS-Puffer aufgenommen, welcher die für die Untersuchung verwendeten Antikörper in einer nach Herstellerangaben definierten Menge enthielt. Bei Verwendung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper wurden die Proben unter Lichtausschluss für 10 min bei 4 °C inkubiert und daraufhin jeweils mit 2 mL PBS mit EDTA versetzt, wodurch die Inkubation durch Verdünnen beendet wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in einer Konzentration von 10^5 Zellen/100 μ L FACS-Puffer aufgenommen und unter Lichtausschluss auf Eis gelagert, ehe die Fluoreszenzintensität der Proben am BD FACSCalibur™ vermessen wurde.

Bei Verwendung unkonjugierter Antikörper wurden die Proben für 10 min bei 4 °C inkubiert, dreimal in 2 mL PBS in EDTA aufgenommen und bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^5 Zellen/100 μ L FACS-Puffer aufgenommen, welcher Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper in einer nach Herstellerangaben definierten Menge enthielt und sich erneut eine Inkubation unter Lichtausschluss für 10 min bei 4 °C anschloss. Da diese nun gegen den unkonjugierten Primärantikörper gerichtet waren, konnte das Antigen nachträglich durch Fluorochrome markiert werden. Nachdem auch hier 2 mL PBS mit EDTA zugesetzt und das Zellpellet nach Zentrifugation in einer Konzentration von 10^5 Zellen/100 μ L FACS-Puffer aufgenommen wurde, lagerte die Probe unter Lichtausschluss auf Eis und wurde anschließend analysiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben mittels Vortex-Gerät Genie™ 2 homogenisiert.

Die Vermessung der Proben wurde über die Software: CellQuest™ Vers. 3.1f durchgeführt und nach Erreichen einer Anzahl von 1 - $2,5 \times 10^5$ Zellen beendet, wobei die Auswertung mit dem Programm: WinMDI 2.8 erfolgte. Die Tabelle listet die Antikörper, welche für die Vermessung der Oberflächenproteine verwendet wurden:

Fluorochrom	Klon	Antigen	Reaktivität
Alexa Fluor 488	108724	Anti-Axl	Maus anti-human
Alexa Fluor 488	---	IgG1 Isotypkontrolle	Maus
FITC	HI149	Anti-CD1a	Maus anti-human
FITC	R6H1	Anti-CD196	Maus anti-human
FITC	T2.5	Anti-CD282	Maus anti-human
FITC	67A4	Anti-CD324	Maus anti-human
FITC	T6D11	Anti-CD45RA	Maus anti-human
FITC	2D10.4	Anti-CD80	Maus anti-human
FITC	FM95	Anti-CD86	Maus anti-human
FITC	----	IgG1 Isotypkontrolle	Maus
PE	12G5	Anti-CD184	Maus anti-human
PE	150503	Anti-CD197	Maus anti-human
PE	10E2	Anti-CD207	Maus anti-human
PE	DCN47.5	Anti-CD209	Maus anti-human
PE	HTA125	Anti-CD284	Maus anti-human
PE	VIT4	Anti-CD4	Maus anti-human
PE	HB15e	Anti-CD83	Maus anti-human
PE	----	IgG1 Isotypkontrolle	Maus
PE	----	Anti-Maus IgG1	Ziege anti Maus
PerCP	TÜK4	Anti-CD14	Maus anti-human
PerCP	----	IgG1 Isotypkontrolle	Maus
Unkonjugiert	162-46	Anti-TROP-2	Maus anti-human
Unkonjugiert	----	IgG1 Isotypkontrolle	Maus

2.2.4.1.2 Bestimmung der Zellviabilität

Die Detektion apoptotischer sowie nekrotischer Zellkörper verlief mittels FITC-gekoppeltem, rekombinanten Annexin-V Fusionsprotein sowie Propidiumiodid (PI). Annexin-V bindet dabei an Phosphatidylserin, welches während der frühen Phase der Apoptose von der Innenseite

der Plasmamembran zur Außenseite transportiert wird, wohingegen PI ausschließlich in perforierte Membranen spät-apoptotischer- bzw. nekrotischer Zellen gelangt und dort in die DNA interkaliert. Die Messung der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten ermöglicht somit eine differenzierte Analyse der Viabilität.

Hierzu wurden die Zellen nach Beendigung der Differenzierung bzw. Stimulation in FACS-Röhrchen mit Rundboden (75x12 mm) überführt, mit 5 mL PBS mit EDTA gewaschen und nach Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C in einer Konzentration von 10^5 Zellen/100 μ L Annexin-Bindungspuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit FITC-konjugierten Annexin-V Fusionsprotein in einer Hersteller-spezifischen Konzentration von 2,5 μ g/mL für 10 min unter Lichtausschluss bei 4 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mL Annexin-Bindungspuffer durch Verdünnung beendet, wobei nach erfolgter Zentrifugation der Proben diese erneut in 100 μ L Annexin-Bindungspuffer resuspendiert und unter Lichtausschluss auf Eis gelagert wurden. Die Zugabe von PI erfolgte optional und zeitnah vor der Analyse der Fluoreszenzsignale am BD FACSCalibur™ in einer Endkonzentration von 1 μ g/mL. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben mittels Vortex-Gerät Genie™ 2 homogenisiert. Die Vermessung der Proben wurde über die Software CellQuest™ Vers. 3.1f durchgeführt und nach Erreichen einer Anzahl von 1 - $2,5 \times 10^5$ Zellen beendet, wobei die Auswertung mit dem Programm WinMDI 2.8 erfolgte.

2.2.4.1.3 Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion

Die Stimulation unreifer MoDC und MoLC, bei gleichzeitiger Inhibition zellulärer Transportmechanismen führte zu intrazellulärer Akkumulation der produzierten Zytokine aufgrund der Hemmung der vesikulären Sekretion. Der Einsatz spezifischer Antikörper erlaubte demnach die Detektion von Fluoreszenzsignalen, deren Intensität mit der Menge an produziertem Zytokin korreliert. Hierzu wurden die in Gegenwart von Brefeldin A bzw. Monensin stimulierten MoDC bzw. MoLC quantitativ in ein FACS-Röhrchen mit Rundboden (75x12 mm) überführt, in 5 mL PBS mit EDTA gewaschen und nach Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C in 1 mL einer Mischung aus PBS mit EDTA und Fixierlösung (1:1) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das enthaltene PFA, ein kurzkettiges Polymer des Formaldehyds, führt hierbei zu einer reversiblen Quervernetzung der zellulären Membranproteine, wodurch die Antigenstruktur erhalten bleibt. Nach erfolgter Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet in 1 mL Permeabilisierungslösung aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die hierin enthaltenen Saponine die Durchlässigkeit der Zellmembran durch Herauslösen von

Strukturproteinen erhöhen und die Zellen somit für die Markierung intrazellulärer Strukturen vorbereitet sind. Die Proben wurden erneut bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert und anschließend in 100 µL Permeabilisierungslösung resuspendiert, welche die für die Untersuchung verwendeten Antikörper bereits in einer nach Herstellerangaben definierten Menge enthielt. Nach Inkubation für 10 min bei 4 °C unter Lichtausschluss wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 mL Permeabilisierungslösung beendet, wobei die Zellen nach Zentrifugation in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert und unter Lichtausschluss auf Eis gelagert wurden. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben mittels Vortex-Gerät Genie™ 2 homogenisiert. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde am BD FACSCalibur™ über die Software: CellQuest™ Vers. 3.1f vermessen und nach Erreichen einer Anzahl von 1 - 2,5 x 10⁵ Zellen beendet. Anschließend erfolgte die Auswertung über das Programm: WinMDI 2.8. Die folgende Tabelle listet die Antikörper, die für die Analyse der intrazellulär akkumulierten Zytokine verwendet wurden:

Fluorochrom	Klon	Antigen	Reaktivität
FITC	MQ2-13A5	Anti-IL-6	Ratte anti-human
PE	JES3-9D7	Anti-IL-10	Ratte anti-human
PE	HP40	Anti-IL-12p40 a	Maus anti-human

2.2.4.1.4 Bestimmung der CCR7-abhängigen Migrationskapazität

Die Kapazität der gerichteten Zellwanderung unreifer sowie aktivierter MoDC bzw. MoLC in regionale Lymphknoten kann *in vitro* über Membraneinsätze einer definierten Porengröße von 8 µm sowie die Verwendung rekombinant-humaner Chemokinrezeptor-Liganden analysiert werden. Gemäß des Prinzips eines Zweischritt-Migrationsverhaltens humaner LC erfolgt die Erhöhung der Oberflächenexpression an CCR7 zu späteren Zeitpunkten der Aktivierung [101].

Analog hierzu wurde für die Migrationsstudien eine Stimulationsdauer von 48 h gewählt, um eine ausreichende Expressionsrate an CCR7 zu gewährleisten. Anschließend wurden die aktivierten MoDC und MoLC quantitativ in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt, mit 5 mL PBS mit EDTA gewaschen und bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet in 5 mL PBS mit EDTA resuspendiert wurde, erfolgte die Quantifizierung mittels Hämozytometer. Gleichzeitig wurde der Anzahl an Proben entsprechend in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte (24-Loch, *insert companion plate*) 350 µL Migrationsmedium 2 eingefüllt und anschließend ein entsprechender Membraneinsatz (Porengröße 8 µm) aufgesetzt. Die Verwendung der zugehörigen

Kulturplatten garantiert eine Hersteller-spezifische Distanz der Unterseite der Membraneinsätze vom Plattenboden von 0,8 mm und ermöglicht so eine Trennung der jeweiligen Kompartimente. Die nun quantifizierten Zellen wurden bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert und anschließend in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/100 μ L in Migrationsmedium 1 aufgenommen und vorsichtig auf die Oberfläche der Membraneinsätze pipettiert. Nachfolgend verblieb die Platte für 3,5 Stunden im Brutschrank und erlaubte die gerichtete Wanderung aktivierter MoDC und MoLC entlang des Chemokingradienten, wobei diese die Poren der Membraneinsätze durchdrangen und durch den konstanten Spalt von 0,8 mm Größe hindurch auf den Plattenboden gelangten. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Membraneinsätze entfernt, das Migrationsmedium 2 aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte in FACS-Röhrchen überführt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das FACS Röhrchen mit 500 μ L FACS-Puffer aufgefüllt, woraufhin die jeweilige Zellzahl in den jeweiligen Proben mittels BD FACSCalibur™ über die Software: CellQuest™ Vers. 3.1f quantifiziert und mittels WinMDI 2.8 ausgewertet wurde.

Um eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Analyse nach einer definierten Messdauer unterbrochen und stets unter folgenden Einstellungen durchgeführt.

Probenmenge	Vortex	Messdauer	Flussrate
500 μ L	1 Sekunde	130 Sekunden	Hoch

2.2.4.2 Immunhistochemie (IHC)

Die für die Zellanalyse angewandten immunhistologischen Methoden umfassten die indirekte Immunfluoreszenz sowie die Immunperoxidasefärbung. Beide Prinzipien beruhen dabei auf der Sichtbarmachung spezifischer Antigene mittels konjugierter Antikörper, wobei im Fall der Immunfluoreszenz die Detektion der Zielstrukturen über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper erreicht wird, die Immunperoxidasefärbung dagegen auf dem Prinzip der enzymatischen Substratumsetzung eines farblosen Chromogens in ein farbiges Endprodukt beruht. Die Analyse spezifischer Signale wurde dabei am Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 durchgeführt, dessen Spezifikationen neben einer üblichen Hellfeldbetrachtung eine simultane Detektion dreier unterschiedlicher Fluorochrome ermöglicht. Die folgende Tabelle listet die verwendeten optischen Systeme auf:

Lichtquelle	Typ	Ex. Filter	dichroischer Spiegel	Em. Filter
Quecksilberdampf Lampe	DAPI B	360 nm \pm 40	Reflexion \leq 400 nm	460 nm \pm 50
Quecksilberdampf Lampe	GFP	470 nm \pm 40	Reflexion \leq 495 nm	535 nm \pm 50
Quecksilberdampf Lampe	Texas Red	560 nm \pm 40	Reflexion \leq 595 nm	630 nm \pm 60
100 W Halogenlampe	Hellfeld	---	---	---

Das weiße Licht einer Quecksilberdampf Lampe dient der Anregung von Fluorochromen und passiert zuerst den jeweiligen Anregungsfilter, wodurch ein geeigneter Wellenlängenbereich isoliert wird. Dieses Licht wird anschließend von einem dichroischen Spiegel mit einer definierten kritischen Wellenlänge (ideal: zwischen Extinktions- und Emissionsmaximum des Fluorochroms) auf die zu untersuchende Probe gelenkt. Die kritische Wellenlänge besagt dabei, dass ausschließlich Licht geringerer Wellenlängen (Anregungslicht) reflektiert wird, wohingegen höhere Wellenlängen (Emissionslicht) diesen Spiegel passieren. Um das Fluoreszenzsignal ausreichend selektiv zu analysieren, gelangt das emittierte Licht des angeregten Fluorochroms letztlich auf einen Emissionsfilter, welcher die simultane Vermessung mehrerer Fluoreszenzsignale ermöglicht. Die hier durchgeführten Analysen verliefen dabei nach dem Prinzip der indirekten Antigendetektion, bei der ein unkonjugierter Primäantikörper spezifisch das Antigen bindet und ein Fluorochrom- bzw. Enzymgekoppelter Sekundäantikörper die Visualisierung des Zielproteins nach Bindung des Primäantikörpers ermöglicht. Trotz des zeitintensiveren Arbeitsaufwandes gegenüber der direkten Methodik, welche ausschließlich auf der Verwendung eines Antigen-spezifischen und gleichzeitig konjugierten Detektionsantikörpers basiert, besitzt die indirekte Variante die Vorteile einer geringeren Hintergrundfärbung sowie einer effizienten Signalverstärkung, bei gleichzeitig ökonomischerem Einsatz der zur Verfügung stehenden Antikörper.

2.2.4.2.1 Bestimmung von LC-typischen Markern und intrazellulären LC3-Level

Nach der Differenzierung bzw. Stimulation wurden 10^6 der zur Vermessung vorgesehenen Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt, mit 1 mL PBS mit EDTA aufgenommen und nach Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen/min (300 g) für 10 min bei 20 °C in 100 μ L Wasser (steril, pyrogenfrei) resuspendiert, auf einen Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet) tropfenförmig aufgetragen und anschließend mittels Zellschaber S vorsichtig verteilt. Die somit erzielte Vergrößerung der Oberfläche der Zellsuspension resultierte in einer raschen Evaporation des Wassers, sobald die Objektträger auf dem Plattformschüttler Swip mit

Inkubationshaube TH10 bei 37 °C unter leichter Rotation inkubierten. Diese wurden anschließend in leere Zentrifugeneinsätze gelegt und bei 1000 Umdrehungen/min (200 g) für 5 min bei 20 °C zentrifugiert und daraufhin direkt in PFA-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einmaligem Waschen in PBS für 5 min erfolgte eine Inkubation der Objektträger in Triton X-Lösung für 10 min. Die Anwesenheit nichtionischer Tenside erhöhte hierbei die Permeabilität der Zellmembran durch das Herauslösen von Strukturproteinen, sodass die Zellen für die Markierung intrazellulärer Zielantigene vorbereitet wurden. Nach zweimal 10-minütigem Waschen in Waschlösung für IHC schloss sich darauf folgend eine Inkubation in Blockierungslösung für Proteine an, wobei die Albuminfraktion und unselektive Antikörper des enthaltenen Ziegenerums unspezifische Bindungsstellen an Gewebe oder Zellen maskieren und somit die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen bzw. Hintergrundsignalen reduzieren. Die anschließende Inkubation der ungekoppelten Primärantikörper erfolgte in einer Hersteller-spezifischen Konzentration in Waschlösung für IHC über Nacht bei 4 °C. Dem folgte eine dreimal 5-minütige Waschphase der Objektträger und eine Inkubation mit konjugierten Sekundärantikörpern in Waschlösung für IHC gemäß Herstellerangaben für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Nach erneuter Auswaschung mittels Waschlösung für IHC erfolgte das Auftragen des ImmunoSelect Antifading Mounting Medium DAPI, einem Zweikomponentengemisch bestehend aus 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welches sich in A-T-reiche Regionen der DNA einlagert und diese mittels Emission von Fluoreszenzsignalen sichtbar macht sowie einem Eindeckmedium für Fluoreszenzproben (Antifading Mounting Medium) auf Wasserbasis, welches als viskose Flüssigkeit ohne Eigenfluoreszenz langsam aushärtet und nach Aufsetzen eines Deckglases (24x50 mm) die Proben versiegelt. Nachdem die Objektträger bei 4 °C über 24 - 48 h unter Lichtausschluss aushärteten, erfolgte die Betrachtung am Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 unter Verwendung der Software: BZ Observation Application, wobei das Programm: BZ Image Analysis Application die anschließende Analyse ermöglichte. Folgende Antikörper wurden für die immunhistochemische Fluoreszenzanalyse verwendet:

Fluorochrom	Klon	Antigen	Reaktivität
Unkonjugiert	7A7	Anti-CD1a	Kaninchen anti-human
Unkonjugiert	EP700Y	Anti-CD324	Kaninchen anti-human
Unkonjugiert	DCGM4/122D5	Anti-CD207	Maus anti-human
Unkonjugiert	D50G8	Anti-LC3A	Kaninchen anti-human
Unkonjugiert	---	Anti-LC3B	Kaninchen anti-human
DyLight488	---	Anti-Maus IgG	Ziege anti-Maus

DyLight488	---	Anti-Kaninchen IgG	Ziege anti-Kaninchen
DyLight594	---	Anti-Maus IgG	Ziege anti-Maus
DyLight594	---	Anti-Kaninchen IgG	Ziege anti-Kaninchen

2.2.4.2.2 Quantitative Bestimmung der LC3A-Level

Die Bewertung der LC3A-Expression erfolgte nach Analyse der Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 unter Verwendung der Software: BZ Observation Application. Daran schloss sich eine quantitative Analyse der punktuellen Visualisierung der Proteine durch die Software: Dotcount an. Hierzu wurden zunächst die Hintergrundsignale der für die Analyse bestimmten Fluoreszenzbilder über die Software: BZ Image Analysis Application nachträglich reduziert und anschließend der Schwellenwert der Signalverstärkung der Dotcount-Analysesoftware analog angepasst. Die sichtbaren Signale wurden anschließend quantifiziert, auf eine Gesamtzahl von mind. 40 Zellen je Probe erweitert und der Durchschnitt an punktuellen Fluoreszenzsignalen pro Zelle ermittelt.

2.2.4.2.3 Bestimmung der Integration von MoLC in humane Vollhautäquivalente

Der Nachweis einer erfolgreichen Integration *ex vivo* differenzierter MoLC in organotypische Vollhautäquivalente erfolgte über den direkten Vergleich der Distribution humaner LC in epidermalen Schichten menschlicher Haut. Die für die Isolierung humaner LC verwendete Abdominalhaut wurde hierzu mittels eines Stanzeisens (Rundloch, 15 mm) auf eine definierte Form gepresst, anschließend in Gefriermedium eingebettet und in Cryomold Standard (25x20x5 mm) Schnittboxen verpackt. Nachdem diese in Flüssigstickstoff aushärteten, erfolgte die Lagerung der Kryoblöcke im Gefrierschrank (-80 °C). Auch das nach einer Gesamtinkubationszeit von 20 Tagen fertig ausdifferenzierte *in vitro* generierte Vollhautäquivalent wurde anschließend aus dem Membraneinsatz (0,4 µm Porengröße) entfernt und mittels Skalpell halbiert. Während die eine Hälfte des Modells für die direkte Analyse am Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 in PBS verblieb, wurde die andere Hälfte ebenfalls in Gefriermedium eingebettet, dabei in Cryomold Intermediate (15x15x5 mm) Schnittboxen verpackt und anschließend in Flüssigstickstoff ausgehärtet bzw. bei -80 °C gelagert. Die direkte Verwendung der Vollhautmodelle für die immunhistochemische Fluoreszenzanalytik basierte auf der Verwendung von mit CellTracker™ markierten MoLC, welche über eine Aufsicht auf die Epidermis detektiert wurden und deren Verteilung damit sogleich abgeschätzt werden konnte. Hierzu wurde

zunächst mittels anatomischer Pinzetten das Epidermisäquivalent separiert, vorsichtig auf einen Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet) transferiert, anschließend mittels PFA Lösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und nach Aufsetzen eines Deckglases (24x50 mm) sowie durch Zugabe des ImmunoSelect Antifading Mounting Medium DAPI konserviert. Die direkte Betrachtung am Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 erfolgte unter Verwendung der Software: BZ Observation Application, wobei die nachfolgende Analyse über die Software: BZ Image Analysis Application ermöglicht wurde.

Die genauere Prüfung der intraepidermalen Lokalisation der integrierten MoLC erfolgte nach Anfertigung von Gefrierschnitten der verpackten und eingefrorenen Hautmodellhälften. Hierzu wurden die Blöcke aus erhärtetem Gefriermedium aus den Schnittboxen entfernt und auf -20 °C gekühlte Stempleinsätze des Kryostat Leica CM 1510S fixiert. Um eine konstante und spezifische Schichtdicke der angefertigten Quer- bzw. Längsschnitte zu gewährleisten wurde der Stempleinsatz samt eingespanntem Gewebe über eine mechanische Kurbelbewegungen um eine definierte Strecke einer dem Kryostat zugehörigen Messerklinge angenähert, welche selbst in einem stationären Block integriert war. Entsprechend der gewünschten Anwendung wurden hierbei Schnitte zwischen 5 und 30 µm Schichtdicke angefertigt. Dabei nimmt die Intensität der Hintergrundfärbung mit der Dicke der Gewebeschnitte zu, sodass für die Anwendung immunhistochemischer Charakterisierungen eine maximale Dicke von 10 µm gewählt wurde und breitere Schnitte ausschließlich zum Einsatz kamen um eine direkte Detektion von mit CellTrackerTM markierten MoLC vorzunehmen und dabei die Integrität der Zellen zu gewährleisten. Im Fall der Visualisierung letzterer Gewebeschnitte wurden diese nach Überführung auf einen Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet) für 30 min unter Lichtausschluss getrocknet, anschließend mittels PFA-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und nach Aufsetzen eines Deckglases (24x50 mm) sowie durch Zugabe des ImmunoSelect Antifading Mounting Medium DAPI konserviert. Die für die immunhistochemische Analytik angefertigten Gewebeschnitte der Humanhaut bzw. der organotypischen Hautmodelle wurden ebenfalls auf Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet) transferiert und für mind. 45 min an der Luft getrocknet. Darauf folgte zuerst eine 10-minütige Fixierung der Proben in Aceton (-20°C) und nach vollständigem Abdampfen der Flüssigkeit eine Waschphase in PBS sowie in Waschlösung für IHC für je 5 min. Nach erfolgter Inkubation in Blockierungslösung für Proteine für 30 min schloss sich die Inkubation mit ungekoppelten Primäantikörpern in einer Hersteller-spezifischen Konzentration in Waschlösung für IHC über Nacht bei 4 °C an. Die Aufbereitung der Humanhaut für eine fluoreszenzbasierte Analyse, inklusive Inkubation mit Fluorochromgekoppelten Sekundäantikörpern und nachfolgende Versiegelung der Objektträger, verlief anschließend analog der Bestimmung von LC-typischen Markern an Einzelzellen.

Die Detektion integrierter MoLC in Vollhautäquivalenten erfolgte dagegen auf Basis der Immunperoxidasefärbung, wobei hierfür nach erfolgter Inkubation mit den Primärantikörpern zunächst die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes inhibiert wurde um ein Verfälschen der Signale zu vermeiden. Der Inkubation der Gewebeschnitte in Blockierungslösung für endogene Enzymaktivität für 30 min schloss sich eine zweimalige Waschphase in destilliertem Wasser für 5 min an, ehe die Proben mit der Signal Enhancer Lösung (Lösung 1) des MaxPoly-Two™ Plus Polymer HRP Detection Kit für 20 min inkubiert und anschließend dreimal in Waschlösung für IHC für 5 min gespült wurden. Hierauf folgte eine 30-minütige Inkubation der Proben mit einer Enzym-gekoppelten Antikörperlösung (Lösung 2), welche mit Meerrettichperoxidase (*horseradisch peroxidase*, HRP) -konjugierte Sekundärantikörper enthielt. Nach erneuter Waschphase wurden die Gewebeschnitte daraufhin für 3 min mit Substratlösung für IHC inkubiert, wobei das hier enthaltene Chromogen: 3,3' Diaminobenzidin (DAB) durch den Komplex aus Wasserstoffperoxid und HRP zu einem braunfarbigen Indaminpolymer oxidiert wird. Nachdem die Objektträger leicht mit destilliertem Wasser gespült und anschließend getrocknet wurden, erfolgte deren Konservierung durch Zugabe des ImmunoSelect Antifading Mounting Medium DAPI und dem Aufsetzen eines Deckglases (24x50 mm). Die Betrachtung am Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-8000 fand im Hellfeld unter Verwendung der Software: BZ Observation Application statt, die nachfolgende Analyse wurde über die Software: BZ Image Analysis Application durchgeführt. Die folgenden Antikörper wurden für die immunhistochemische Analyse von Gewebeproben verwendet:

Fluorochrom	Klon	Antigen	Reaktivität
Unkonjugiert	O10	Anti-CD1a	Maus anti-human
Unkonjugiert	DCGM4/122D5	Anti-CD207	Maus anti-human
DyLight594	---	Anti-Maus IgG	Ziege anti-Maus
MaxPoly-Two™ Plus Polymer HRP Detection Kit		Anti Maus und Kaninchen IgG	

2.2.4.3 ELISA Analytik

Die quantitative Vermessung sezernierter Zytokine in Zellkulturüberständen erfolgte mittels Sandwich-ELISA. Die hohe Sensitivität und Selektivität dieses Verfahrens begründet sich durch die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und der Oxidation des Chromogens in Abhängigkeit von der Konzentration des Zielantigens. Das Prinzip des Sandwich-ELISA basiert auf einer indirekten Quantifizierung des Antigens mittels Biotin-konjugierter Antikörper, welche durch die Bindung einer an Avidin- bzw. Streptavidin-

gekoppelten HRP die Substratumsetzung induzieren. Die hier angewendeten ELISA-Kits (DuoSet[®] und ReadySetGo[®]) basieren dabei auf der enzymatischen Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), analog der Umsetzung von 3,3' Diaminobenzidin (DAB).

Für die Vermessung wurde für jedes zu bestimmende Zytokin eine eigene Zellkulturplatte (MaxiSorp Immuno plate F96) verwendet und deren Vertiefungen mit je 100 µL einer Lösung befüllt, welche eine nach Herstellerangaben definierte Menge an Antigen-spezifischen Fänger-Antikörper enthält. Die Platte wurde daraufhin mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur (DuoSet[®]) bzw. bei 4°C (ReadySetGo[®]) inkubiert, sodass nun die Antikörper auf der Oberfläche der Vertiefungen adsorbieren und nachfolgend das Zielantigen binden können. Die für die Analyse mittels Sandwich-ELISA bestimmten zellfreien Kulturüberstände wurden aus dem Gefrierschrank (-80 °C) entnommen und auf einem Plattformschüttler Titramax 100 für 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Parallel wurden die Vertiefungen der vorbereiteten MaxiSorp Platte nach dreimaligem Waschen in Waschlösung für ELISA für 1 Stunde mit 300 µL Blockierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert, um die Entwicklung unspezifischer Signale zu unterbinden. Nach erneut dreimaligem Waschen wurden 100 µL der Zytokin-spezifischen Standards in einer nach Herstellerangaben definierten Verdünnungsreihe in jeweiligen Doppelansätzen appliziert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Ebenso wurden die zu vermessenen Proben als Dublikate aufgetragen, wobei eine etwaige Verdünnung stets in spezifischem Verdünnungsreagenz erfolgte. Nach erneutem Waschen in Waschlösung für ELISA begann die Zugabe von 100 µL einer nach Herstellerangaben definierten Menge Biotin-gekoppelter Detektionsantikörper, welche das Zielantigen markierten, jedoch ein anderes Epitop erkannten als die zuvor eingesetzten Fänger-Antikörper. Nach 1-stündiger (ReadySetGo[®]) bzw. 2-stündiger (DuoSet[®]) Inkubationsdauer und erneuter Waschung erfolgte die Zugabe von 100 µL HRP (1:200 in Verdünnungsreagenz), wobei diese entweder an Avidin (ReadySetGo[®]) oder Streptavidin (DuoSet[®]) gekoppelt war und hierdurch die Bindung an Detektionsantikörper vermittelt wurde. Nach 20-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss und dreimaliger Waschung mittels Waschlösung für ELISA wurde anschließend 100 µL der Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert und für 15- bzw. 20 min unter Lichtausschluss inkubiert, sodass nun die oxidative Umsetzung des Chromogens erfolgte. Nach Aktivierung des TMB durch den Komplex aus HRP und Wasserstoffperoxid färbt sich dieses zu einem blauen Oxidationsprodukt, wobei die Intensität der Färbung mit der Menge an HRP bzw. gebundenem Zielantigen korreliert. Diese Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 50 µL Salzsäure (0,1 M) beendet, wobei der veränderte pH-Wert einen Farbumschlag des Oxidationsprodukts durch Protonierung induzierte, dessen Intensität mittels Multimode Mikroplatten-Leser FLUOstar Optima vermessen wurde. Hierzu diente die Software: Optima 2.20R2, wobei die Quantifizierung des Zytokingehalts der internen Standardreihe (in pg/mL),

deren Korrelationskoeffizient stets $\geq 0,98$ betrug sowie der jeweiligen Proben durch Errechnung der Mittelwerte aus dublikaten Konzentrationen erfolgte und mittels Microsoft Excel ausgewertet wurde. Die Absorption der einzelnen Vertiefungen wurde bei 450 nm und 540 nm Referenzwellenlänge vermessen, wodurch die Genauigkeit der Ergebnisse aufgrund der Reduktion optischer Fehler erhöht wurde.

2.2.4.4 PCR Analytik

Die PCR erlaubt eine gezielte Betrachtung des zellulären Genoms durch Vervielfältigung der DNA [282]. Das Prinzip der Genamplifikation unter Verwendung von sequenzspezifischen Primern und definierten Temperaturprogrammen kann in Anwesenheit von Fluoreszenzfarbstoffen auch zur quantitativen Analytik in Echtzeit (*quantitative* PCR, qPCR) eingesetzt werden. Die hier verwendete qRT-PCR stellt eine Kombination zweier Methoden dar, nämlich der qPCR sowie der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR), welche unter Verwendung einer komplementären RNA-Polymerase eine Quantifizierung des Transkriptoms ermöglicht.

2.2.4.4.1 Isolierung der RNA, Quantifizierung und Testung auf Integrität

Die für die qRT-PCR Analyse verwendeten Zellen wurden nach erfolgter Differenzierung bzw. Stimulation in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/360 μ L Lyse-Puffer aufgenommen und für ca. 5 Sekunden mittels Vortex-Gerät Genie™ 2 homogenisiert, anschließend in Reaktionsgefäße Safe-Lock (1,5 und 2 ml) transferiert und im Gefrierschrank (-80 °C) gelagert. Die anschließende Isolierung der RNA erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin® RNA II Kit nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden die Proben auf die dem Kit zugehörigen NucleoSpin® Filter (violett) überführt, für 1 min bei 11000 g zentrifugiert und in einem entsprechenden RNase-freiem Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde das Filtrat mit 350 μ L Ethanol (70%) denaturiert, ausreichend durchmischt und auf eine NucleoSpin® Filtersäule (blau) transferiert. Während für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert wurde, fand die Bindung der RNA und DNA an die Säulenmatrix statt, während das aufgefangene Filtrat verworfen wurde. Nachdem anschließend 350 μ L einer MDB (*membrane desalting buffer*) Lösung auf den Filter appliziert und nach erneuter Zentrifugation bei 11000 g für 1 min die Säule hierdurch entsalzen wurde, konnte die kontaminierende DNA aus der Säulenmatrix abgebaut werden, indem der Filter für 15 min mit 100 μ L einer DNase I Lösung (1:10 in zugehörigem Reaktionspuffer) inkubiert wurde.

Nachdem zuerst 200 μL RA2 (*reagent additive 2*) appliziert und hierdurch die DNase I inaktiviert wurde, schloss sich eine zweimalige Waschphase des Säulenfilters an, wobei hierfür anfänglich 600 μL und darauf folgend 250 μL RA3 zugegeben und stets bei 11000 g zentrifugiert wurde. Das gesammelte Filtrat wurde verworfen, die aufgereinigte RNA anschließend in 60 μL Wasser (RNase-frei) aufgenommen und durch Zentrifugation bei 11000 g für 1 min in RNase-freie Reaktionsgefäße (1,5 mL) eluiert und auf Eis gelagert.

Der Gehalt an RNA wurde anschließend mittels UV-Meter WPA Biowave DNA quantifiziert. Hierzu wurden die Proben in Quantifizierungslösung Tris-HCl aufgenommen (1:10), unter Verwendung von Einmalküvetten bei 260 nm und 280 nm vermessen und anhand der Konzentration das nötige Volumen für die nachfolgenden Schritte berechnet. Hieran schloss sich die Integritätsprüfung der isolierten RNA mittels Gelelektrophorese an, wobei zunächst ein flüssiges Agarosegel (1%) in eine entsprechende Gelelektrophoresekammer gegossen und ein Plastikamm zur Errichtung von Aussparungen eingesetzt wurde. Nach Aushärtung des Gels wird die Kammer mit TBE-Puffer (1x) überschichtet und 2 μL der Probe zusammen mit 2 μL Ladepuffer (5x) und 6 μL DEPC-Wasser in die Geltaschen pipettiert. Nachdem die Gelelektrophorese für 45 min bei 100 V stattfand, wobei der PowerPack P25 als Spannungsquelle diente, wurde das fertige Gel für 20 min in einer Gelfärbelösung inkubiert. Das hierin enthaltene GelredTM Nucleic Acid Stain diente dabei als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff und ermöglichte die anschließende Betrachtung der Gele am Geldokumentationssystem BioDocAnalyse über Transillumination. Die Auswertung erfolgte durch die Software: BioDocAnalyse 2.1 wobei hohe Detektionssignale in den Geltaschen für das Vorhandensein von DNA sprachen und zwei charakteristische Signale der 18S- sowie 28S-Untereinheit die Integrität der ribosomalen RNA bestätigten.

2.2.4.4.2 cDNA Synthese

Mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit erfolgte die anschließende Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre DNA-Stränge (*complementary DNA*, cDNA). Die hierfür verwendete und genetisch modifizierte M-MuLC (*moloney murine leukemia virus*) Reverse Transkriptase besitzt eine höhere Effektivität als RNA-Polymerase bei gleichzeitig geringer RNase H Aktivität.

Im ersten Schritt erfolgte zunächst die hydrolytische Spaltung kontaminierender DNA-Reste mittels DNase I (Amplification grade), wobei hierfür eine Mischung aus 1 μL Reaktionspuffer (10x), 1 μL DNase I und 8 μL Probe (ggf. verdünnt in DEPC-Wasser) in PCR Reaktionsgefäße mit Deckelstreifen überführt und diese im Thermocycler T Gradient für

15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nachdem anschließend je 1 µL Stop-Lösung für DNase hinzugegeben wurde, inaktivierte das enthaltene EDTA (50 mM) die Aktivität der DNase I durch Bindung von Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} Ionen, wobei die anschließende Inkubation bei 70 °C für 10 min das Enzym zusätzlich denaturierte. Die aufbereiteten RNA-Proben wurden daraufhin mit einer Mischung aus 1 µL Random Hexamer Primer (0,2 µg/µL), 4 µL Reaktionspuffer (5x), 1 µL RiboLock Ribonuklease-Inhibitor (20 U/µL), 2 µL desoxy-Nukleotid-Triphosphat (dNTP) -Mischung (10 mM) sowie 1 µL M-MuLC RT (200 U/µL) vereint und anschließend einem nach Herstellerangaben angepasstem Temperaturprogramm unterzogen. Dieses beinhaltete eine 5-minütige Inkubation bei 25 °C, eine anschließende Reaktionsphase bei 42 °C für 60 min sowie ein terminales Aufheizen auf 70 °C für 5 min. Das Temperatur-abhängige Aktivitätsoptimum der M-MuLC RT wird hierbei für 1 Stunde gehalten, was das Umschreiben der RNA in cDNA garantiert, wobei eine Temperatur von 70 °C zur Denaturierung des Enzyms führt und die Reaktion beendet. Nach erfolgter cDNA Synthese wurden die Proben mit 60 µL DEPC-Wasser aufgenommen, in Reaktionsgefäße Safe-Lock (1,5 und 2 mL) überführt und im Gefrierschrank (-80 °C) gelagert.

2.2.4.4.3 Quantitative Real Time PCR

Die qPCR, eigentlich ein Instrument zur Vervielfältigung der DNA in Echtzeit, diente hierbei als Methode der Quantifizierung des Gehalts an mRNA in den zu untersuchenden Zellen, wobei dies indirekt über die nun synthetisierte cDNA Menge geschah. Insgesamt drei Kernprozesse regeln den Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion: (1) Denaturierung der DNA-Doppelstränge sowie Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen durch hohe Temperaturen, (2) optimale Anlagerung der sequenzspezifischen Primer an komplementäre Stränge bei Temperaturen von 5 - 10 °C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenz und (3) Polymerisation neuer DNA-Doppelstränge, beginnend am 3'-Ende des Primers. Die Vermessung der Menge an synthetisierter DNA am Ende jedes Zyklus verläuft dabei über den Zusatz eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes: SYBR Green, dessen Signalintensität mit der Menge an Nukleinsäuren korreliert und dabei die Quantifizierung in Echtzeit erlaubt. Die Analyse wurde am qPCR System LightCycler® 480 durchgeführt, wobei jedes verwendete Primerpaar bereits im Vorfeld einer Effizienzanalyse mit unterschiedlichen Konzentrationen an zu amplifizierender DNA-Sequenz unterzogen wurde. Zuvor wurden die verwendeten Primerpaare hierfür einerseits entsprechend der gewünschten PCR-Produktgröße und Primer-Schmelztemperatur mittels Gendatenbanken (RTPrimerDB, Primer3) ermittelt und etabliert (gilt für: INF- α , TLR5, YWHAZ) bzw. aus der Literatur

entnommen und anschließend auf ihre Eignung hin überprüft. Für die qRT-PCR wurden 5 nM lyophilisierte Primer mit DEPC-Wasser in einer finalen Konzentration von 10 µM rekonstituiert und zu je 125 µl aliquotiert:

Zielgen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
IFN-α	5'-GTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCAC-3'	5'-TCTCATGATTTCTGCTCTGACAA-3'
IFN-β	5'-CAGCAATTTTCAGTGTCAGAAGC-3'	5'-TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT-3'
IL-23p19	5'-TTCCCCATATCCAGTGTGGAG-3'	5'-TCAGGGAGCAGAGAAGGCTC-3'
IL-12p35	5'-AGCCTCCTCCTTGTGGCTA-3'	5'-TGTGCTGGTTTTATCTTTTGTG-3'
IL-12p40	5'-CATGGTGGATGCCGTTCA-3'	5'-ACCTCCACCTGCCGAGAAT-3'
SDHA	5'-TGGGAACAAGAGGGCATCTG-3'	5'-CCACCACTGCATCAAATTCATG-3'
TLR1	5'-AACCCATTCCGCAGTACTCCA-3'	5'-AAGGCCACGTTTGCTCTTTTC-3'
TLR2	5'-GGAGGCTGCATATTCCAAGG-3'	5'-GCCAGGCATCCTCACAGG-3'
TLR3	5'-ACAACCTTAGCACGGCTCTGGA-3'	5'-ACCTCAACTGGGATCTCGTCA-3'
TLR4	5'-AGTTTCCTGCAATGGATCAAGG-3'	5'-CTGCTTATCTGAAGGTGTTGCAC-3'
TLR5	5'-CGAACCTGGAGACAGGAAAA-3'	5'-TCTCCCATGATCCTCGTTGT-3'
TLR6	5'-CCCATTCCACAGAACAGCAT-3'	5'-ATAAGTCCGCTGCGTCATGA-3'
TLR7	5'-TGGAAATTGCCCTCGTTGTT-3'	5'-GTCAGCGCATCAAAAGCATT-3'
TLR8	5'-CTTCGATACCTAAACCTCTCTAGCAC-3'	5'-AAGATCCAGCACCTTCAGATGA-3'
TLR9	5'-AGTCAATGGCTCCCAGTTCCT-3'	5'-CGTGAATGAGTGCTCGTGGTA-3'
TLR10	5'-TGTTATGACAGCAGAGGGTGATG-3'	5'-GAGTTGAAAAAGGAGGTTATAGGATAAATC-3'
YWHAZ	5'-AGACGGAAGGTGCTGAGAAA-3'	5'-GAAGCATTGGGGATCAAGAA-3'

2 µL der cDNA Proben wurden in einem Reaktionsansatz von 2 µL RNase-freiem Wasser, 0,5 µL der jeweiligen Primerlösung (10 x) sowie 5 µL LightCycler® SYBR Green I Master (2 x konzentriert) in einer LightCycler® 480 96-Loch Mikrotiterplatte (klar) pipettiert, die Platte mit einer Folie versiegelt und bei 1500 Umdrehungen/min für 2 min zentrifugiert. Daraufhin begann die Vermessung der Proben am LightCycler® 480, wobei einer 5-minütigen Denaturierung bei 95 °C insgesamt 45 Amplifikationszyklen, eine nachfolgende Analyse der Schmelzkurven und eine finale Abkühlphase folgten.

Die Amplifikationszyklen umfassten dabei jeweils eine 10-sekündige Denaturierung bei 95 °C, Anlagerung von Primern bei 60 °C und Elongation bei 72 °C. Die

Schmelzkurvenanalyse diente dabei der Bestätigung der Primerspezifität und der Kontrolle möglicher Primerdimere. Zudem diente die Auftrennung der bei der Effizienzbestimmung entstandenen PCR-Produkte in Agarosegel (2%) bei 90 V und anschließender Detektion von Produktgröße sowie Ausschluss von Nebenbanden als Nachweis für die Eignung der verwendeten Primer. Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte unter Verwendung der Software: LightCycler® 480 1.5.0, mittels der „Second Derivate Maximum“-Methode, wobei die relative mRNA Expression der Zielgene nach Normalisierung gegen spezifische Referenzgene (SDHA, YWHAZ) errechnet wurde, deren Expression unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Regulation erfuhr (*Daten nicht abgebildet*).

2.2.5 Statistik

Die Daten von mindestens drei unabhängigen Messreihen wurden mittels deskriptiver Statistik in GraphPad Prism 5.04 ausgewertet. Für die Prüfung auf Signifikanz diente der nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Datenreihen, wobei als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (* $p \leq 0,05$) gewählt und diese dabei stets auf die unbehandelte Kontrolle bezogen wurde. Bezüglich der durchflusszytometrischen- bzw. immunhistochemischen Analysen wurden ausschließlich repräsentative Darstellungen ausgewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Immunogene Diversität in Abhängigkeit inflammatorischer Einflüsse

Entsprechend der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung zur immunologischen Reaktivität humaner DC Populationen anhand *ex vivo* generierter Subtypen untersucht. Daher wurden primär unterschiedliche Kultivierungsprotokolle etabliert, welche neben einer akzeptablen Differenzierung in MoDC bzw. MoLC auch eine hinreichende Reproduzierbarkeit sowie Zellviabilität garantierten. Darüber hinaus galt die Aufrechterhaltung eines unreifen Phänotyps als integraler Bestandteil der Differenzierung, um deren nachfolgende Stimulation selektiv zu ermöglichen. Um zusätzlich eine geeignete Phänotypisierung der differenzierten Langerhans-ähnlichen Zellen gegenüber primären LC zu gewährleisten, wurde eine Methodik zur Isolierung epidermaler LC aus operativ entfernter Humanhaut entwickelt. Die weiterführende funktionelle Analyse umfasste dabei alle essentiellen Prozesse der angeborenen sowie adaptiven Immunantwort.

3.1.1 *Ex vivo* generierte Zellen exprimieren typische Differenzierungsmarker humaner DC

LC repräsentieren professionelle APC der Epidermis und unterscheiden sich von anderen CD1a⁺MHC-2⁺ DC der menschlichen Haut durch die Expression des Oberflächenrezeptors CD207. Die durchflusszytometrische Analyse enzymatisch vereinzelter humaner Epidermis aus operativ entfernter Abdominalhaut bzw. nach Mammareduktion resultierte daher in der Detektion einer CD1a⁺CD207⁺ Zellpopulation, deren Häufigkeit der physiologischen Zelldichte humaner LC entsprach (Abb.: 3-1 A). Die weitere Aufreinigung mittels magnetischer Sortierung ermöglichte eine umfassende Charakterisierung der CD1a⁺ Zellfraktion und bestätigte das Vorhandensein LC-typischer Oberflächenproteine wie MHC-2, TROP-2 und Axl, wobei die fehlende Expression von CD209 eine Abgrenzung zu dermalen DC sowie Makrophagen erlaubte (Abb.: 3-1 B und C). Die geringe Anzahl CD196⁺ (CCR6) Zellen sowie die relativ hohe Expressionsrate an CD83 und dem kostimulatorischen Molekül CD86 deutete zudem auf eine partielle Aktivierung der Zellen hin, vermutlich infolge längerer enzymatischer Einwirkung bzw. aufgrund andauernder mechanischer Stresseinflüsse. Die hiernach isolierten primären LC eigneten sich daher nur bedingt für weiterführende funktionelle Analysen. Dennoch erlaubte diese Methodik eine vergleichende Betrachtung mit nachfolgend *ex vivo* generierten MoDC und MoLC und galt daher als Basis für eine umfangreiche Phänotypisierung dieser Zellpopulationen, mit dem Ziel eine optimale Differenzierung nach physiologischem Vorbild zu gewährleisten.

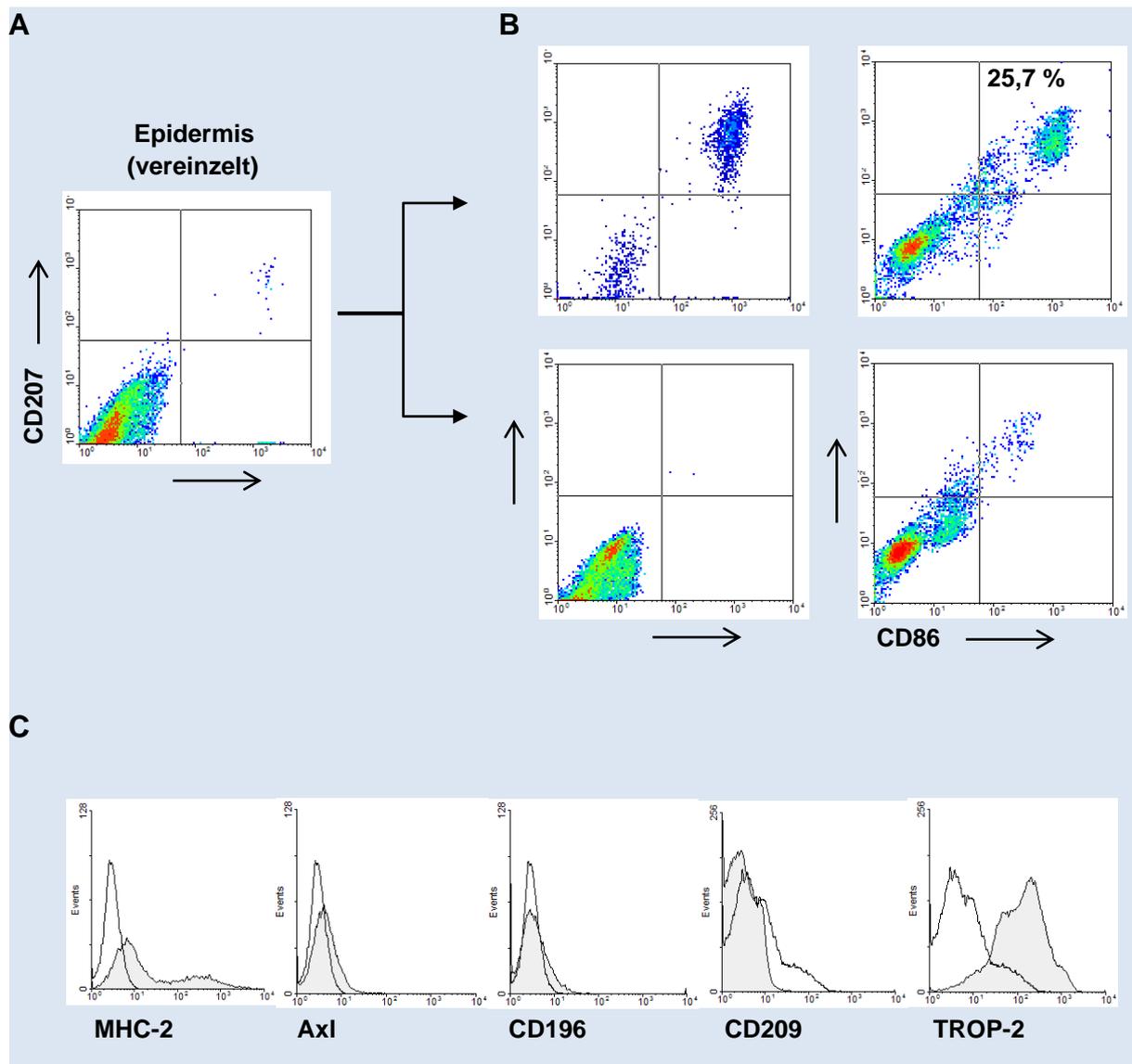
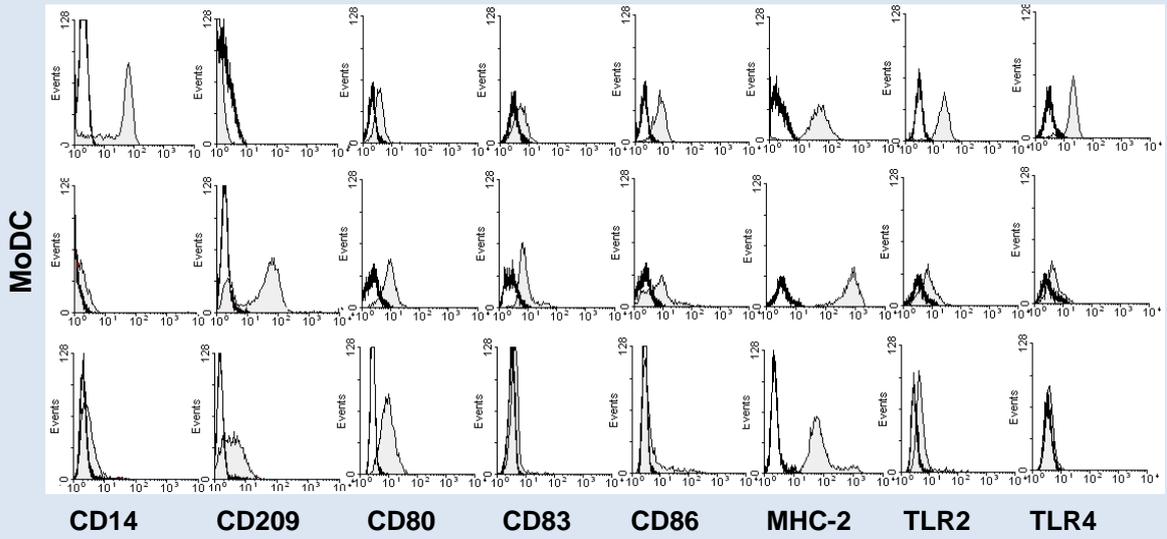


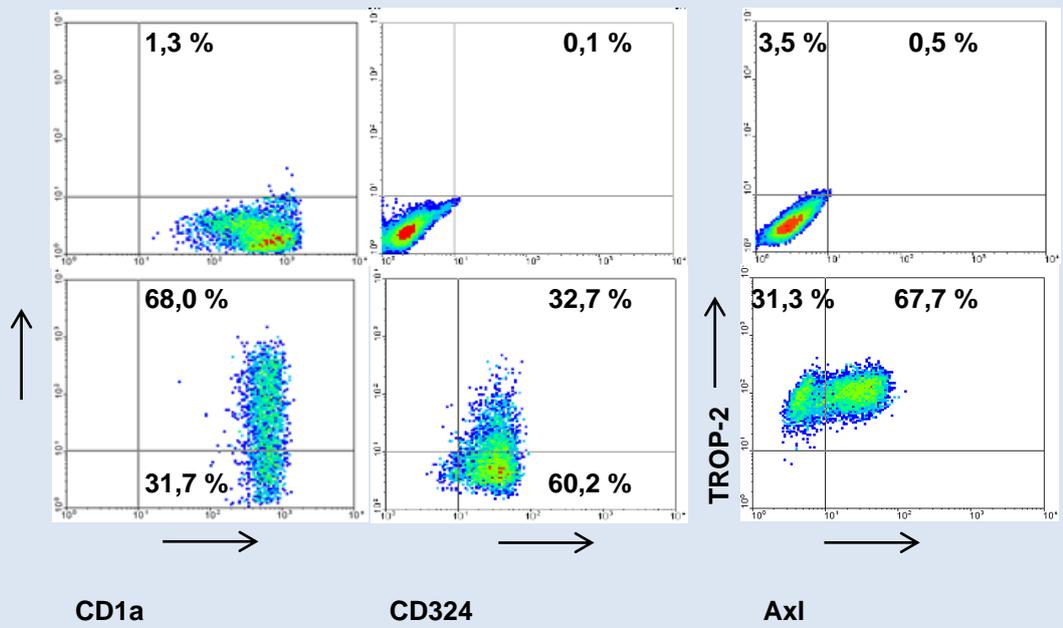
Abbildung 3-1: Die Aufarbeitung humaner Epidermis resultiert in der Isolation primärer LC. Die operativ entfernte Abdominalhaut bzw. Mammareduktion wurde innerhalb der nächsten 24 Stunden aufgearbeitet, vereinzelt und untersucht. (A, B) Die epidermale Einzelzell suspension wurde nach magnetischer Sortierung in $CD1a^+$ und $CD1a^-$ Zellpopulationen aufgetrennt und mittels 2-Farben-Durchflusszytometrie analysiert. Die prozentualen Anteile $CD1a^+CD207^+$ bzw. $CD83^+CD86^+$ Zellen sind angegeben. (C) Die durchflusszytometrische Analyse ergab ein charakteristisches Profil an LC-typischen Markern. Die Histogramme zeigen die Antigenexpression (grau, Isotypkontrolle farblos) von 10^5 Zellen der $CD1a^+$ Zellfraktion. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 3 bis 5 unabhängigen Experimenten dar.

GM-CSF und IL-4 gelten als essentielle Wachstumsfaktoren der *ex vivo* Differenzierung frisch isolierter humaner $CD14^+$ Monozyten in MoDC oder auch in Langerhans-ähnliche Zellen, sofern den Kulturbedingungen zusätzlich TGF- β 1 zugesetzt wird [170, 172]. Die zu Beginn der Generierung durchgeführte durchflusszytometrische Analyse der adhärennten Vorläuferzellen bestätigte dabei deren monozytäre Natur aufgrund der Expression von CD14, TLR2, TLR4 sowie MHC-2.

A



B



C

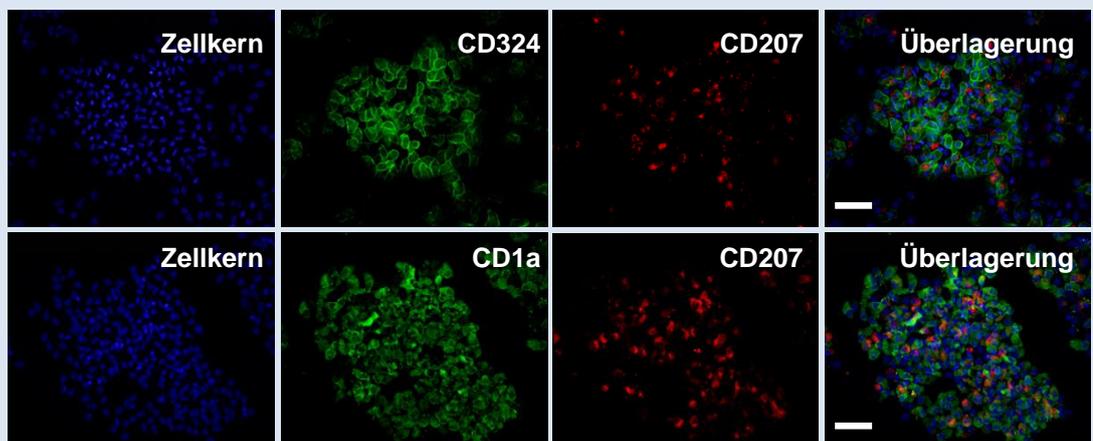


Abbildung 3-2: Ex vivo generierte MoDC bzw. MoLC zeigen charakteristische Merkmale unreifer humaner DC Populationen. Nach 6 Tagen der Zellkultur isolierter Monozyten unter definierten Bedingungen erfolgte die magnetische Aufreinigung der viablen CD1a⁺ Zellpopulationen mittels Anti-CD1a MicroBeads, woraufhin diese hinsichtlich Differenzierungs- und Reifungsgrad analysiert wurden. (A) Die Expression des Monozyten-spezifischen Antigens CD14, des DC-typischen Rezeptors CD209, der kostimulatorischen Moleküle bzw. Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 sowie weiterer Oberflächenrezeptoren wie MHC-2, TLR2 und TLR4 wurde mittels Durchflusszytometrie an Tag 1 (Monozyten) bzw. Tag 6 (MoDC und MoLC) analysiert. Die Histogramme zeigen die jeweilige Antigenexpression (grau, Isotypkontrolle farblos) von 10⁵ Zellen. (B) Unreife MoLC wurden von MoDC über die Expression charakteristischer Proteine: CD1a, CD207, CD324, TROP-2 und Axl unterschieden und hierfür durchflusszytometrisch analysiert. Die prozentualen Anteile markierter Zellen sind jeweils angegeben. (C) Die immunhistochemische Fluoreszenzanalyse von MoLC bestätigte die Expression von CD1a (grün), CD207 (rot) und CD324 (grün). Nukleinsäuren in Zellkernen wurden mittels DAPI (blau) visualisiert. Maßstabsbalken: 50 µm. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 3 bis 5 unabhängigen Experimenten dar.

Während der anschließenden 7-tägigen Differenzierung vollzog sich eine grundlegende Veränderung der charakterisierenden Expressionsprofile in DC- bzw. LC-typische Oberflächenmarker (*Abb. 3-2 A*). Die magnetische Sortierung resultierte in einer Selektion viabler Zellen mit variabler Morphologie, inklusive charakteristischer Zellausläufer. Darüber hinaus zeigten immunhistochemische Fluoreszenzanalysen sowie durchflusszytometrische Untersuchungen der jeweiligen CD1a⁺ Zellen CD207⁺CD324⁺TROP-2⁺Axl⁺ Populationen, welche im Vergleich zu primären LC aus humaner Epidermis, als Langerhans-ähnliche Zellen identifiziert wurden und eindeutig von CD209⁺ MoDC unterschieden werden konnten (*Abb. 3-2 B, C*). Die geringe Expressionsrate der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie des Reifungsmarkers CD83 bestätigte darüber hinaus den unreifen Zustand der CD14⁺ Vorläuferzellen sowie der ausdifferenzierten MoDC bzw. MoLC, wobei auch die Level an MHC-2 Oberflächenrezeptoren jenen von nicht stimulierten APC entsprachen. Nach 7 Tagen Kulturdauer zeigten Viabilitätsuntersuchungen mittels Propidiumiodid sowie Trypanblau-Lösung durchschnittliche Lebendzellzahlen von $\geq 90\%$ (*Daten nicht abgebildet*).

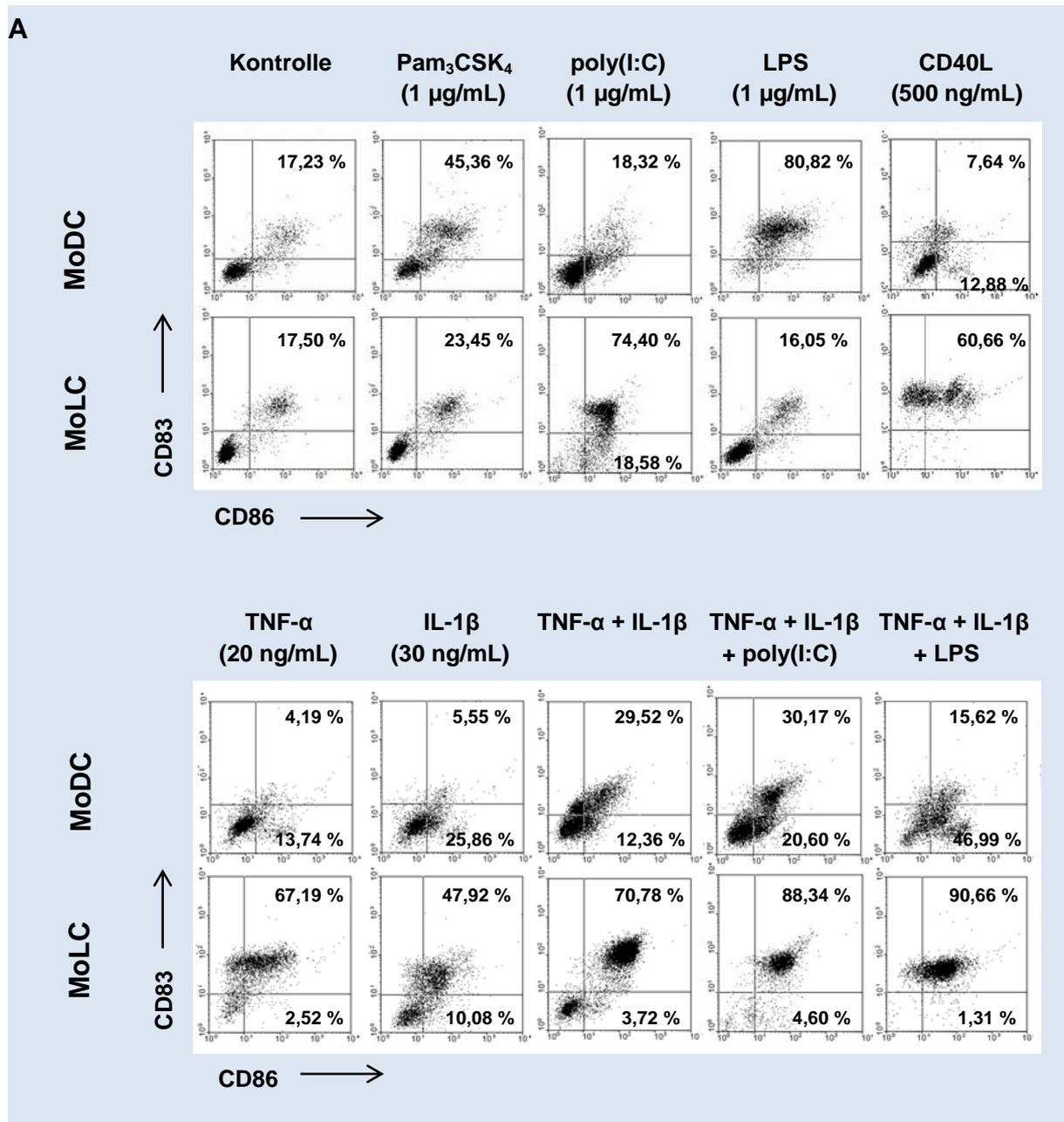
Die morphologische Gegenüberstellung ex vivo generierter DC Subtypen untereinander bzw. der Vergleich mit frisch isolierten epidermalen LC diente der Beurteilung eines experimentellen Kultivierungsprotokolls. Die Expression der wichtigsten Oberflächenproteine CD1a, CD207 bzw. CD209 und MHC-2, zusammen mit den neu assoziierten Rezeptoren TROP-2 und Axl garantierten darüber hinaus eine ausreichend valide Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen nach heute gültigen Standards, während die Bestätigung des unreifen Phänotyps eine vollständige Analyse des nachfolgenden Reifungsprozesses erlaubte.

3.1.2 Inflammatorische Zytokine modulieren den phänotypischen Reifegrad in Anwesenheit mikrobieller Antigene

Humane DC Typen der Haut zeigen charakteristische Unterschiede in der individuellen Erkennung pathogener Antigene. Oftmals wird dies auf die spezifischen Expressionsmuster wichtiger PRR, inklusive Toll-like Rezeptoren, auf der Oberfläche der jeweiligen Subtypen zurückgeführt [63-65]. Primär wurden daher die funktionellen Eigenschaften der generierten MoDC und MoLC nach Stimulation mit bakteriellen bzw. viralen TLR Liganden untersucht und anschließend der induzierte phänotypische Reifungsgrad durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu diente zunächst die Untersuchung der simultanen Expression des Reifungsmarkers CD83 sowie des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf der Oberfläche von MoDC bzw. MoLC, nach 24 stündiger Aktivierung (*Abb. 3-3 A*). Analog der postulierten Beteiligung epidermaler LC an der Kontrolle der Integrität der kommensalen Hautflora, zeigten MoLC eine geringere Reaktivität gegenüber bakteriellen TLR Liganden als MoDC, welche nach Exposition mit Pam₃CSK₄ (TLR2/1) und LPS (TLR4) eine stark erhöhte Anzahl CD83⁺CD86⁺ Populationen aufwiesen. Die unterschiedliche Reaktivität beider *ex vivo* differenzierten DC Typen bestätigte sich darüber hinaus im individuellen Spektrum der Genexpression der TLR1 bis 10 (*Abb. 3-3 B*). MoLC zeigten hier ein ähnliches Rezeptorprofil wie humane LC, welches durch die geringe Expression von TLR2, TLR4 und TLR5 charakterisiert ist [65]. Im Gegensatz zu bakteriellen Antigenen resultierte die Exposition mit aktivierenden Signalen stimulierter T-Lymphozyten (rh-CD40L) sowie mit pro-inflammatorischen Zytokinen, allein oder in Kombination, in einer massiven Erhöhung der Oberflächenexpression von CD83 und CD86 in aktivierten MoLC (*Abb. 3-3 A*). Folglich zeigte sich auch eine starke Erhöhung phänotypisch reifer MoLC nach Stimulation mittels rh-TNF- α , rh-IL-1 β und LPS, verglichen mit der separaten Aktivierung durch Zytokine bzw. bakterielle Liganden allein. Die unterschiedlichen Profile der Zellreifung von *in vitro* stimulierten MoDC und MoLC bestätigen somit die höchst spezialisierte Funktionalität beider Populationen, analog zu Beobachtungen *in vivo*. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Fall eines inflammatorischen Hautmilieus die tolerogene Aktivität epidermaler LC gegenüber bakteriellen Stimuli in eine immunogene konvertiert werden kann und die spezifische Funktionalität somit stark abhängig ist von den jeweilig vorherrschenden Bedingungen.

Trotz ihrer attenuierten Aktivität gegenüber kommensalen Bakterien sind humane LC aufgrund ihrer speziellen Lokalisation in suprabasalen Schichten der Epidermis dazu prädestiniert als professionelle APC frühzeitig auf eindringende Viren zu reagieren. In der Tat identifizierten frühere Studien bereits, dass LC als effektive Aktivatoren adaptiver Immunantworten nach Exposition mit viralen Antigenen fungieren [144, 283]. Analog hierzu zeigten auch die generierten MoLC eine stark erhöhte Expression der Reifungsmarker CD83

und CD86, nachdem diese über 24 Stunden mit poly(I:C) stimuliert wurden, einem molekularen Muster welches virale Nukleinsäuren imitiert und über den intrazellulär lokalisierten TLR3 erkannt wird (Abb. 3-3 A). MoDC hingegen zeigten entsprechend ihres spezifischen TLR-abhängigen Genexpressionsprofils einen geringeren phänotypischen Reifegrad nach Exposition mit poly(I:C), wobei auch hier die gleichzeitige Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine in einer Erhöhung der Expressionsrate an CD86 resultierte. Die Ergebnisse unterstreichen somit eine mögliche Beteiligung epidermaler LC in der Induktion anti-viraler Immunantworten und verdeutlichen erneut die funktionale Spezialisierung unterschiedlicher DC Typen in humaner Haut.



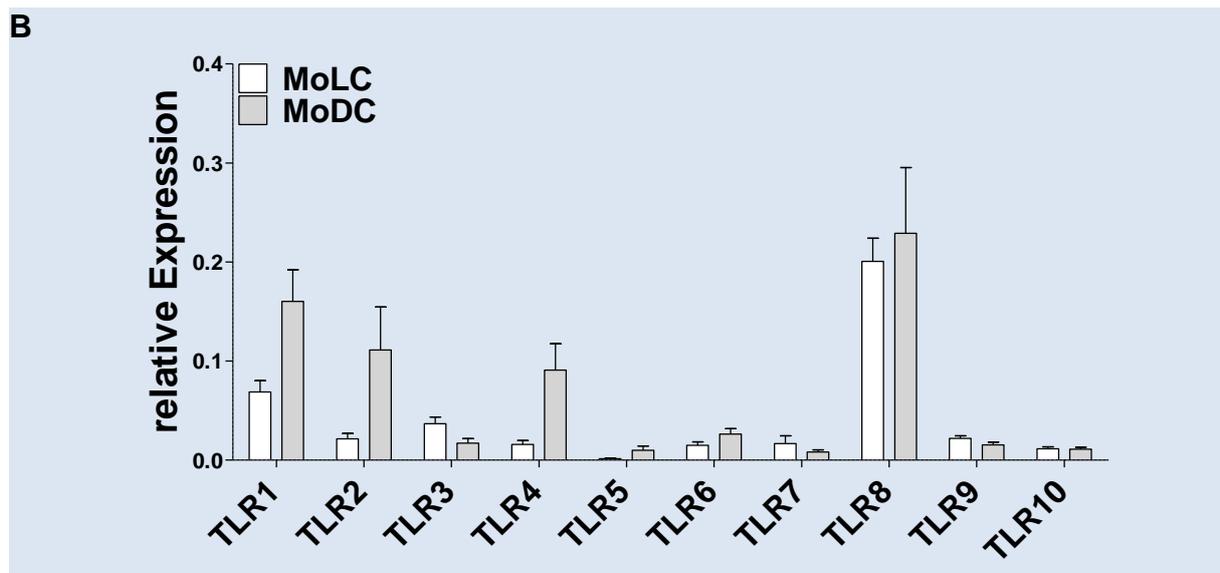
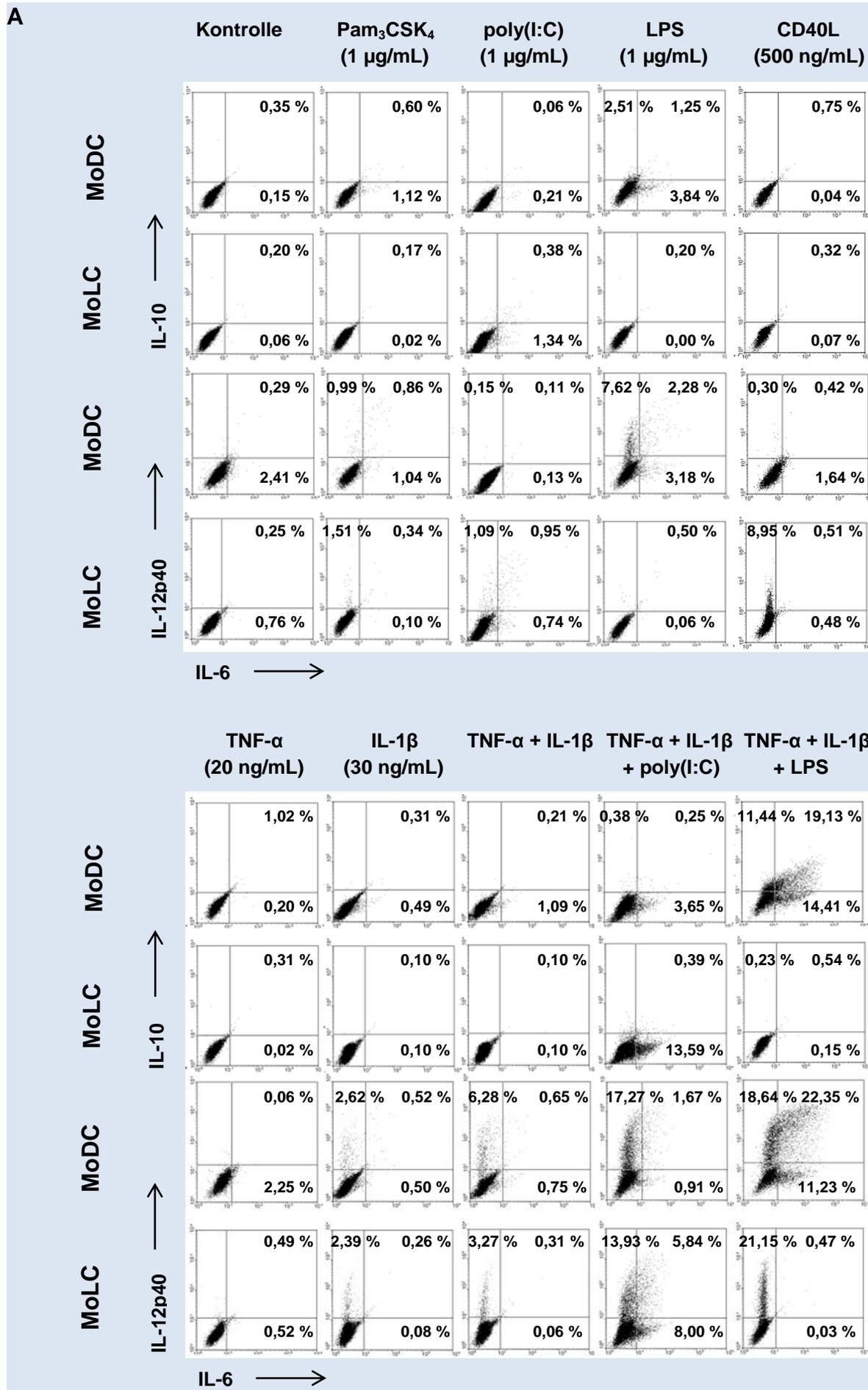


Abbildung 3-3: MoDC und MoLC zeigen unterschiede im phänotypischen Reifungsgrad nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen. (A) Unreife Zellen wurden mit definierten mikrobiellen und nicht-mikrobiellen Antigenen für 24 Stunden stimuliert und anschließend die individuellen Level des Reifungsmarkers CD83 und des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf der Oberfläche mittels 2-Farben-Durchflusszytometrie analysiert. Die spezifischen Konzentrationen der eingesetzten Stimuli sowie die prozentualen Anteile der CD83⁺ bzw. CD86⁺ Zellen sind angegeben. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 4 bis 6 unabhängigen Experimenten dar. (B) Nach 6 Tagen der Differenzierung zeigen MoDC und MoLC quantitative Unterschiede im individuellen Genprofil der TLR1 - 10. Die relative mRNA Expression der Zielgene wurde nach Normalisierung gegen das spezifische Referenzgen YWHAZ errechnet. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 6 unabhängigen Experimenten.

3.1.3 TNF- α und IL-1 β regulieren die Produktion und Sekretion immunregulatorischer Zytokine nach Antigenkontakt

Die erhöhte Expression definierter Reifungsmarker bzw. kostimulatorischer Moleküle in MoDC und MoLC resultiert nicht zwangsläufig in einer funktionalen Aktivierung effektorischer T-Lymphozyten, sodass die immunogenen Eigenschaften der stimulierten Zellen über die einfache Analyse der Oberflächenexpression von CD83 und CD86 nur unzureichend beschrieben wird [284]. Entscheidend für die Funktion humaner DC Typen der Haut ist darüber hinaus die Interaktion mit naiven T-Lymphozyten und der damit einhergehenden Induktion einer spezifischen adaptiven Immunantwort. Um daher die komplexen modulatorischen Eigenschaften aktivierter MoDC bzw. MoLC genauer zu charakterisieren, schloss sich daraufhin eine detaillierte Untersuchung der mit der Reifung einhergehenden Produktion sowie Sekretion diverser immunregulatorischer Zytokine an.



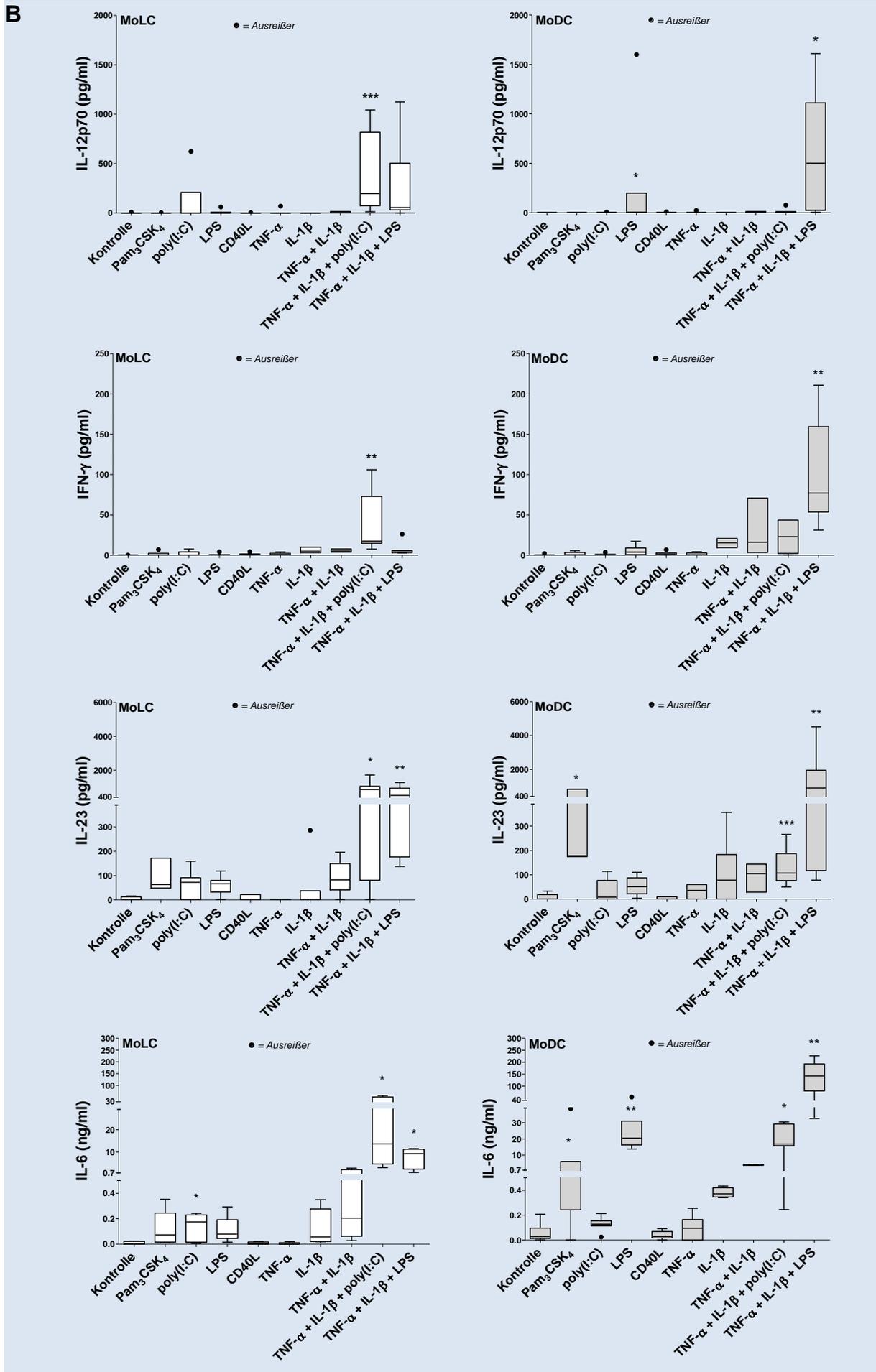


Abbildung 3-4: MoDC und MoLC zeigen Unterschiede in der Produktion und Sekretion immunregulatorischer Zytokine nach Stimulation mit mikrobiellen TLR Agonisten, in An- oder Abwesenheit von rh-TNF- α und rh-IL-1 β . (A) Unreife Zellen wurden mit definierten Aktivatoren für 24 Stunden in Anwesenheit von Brefeldin A bzw. Monensin stimuliert und anschließend die intrazelluläre Produktion von IL-6, IL-10 und IL-12p40 mittels 2-Farben-Durchflusszytometrie analysiert. Die spezifischen Konzentrationen der eingesetzten Stimuli sowie die prozentualen Anteile der zytokinproduzierenden Zellen sind angegeben. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 4 bis 6 unabhängigen Experimenten dar. (B) MoDC und MoLC wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/mL), poly(I:C) (1 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL), rh-CD40L (500 ng/mL), rh-TNF- α (20 ng/mL) und rh-IL-1 β (30 ng/mL), allein oder in Kombination, über 24 Stunden stimuliert und anschließend die Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen: IL-6, IL-12p70, IL-23 und IFN- γ in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert. Die Box-Plots zeigen den jeweiligen Median +/- oberes und unteres Quartil (25 % - 75 %), sowie die darüber und darunter liegenden Werte außerhalb des Kastens. Mögliche Ausreißer sind als solche gekennzeichnet (n=5-17). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Die durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion zeigte hierbei eine Zunahme an IL-12p40⁺ MoDC nach 24 stündiger Stimulation mit LPS (Abb. 3-4 A), wobei durch die zusätzliche Anwesenheit von rh-TNF- α und rh-IL-1 β eine starke Erhöhung der Produktion induziert wurde. Darüber hinaus zeigte sich auch, dass die Kombination aus pro-inflammatorischen Zytokinen und dem bakteriellen Liganden für TLR4 die Produktion von IL-6 sowie IL-10 forcierte, wobei letzteres als kritischer Regulator zur Entwicklung regulatorischer T-Zellen gilt. Daher ist anzunehmen, dass dermale DC neben ihrer Kapazität zur Initiation einer adaptiven Immunantwort, auch an der Entwicklung induzierbarer Treg beteiligt sind, sofern aufgrund simultan auftretender inflammatorischer sowie bakterieller Reize die Gefahr einer überschießenden Immunantwort mit nachhaltiger Schädigung des betroffenen Gewebes besteht. Im Gegensatz hierzu zeigten stimulierte MoLC keine Produktion von IL-10, jedoch konnte eine ausgeprägte IL-12p40⁺ Population nachgewiesen werden, nachdem diese mit einer Kombination aus pro-inflammatorischen Zytokinen und poly(I:C) bzw. LPS stimuliert wurden. Analog zu den Beobachtungen der durchflusszytometrischen Analyse des phänotypischen Reifungsgrads aktivierter MoLC, zeigen diese erneut eine stark erhöhte immunogene Kapazität nach simultaner Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen sowie mikrobiellen TLR Liganden.

Die Interaktion professioneller APC mit naiven T-Zellen umfasst die Präsentation prozessierter Fremdantigene sowie die simultane Kostimulation mittels CD80 bzw. CD86, wohingegen T-Lymphozyten durch Bindung des CD40 Rezeptors auf aktivierten DC deren Sekretion immunregulatorischer Signalmoleküle fördern. Eine Forcierung der Zytokinfreisetzung geschieht jedoch nur, sofern eine vorherige Stimulation der DC mittels mikrobieller Antigene stattfand [109, 110]. Die Aktivierung mit rh-CD40L allein resultierte

dementsprechend, trotz starker Expressionsraten an CD83 und CD86 (*Abb. 3-3, A*), nur in einer geringen Menge IL-12p40⁺ MoLC.

Weiterhin wurde die potentielle Effektivität einer Aktivierung unterschiedlicher effektorischer T-Lymphozyten analysiert, indem die Freisetzung Th1- (IL-12p70, IFN- γ) bzw. Th17-abhängiger (IL-6, IL-23) Zytokine in den jeweiligen Zellkulturüberständen betrachtet wurde (*Abb. 3-4, B*). TLR2/1 Ligand Pam₃CSK₄ induzierte hierbei die Sekretion von IL-6 und IL-23 in stimulierten MoDC, wohingegen die Aktivierung mit LPS in der Freisetzung von IL-12p70 und IL-6 resultierte. In Übereinstimmung mit der erhöhten Zytokinproduktion nach simultaner Stimulation mit rh-TNF- α , rh-IL-1 β und TLR4 Ligand LPS, führte die Exposition dieser Kombination zu einer signifikanten Erhöhung der Freisetzung von IFN- γ , IL-6, IL-12p70 und IL-23 und lässt somit eine potente Aktivierung Th1- bzw. Th17-abhängiger Immunreaktionen durch stimulierte MoDC nach bakteriellen Antigenkontakt vermuten. Die geringe Reaktivität unreifer MoLC gegenüber bakteriellen TLR Liganden zeigte sich auch in der geringen Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine nach alleiniger Stimulation mit Pam₃CSK₄ bzw. LPS, wobei auch hier die Präsenz von rh-TNF- α und rh-IL-1 β in einem signifikanten Anstieg der Sekretion Th-17-abhängiger Zytokine resultierte. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut, dass dermale DC an der Erkennung und Abwehr bakterieller Antigene beteiligt sind, möglicherweise in Synergie mit epidermalen LC, sofern diese aufgrund eines inflammatorischen Hautmilieus weitere aktivierende Reize erfahren.

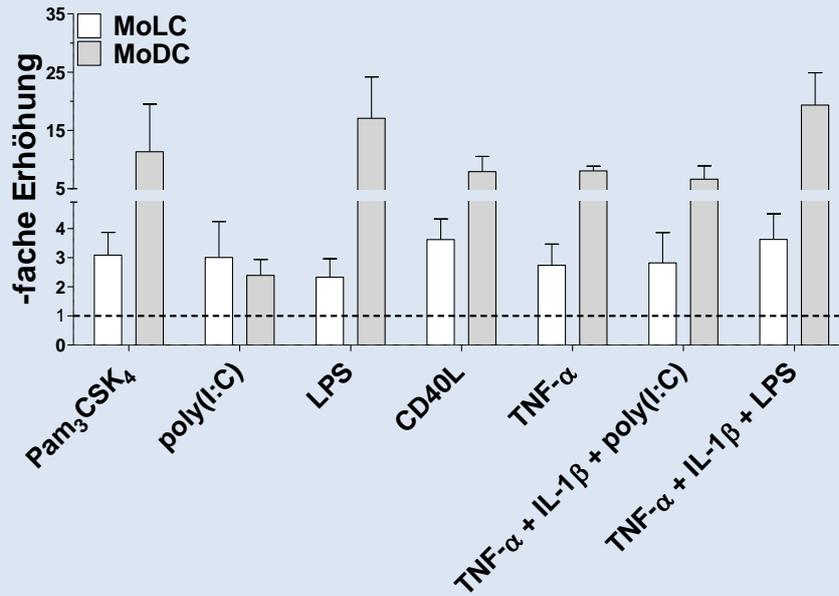
Der virale TLR-Agonist poly(I:C) erhöhte zudem die Freisetzung von IL-12p70 in MoLC, wobei die Kombination mit rh-TNF- α und rh-IL-1 β sowohl die Sekretion von IL-23 und IL-6 verstärkte, als auch die Freisetzung Th1-abhängiger Zytokine. Sowohl der phänotypische Reifegrad (*Abb 3-3, A*) als auch die beobachtete Erhöhung der IL-12p40⁺IL-6⁺ MoLC-Population in Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine (*Abb. 3-4, A*) zeigte sich somit in der veränderten Zytokinsekretion bestätigt. Darüber hinaus unterstreichen diese Resultate die bereits postulierte funktionale Spezialisierung epidermaler LC als potente Aktivatoren einer anti-viralen Immunantwort. MoDC dagegen zeigten nach Stimulation mit poly(I:C) allein nur eine geringe Freisetzung an Zytokinen, wohingegen nach gleichzeitiger Exposition mit rh-TNF- α und rh-IL-1 β auch hier die Sekretion an IL-23 signifikant erhöht wurde und dies eine Aktivierung Th17-abhängiger Immunreaktionen vermuten lässt. Die induzierte Zytokinproduktion des heterodimeren Proteins IL-23 erschien jedoch gering im Vergleich mit der erhöhten Anzahl IL-12p40⁺ MoDC nach simultaner Aktivierung mit poly(I:C) und pro-inflammatorischen Zytokinen (*Abb. 3-4 A*) und lässt vermuten, dass dermale DC nach Kontakt mit viralen Antigenen hauptsächlich an der Sekretion des IL-12p40 Monomers beteiligt sein könnten, welches sowohl chemotaktische sowie bis heute nicht vollständig aufgeklärte immunregulatorische Eigenschaften besitzt [285].

3.1.4 MoDC und MoLC zeigen Unterschiede in der CCR7-abhängigen Migration

Das Erkennen von pathogenen Organismen bzw. von Gefahrensignalen wie TNF- α und IL-1 β initiiert eine komplexe Differenzierung der zuvor unreifen APC in reifende Zellen, welche nun ein erhöhtes migratorisches Potential aufweisen um regionale Lymphgewebe zu erreichen. Der Chemokinrezeptor CCR7 wurde hierbei bereits als Schlüsselregulator der Migration aktivierter DC identifiziert [286]. Um die dem Reifungsprozess begleitende Erhöhung der CCR7-abhängigen migratorischen Kapazität aktivierter MoDC bzw. MoLC zu verifizieren, wurden diese in einer rh-CCL21 vermittelten *in vitro* Migrationsstudie untersucht. Nach 48 stündiger Stimulation zeigten beide Subtypen eine erhöhte Wanderungsaktivität entlang des eingesetzten Chemokingradienten, wobei aktivierte MoDC, entsprechend ihres phänotypischen Reifungsgrads (Abb. 3-3, A), eine höhere migratorische Kapazität aufwiesen als MoLC, sofern diese mit bakteriellen TLR Liganden allein oder in Kombination mit pro-inflammatorischen Zytokinen stimuliert wurden (Abb. 3-5, A). Die Aktivierung mittels poly(I:C) resultierte dagegen nicht in einer Erhöhung des phänotypischen Reifungsgrads der MoDC und auch das migratorische Potential nahm hier erst nach simultaner Kostimulation mit rh-TNF- α und rh-IL-1 β zu. Die Ergebnisse verdeutlichen erneut die zentrale Funktion dermalen DC als potente Vermittler adaptiver Immunreaktionen gegen invasive Bakterien und bestätigen zudem die *in vivo* Beobachtungen einer raschen Migration aktivierter DC in regionale Lymphknoten, wohingegen epidermale LC diese erst zu späteren Zeitpunkten erreichen.

Letzteres wurde anhand des Zweischritt-Migrationsmodells für Langerhans Zellen erklärt, deren mehrstufige Migration aus epidermalen Schichten in einer längeren Verweildauer in peripheren Geweben resultiert [101]. Daher wurde die initial gesteigerte Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 sowie die darauf folgende Erhöhung der Level an CCR7 auf aktivierten MoLC mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen analysiert (Abb. 3-5, B). Das aktivierende Signal stimulierter T-Lymphozyten gilt als potenter Aktivator des migratorischen Potentials aktivierter DC [287], sodass auch hier das eingesetzte rh-CD40L bei MoLC in einer Erhöhung der Oberflächenexpression von CXCR4 resultierte. Verlängerte sich die Stimulationsdauer von 24 auf 48 Stunden, verstärkte sich dieser Effekt sogar, wobei MoLC nun auch CCR7 exprimierten. Im Gegensatz hierzu führte die Stimulation mit bakteriellen TLR Liganden allein sowie in Kombination mit pro-inflammatorischen Zytokinen nur geringfügig zu einer Veränderung der Chemokinrezeptor-Expression, wodurch die geringe migratorische Kapazität stimulierter MoLC bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut, dass die verschiedenen Populationen dendritischer Zellen der Haut eine breite funktionale Diversität aufweisen, welche neben der individuellen Antigenerkennung auch auf die Unterschiede im Migrationspotential zurückzuführen sind.

A



B

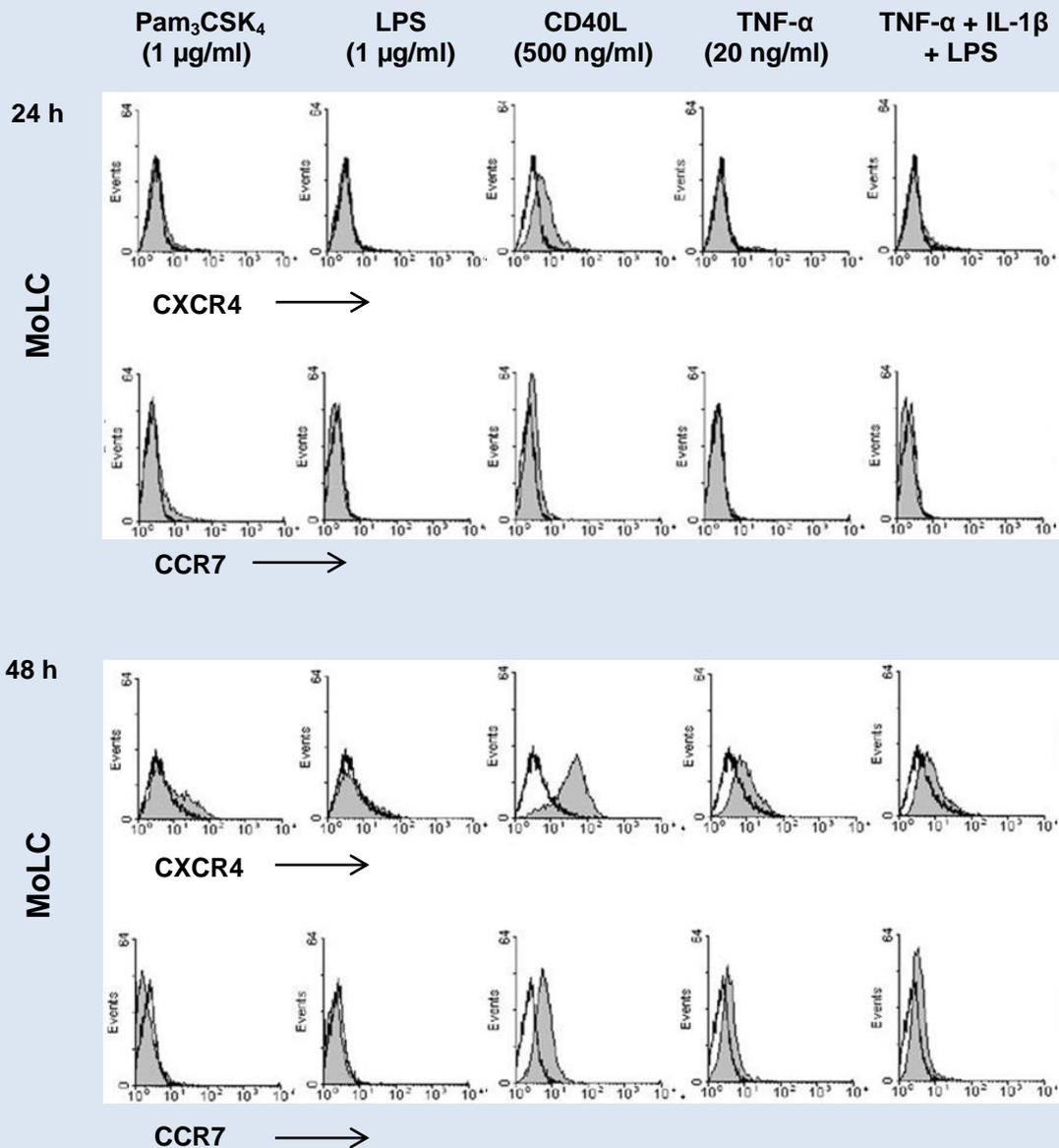


Abbildung 3-5: Die Aktivierung über 48 Stunden resultiert in einer veränderten Kapazität der CCR7-abhängigen Migration. (A) MoDC und MoLC wurden mit Pam₃CSK₄ (1 µg/mL), poly(I:C) (1 µg/mL), LPS (1 µg/mL), rh-CD40L (500 ng/mL), rh-TNF-α (20 ng/mL) und rh-IL-1β (30 ng/mL), allein oder in Kombination, über 48 Stunden stimuliert. Nachdem die Zellen anschließend für 3,5 Stunden in einer rh-CCL21 (100 ng/mL) vermittelten *in vitro* Migrationsstudie durch einen Membraneinsatz (8 µm Porengröße) wanderten, wurden diese auf dem Plattenboden gesammelt und durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Anzahl migrierter Zellen wurde in Relation zur Menge unstimulierter Kontrollzellen dargestellt (Kontrolle als 1 aufgetragen). Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 5 - 12 unabhängigen Experimenten. (B) Die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 auf MoLC nach Stimulation mit definierten Aktivatoren für 24 sowie 48 Stunden wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die spezifischen Konzentrationen der eingesetzten Stimuli sind angegeben. Die Histogramme zeigen die Antigenexpression (grau, Isotypkontrolle farblos) von 10⁵ Zellen und stellen repräsentative Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten dar.

3.1.5 Poly(I:C) induziert die Genexpression anti-viraler Typ 1 Interferone

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichten, dass inflammatorische Einflüsse zu einer erhöhten Freisetzung Th1- bzw. Th17-abhängiger Zytokine durch poly(I:C) stimulierte MoLC führten, wobei die migratorische Kapazität hiervon unbeeinflusst blieb. Auch MoDC zeigten keine erhöhte Wanderungsaktivität entlang des rh-CCL21-Gradienten sowie eine nur geringe Sekretion immunrelevanter Zytokine, weshalb untersucht wurde, ob neben den adaptiven Prozessen der Immunität, möglicherweise primär Effekte des angeborenen Immunsystems vermittelt werden [288]. Hierzu wurde das Genprofil der anti-viral wirkenden Zytokine IFN-α und IFN-β in stimulierten MoLC und MoDC mittels qRT-PCR analysiert. Tatsächlich zeigten beide Subtypen eine Erhöhung der mRNA Level von IFN-β nach Aktivierung mittels poly(I:C), wobei MoDC zusätzlich die Expression der IFN-α mRNA steigerten (*Abb 3-6, A*). Um die beobachtete Genregulation genauer zu analysieren, wurden MoDC und MoLC zusätzlich in Gegenwart von Chloroquin (CHQ) stimuliert, einem Inhibitor endosomaler Azidifizierungen und intrazellulär lokalisierter TLR und anschließend die Genprofile vergleichend betrachtet [289]. Tatsächlich reduzierte die Anwesenheit von CHQ die Erhöhung der mRNA Level beider Typ I Interferone, wobei auch die Induktion der TLR3 mRNA Expression in MoDC nach Stimulation mit poly(I:C) unterdrückt wurde und sich bestätigte, dass dieses spezifisch über TLR3 erkannt wird (*Abb. 3-6, B*) [290]. Dagegen hatte die simultane Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen und poly(I:C) bzw. LPS nur geringe Auswirkungen auf die Regulation der Genexpression von IFN-α und IFN-β, jedoch zeigte sich eine Verringerung der TLR3 mRNA Level. Die Ergebnisse bestätigen somit, dass sowohl dermale DC als auch epidermale LC an den Prozessen der angeborenen Immunität gegen virale Antigene beteiligt sein können, wohingegen zusätzliche inflammatorische Einflüsse womöglich auch adaptive Effekte induzieren, sodass die beobachtete Sekretion immunregulatorischer Zytokine durch stimulierte LC zu einer Initiierung Th1- sowie Th17-abhängiger Immunantworten führt.

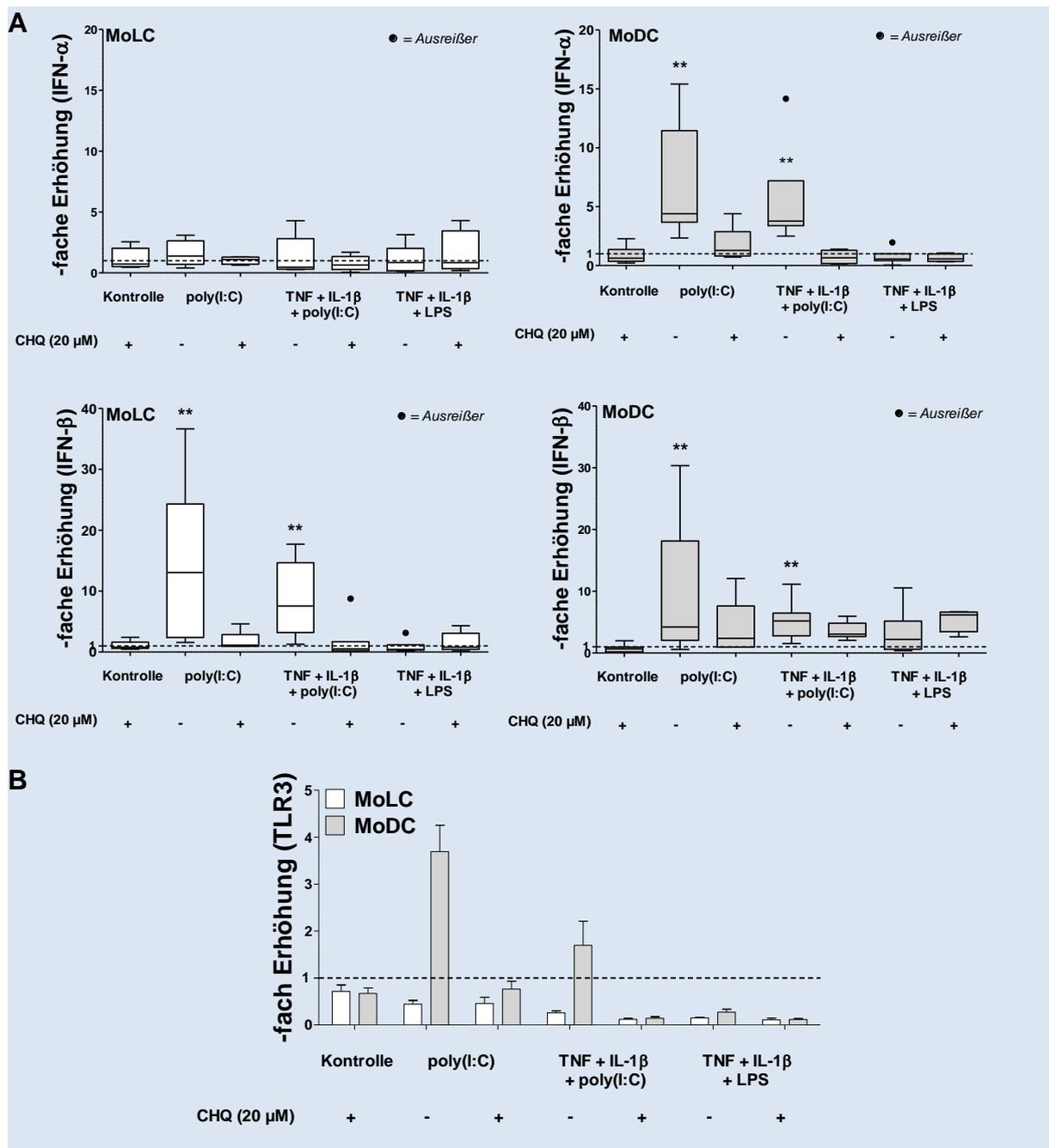


Abbildung 3-6: Die Stimulation mit poly(I:C) induziert die Genexpression anti-viraler Typ I Interferone in MoDC und MoLC. (A) Die Zellen wurden mit LPS (1 μ g/mL) in Kombination mit rh-TNF- α (20 ng/mL) und rh-IL-1 β (30 ng/mL) oder mit poly(I:C) (1 μ g/mL) allein sowie zusammen mit pro-inflammatorischen Zytokinen über 24 Stunden in An- oder Abwesenheit von Chloroquin (20 μ M) stimuliert. Die relative mRNA Expression von IFN- α und IFN- β wurde nach Normalisierung gegen die spezifischen Referenzgene YWHAZ und SDHA errechnet und in Relation zur unstimulierten Kontrolle dargestellt (Kontrolle als 1 aufgetragen). Die Box-Plots zeigen den jeweiligen Median +/- oberes und unteres Quartil (25 % - 75 %), sowie die darüber und darunter liegenden Werte außerhalb des Kastens. Mögliche Ausreißer sind als solche gekennzeichnet (n=4-10). ** p < 0.01, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. (B) Chloroquin verhindert die Erhöhung der TLR3 mRNA Expression nach Stimulation mit poly(I:C) in MoDC. Die relative mRNA Expression von TLR3 wurde nach Normalisierung gegen die spezifischen Referenzgene YWHAZ und SDHA errechnet und in Relation zur unstimulierten Kontrolle dargestellt (Kontrolle als 1 aufgetragen). Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 4 - 6 unabhängigen Experimenten.

Die Resultate bestätigen, dass das Spektrum immunregulatorischer Funktionen dermalen DC bzw. epidermalen LC sowohl die Mechanismen der adaptiven als auch angeborenen Immunität umfassen. Die jeweilige Reaktivität dieser Subpopulationen gegenüber pathogenen Organismen wird darüber hinaus nicht nur über die Art des mikrobiellen Stimulus determiniert, sondern auch in verstärktem Maße von den jeweils vorherrschenden Bedingungen im kutanen Gewebe.

3.2 Chloroquin induziert die Sekretion von IL-23 in aktivierten MoLC

Die Autophagie dient dem Abbau zelleigener Bestandteile in eukaryotischen Organismen und reguliert darüber hinaus auch zahlreiche Prozesse der angeborenen und adaptiven Immunität, wie der intrazellulären Verarbeitung zytosolischer bzw. phagozytierter Mikroben, der Freisetzung anti-viraler Typ I Interferone sowie der Produktion und Sekretion immunregulatorischer Zytokine [213]. Auch die Prozesse der Autophagozytose selbst werden von aktivierenden bzw. inhibierenden Einflüssen unterschiedlichster Zytokine gesteuert. Die komplexen Wechselwirkungen zwischen den Mechanismen der Autophagozytose und der Freisetzung bzw. Produktion diverser immunregulatorischer Zytokine sind bisher nicht vollständig geklärt, jedoch verweisen neuere Studien auf eine mögliche Dysregulation einer Th1- bzw. Th17-abhängigen Immunantwort nach spezifischer Modulation der Autophagie [291].

Chloroquin besitzt aufgrund des lysosomotropen Charakters einen hemmenden Effekt auf die Formation der Autolysosomen und ist infolge der Inhibition der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine durch humane PBMC als Therapeutikum der rheumatoiden Arthritis indiziert [292]. Dennoch existieren Fallberichte, in denen unter systemischer Behandlung mit Chloroquin oder Hydroxychloroquin eine Induktion bzw. Exazerbation inflammatorischer Hauterkrankungen wie Psoriasis vulgaris beobachtet worden ist [293]. Diese wird durch die dominierende Aktivität effektorischer Th1- und Th17-Zellen charakterisiert, womit eine mögliche Relevanz der Autophagie in der Pathogenese der Erkrankung verdeutlicht wird.

Die Verwendung potenter Modulatoren Autophagie-relevanter Prozesse in MoDC und MoLC, als *ex vivo* generierte Equivalente zu professionellen APC der menschlichen Haut, diente dazu einen möglichen Einfluss auf die Freisetzung immunregulatorischer Zytokine zu verifizieren. Eine veränderte Produktion und Sekretion Th1- bzw. Th17-abhängiger Zytokine gilt möglicherweise als Hinweis auf eine hierdurch induzierte Dysregulation der adaptiven Immunantwort in chronisch-inflammatorischen Hauterkrankungen.

3.2.1 3-MA und Chloroquin verändern die molekularen Prozesse der Autophagie

LC3, das Säugerhomologe des autophagie-abhängigen Proteins ATG8 wird von der Zelle als zytosolisches Protein synthetisiert und nach Induktion der Autophagie proteolytisch gespalten sowie mit Phosphatidylethanolamin (PhE) konjugiert. Dieses lagert sich an das sich formierende Phagophor ein und findet sich sowohl außerhalb, als auch innerhalb des entstehenden Autophagosoms. Die intrazelluläre Expression dieses Markers in MoDC bzw. MoLC diente dementsprechend der Verifizierung Autophagie-modulierender Einflüsse.

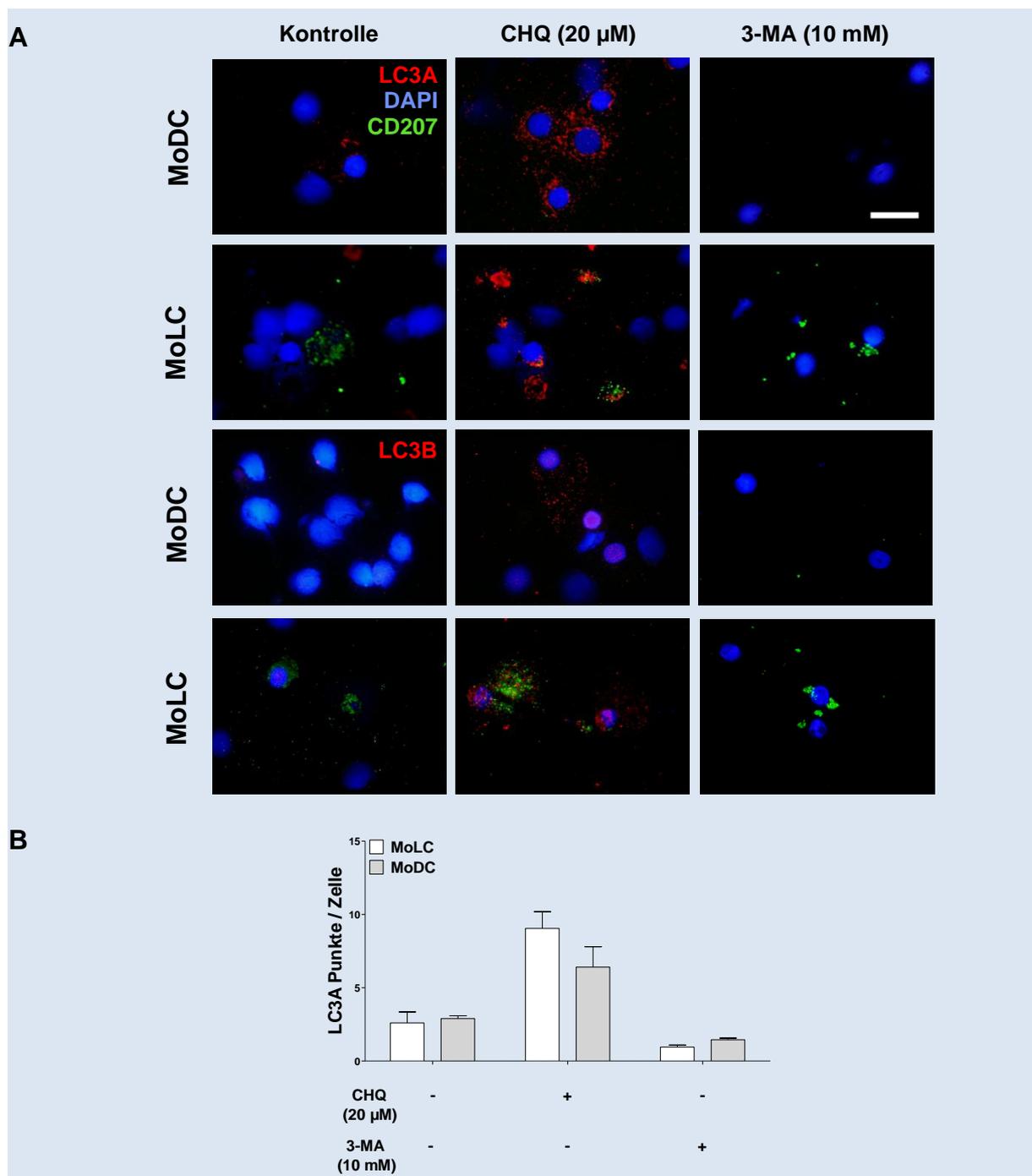


Abbildung 3-7: CHQ erhöht die Anzahl LC3-positiver Vesikel, wohingegen 3-MA die expression von LC3 verringert. (A) MoDC und MoLC wurden in komplettiertem Medium mit CHQ (20 μ M) bzw. 3-MA (10 mM) für 24 Stunden kultiviert. Die immunhistochemische Fluoreszenzanalyse zeigt die Expression von Langerin (grün), LC3A und LC3B (rot). Nukleinsäuren in Zellkernen wurden mittels DAPI (blau) visualisiert. Maßstabsbalken: 30 μ m. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten dar. (B) Die Auszählung LC3A-positiver Vesikel wurde für jede Probe an mind. 40 Zellen quantifiziert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM an punktuellen Fluoreszenzsignalen pro Zelle an (n=3-4).

Im Vergleich zu unbehandelten MoDC und MoLC zeigten immunhistochemische Fluoreszenzanalysen eine verminderte Anzahl endogener LC3A- bzw. LC3B-positiver Vesikel nach 24 stündiger Behandlung mit 3-Methyladenin (3-MA), einem Inhibitor der Klasse 3 Ph13 Kinase Vps34, die als wichtiger Induktor der Formation des Phagophors fungiert (*Abb. 3-7, A*). Im Gegensatz hierzu führt die Behandlung mit CHQ zu einer Erhöhung der intrazellulären LC3A- sowie LC3B-Expression, womit dessen lysosomotropher Charakter bestätigt wurde, da eine Hemmung der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen in sog. Autolysosomen auch die damit verbundene proteolytische Spaltung membrangebundener LC3-Proteine inhibiert. Die Akkumulation LC3A-positiver Vesikel nach 24 stündiger Behandlung mit CHQ wurde zusätzlich durch die Auszählung entsprechender intrazellulärer Fluoreszenzsignale quantifiziert und mit Kontrollzellen bzw. den mit 3-MA behandelten MoDC und MoLC verglichen (*Abb. 3-7, B*).

3.2.2 Chloroquin vermindert die Stimulation einer Th1-abhängigen Immunantwort durch MoLC

CHQ zeigt einen inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung pro-inflammatorischer Signalmoleküle durch PBMC und vermindert die Sekretion Th1-typischer Zytokine wie IFN- γ durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in Patienten mit rheumatoider Arthritis [292, 294]. Um den Einfluss von CHQ auf die Zytokinfreisetzung *ex vivo* differenzierter MoLC und MoDC zu analysieren, wurden diese in einer definierten Mischung aus rh-TNF- α , rh-IL-1 β und LPS über 24 Stunden inkubiert. Die Freisetzung des Th1-abhängigen Zytokins IL-12p70 wurde in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA verifiziert und auf mögliche Unterschiede in der Zytokinsekretion bei gleichzeitiger Anwesenheit von CHQ hin untersucht. Aufgrund der verringerten Reaktivität generierter MoLC gegenüber bakterieller Stimuli, zeigen diese gegenüber MoDC eine geringere Freisetzung an IL-12p70 (*Abb 3-8, A*). Unabhängig hiervon resultierte die Anwesenheit von CHQ während der 24 stündigen Stimulationsphase in einer Reduktion der Zytokinfreisetzung in beiden Subtypen. Um darüber hinaus auch die Kapazität einer primären Stimulation effektorischer T-Zell-Reaktionen zu untersuchen, wurden MoLC

nach 24 stündiger Aktivierung mit rh-IL-1 β für 5 Tage mit frisch isolierten naiven CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Die jeweiligen Zellkulturüberstände zeigten erhöhte Level an IFN- γ und bestätigten somit eine induzierte Th1-Aktivität (Abb 3-8, B), welche jedoch auch hier durch die Zugabe von CHQ während der Stimulation der MoLC stark reduziert wurde. Somit konnte der inhibierende Effekt von CHQ auf die Sekretion Th-1 typischer Zytokine analog der *in vivo* Beobachtungen bestätigt werden, wodurch dessen Einsatz bei chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen verdeutlicht wird.

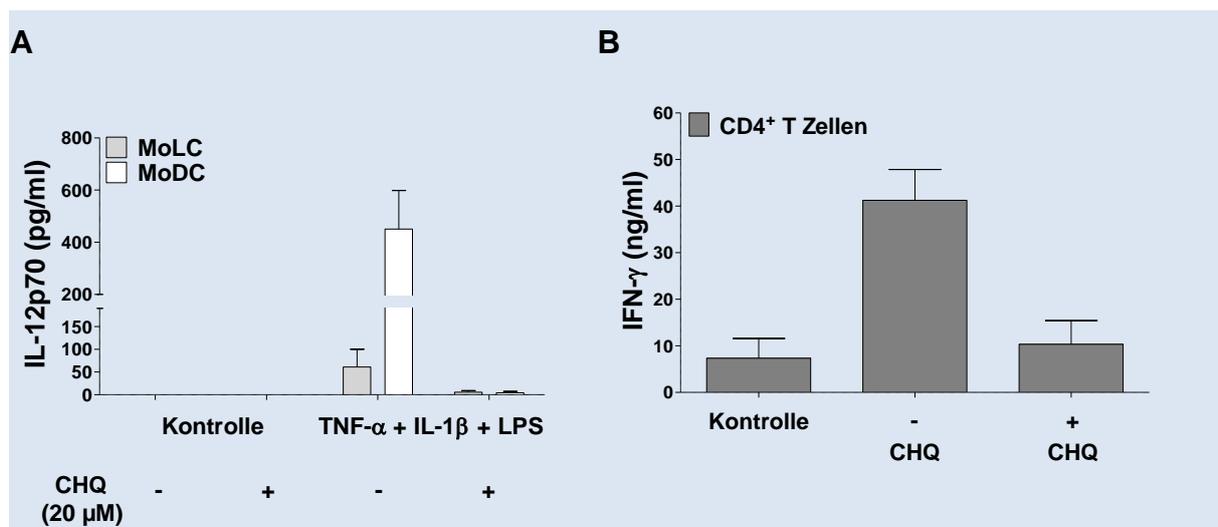


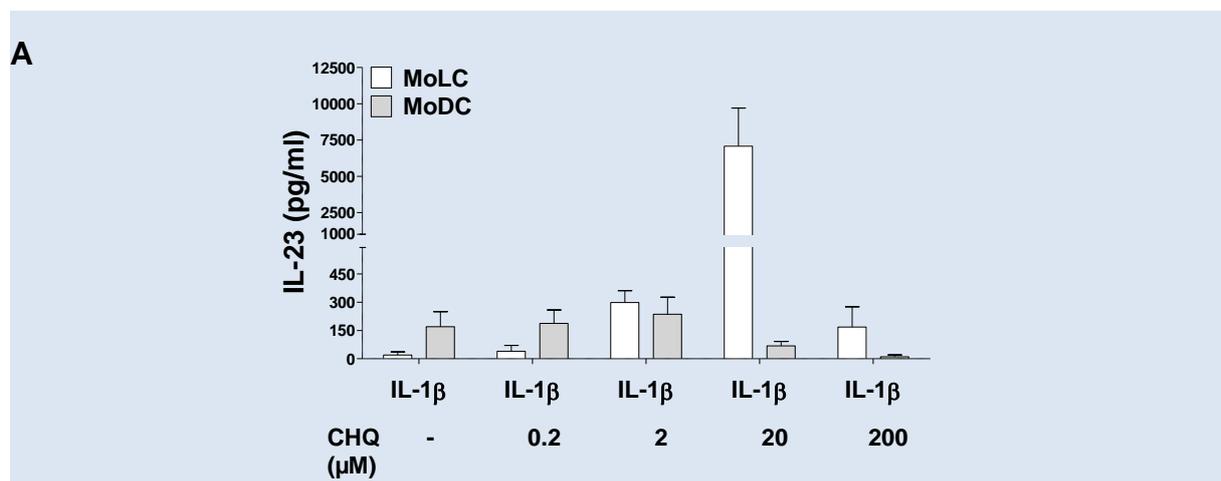
Abbildung 3-8: CHQ inhibiert die Freisetzung von IL-12p70 und vermindert die Kapazität einer primären Stimulation effektorischer Th1-Reaktionen durch MoLC. (A) MoDC und MoLC wurden mit LPS (1 μ g/mL) in Kombination mit rh-TNF- α (20 ng/mL) und rh-IL-1 β (30 ng/mL) für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von CHQ (20 μ M) stimuliert. Die Freisetzung von IL-12p70 wurde in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 4 unabhängigen Experimenten. (B) MoLC wurden mit rh-IL-1 β (30 ng/mL) für 24 h in An- oder Abwesenheit von CHQ (20 μ M) für 24 Stunden stimuliert und anschließend für weitere 5 Tage mit naiven CD4⁺ T-Lymphozyten kokultiviert, welche ebenfalls frisch aus humanen PBMC isoliert wurden. Die Level an IFN- γ in den jeweiligen Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

3.2.3 Inhibitoren später Prozesse der Autophagie erhöhen die Sekretion von IL-23

Aufgrund der nachgewiesenen Kapazität der Aktivierung primärer T-Zellen nach Stimulation mit rh-IL-1 β , wurden anschließend die modulierenden Effekte von CHQ in Anwesenheit dieses pro-inflammatorischen Zytokins näher betrachtet. Bezüglich der Freisetzung Th17-typischer Zytokine konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von MoDC und MoLC mittels rh-IL-1 β in einer Erhöhung der Sekretion von IL-23 resultierte und die Aktivierung in Kombination mit rh-TNF- α und LPS bzw. poly(I:C) diese noch weiter steigerte (Abb. 3-4, B).

In Kontrast zur Freisetzung Th1-abhängiger Zytokine wie IL-12p70, führte die Anwesenheit von CHQ zu einer starken Erhöhung der Sekretion von IL-23 durch MoLC, nachdem diese mit rh-IL-1 β stimuliert wurden, wohingegen MoDC unveränderte bzw. leicht erniedrigte Zytokinlevel in den jeweiligen Zellkulturüberständen aufwiesen (Abb. 3-9, A). Auch die simultane Stimulation mit rh-TNF- α und LPS führte hierbei zu keiner weiteren Steigerung der Freisetzung von IL-23 in aktivierten MoLC bzw. MoDC (Daten nicht abgebildet). Um diesen Effekt genauer zu evaluieren, wurde CHQ anschließend in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und das Ausmaß der Zytokinfreisetzung mittels ELISA analysiert (Abb. 3-9, A). Hierbei induzierte eine Konzentration von 20 μ M die stärkste Erhöhung der Sekretionsrate an IL-23 in MoLC, wohingegen höhere Mengen an CHQ ausschließlich die Viabilität der behandelten Zellen verringerte (Abb. 3-9, B).

Obwohl die Behandlung mit CHQ in einer verringerten Stimulation effektorischer Th1-Reaktionen resultierte (Abb. 3-8, B), ging die erhöhte IL-23 Sekretion durch MoLC nicht mit einer gesteigerten Freisetzung Th17-abhängiger Zytokine wie IL-17A einher (Daten nicht abgebildet). Um darüber hinaus zu evaluieren, ob die Modulation der Freisetzung von IL-23 auf einen veränderten Prozess der Autophagie zurückzuführen ist, wurden MoDC und MoLC mittels rh-IL-1 β in Anwesenheit von Hydroxy-CHQ, Bafilomycin A1 oder 3-MA stimuliert. Sowohl Hydroxy-CHQ als auch Bafilomycin A1 erhöhten die Freisetzung von IL-23 in MoLC in ähnlichem Maße wie nach Behandlung mit CHQ, wobei einzig 3-MA keinen weiteren Einfluss auf die Zytokinfreisetzung zeigte (Abb. 3-9, C). Auch die Behandlung mit Rapamycin, einem Induktor der Autophagieaktivität durch Repression von mTOR, resultierte in keiner weiteren Gegenregulation der IL-23 Sekretion (Daten nicht abgebildet). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die veränderte Zytokinfreisetzung auf Mechanismen beruhen, die vornehmlich mit Prozessen der späten Phase der Autophagie assoziiert sind und somit hauptsächlich durch lysosomotrophe Stoffe sowie Bafilomycin A1, als Inhibitor der lysosomalen H⁺-ATPasen vom V-Typ, induziert werden können.



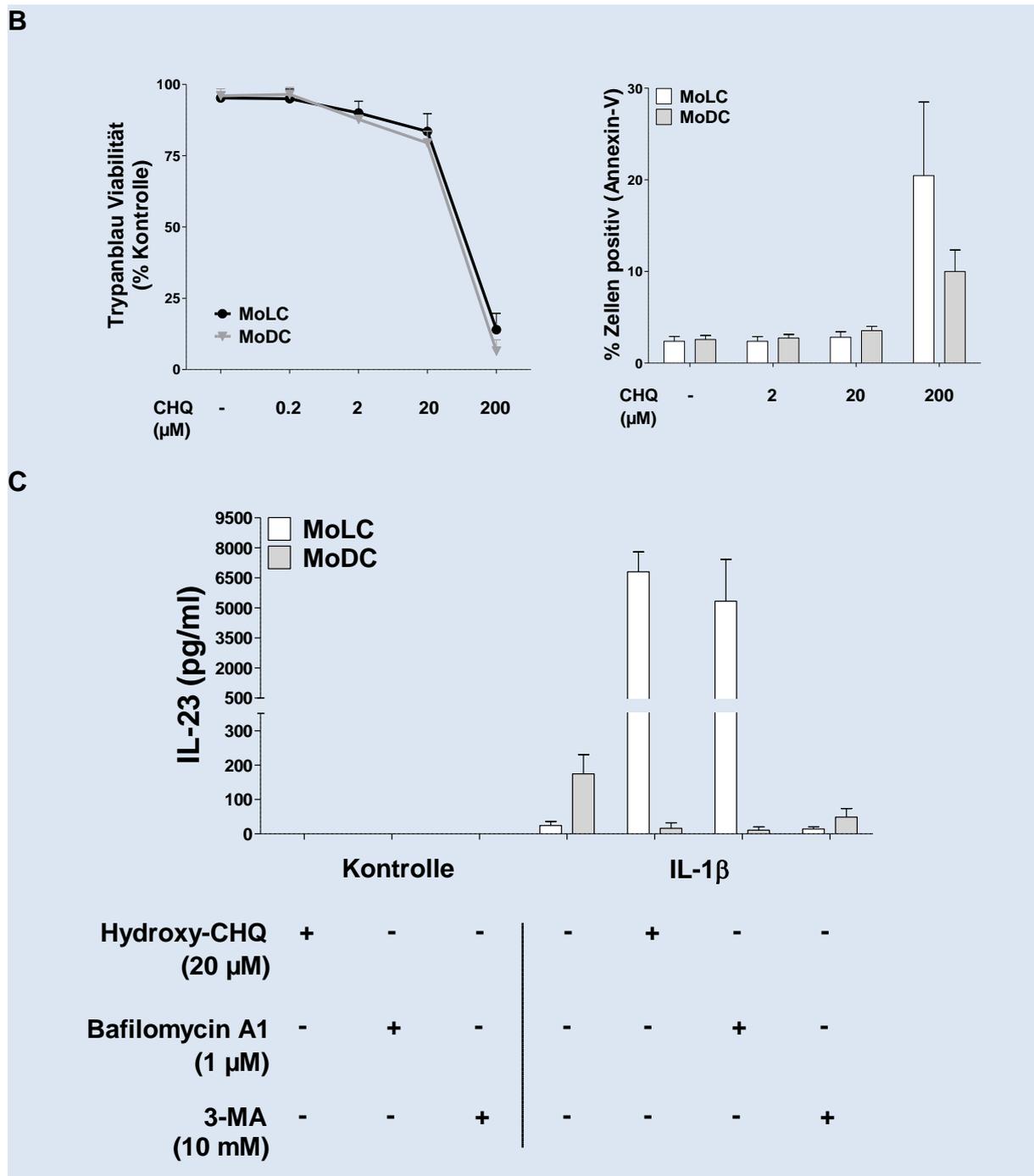


Abbildung 3-9: Die Inhibition von Prozessen der späten Phase der Autophagie führt dosisabhängig zu einer Induktion der IL-23 Sekretion in MoLC. (A) MoDC und MoLC wurden mit rh-IL-1 β (30 ng/mL) für 24 Stunden in Anwesenheit von CHQ in aufsteigenden Konzentrationen (0 - 200 μ M) stimuliert. Die Freisetzung von IL-23 wurde in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 6 unabhängigen Experimenten. (B) Zellen zur Viabilitätsuntersuchung mittels Trypanblau-Lösung wurden in einem Hämocytometer am Phasenkontrastmikroskop ausgezählt oder nach Inkubation mit rekombinantem Annexin-V Fusionsprotein durchflusszytometrisch analysiert. Das Linien- bzw. Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 4 unabhängigen Experimenten. (C) MoDC und MoLC wurden mit rh-IL-1 β (30 ng/mL) für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von Hydroxy-CHQ (20 μ M), Bafilomycin A1 (1 μ M) oder 3-MA (10 mM) stimuliert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Unterschiede in der Genregulation spezifischer Untereinheiten der IL-12 Zytokinfamilie

Um die Unterschiede der Freisetzung von IL-12p70 und IL-23 in MoDC und MoLC detaillierter zu betrachten, wurden die induzierten Effekte zusätzlich auf Ebene der Genexpression analysiert. Beide Zytokine entstammen der IL-12 Familie und stellen heterodimere Proteine dar, bestehend aus einer gemeinsamen p40 Untereinheit (IL-12B), welche im Fall von IL-12p70 an p35 (IL-12A) konjugiert vorliegt, oder an die p19 Untereinheit (IL-23A) assoziiert ist und das Zytokin IL-23 darstellt [295, 296].

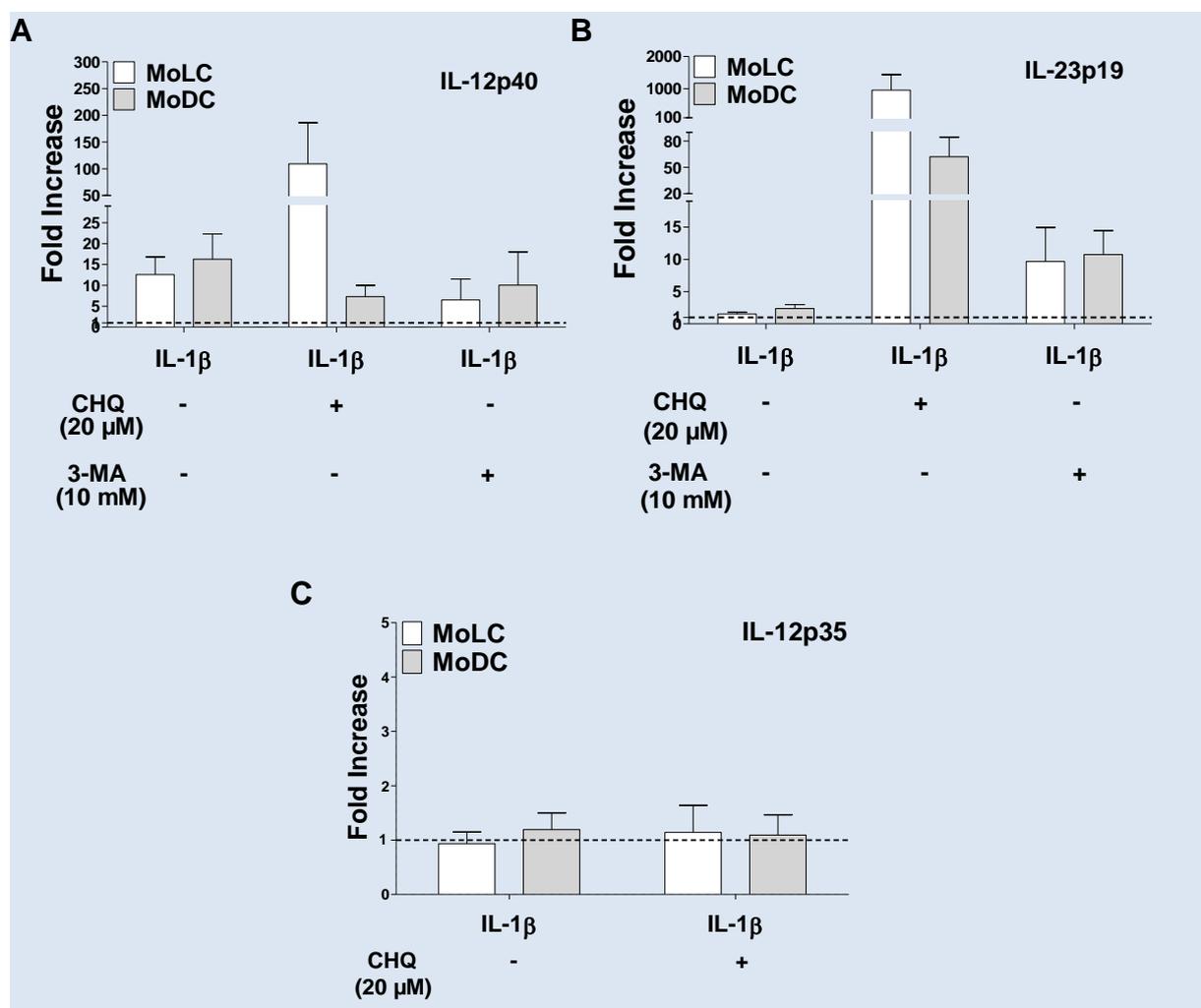


Abbildung 3-10: CHQ induziert unterschiedliche Modulationen der Genexpression spezifischer Untereinheiten der IL-12 Zytokinfamilie in aktivierten MoDC und MoLC. Die Zellen wurden mit rh-IL-1 β (30 ng/mL) in An- bzw. Abwesenheit von CHQ (20 μ M) oder 3-MA (10 mM) für 24 Stunden stimuliert. Die relative mRNA Expression von (A) IL-12p40, (B) IL-12p19 und (C) IL-12p35 wurden nach Normalisierung gegen die spezifischen Referenzgene YWHAZ und SDHA errechnet und in Relation zur unstimulierten Kontrolle dargestellt (Kontrolle als 1 aufgetragen). Die Balkendiagramme zeigen den jeweiligen Mittelwert + SEM (n=3-8).

Die Stimulation mit rh-IL-1 β über 24 Stunden zeigte hierbei keinen Einfluss auf die Genexpression der p35 Untereinheit (Abb. 3-10, C) und bestätigte damit vorherige Resultate, welche die Freisetzung von IL-12p70 nach Aktivierung mittels rh-IL-1 β beschrieben (Abb. 3-4, B). Die Genanalyse der weiteren Untereinheiten zeigte, dass die spezifische Expression in aktivierten MoLC der beobachteten Freisetzung von IL-23 entsprach. Die Stimulation mittels rh-IL-1 β und CHQ führte zu einer starken Erhöhung der mRNA Level der IL-23-spezifischen Untereinheit p19 sowie des p40 Monomers (Abb. 3-10, A und B). Im Gegensatz hierzu wiesen MoDC ein verschiedenartiges Genprofil in Anwesenheit von CHQ auf. Zwar erhöhte sich die Expression der p19 Untereinheit, jedoch zeigte sich keine weitere Erhöhung von IL-12p40. Diese Diskrepanz erklärt möglicherweise die beobachteten Unterschiede in der Freisetzung des biologisch aktiven, aus der p19 und p40 Untereinheit bestehenden, heterodimeren IL-23. In Übereinstimmung hierzu zeigte die Anwesenheit von 3-MA keine weitere Erhöhung der Freisetzung von IL-23 (Abb. 3-9, C) und auch die Genexpression der p40 Untereinheit blieb trotz leicht erhöhter mRNA Level von p19 in MoDC und MoLC, nahezu unverändert (Abb. 3-10, A und B). Die Ergebnisse der Genanalyse lassen darauf schließen, dass die Freisetzung von biologisch aktivem IL-23 mit der erhöhten Expression der spezifischer monomerer Untereinheiten einhergeht und der Einfluss von CHQ, Hydroxy-CHQ und Bafilomycin A1 in einer verstärkten Aktivität distinktiver Transkriptionsfaktoren in aktivierten MoLC und MoDC resultiert.

3.2.5 Die Stimulation des IL-1Rezeptors ist entscheidend für die Erhöhung der IL-23 Sekretion durch Chloroquin

Die Behandlung mit CHQ resultierte nur dann in einer erhöhten Freisetzung von IL-23, wenn MoLC gleichzeitig mittels rh-IL-1 β stimuliert wurden, wohingegen die Aktivierung mittels rh-TNF- α allein, als weiteres wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin, nicht zu einer Erhöhung der IL-23 Sekretion führte (*Daten nicht abgebildet*). Hieraus wird ersichtlich, dass ein adäquater Stimulus benötigt wird um eine Modulation der Produktion und Sekretion Th17-abhängiger Zytokine zu induzieren und dieser vermutlich über IL-1 Zytokine vermittelt wird. Um diesen Sachverhalt detaillierter zu betrachten, wurden MoDC und MoLC zusätzlich mit rh-IL-1 α stimuliert (Abb. 3-11, A). Analog der Aktivierung mit rh-IL-1 β , führte die Anwesenheit von CHQ zu einer veränderten Freisetzung von IL-23 und bestätigte somit die Annahme einer IL-1 Rezeptor-vermittelten Regulation der Zytokinsekretion. Darüber hinaus diente Hydrocinnamoyl-L-valyl-pyrrolidin als spezifischer Hemmstoff des IL-1 Rezeptors und wurde in unterschiedlichen Konzentrationen während der Stimulationsphase von MoLC mit rh-IL-1 α oder rh-IL-1 β und CHQ zugesetzt, um einen inhibierenden Effekt auf die induzierte Dysregulation der IL-23 Freisetzung zu analysieren. Die Antagonisierung des Rezeptors

verläuft hierbei über die Interaktion mit der intrazellulär lokalisierten TIR Domäne, welche nach Aktivierung das Adaptermolekül MyD88 mobilisiert und die Signalweiterleitung steuert. Im Vergleich zu der stark erhöhten Zytokinfreisetzung in Anwesenheit von CHQ resultierte die konzentrationsabhängige Inhibition der rh-IL-1 α - bzw. rh-IL-1 β -vermittelten Signalkaskade in einer verringerten Sekretion von IL-23 durch aktivierte MoLC (Abb. 3-11, B), wodurch erneut bestätigt werden konnte, dass die spezifische Aktivität des IL-1 Rezeptors einen wichtigen Einfluss auf die Produktion und Sekretion von IL-23 ausübt und dessen Signaltransduktion daher möglicherweise in Wechselwirkung mit Autophagie-abhängigen Prozessen steht. Betrachtet man die unterschiedliche Regulation der Zytokinfreisetzung in MoDC und MoLC untereinander, scheint ein möglicher Einfluss von TGF- β -vermittelten Signalen wahrscheinlich, da dieser als essentieller Differenzierungsfaktor *ex vivo* generierter MoLC fungiert. Darüber hinaus zeigte sich bereits an humanen Hepatomzellen sowie am Mammakarzinom, dass TGF- β als potenter Modulator der Autophagozytoseaktivität agiert [228, 297]. Der Einsatz des spezifischen TGF- β Rezeptor 1 Inhibitors LY364947 resultierte jedoch in keiner veränderten Zytokinfreisetzung (Abb. 3-11, C), weshalb eine mögliche Beeinflussung IL-1 Rezeptor- bzw. Autophagie-abhängiger Systeme durch TGF- β -vermittelte Signalwege ausgeschlossen wurde.

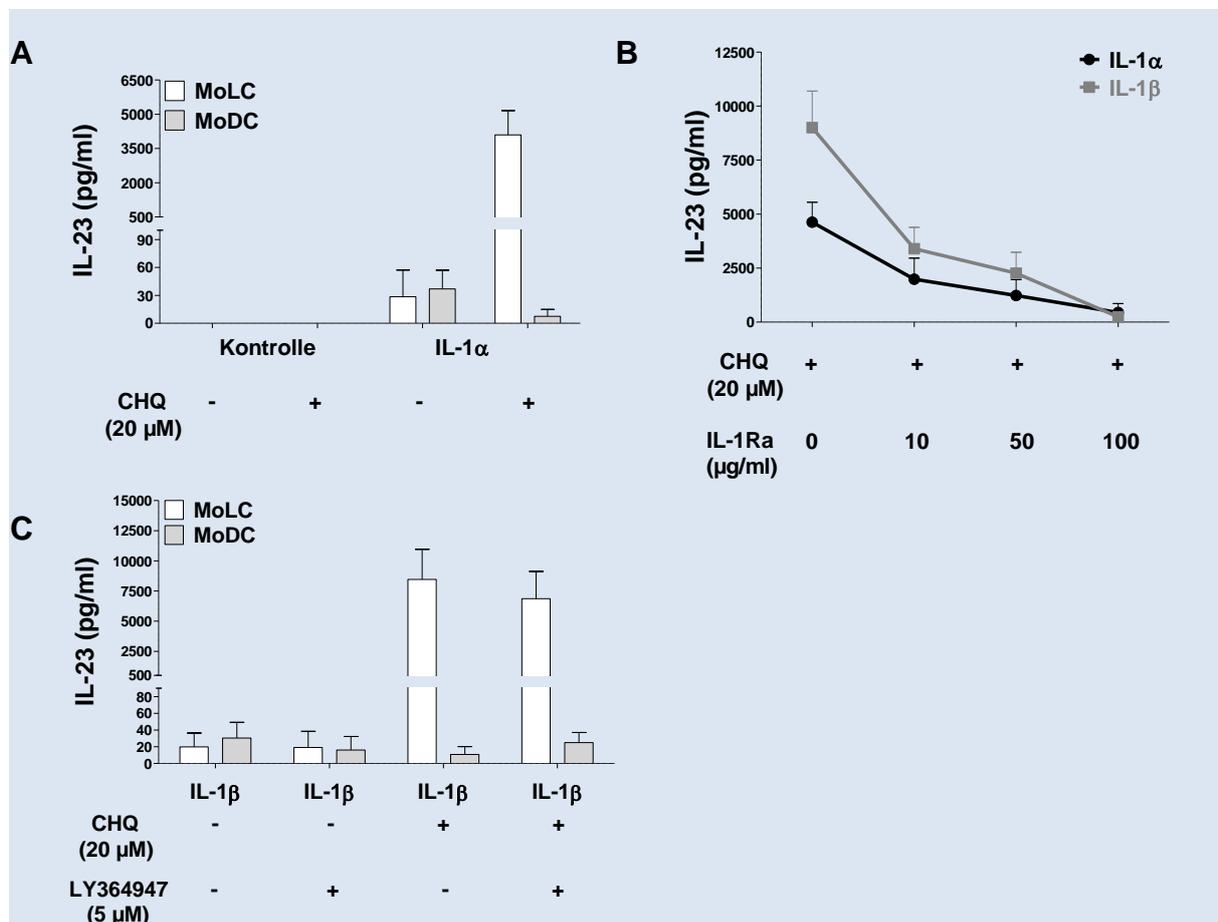


Abbildung 3-11: Die Aktivierung IL-1 Rezeptor-abhängiger Signale ist entscheidend für die erhöhte Zytokinfreisetzung in aktivierten MoLC. (A) Die Zellen wurden mit rh-IL-1 α (5 ng/mL) in An- bzw. Abwesenheit von CHQ (20 μ M) für 24 Stunden stimuliert. Die Freisetzung von IL-23 wurde in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM (n \geq 3). (B) MoLC wurden mit rh-IL-1 α (5 ng/mL) oder rh-IL-1 β (30 ng/mL) und CHQ (20 μ M) in Anwesenheit des spezifischen IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) Hydrocinnamoyl-L-valyl-pyrrolidin in unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 100 μ g/mL) für 24 Stunden stimuliert. Die Freisetzung von IL-23 wurde in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM (n=3). (C) MoDC und MoLC wurden mit rh-IL-1 β (30 ng/mL) und CHQ (20 μ M) in An- oder Abwesenheit von LY364947 (5 μ M), einem spezifischen Inhibitor des TGF- β Rezeptors 1, für 24 Stunden stimuliert. Die Freisetzung von IL-23 wurde in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt den jeweiligen Mittelwert + SEM (n=5-6).

3.2.6 Chloroquin erhöht die TLR2/1-abhängige Sekretion von IL-6 und IL-23

Neben IL-23, welches die Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung und Expansion einer bereits initiierten Th17-Antwort vermittelt, gehören TGF- β , IL-1 β und IL-6 zu den Zytokinen, welche eine Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Th17-Zellen induzieren. Daher wurde zusätzlich eine mögliche Dysregulation der Freisetzung von IL-6 durch stimulierte MoDC und MoLC bei Anwesenheit von CHQ untersucht. Analog vorheriger Ergebnisse zeigten aktivierte MoDC einen hohen Anteil IL-6⁺ Populationen sowie eine erhöhte Sekretion von IL-6, nachdem diese mit rh-IL-1 β stimuliert wurden (*Abb. 3-12, A und C*). Im Unterschied zur Freisetzung von IL-23 zeigte die Zugabe von CHQ eine starke Erhöhung der Zytokinfreisetzung in aktivierten MoDC, wobei auch MoLC die Sekretion von IL-6 erhöhten. Darüber hinaus zeigte die durchflusszytometrische Untersuchung eine verringerte Produktion der p40 Untereinheit und bestätigte somit die verringerte Sekretion an IL-12p70 in beiden Subtypen sowie IL-23 in MoDC (*Abb. 3-12, C*).

Die Aktivität des IL-1 Rezeptors besitzt direkten Einfluss auf die Produktion und Sekretion der Th17-assoziierten Zytokine IL-23 oder IL-6 in Anwesenheit von CHQ, Hydroxy-CHQ oder Bafilomycin A1. Daher wurde untersucht, ob auch die Stimulation definierter PRR, mit spezifischen Gemeinsamkeiten zu IL-1 Rezeptor-abhängigen Signalkaskaden, ähnliche Modulationen der Zytokinfreisetzung in MoDC und MoLC provoziert. Der TLR2 Rezeptor initiiert nach Ligandenbindung und Dimerisierung mit TLR1 eine über das Adaptermolekül MyD88 vermittelte Signalkaskade, welche in signifikanter Homologie zum IL-1 Rezeptor steht [298]. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass ähnlich der Stimulation mit rh-IL-1 β auch Pam₃CSK₄ eine Freisetzung von IL-23, aber nicht von IL-12p70 induzierte (*Abb. 3-4, B*). Tatsächlich resultierte die Aktivierung mit TLR2/1 Ligand Pam₃CSK₄ über 24 Stunden in einer erhöhten Freisetzung von IL-6 in Anwesenheit von CHQ (*Abb. 3-12, A und C*), wobei

sich auch die Sekretion von IL-23 in beiden Subtypen erhöhte und damit in Kontrast zu IL-1 Zytokinen steht (Abb. 3-12, B). Unabhängig der erwähnten Gemeinsamkeiten der jeweiligen Rezeptor-abhängigen Adaptermoleküle weisen diese Resultate auf einen möglichen Unterschied in den involvierten Signalkaskaden hin sowie auf die damit verbundenen Wechselwirkungen mit Autophagie-vermittelten Prozessen, welche die gemeinsamen sowie unterschiedlichen Dysregulationen der Zytokinfreisetzung erklären könnten.

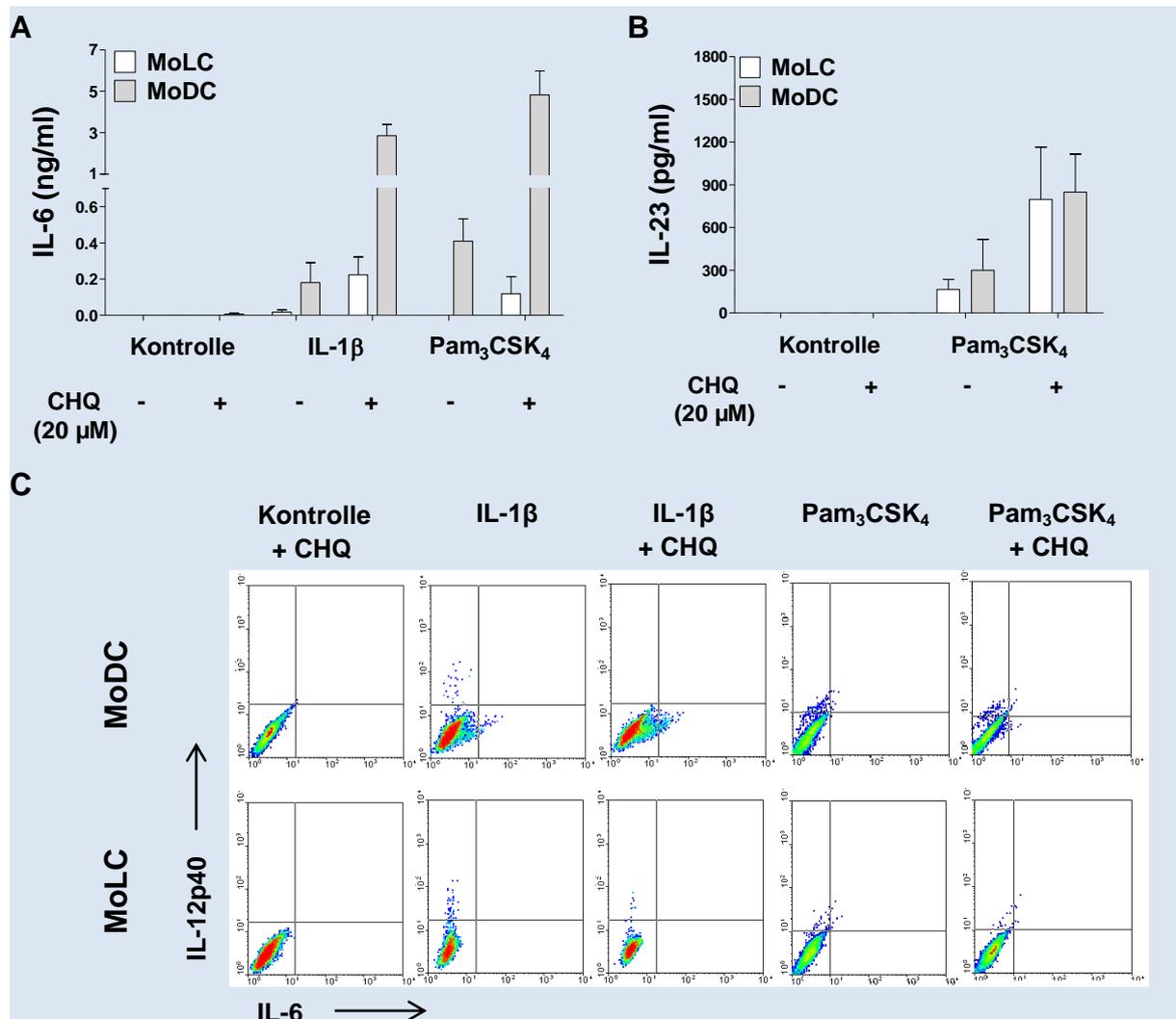


Abbildung 3-12: CHQ erhöht die TLR2/1-vermittelte Freisetzung von IL-6 und IL-23. MoDC und MoLC wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/mL) oder rh-IL-1 β (30 ng/mL) für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von CHQ (20 μ M) stimuliert. Die Freisetzung von (A) IL-6 und (B) IL-23 wurde in den jeweiligen Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den jeweiligen Mittelwert + SEM (n=3). (C) Die Zellen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/mL) bzw. rh-IL-1 β (30 ng/mL) und Brefeldin A für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von CHQ (20 μ M) stimuliert und anschließend die intrazelluläre Produktion von IL-6 und IL-12p40 mittels 2-Farben-Durchflusszytometrie analysiert. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Die vorliegenden Resultate verweisen auf eine wichtige regulatorische Aktivität der Autophagozytose auf die immunologische Funktionalität epidermaler LC und dermalen DC. Eine selektive Inhibition der Prozesse später Phasen der Autophagie geht mit einer Dysregulation der Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren einher. Die damit verbundene Modulation der Produktion und Sekretion Th1- bzw. Th17-abhängiger Zytokine besitzt womöglich einen direkten Einfluss auf die Regulation unterschiedlichster immunologischer Prozesse und damit vermutlich auch auf die Pathogenese chronisch-inflammatorischer Hauterkrankungen.

3.3 Die *in vitro* Generierung von Hautmodellen mit integrierten MoLC

Die Entwicklung humaner Hautmodelle als Alternativsystem zur prädiktiven Analyse sensibilisierender Stoffe beruht auf der Integration unreifer LC in ein rekonstruiertes Vollhautäquivalent. Epidermale LC sind essentieller Bestandteil der Vermittlung einer adaptiven Immunantwort und ermöglichen somit die Identifizierung sensibilisierender Moleküle sowie deren Unterscheidung zu irritativen Noxen. Voraussetzung für die Richtigkeit solch eines Testsystems ist der vergleichbare Aufbau der rekonstruierten Vollhaut im Vergleich zu humaner Haut sowie die vollständige und umfassende funktionelle Charakterisierung der eingesetzten Immunzellen.

Aufgrund der langjährigen Erfahrung und Expertise der Arbeitsgruppe konnte bereits die grundlegende Entwicklung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Hautäquivalents etabliert werden, dessen morphologischer Differenzierungsstatus bereits den gewünschten Anforderungen entsprach. Darüber hinaus dienten die neu etablierten Methodiken zur Isolierung humaner CD14⁺ Monozyten aus humanem Blut sowie deren anschließende *ex vivo* Differenzierung in CD1a⁺CD207⁺CD324⁺TROP-2⁺Axl⁺ MoLC, der Generierung allogener Äquivalente epidermaler LC. Die weitreichende Charakterisierung dieser Zellen bestätigte dabei bereits ihren unreifen Phänotyp, wobei die nachfolgende Analyse ihrer jeweiligen Funktionalität gegenüber mikrobiellen und pro-inflammatorischen Stimuli eine hohe Übereinstimmung zu entsprechenden *in vivo* Beobachtungen primärer LC aufwies.

Gemäß der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Methodik zur Integration unreifer MoLC in *in vitro* generierte humane Vollhautäquivalente etabliert, mit der Zielsetzung der optimalen Verteilung der Zellen nach physiologischem Vorbild. Dies umfasste einerseits eine entsprechende Lokalisation der MoLC in suprabasalen Schichten der Epidermis sowie deren limitierte Zelldichte von 1 - 3 % aller epidermalen Zellen.

3.3.1 Integration *ex vivo* differenzierter MoLC in humane Vollhautmodelle

Der Nachweis einer erfolgreichen Integration unreifer MoLC in organotypische Vollhautäquivalente erfolgte über den direkten Vergleich der Distribution epidermaler LC in menschlicher Haut. Die operativ entfernte humane Abdominalhaut zeigte nach Anfertigung von Gewebs-Querschnitten und anschließender immunhistochemischer Fluoreszenzanalyse eine ausschließliche Lokalisation CD207⁺ LC in suprabasalen Schichten der Epidermis (Abb. 3-13, A).

Die genaue Analyse der intraepidermalen Lokalisation integrierter MoLC erfolgte teilweise nach vorheriger Inkorporation von CellTrackerTM (grün), was die direkte Detektion spezifischer Fluoreszenzsignale nach Anfertigung von Gefrierschnitten ermöglichte. Die Analyse entsprechender Querschnitte bestätigte den Verbleib grün fluoreszierender MoLC in rekonstruierter Epidermis (Abb. 3-13, A). Die genauere Betrachtung der Fluoreszenzsignale bestätigte zudem eine auffällige Morphologie der integrierten MoLC, welche analog der epidermalen LC in Humanhaut dendritenhafte Ausläufer aufwies und mit diesen ein auffallendes Netzwerk mit sich umgebenden Keratinozyten ausbildeten (siehe Pfeil). Obwohl die Detektion mittels CellTrackerTM eine einfache und sichere Wiederfindung der integrierten MoLC garantierte, zeigte die immunhistochemische Fluoreszenzanalyse der Expression von CD1a sowie CD207 keine ausreichende Signalstärke um die entsprechenden Zellen anhand der zellspezifischen Antigene zu detektieren. Der Einsatz enzymgekoppelter Sekundärantikörper ermöglichte jedoch aufgrund der individuell anzupassenden Einwirkzeit der Substratlösung eine Erhöhung der Sensitivität des Systems, sodass der Nachweis CD1a⁺ bzw. CD207⁺ Zellen in rekonstruierter Vollhaut anhand der Immunperoxidasefärbung in entsprechenden Querschnitten bestätigt werden konnte (Abb. 3-12, B, siehe Pfeile).

Trotz der überwiegenden Lokalisation der MoLC im *in vitro* generierten Epidermisäquivalent, zeigte sowohl die Fluoreszenzdetektion durch CellTrackerTM Inkorporation als auch die Sichtbarmachung der Zellen mittels immunhistochemischer Peroxidasefärbung keine vollständige Beschränkung der Distribution in suprabasalen Schichten. Der Nachweis spezifischer Signale unterhalb der dermoepidermalen Verbindungszone (siehe Linie) lässt daher auf eine spontane Migration der MoLC aufgrund partieller Aktivierung während der Kulturdauer schließen. Dessen ungeachtet bestätigten die Ergebnisse die intraepidermale Verteilung der integrierten MoLC entsprechend der physiologischen Distribution, wobei auch die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes über LC-typische Zellausläufer nachgewiesen wurde.

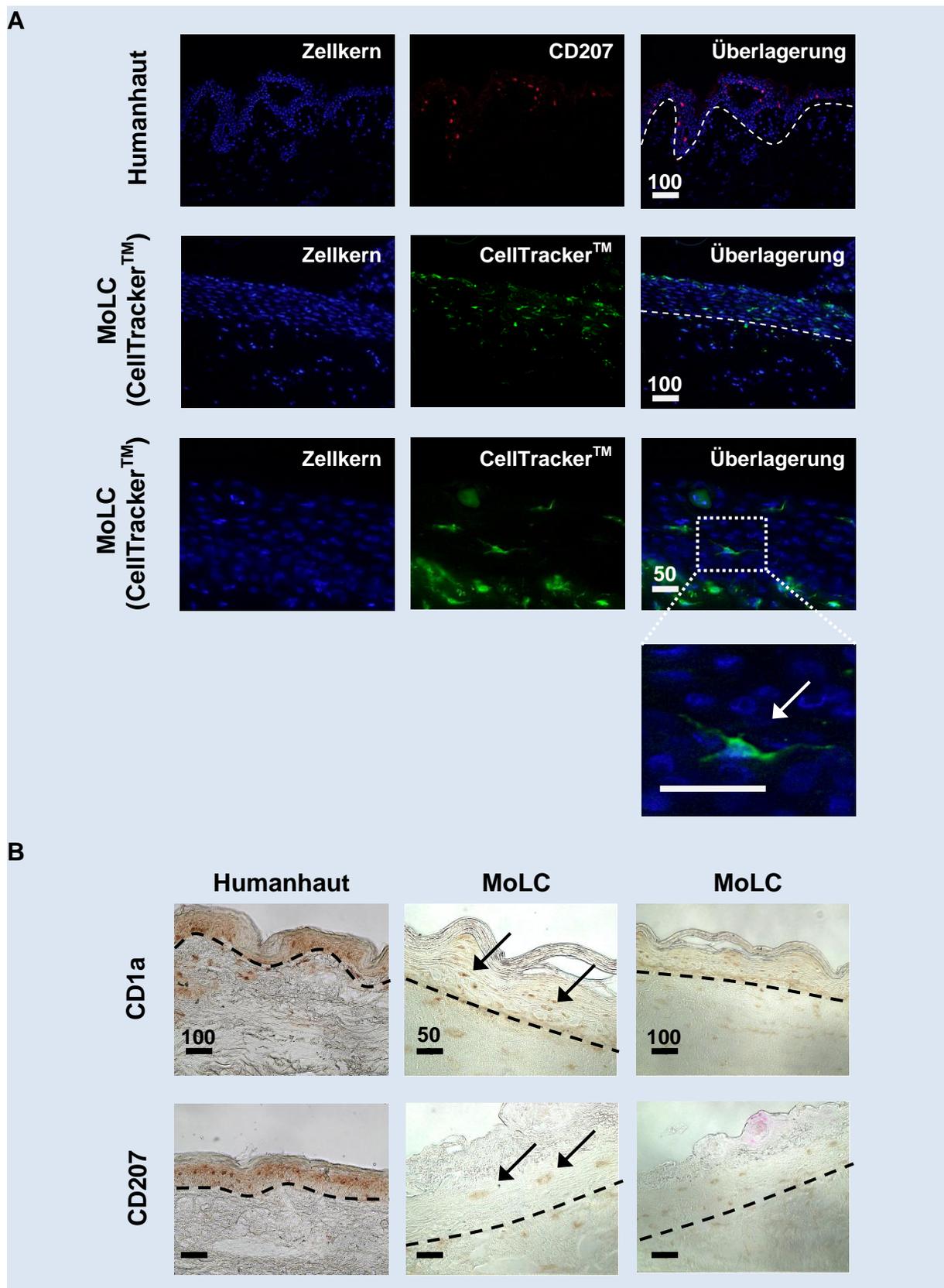


Abbildung 3-13: Lokalisation integrierter MoLC in suprabasalen Schichten rekonstruierter Vollhautmodelle. (A) Die immunhistochemische Fluoreszenzanalyse operativ entfernter Abdominalhaut bestätigte die ausschließliche Lokalisation CD207⁺ LC (rot) in der Epidermis. Unreife MoLC zeigen nach Inkorporation von CellTracker™ (grün) charakterisierende Morphologie aufgrund dendritenhafter Ausläufer und sind überwiegend in suprabasalen Schichten detektierbar. Nukleinsäuren in Zellkernen wurden mittels DAPI

(blau) visualisiert. (B) Die Immunperoxidasefärbung zeigte die alleinige Expression des Antigens CD207 in humaner Epidermis, wohingegen LC und dermale DC mittels Anti-CD1a Antikörper visualisiert wurden. Auch integrierte MoLC bestätigten die Expression LC-typischer Oberflächenmarker CD1a und CD207. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Maßstabsbalken: in μm .

3.3.2 Verteilung der integrierten MoLC nach physiologischem Vorbild

Die vergleichende Betrachtung einzeln angefertigter Gewebs-Querschnitte *in vitro* generierter Vollhautäquivalente bestätigte die Lokalisation unreifer MoLC in suprabasalen Schichten der Epidermis. Um darüber hinaus die homogene Integration der *ex vivo* differenzierteren Immunzellen gemäß der physiologischen Verteilung zu bestätigen, wurden die Hautäquivalente mittels horizontaler Aufsicht analysiert. Hierzu ermöglichte erneut die vorherige Inkorporation von CellTrackerTM (grün) die direkte Detektion spezifischer Fluoreszenzsignale integrierter MoLC. Zunächst diente die Anfertigung von Längsschnitten durch die Epidermis humaner Vollhautbiopsien sowie deren nachträgliche immunhistochemische Fluoreszenzanalyse der Visualisierung CD207⁺ LC (Abb. 3-14, A). Die analoge Analyse der rekonstruierten Epidermis gelang nach einfacher Aufsicht durch das gesamte Hautmodell hindurch bzw. nach vorheriger Separation des Dermisäquivalents. Die Analyse bestätigte dabei erneut die auffallende Morphologie der integrierten MoLC sowie deren annähernd übereinstimmende Quantität, im optischen Vergleich zu den betrachteten Gewebs-Längsschnitten humaner Haut.

Die Möglichkeit der manuellen Ausrichtung des *in vitro* generierten Hautmodells und der anschließenden Aufnahme mehrerer Fluoreszenzbilder anhand eines vordefinierten Musters, erlaubte eine künstlich-perspektivische Übersicht, um das Verteilungsmuster der integrierten MoLC näherungsweise abzuschätzen. Um eine einfache Detektion der Zellen zu ermöglichen wurde erneut eine horizontale Aufsicht durch das gesamte Hautäquivalent gewählt, wobei eine nahtlose Bildfolge eines Bereiches von ca. 2,25 mm Breite und 1,95 mm Höhe generiert werden konnte. Die Fluoreszenzanalyse spezifischer Signale mittels CellTrackerTM (grün) markierter MoLC bestätigte deren Verteilung in der äußeren Peripherie sowie in weiter innenliegenden Bereichen des Hautmodells, wobei annähernde Homogenität der Distribution gegeben war (Abb. 3-14, B). Die genauere Betrachtung eines beliebigen Bereiches innerhalb des Hautmodells zeigte neben fluoreszierenden MoLC mit auffallend uneinheitlicher Morphologie (*siehe Pfeile*) auch das Vorhandensein apoptotischer Strukturen geringerer Größe, was auf ein partielles Absterben der integrierten Immunzellen hindeutet. Unabhängig davon gelang durch die erstmalig etablierte Methodik der Integration unreifer MoLC in *in vitro* generierte Vollhautmodelle deren homogene Verteilung nach physiologischem Vorbild.

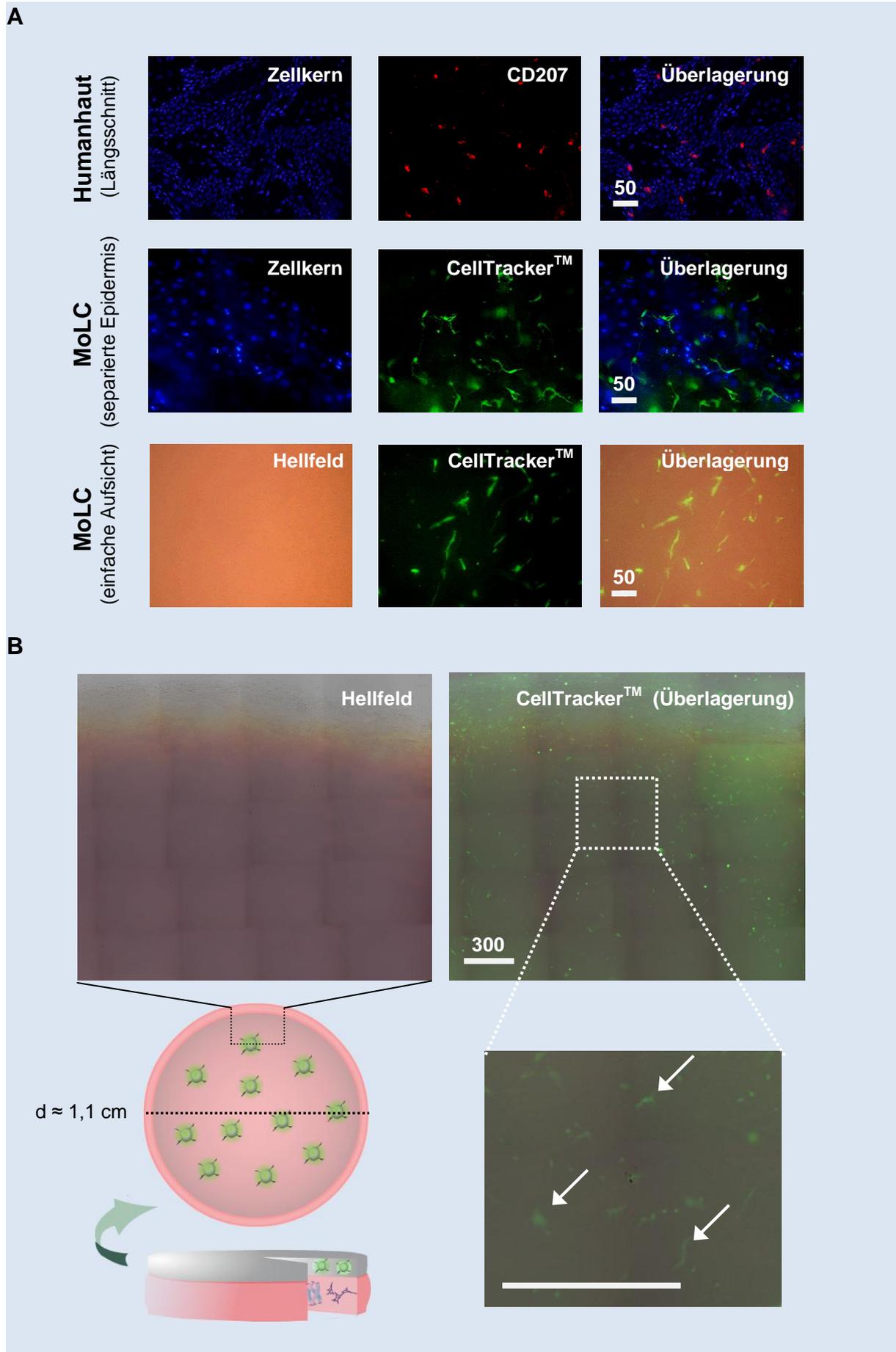


Abbildung 3-14: Homogene Verteilung integrierter MoLC in rekonstruierten Vollhautmodellen. (A) Die immunhistochemische Fluoreszenzanalyse von Längsschnitten humaner Abdominalhaut diente der Visualisierung CD207⁺ LC (rot) in der Epidermis. Die horizontale Aufsicht separierter Epidermis bzw. der gesamten Vollhautmodelle bestätigte die zelltypische Morphologie unreifer MoLC (grün) sowie deren optisch vergleichbare Zelldichte in Relation zum physiologischen Vorkommen. Nukleinsäuren in Zellkernen wurden mittels DAPI (blau) visualisiert. (B) Die Anfertigung einer Bildfolge gemäß vorgefertigter Aufnahmemuster erlaubte die Abschätzung der Homogenität der Zellverteilung im Vollhautmodell. Die dargestellten Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Maßstabsbalken: in μm .

Die Etablierung einer Methode zur Entwicklung *in vitro* generierter Hautmodelle mit integrierten MoLC erwies sich als höchst anspruchsvoll und bedurfte der exakten Koordinierung unterschiedlichster Prozesse der Zelldifferenzierung und -kultivierung sowie der stetigen Anpassung und Überprüfung modellabhängiger Parameter. Neben der homogenen Verteilung der Immunzellen und ihrer intrepidermalen Lokalisation wird zukünftig auch ihre immunologische Funktionalität charakterisiert.

4. Diskussion

4.1 Inflammatorische Einflüsse modulieren die immunologische Funktionalität *ex vivo* generierter DC Populationen

Humanen DC obliegt die einmalige Aufgabe die Prozesse der angeborenen mit denen der erworbenen Immunität zu verknüpfen. Die Detektion von mikrobiellen Pathogenen führt zu einem komplexen Prozess der Zellreifung sowie Migration aus der Peripherie in regionale Lymphknoten, in der die aktivierten DC als professionelle APC fungieren und eine adäquate T-Zell-Antwort induzieren können. Inwiefern die verschiedenen Subtypen auf die Vielzahl unterschiedlicher, potentiell schädigender Einflüsse reagieren, wird von ihrer spezifischen Expression essentieller PRR sowie von der jeweiligen Lokalisation im menschlichen Körper festgelegt. Die Haut ist hier im besonderen Maße pathogenen Belastungen von Außen ausgesetzt und weist daher ein komplexes Netzwerk dermalen DC sowie epidermalen Langerhans Zellen auf, welche die Funktionalität des kutanen Immunsystems verantworten.

Studien versuchen seither durch gezieltes Ansprechen der Pathogen-erkennenden Rezeptoren die Beteiligung unterschiedlicher Subpopulationen an der Initiation und Koordinierung von Immunreaktionen in der menschlichen Haut detailliert zu charakterisieren und postulierten bereits, dass die attenuierte Reaktivität epidermalen LC gegenüber bakteriellen Mikroben die Integrität der kommensalen Hautflora garantiert. Inwiefern diese Studien das immunologische Verhalten unter akut- bzw. chronisch-entzündlichen Bedingungen beschreibt bleibt jedoch umstritten, da eine gestörte Barrierefunktion geschädigter Haut das Eindringen pathogener Organismen erleichtert und darüber hinaus die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine aus umgebenden Keratinozyten bzw. Fibroblasten fördert, welche ihrerseits immunmodulatorisch auf die Funktionalität der DC wirken können [299]. Die Erforschung der Reaktivität humaner DC in pathologisch veränderter bzw. entzündeter Haut ist aufgrund ethischer Aspekte und der Schwierigkeit der Isolation unreifer DC Typen aus erkrankten Hautbiopsien nachweislich problematisch, wodurch zunehmend auf Studien an induzierten Krankheitsmodellen in genetisch modifizierten Mäusen zurückgegriffen wird. Aufgrund physiologischer Unterschiede in der Ontogenität, Phänotypisierung und spezifischen Verteilung verschiedener DC Populationen in muriner Haut erscheint die Übertragbarkeit ihrer distinktiven Reaktivität auf das menschliche Immunsystem jedoch zunehmend fragwürdig [300, 301]. Die grundlegende Betrachtung der Immunogenität unterschiedlicher mikrobieller Antigene in An- bzw. Abwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine durch *in vitro* Stimulation generierter humaner DC Populationen ermöglicht die differenzierte Analyse ihrer Pathogenität und gibt näherungsweise Aufschluss über die mögliche Beteiligung epidermalen LC und DDC an chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen.

Bezugnehmend auf die bereits nachgewiesene Variabilität der Expression unterschiedlicher Pathogen-erkennender Rezeptoren in unterschiedlichen DC Subtypen sowie der daraus resultierenden Diversität ihrer immunologischen Funktionalität, wurden im Rahmen dieser Arbeit humane Äquivalente aus primären CD14⁺ Monozyten differenziert. Tatsächlich resultierten die neu etablierten Protokolle in der Generierung verschiedener DC Populationen *ex vivo*. Die umfangreiche Phänotypisierung bestätigte dabei einen ausreichenden Differenzierungsgrad der MoDC bzw. Langerhans-ähnlichen Zellen nach physiologischem Vorbild und ermöglichte die selektive Stimulation mit diversen mikrobiellen TLR Agonisten allein, oder in Kombination mit Entzündungsmediatoren. Der Zusatz an TNF- α und IL-1 β diente hierbei der Simulation eines präsenten Entzündungsgeschehens, welches charakterisiert ist durch eine erhöhte Konzentration an pro-inflammatorischen Zytokinen. Der phänotypische und funktionelle Reifungsgrad der stimulierten DC sowie die damit assoziierten Modulationen im Sekretionsprofil immunregulatorischer Zytokine bzw. in der Kapazität der Chemokin-abhängigen Migration, diente dem Nachweis einer möglichen Veränderung ihrer immunologischen Funktionalität.

4.1.1 Bakterielle Stimuli induzieren Unterschiede im Reifungsgrad von DC Subtypen

In Übereinstimmung mit der selektiven Reaktivität epidermaler LC gegenüber bakteriellen Antigenen *in vivo*, zeigten MoLC nach 24 stündiger Aktivierung mit Pam₃CSK₄ bzw. LPS eine nur nominelle Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine sowie eine geringe Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Oberflächenrezeptors CD83. Die attenuierte Immunität wurde bereits in früheren Studien mit der fehlenden Expression an TLR2, 4 und 5 begründet, wobei auch hier gezeigt werden konnte, dass sich im Zuge der Differenzierung *ex vivo* die Oberflächenlevel an TLR2 und TLR4 reduzierten [64, 65]. Auch das individuelle Genprofil der MoLC bestätigte eine geringe Transkriptionsrate dieser Rezeptoren. Demgegenüber zeigten MoDC trotz geringer Expressionsrate an TLR2 und TLR4 eine hohe Reaktivität gegenüber bakteriellen Stimuli allein bzw. in Kombination mit Entzündungsmediatoren. Die jeweiligen Unterschiede in der immunologischen Aktivität unreifer MoDC und MoLC nach Stimulation mit Pam₃CSK₄ oder LPS ist demnach nicht ausschließlich auf eine geringe Expressionsrate an individuellen PRR zurückzuführen, sondern in zwingendem Maße auch auf die unzureichende Aktivierung spezifischer Signaltransduktionswege, bzw. derer regulatorischen Proteine [302]. Dieser Effekt ist möglicherweise direkt mit dem Einfluss des kritischen Wachstumsfaktors TGF- β verbunden, dem Schlüsselzytokin der Differenzierung in Langerhans Zellen, da bereits gezeigt werden konnte, dass hierdurch die Aktivierung der p38 MAPK inhibiert und somit die Empfindlichkeit

der DC gegenüber diverser Stimuli erniedrigt wird [303]. Die Expression von TGF- β reguliert die Differenzierung und Re-Epithalisierung der Keratinozyten in humaner Epidermis und besitzt möglicherweise protektive Bedeutung für Langerhans Zellen, welche aufgrund ihrer besonderen Lokalisation in der äußersten Grenzschicht der Haut einer Vielzahl von Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Zukünftige Studien dienen daher der genauen Analyse der molekularen Mechanismen einer möglichen Beeinflussung TLR-abhängiger Signalwege durch die Aktivität LC spezifischer TGF- β Rezeptoren.

4.1.2 TNF- α und IL-1 β erhöhen die Reaktivität von LC gegenüber LPS

Umgebende Keratinozyten und dermale Fibroblasten vermögen im Falle verletzender bzw. schädigender Noxen die Freisetzung von Alarminen zu induzieren und vermitteln somit die Stimulation epidermaler LC trotz der postulierten Effekte von TGF- β . Ebenso demonstrierte die vorliegende Arbeit substantielle Unterschiede des zellulären Reifungsprozesses in Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine. Hier resultierte die Aktivierung mit LPS in einem verstärkten phänotypischen Reifegrad der MoLC und erhöhte in beiden Subtypen die spezifische Kapazität zur Produktion bzw. Sekretion Th1- und Th17-abhängiger Zytokine. Die Aktivierung in Gegenwart der Entzündungsmediatoren TNF- α und IL-1 β induziert vermutlich einen zentralen Prozess der Kreuzregulation unterschiedlichster Rezeptor-vermittelter Signaltransduktionswege, inklusive derer der TLR4-abhängigen Aktivierung durch LPS. Möglicherweise forciert die Interaktion spezifischer Signalmoleküle eine bereits bestehende Vermittlung angeborener bzw. adaptiver Immunreaktionen und konvertiert etwaige Prozesse der Toleranzentwicklung durch MoLC in Mechanismen der funktionellen Immunität. Tatsächlich weist die IL-1 Rezeptorfamilie molekulare Homologien zu TLR2/1 bzw. TLR4-abhängigen Signaltransduktionswegen auf und vermittelt die Transkription pro-inflammatorischer Mediatoren [298]. Obwohl die extrazelluläre Region der TLR charakteristische Leucin-reiche Domänen aufweist und die der IL-1 Rezeptoren eher eine Immunglobulin-ähnliche Struktur besitzt, existieren signifikante Gemeinsamkeiten in der jeweiligen zytoplasmatischen Rezeptorregion [304]. Diese als TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*) Domäne bekannte Struktur ist entscheidend für die adäquate Signalweiterleitung, da diese nach Aktivierung des Rezeptors die Mobilisierung von spezifischen Adaptermolekülen vermittelt und somit die nachfolgenden Signalkaskaden initiiert. Dies lässt eine zentrale Rolle für gemeinsame Rezeptor-abhängige Adaptermoleküle vermuten, deren regulatorische Aktivität über unterschiedliche Signalwege die Phosphorylierung vielfältiger Transkriptionsfaktoren und Effektorproteine vermitteln, die mit dem Prozess der Zellreifung assoziiert sind (*Abb.: 4-1*). Eine genaue Analyse der molekularen Mechanismen ist jedoch essentiell, um die postulierten Interaktionen zu bestätigen, wobei die bisherigen Ergebnisse

Peripherie in lymphatische Gewebe, mit dem Ziel eine adäquate T-Zell-Antwort auszulösen. Hierbei entscheidend ist die Expression des Chemokinrezeptors CCR7, welcher die gerichtete Wanderung aktivierter DC über abwärtsgerichtete Lymphbahnen in den Parakortex der Lymphknoten vermittelt und somit den direkten Kontakt mit naiven T-Zellen erlaubt. Der phänotypische Reifungsgrad sowie das Ausmaß der Migration unterscheidet dabei die immunologische Aktivität der DC während der Vermittlung peripherer Toleranz unter physiologischen Bedingungen sowie nach Antigenkontakt, mit dem Ziel der Initiation einer potenten adaptiven Immunantwort. Kritischer Regulator dieses komplexen Migrationsprozesses ist hierbei das regulative Chemokin CCL21, welches als Ligand des Chemokinrezeptors CCR7 fungiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht das individuelle Wanderungsverhalten mit Hilfe einer sich der *in vitro* Stimulation anschließenden Migrationsstudie zu analysieren. Entsprechend früherer Studien, welche das Erscheinen dermalen DC in lymphoiden Geweben bereits ein bis zwei Tage nach Antigenkontakt dokumentierten [305], zeigen MoDC nach 48 stündiger Aktivierung mit Pam₃CSK₄ bzw. LPS eine hohe Kapazität der gerichteten Migration entlang eines künstlichen rh-CCL21-vermittelten Chemokingradienten. Dieser Prozess erschien hierbei unabhängig von simultanen inflammatorischen Einflüssen durch TNF- α und IL-1 β , was erneut die Bedeutsamkeit dermalen DC in der spezifischen Abwehr invasiver Mikroben der menschlichen Haut unterstreicht. Darüber hinaus bestätigt die geringe migratorische Kapazität stimulierter MoLC das kürzlich postulierte Konzept eines Zweischritt-Migrationsmodells epidermalen LC *in vivo*, nachdem die initiale Wanderung aktivierter LC in Abhängigkeit zu der Expression des spezifischen Chemokinrezeptors CXCR4 steht und die Migration in dermale Schichten vermittelt. Das primäre Verweilen in der Dermis dient möglicherweise der Übertragung aufgenommener Antigenfragmente auf DDC, womit die induzierte Immunantwort amplifiziert und analog der hohen migratorischen Kapazität stimulierter DC übergangslos initiiert würde [101]. Entsprechend der Theorie einer gestaffelten Auswanderung aktivierter LC erscheinen diese nämlich erst frühestens vier bis fünf Tage nach Antigenkontakt in lymphoiden Geweben.

Die zeitliche Abhängigkeit der Expression spezifischer Chemokinrezeptoren nach 24 bzw. 48 stündiger Stimulation zeigte sich in der Analyse der Oberflächenlevel von CXCR4 und CCR7 in aktivierten MoLC. Ihre geringe Expressionsrate in unstimulierten MoLC kennzeichnete zunächst deren unreifen Phänotyp. Auch die Stimulation mit bakteriellen TLR Liganden allein bzw. in Kombination mit pro-inflammatorischen Zytokinen resultierte trotz der vorher beschriebenen Diversität der phänotypischen und funktionellen Reifegrade in einer nur sehr geringen Erhöhung der Expression beider Chemokinrezeptoren, wodurch sich die geringere migratorische Kapazität der MoLC in der *in vitro* Migrationsstudie bestätigte. Diese Beobachtung unterstreicht die postulierte Latenz der Auswanderung epidermalen LC im

Vergleich zu DC *in vivo*, und zeigt zusätzlich, dass die simultane Stimulation der MoLC mit LPS, TNF- α und IL-1 β trotz der induzierten Expression kritischer Reifungsmarker und einer Erhöhung der Sekretion Th17-typischer Zytokine, keine unmittelbaren Auswirkungen auf die Wanderungsaktivität bzw. Chemokinrezeptorexpression hat. Dies lässt vermuten, dass im Gegensatz zu DDC, epidermale LC trotz substantieller Unterschiede des zellulären Reifungsprozesses in Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine keine substantielle Bedeutung in der Initiation einer primären Immunantwort gegen bakterielle Antigene besitzen, jedoch aufgrund der erworbenen funktionellen Immunität entscheidende immunregulatorische Prozesse zu späteren Zeitpunkten der Abwehrreaktion beeinflussen.

4.1.4 Die CD40L/CD40-Interaktion als Regulator peripherer Toleranz und Immunität

Im Gegensatz zur Stimulation mit mikrobiellen Antigenen, vermittelt die Aktivierung der MoLC mit CD40L, dem aktivierenden Signal stimulierter T-Lymphozyten, eine moderate Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 nach 24 bzw. 48 Stunden. Das CD40L/CD40 System repräsentiert eines der über 40 Ligand-Rezeptor-Systeme der TNF-Superfamilie und ist essentieller Faktor in der Initiierung adaptiver Immunantworten durch direkte Interaktion aktivierter T-Zellen mit APC. Die Regulation der migratorischen Kapazität durch Ligation des CD40 Rezeptors auf DC wurde bereits beschrieben und manifestiert sich als funktionale Verbindung der angeborenen sowie adaptiven Immunität [306]. Die Frage nach der immunologischen Relevanz des CD40L/CD40 Systems fokussiert sich auf die endogenen Quellen CD40L-exprimierender bzw. -sezernierender Zellen in humaner Haut. CD4⁺ sowie in geringerem Umfang auch CD8⁺ T-Lymphozyten erscheinen als offensichtlichste Option, da diese nach Kontakt mit professionellen APC hohe Mengen an CD40L auf ihrer Oberfläche exprimieren, jedoch sind diese weder in gesunder Haut noch während der Initiation einer adaptiven Immunantwort in ausreichendem Maße präsent. Daher reduziert sich der mögliche Einfluss aktivierter CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen auf epidermale LC zu späteren Zeitpunkten der Immunreaktion, vermutlich als Konsequenz einer vorherigen Stimulation durch DDC, den postulierten Initiatoren einer primären Immunantwort. Während LC hierdurch erneut hauptsächlich als Regulatoren einer bereits anlaufenden Immunreaktion beschrieben werden, verbleibt weiterhin die Möglichkeit der Interaktion mit gewebsspezifischen γ/δ T-Zellen, die anders als die klassischen, rezirkulierenden α/β T-Lymphozyten, einen TCR aus γ - und δ -Untereinheiten exprimieren. Da die natürlichen Liganden der γ/δ TCR bisher noch weitestgehend unbekannt sind, ist auch deren spezifische Funktion nicht vollständig aufgeklärt, jedoch erscheint die nachgewiesene Expression des

CD40L, nach spezifischer Aktivierung der T-Lymphozyten, eine direkte Beeinflussung epidermaler LC zu ermöglichen [307].

Darüber hinaus exprimieren Mastzellen signifikante Mengen an CD40L auf ihrer Oberfläche und kommen in geringer Menge auch in gesunder Haut vor [308]. Zudem speichern Mastzellen hohe Mengen an TNF- α , einem Entzündungsmediator, welcher die Reifung epidermaler LC nach Antigenkontakt forcieren kann. Diesbezüglich zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit auch, dass die Stimulation mit CD40L allein neben der verstärkten Expression diverser Chemokinrezeptoren, zu einem erhöhten Level an Reifungsmarker CD83 und kostimulatorischem Molekül CD86 auf der Oberfläche aktivierter MoLC führt. Trotz der Förderung eines phänotypischen Reifungsgrads, bedarf die Induktion der Freisetzung immunregulatorischer Zytokine jedoch eines vorherigen Antigenkontakts der DC [109, 110].

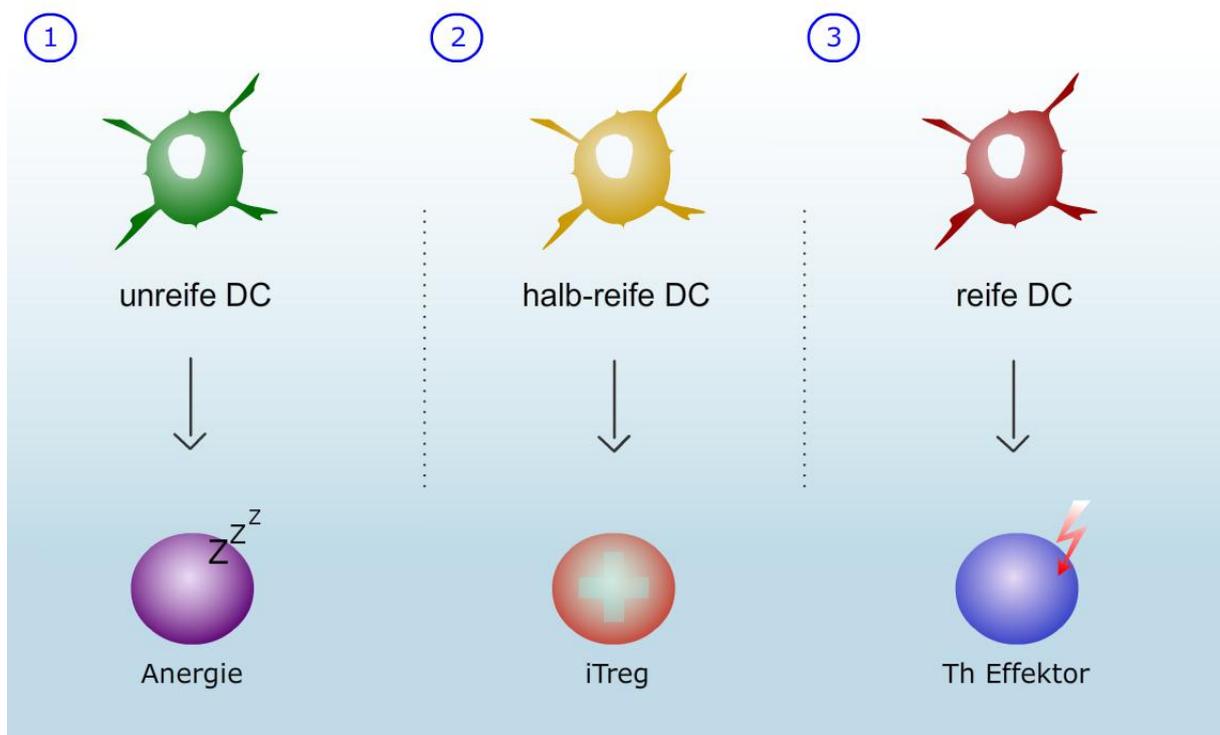


Abbildung 4-2: Übersicht der spezifischen immunregulatorischen Funktionalität humaner DC. Während DC nach konventionellem Antigenkontakt einen komplexen Reifungsprozess erfahren und sich in ihrer immunologischen Funktionalität eindeutig von unreifen Zellen unterscheiden, nehmen DC im halb-reifen Zustand eine phänotypische und funktionelle Zwischenstellung ein. Trotz erhöhter Expression von Reifungsmarkern und verstärkter Migration in lymphatische Gewebe, setzen halb-reife DC keine pro-inflammatorischen Zytokine frei. *In vivo* Beobachtungen assoziieren halb-reife DC daher mit der Regulation der spezifischen Immuntoleranz.

Die alleinige Ligation des CD40 Rezeptors simuliert demnach eine mögliche Interaktion epidermaler LC bzw. dermalen DC mit unstimulierten CD40L-exprimierenden Zellen in gesunder Haut. Die Resultate dieser selektiven Aktivierung *in vitro* beschreiben einen spezifischen funktionellen Status der Zellen, welcher sich durch die verstärkte Präsentation von Antigenen bei gleichzeitig erhöhter migratorischer Kapazität auszeichnet, ohne dabei jedoch durch Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine die Aktivierung effektorischer T-Zellen zu induzieren. MoDC und MoLC in diesem „halb-reifen“ (*semi-mature*) Zustand besitzen vermutlich wichtige tolerogene Eigenschaften und unterscheiden sich in ihrer immunologischen Funktionalität von aktivierten Zellen nach konventionellem Antigenkontakt (Abb.: 4-2) [309, 310]. Die Induktion halb-reifer DC konnte bereits für einige Stimuli, wie bspw. nicht-pathogene Lactobacillus-Arten der Darmflora, beschrieben werden, wobei die Entwicklung und Reifung spezifischer Treg aktiv vermittelt wurde [311]. Möglicherweise ist die Interaktion epidermaler LC bzw. DDC mit CD40L-exprimierenden Zellen in gesunder Haut ein wichtiger regulativer Faktor für die Erhaltung der peripheren Toleranz.

4.1.5 DC vermitteln angeborene und adaptive Prozesse der anti-viralen Immunität

Die spezielle Lokalisation der Langerhans Zellen in der humanen Epidermis ermöglicht es ihnen frühzeitig eindringende Pathogene zu detektieren und eine adäquate Immunantwort auszulösen. Die bereits beschriebenen Reaktionen gegenüber bakteriellen TLR-Agonisten verdeutlichen jedoch, dass LC eine hohe Selektivität bezüglich der Antigenerkennung aufweisen und die Art der nachfolgenden tolerogenen oder immunogenen Mechanismen von multiplen Faktoren determiniert wird. Bezüglich der Aktivität gegenüber viralen Antigenen postulierten einige Studien bereits, dass humane LC als potente Initiatorer adaptiver Immunreaktionen fungieren und die Aktivierung Antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten vermitteln. Während LC demnach kommensale Bakterien ignorieren, erweisen sie sich, verglichen mit DDC, als überlegen in der Regulation der anti-viralen Immunität [144, 283]. Um die Reaktivität der *ex vivo* generierten MoDC und MoLC gegenüber viralen Antigenen zu beurteilen, diente poly(I:C), ein synthetisches Analogon doppelsträngiger Nukleinsäuren, welches über den endosomalen TLR3 erkannt wird. Tatsächlich bestätigen die Ergebnisse eine vorrangige Antigenerkennung durch MoLC, wobei neben der erhöhten Expression von CD83 und CD86 auch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zunahm. MoDC dagegen verstärkten hauptsächlich die Genexpression von TLR3, wodurch zwar die spezifische Detektion des Liganden bestätigt werden konnte, die Stimulation jedoch nicht in einem analogen Reifungsprozess resultierte. Darüber hinaus zeigten MoDC auch keinen Anstieg der migratorischen Kapazität, wie dies nach Stimulation mit bakteriellen

Antigenen beobachtet wurde. Erscheint diese attenuierte Reaktivität zunächst unerwartet, bestätigte sie doch das spezifische Transkriptionsprofil der jeweiligen TLR. Während MoDC eine hohe Genexpression von TLR1, 2 und 4 aufwiesen, zeigten MoLC höhere TLR3 mRNA Level, was vermutlich die geringe Reaktivität der MoDC in Anwesenheit von poly(I:C) erklärt. Darüber hinaus beschränkte sich die Analyse des phänotypischen Reifegrades der Zellen sowie der Produktion und Sekretion immunregulatorischer Zytokine auf eine maximale Stimulationsdauer von 24 Stunden bei Verwendung einer einzigen Konzentration des Antigens gemäß Herstellerangaben. Die beschriebene Induktion der TLR3 mRNA Level in aktivierten MoDC spricht jedoch für eine verzögerte Reaktion im Vergleich zu MoLC, welche bereits eine maximale Stimulation erfahren. Zukünftige Versuche werden daher evaluieren inwiefern die Dauer der Aktivierung sowie die Konzentration an eingesetztem Stimulus die Reaktivität der MoDC beeinflussen.

Eine erste Bestätigung für die verzögerte Induktion adaptiver Immunität durch MoDC ist die initial verstärkte Transkription anti-viraler Typ 1 Interferone: IFN- α und IFN- β . Diese primär unspezifisch wirkenden Signalmoleküle des angeborenen Immunsystems erleichtern den Abbau virusinfizierter Zellen, wonach dermale DC anfänglich eine lokale Verbreitung der Viren verhindern. Möglicherweise geschieht dies in Synergie mit plasmazytoiden DC, welche zur Produktion hoher Mengen an Typ 1 Interferonen befähigt sind [15, 288]. Auch MoLC zeigten eine erhöhte Genexpression von IFN- β und lassen somit eine direkte Beteiligung epidermaler LC an der primären Abwehr viraler Pathogene vermuten. Im Gegensatz dazu induzierte die Aktivierung mit poly(I:C) in Kombination mit TNF- α und IL-1 β u.a. die Freisetzung von IL-12p70 und IFN- γ durch MoLC, wohingegen MoDC die Produktion und Sekretion der Th17-abhängigen Zytokine IL-6 und IL-23 signifikant steigerten und eine erhöhte migratorische Kapazität aufwiesen. Erneut zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich die funktionellen Charakteristika beider *ex vivo* generierten Subtypen durch den Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine partiell konvertieren. Ständen bei MoDC zunächst Reaktionen der angeborenen Immunantwort im Vordergrund, sind diese nun auch an Mechanismen der erworbenen Immunität beteiligt. Auch die negative Regulation der TLR3 mRNA Level in Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine deutet auf eine veränderte Reaktivität und Funktionalität beider Zelltypen hin. MoLC bestätigen ihre postulierte Überlegenheit in der Abwehr viraler Antigene und zeigten unter entzündlichen Bedingungen eine Zunahme der Freisetzung definierter immunregulatorischer Zytokine. Die Ergebnisse favorisieren demnach epidermale LC als potente Initiatoren einer spezifischen, anti-viralen Immunantwort, wobei auch hier eine weiterführende Analyse der molekularen Mechanismen notwendig ist, um die beobachteten Unterschiede der immunologischen Funktionalität genauer zu charakterisieren.

4.1.6 Zusammenfassende Interpretation der Beobachtungen und Ausblick

Die bisherigen Daten bestätigen, dass die Vermittlung der immunologischen Toleranz gegenüber Bakterien der kommensalen Hautflora ein nachweisliches Charakteristikum der Funktionalität epidermaler LC darstellt. Ebenso reagieren MoDC als kritische Initiatoren einer primären Immunantwort nach einfachem Antigenkontakt und unterstreichen die Bedeutsamkeit dermalen DC in der Abwehr invasiver Bakterien. Auffallend erscheint jedoch, dass der gleichzeitige Einfluss inflammatorischer Stimuli diese funktionelle Diversität beider Subtypen nachweislich moduliert. Aufgrund der nun induzierten Freisetzung Th17-typischer Zytokine durch aktivierte LC sind diese vermutlich auch an der Aufrechterhaltung einer potenten Immunreaktion gegen bakterielle Antigene beteiligt. Darüber hinaus fungieren LC aufgrund ihrer Lokalisation in der Epidermis als potente Vermittler primärer Immunreaktionen gegen virale Pathogene. Das postulierte Zusammenwirken unterschiedlicher DC Populationen der Haut unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen definiert daher die Art der induzierten Immunreaktion und steht möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der Pathologie chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen.

Neuartige Behandlungsstrategien der Immuntherapie und Vakzinierung, mit dem Ziel eine potente Vermittlung Antigen-spezifischer Immunität zu induzieren, fokussieren sich auf eine gezielte intradermale Administration, um ein kontrolliertes Ansprechen kutaner DC Populationen zu erreichen [312]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass das Gelingen dieser neuartigen Methoden eine genaue Kenntnis über die jeweiligen Bedingungen am Applikationsort voraussetzt. Die Koadministration von Immunmodulatoren bzw. eine gezielte Gewebsverletzung kann die immunologische Funktionalität aktivierter DC potenzieren, bzw. die Vermittlung der Immuntoleranz nachhaltig konvertieren.

Tabelle 4: Kernaussagen der gezielten *in vitro* Stimulation von MoDC und MoLC.

Beobachtung	Aussage (Interpretation <i>in vivo</i>)
TLR Agonisten vermitteln selektive Reifungsprozesse	DC und LC weisen signifikante Unterschiede in ihrer Reaktivität gegenüber mikrobiellen Antigenen auf, wobei diese durch die jeweilige Funktionalität und Expression des jeweiligen TLR determiniert wird.
TNF-α und IL-1β modulieren die Immunantwort	Die Detektion mikrobieller Pathogene unter inflammatorischen Bedingungen konvertiert oder verstärkt die Reaktivität kutaner DC Populationen und ist evtl. bedeutsam für die Pathogenese entzündlicher Hauterkrankungen.
TLR3 induziert die angeborene und adaptive Immunität	DC und LC reagieren auf den synthetischen TLR3 Agonisten poly(I:C) mit der verstärkten Expression anti-viraler Typ 1 Interferone, wobei vornehmlich LC auch als potente Initiatoren einer adaptiven Th1-Antwort fungieren.

4.2 Chloroquin moduliert die Zytokinsekretion *ex vivo* generierter MoDC und MoLC

Umfassende Studien zur Entschlüsselung regulatorischer Signalwege der konservierten Prozesse der Autophagozytose trugen in den letzten Jahren dazu bei, ein genaueres Verständnis über die vielfältigen Mechanismen der zellulären Entwicklung, Differenzierung und Viabilität zu gewinnen. Eine zunehmende Anzahl an Studien verwies zudem auf eine bedeutende Interaktion immunregulatorischer Signalmoleküle und der Aktivität der Autophagie [223]. Essentielle, die Prozesse der Autophagozytose regulierende, Proteine steuern die Abwehr und zelluläre Degradierung invasiver Mikroorganismen oder modulieren die Produktion und Sekretion immunregulatorischer Mediatoren und nehmen damit direkten Einfluss auf die funktionelle Immunität humaner DC [188]. Diese umfasst die Erkennung, Internalisierung und Prozessierung pathogener Organismen und die nachhaltige Aktivierung Antigen-spezifischer Immunantworten durch effektorische oder tolerogene T-Lymphozyten.

Die neuen Hypothesen ergänzten die ebenfalls nachgewiesene Korrelation zwischen der Dysfunktionalität der Autophagie und der Pathogenese sowie Progression verschiedenster neurodegenerativer und chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit und Morbus Crohn [184, 185]. Inwiefern die molekulare Regulation der Autophagozytose die jeweiligen immunpathologischen Prozesse beeinflusst ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, jedoch fungieren Th1- und Th17-Zellen als wichtige Regulatoren der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen, wobei die Aktivierung und Differenzierung vornehmlich durch die Sekretion definierter Zytokine reguliert wird. Während IFN- γ und IL-12p70 die Entwicklung von Th1-Lymphozyten beeinflussen, gelten IL-1 β , IL-6 und TGF- β als kritische Faktoren der Induktion einer Th17-abhängigen Immunantwort, welche bspw. auch an der Pathogenese inflammatorischer Hauterkrankungen wie Psoriasis vulgaris beteiligt ist. Erkrankungen mit psoriatischem Phänotyp charakterisieren sich durch Hyperproliferation und abnormale Differenzierung epidermaler Keratinozyten und gehen mit einer erhöhten Produktion an IL-1 Zytokinen einher, deren Freisetzung nachweislich über die Aktivität der Autophagozytose in den beteiligten Zellen gesteuert wird [291, 313]. Veränderungen im Expressionsprofil immunmodulatorischer Zytokine weisen somit auch auf eine Dysregulation der Autophagie-assoziierten Mechanismen hin.

Basierend auf den Erkenntnissen der Vermittlung immunologischer Prozesse dienen daher Inhibitoren und Aktivatoren der Autophagozytose als nützliche Instrumente zur Evaluation Autophagie-bedingter Modulationen der angeborenen und adaptiven Immunität. Tatsächlich demonstriert die vorliegende Arbeit, dass der Zusatz lysosomotropher Agenzien zellspezifische Prozesse der Autophagozytose in *ex vivo* differenzierten MoDC und MoLC

selektiv unterdrückt und dies zu einer nachhaltigen Dysregulation der Zytokinfreisetzung führt bzw. eine potentielle Vermittlung adaptiver Immunantworten moduliert.

4.2.1 Inhibitoren der autolysosomalen Proteolyse erhöhen die IL-23 Sekretion in MoLC

Anhand der Einteilung in 1) Initiation der Autophagie, 2) Formation des Phagophors sowie der Autophagosomen und 3) Reifung zu Autolysosomen und anschließende enzymatische Proteolyse der eingeschlossenen Proteine, Proteinkomplexe sowie Organellen, bestätigten die vorliegenden Ergebnisse die Hemmung definierter Autophagie-abhängiger Prozesse in MoDC und MoLC durch Einsatz verschiedener Inhibitoren gemäß ihrer modulatorischen Qualität. Hierbei wurde eindrucksvoll demonstriert, dass die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine in direkter regulatorischer Abhängigkeit zur Funktionalität der Autolysosomen bzw. derer proteolytischen Enzyme steht. Die vorliegende Arbeit beweist eine distinktive Produktion sowie Sekretion von IL-12p70, IL-23 und IL-6 durch aktivierte MoDC und MoLC in An- bzw Abwesenheit des lysosomal alkalisierenden Aminochinolins Chloroquin. Die verringerte Sekretion von IL-12p70 durch aktivierte MoDC und MoLC steht in evidenter Übereinstimmung mit früheren Studien, welche den Einsatz von CHQ und Hydroxy-CHQ in Patienten mit rheumatoider Arthritis begründen. Diese beobachteten einen inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung Th1-typischer Zytokine durch humane CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten [292]. Die Kausalität der Assoziation einer veränderten Zytokinsekretion mit der Inhibition der Autophagie wird darüber hinaus durch Studien verdeutlicht, welche ebenfalls eine reduzierte Freisetzung von IL-12p70 in murinen bzw. humanen DC in Anwesenheit der Vps34 Inhibitoren 3-MA oder Wortmannin beobachten [291, 314]. Hierin wird zudem eine erhöhte Sekretion von IL-23 beschrieben, wohingegen das Freisetzungsprofil von IL-6 unverändert blieb. Im Gegensatz dazu demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Zytokinsekretion durch 3-MA, sondern ausschließlich in Präsenz definierter Inhibitoren der autolysosomalen Funktionalität.

Begründet werden kann die Diskrepanz der Beobachtungen aufgrund essentieller Unterschiede im jeweiligen experimentellen Aufbau. Beziehen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf humane MoDC sowie MoLC, finden Letztere in den beschriebenen Studien überhaupt keine Anwendung, überdies aber murine Äquivalente sowie monozytäre Vorläufer der THP-1 Zelllinie, mit jeweils phänotypischen und funktionellen Charakteristika humaner DC. Während die vorliegenden Resultate darüber hinaus die Autophagie-abhängige Modulation der Zytokinsekretion hauptsächlich nach Stimulation mittels pro-inflammatorischer IL-1 Zytokine beschreiben und sich diese Arbeit

somit auf eine immunologische und/oder inflammatorische Noxe fokussiert, verwendeten die erwähnten Studien ausnahmslos mikrobielle Antigene, wie den selektiven TLR4 Agonisten LPS, wodurch die Präsenz einer akuten Infektion simuliert wird. Obwohl IL-1 α und IL-1 β in direkter Assoziation mit den Prozessen der angeborenen Immunantwort gegen pathogene Mikroorganismen stehen, sind sie auch an der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Krankheiten mit „steriler“ Pathogenese beteiligt, welche durch endogene, metabolische oder exogene Gefahrensignale vermittelt werden und zu denen eine Vielzahl neurodegenerativer, sklerotischer sowie chronisch-entzündlicher Erkrankungen zählen [315]. Dennoch, die alternative Stimulation mit dem bakteriellen TLR Liganden Pam₃CSK₄ resultierte in einer erhöhten Freisetzung von IL-23 in beiden Subtypen und bestätigte demnach, analog der erwähnten Studien an humanen sowie murinen DC, eine distinktive Zytokinsekretion in Anwesenheit mikrobieller Stimuli bei gleichzeitiger Inhibition der Autophagie. Dieser Sachverhalt lässt eine grundlegende Diskrepanz TLR- sowie IL-1 Rezeptor-abhängiger Regulationsmechanismen vermuten und wird in nachfolgenden Kapiteln genauer diskutiert.

Ebenso sind die beobachteten Unterschiede in der Modulation der Zytokinsekretion nach Verwendung definierter Inhibitoren der frühen sowie späten Prozesse der Autophagie letztlich auf mögliche Nebeneffekte der eingesetzten Hemmstoffe zurückzuführen. Die lysosomale Alkalisierung durch CHQ und Hydroxy-CHQ bzw. die Hemmung der V-Typ H⁺-ATPasen in der Lysosomenmembran durch Bafilomycin A1 über Inkubationsdauern von mehr als 24 Stunden kann ebenfalls die Beeinflussung von Proteasomen, Endosomen sowie anderer zellulärer Strukturen zur Folge haben und somit vielfältige Modulationen diverser immunologischer Mechanismen begründen [249]. Ebenso besitzen Ph13K Inhibitoren, wie 3-MA oder Wortmannin potentiell hemmende Wirkung auf andere Enzymkinasen und interagieren dadurch gleichzeitig mit einer Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse [247]. Die fehlende Selektivität und Spezifität der verfügbaren Hemmstoffe der Autophagie macht eine eindeutige Interpretation der erwähnten Beobachtungen schwierig, jedoch sind bereits weiterführende Studien in Planung, um die potentielle Auswirkung unerwünschter Dysregulationen eindeutig zu charakterisieren und um zu klären, inwiefern die postulierten Nebeneffekte an der veränderten Zytokinsekretion beteiligt sind. Eine Möglichkeit der selektiven Inhibition molekularer Regulatoren der Autophagie bestünde in der Methodik der Gen-Interferenz unter Einsatz spezifischer siRNA (*small interfering RNA*). Jedoch gilt dieses spezielle Verfahren bei Verwendung von DC Populationen als problematisch, da die gezielte Applikation oftmals mit einer ungewollten Stimulation der Zellen einhergeht und eine selektive Betrachtung der Zellreifung nach Aktivierung mittels definierter Antigene daher unmöglich macht. Die hohe Expressionsrate an TLR8 in *ex vivo* generierten MoDC und MoLC dient dabei als exemplarisches Beispiel zur Verdeutlichung der eben erwähnten

Problematik, wobei die hierdurch vermittelte Erkennung viraler Einzelstrang-RNA und nachfolgende Induktion eines reifen Phänotyps bereits nachgewiesen wurde [316, 317].

4.2.2 Die erhöhte IL-23 Sekretion durch MoLC verschiebt die primäre Differenzierung naiver T-Zellen

Unabhängig der Resultate früherer Studien demonstriert diese Arbeit erstmals, dass die Stimulation *ex vivo* generierter MoLC mit IL-1 Zytokinen in Anwesenheit von CHQ, Hydroxy-CHQ oder Bafilomycin A1 in einer Erhöhung der Sekretion von IL-23 resultiert. Bezüglich der eingesetzten Konzentrationen an CHQ wurde eine dosisabhängige Regulation beobachtet, wobei der Höchstwert der Zytokinfreisetzung bei einer Konzentration von 20 μM erreicht war. Die Frage nach der therapeutischen Relevanz dieser Abhängigkeit fokussiert sich auf die erreichten Plasmaspiegel *in vivo* nach oraler Administration von CHQ bzw. der tatsächlichen Konzentration in humaner Epidermis nach systemischer Umverteilung des Arzneistoffs. In der Tat bestätigten frühere Studien bereits, dass CHQ aufgrund seines lysosomotropen Charakters in epidermalen Schichten der Haut akkumuliert und daher in höheren Mengen vorliegt, als durch die Bestimmung der Plasmaspiegel vermutet. Eine tägliche Dosis von 250 - 500 mg Chloroquin-Diphosphat peroral resultiert in Plasmakonzentrationen von ca. 1 μM CHQ-Base, wobei in humaner Epidermis patientenspezifisch bis zu 25 $\mu\text{g/g}$ (entspricht 0,078 $\mu\text{mol/g}$) erreicht werden und sich dies bei intravenöser Applikation von 1,25 mg/kg Körpergewicht Chloroquin-Sulfat auf eine Gewebekonzentration von 100 $\mu\text{g/g}$ (entspricht 0,312 $\mu\text{mol/g}$) CHQ-Base steigern kann [318-320]. Unter Beachtung patientenindividueller Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der applizierten Dosis an CHQ verdeutlicht sich die therapeutische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse, da die definierten experimentellen Bedingungen *in vitro* von 20 μM (entspricht 0,02 $\mu\text{mol/mL}$) eine annähernde Wiederfindung im Rahmen einer anti-inflammatorischen Behandlung bzw. einer Malariaphylaxe erfahren.

Das Ausmaß der Zytokinfreisetzung aktivierter DC Populationen prägt deren stimulatorische Aktivität gegenüber naiven T-Lymphozyten *in vivo*, wobei auch die vorliegende Arbeit eindrucksvoll zeigen konnte, dass die Stimulation unreifer MoLC mittels IL-1 β in der Induktion einer primären T-Zell-Antwort resultiert. Die beobachtete Freisetzung von IFN- γ durch CD4⁺ T-Lymphozyten weist auf eine primäre Generierung effektorischer Th1-Zellen hin und bestätigt damit Ergebnisse einer früheren Studie, welche für MoLC ebenfalls eine hohe Kapazität zur Differenzierung von Th1-Zellen postuliert [321]. Eine nachhaltige Verschiebung des induzierten Sekretionsprofils immunregulatorischer Zytokine durch die Anwesenheit von CHQ verändert vermutlich auch die Kapazität der primären Aktivierung naiver T-Lymphozyten. Tatsächlich bestätigen die vorliegenden Ergebnisse eine mögliche Modulation

der Differenzierung effektorischer Th1- bzw. Th17-Zellen. Im Einklang mit der verminderten Freisetzung von IL-12p70 durch die Präsenz von CHQ zeigt sich auch eine geringere Sekretion von Th1-spezifischem IFN- γ durch naive T-Zellen, womit sich bestätigt, dass spezifische Inhibitoren der Autophagie direkten Einfluss auf die Regulation adaptiver Immunantworten nehmen können. Trotzdem, obwohl die Aktivierung unreifer DC Typen in Anwesenheit von CHQ in einer erhöhten Freisetzung Th17-typischer Zytokine wie IL-23 resultierte, vermittelten aktivierte MoLC zunächst keine Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in entsprechende Th17-Zellen. Die Sekretion diverser immunregulatorischer Zytokine, wie IL-17A oder auch IL-4 und IL-22 blieb unverändert und steht zunächst in Widerspruch mit der erwarteten Verschiebung einer primären T-Zell-Antwort durch Inhibitoren der Autophagie. Bezüglich der Reaktivität epidermaler LC gegenüber allogeenen T-Lymphozyten ist jedoch bekannt, dass diese nach Antigenkontakt vermehrt CD8⁺ T-Zellpopulationen stimulieren und daher möglicherweise keine effektive *in vitro* Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen erfolgt [283]. Darüber hinaus wurden vornehmlich TGF- β , IL-21, IL-1 β und IL-6 als tatsächliche Stimulatoren einer Th17-Antwort beschrieben, wohingegen IL-23 eher die Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung und Expansion einer bereits induzierten Th17-Antwort vermittelt [124]. Die immunregulatorischen Funktion der IL-12 Zytokinfamilie wird zudem über die spezifische Expression der jeweiligen Rezeptoren bestimmt. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass IL-12p70 die Aktivierung von naiven T-Zellen sowie von Gedächtniszellen induziert, wohingegen der proliferative Einfluss von IL-23 hauptsächlich auf Letztere begrenzt ist [322]. Begründet wird dies durch die Unterschiede in der Expression des IL-23 Rezeptordimers. Während Gedächtniszellen die funktionellen Untereinheiten IL-12R β 1 sowie IL-23R auf der Oberfläche exprimieren, findet sich letztere nicht auf naiven T-Zellen. Erst nach primärer Aktivierung induzieren auch diese die Expression der spezifischen Rezeptoreinheit IL-23R und sind nachfolgend für stimulierende Signale durch IL-23 empfänglich [296].

Dieser Theorie folgend wurden anschließend weitere Stimulationsversuche *ex vivo* generierter MoLC unternommen, um die modulatorischen Effekte von CHQ auf die Induktion einer adaptiven Immunantwort nach gezielter Differenzierung naiver T-Zellen zu analysieren (*Daten nicht abgebildet*). Tatsächlich gelang durch den Zusatz von TGF- β , IL-1 β und IL-6 die geplante Generierung effektorischer Th17-Zellen, welche sich durch die Freisetzung von IL-17A sowie der erhöhten Genexpression des Mastertranskriptionsfaktors RORC als solche definierten. Erste Versuche der Induktion einer primären T-Zell-Antwort nach Stimulation unreifer MoLC mittels IL-1 β und CHQ ergaben darüber hinaus die zu erwartenden Zytokinprofile, nämlich einer verstärkten Freisetzung von IL-17A bei simultaner Verringerung der IFN- γ Sekretion. Die jetzige Datenlage umfasst daher eine komplexe Modulation der Kapazität der spezifischen Differenzierung von Th1- bzw. Th17-Zellen durch Stimulation unreifer MoLC in Gegenwart von CHQ. Die veränderte Zytokinsekretion aktiverter MoLC

resultiert in einer verringerten Generierung effektorischer Th1-Zellen, wobei die erhöhte Freisetzung von IL-23 eine bereits bestehende Aktivität von Th17-Lymphozyten zu verstärken scheint und somit nachhaltig die Pathogenität dieser Zellpopulation beeinflusst.

4.2.3 IL-1 Rezeptoren und TLR als wichtige Regulatoren der Autophagie-abhängigen Immunmodulation

Die bisherigen Beobachtungen zur Dysregulation der Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Inhibitoren der autolysosomalen Funktionalität resultieren vornehmlich nach spezifischer Aktivierung durch Zytokine der IL-1 Familie. Anders als bisherige Studien zur Analyse der Immunmodulation durch Inhibitoren der Autophagie, besitzt die vorliegende Arbeit demnach keine vordergründige Fokussierung auf die Rolle der Autophagozytose in der Infektabwehr, jedoch hohe Relevanz für eine Vielzahl pathophysiologischer Entzündungsreaktionen, inklusive solcher mit mikrobieller Beteiligung. Postulierten frühere Studien bisher eine wichtige regulatorische Funktion für TRIF-abhängige Signalkaskaden nach Stimulation mit TLR3 Agonist poly(I:C) sowie TLR4 Ligand LPS, so erweitert die vorliegende Arbeit die Möglichkeit der Interaktion MyD88-abhängiger Signalwege mit Autophagie-assoziierten Mechanismen [291]. Dies wurde verdeutlicht, nachdem die spezifische Stimulation *ex vivo* generierter MoDC und MoLC in Gegenwart des TLR2/1 Agonisten Pam₃CSK₄ und CHQ ebenfalls in einer erhöhten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen resultierte. Obwohl die Sekretion von IL-23 nicht das gleiche Ausmaß erreichte wie nach Verwendung von IL-1 α und IL-1 β , so ist sie doch in der Freisetzung von IL-6 mit Letzterer zu vergleichen. Dennoch unterscheiden sich die vorliegenden Resultate in zwei wichtigen Aspekten und offenbaren dadurch eine grundlegende Verschiedenheit bezüglich der induzierten Immunantworten.

Die Aktivierung unreifer MoLC mit IL-1 Zytokinen in Anwesenheit von CHQ, Hydroxy-CHQ oder Bafilomycin A1 resultierte jeweils in einer erhöhten Freisetzung von IL-23. Die analogen Beobachtungen in Anwesenheit des bakteriellen TLR2/1 Liganden Pam₃CSK₄ erscheinen daher zunächst nicht ungewöhnlich, jedoch demonstrierte die vorliegende Arbeit bereits in Übereinstimmung mit anderen Studien, dass MoLC aufgrund der geringen Expressionsrate an TLR2, 4 und 5 eine attenuierte Reaktivität gegenüber bakteriellen Antigenen aufweisen [65]. Die verstärkte Sekretion an Th17-spezifischen Zytokinen in Anwesenheit von CHQ deutet demnach darauf hin, dass die Inhibition Autophagie-assoziiierter Mechanismen eine weitreichende Modulation TLR2/1-abhängiger Signaltransduktionswege verursacht und möglicherweise die immunologische Aktivität gegenüber bakteriellen Pathogenen nachhaltig beeinflusst. Neben einer bereits beschriebenen Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung Th17-

abhängiger Immunreaktionen durch die gleichzeitige Stimulation mit IL-1 Zytokinen und CHQ, scheint somit auch die Initiation von Entzündungsreaktionen nach mikrobiellen Antigenkontakt und simultaner Inhibition der Autophagozytose durch epidermale LC möglich. Ein weiterer Aspekt, der die Beobachtungen mit TLR Agonisten von denen mit IL-1 Zytokinen unterscheidet, ist die nachgewiesene Erhöhung der Freisetzung von IL-23 durch MoDC. Resultierte die Stimulation mit IL-1 α oder IL-1 β in Anwesenheit von CHQ ausschließlich in einer verstärkten Produktion und Sekretion von IL-6, so zeigten MoDC nun ebenfalls erhöhte Level an IL-23, was eine grundlegende Diskrepanz TLR- sowie IL-1 Rezeptor-abhängiger Signalwege vermuten lässt.

Die bereits diskutierte Homologie in der intrazellulären TIR-Domäne beider Rezeptorklassen verantwortet vermutlich einen zentralen Prozess der Kreuzregulation unterschiedlichster Rezeptor-vermittelter Signaltransduktionen und vermittelt hierdurch eine veränderte Reaktivität humaner DC Populationen gegenüber mikrobiellen Stimuli in Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine. Analog zu diesen Beobachtungen kann auch die Präsenz von CHQ in einer ausgeprägten Dysregulation der Aktivität unterschiedlichster Signalmoleküle resultieren. Wie zuvor erwähnt, fokussiert sich die vorliegende Arbeit auf die Möglichkeit der Interaktion MyD88-abhängiger Signalwege mit Autophagie-assoziierten Mechanismen, da sowohl IL-1 Rezeptor- als auch TLR2/1-abhängige Signaltransduktionewege die Mobilisierung dieses spezifischen Adaptermoleküls initiieren und nachfolgend die Phosphorylierung vielfältiger Transkriptionsfaktoren und Effektorproteine vermitteln. Die regulatorische Aktivität dieser Signalmoleküle wird auch über Autophagie-abhängige Prozesse distinktiv moduliert, sodass die Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine in Anwesenheit von CHQ verstärkt bzw. vermindert werden kann (*Abb.: 4-3*). Die Fokussierung auf molekulare Regulatoren, welche die Produktion wichtiger pro-inflammatorischer Signalmoleküle induzieren, gelten vordergründig der NF κ B-Familie, einige der wichtigsten Transkriptionsfaktoren die durch MyD88-abhängige Signalwege aktiviert werden [323]. In der Tat enthalten die Promotorregionen von IL-12p40, IL-23p19 sowie IL-6 Bindungsstellen für NF κ B, als zwingende Notwendigkeit für die Initiierung der Transkription [324-326]. Die vorliegende Arbeit demonstrierte eindrucksvoll, dass die Präsenz von CHQ während der Stimulation mit IL-1 β in einer massiven Zunahme der Transkription IL-23-spezifischer Untereinheiten resultierte. Da die Erhöhung der p40 mRNA ausschließlich nach Inhibition später Prozesse der Autophagozytose beobachtet werden konnte, verläuft die Dysregulation vermutlich auf autolysosomaler Ebene. Tatsächlich sind wichtige regulative Rückkopplungsmechanismen zwischen NF κ B-abhängigen Signalwegen und der Aktivität der Autophagozytose bekannt.

Die selektive proteolytische Degradation von I κ B α , der I κ B Kinase (IKK) sowie der NF κ B-induzierenden Kinase (NIK) verläuft teilweise in Autolysosomen, wodurch die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine gehemmt, oder verstärkt werden kann [327-329]. Ebenso können die spezifische Aktivität NF κ B-abhängiger Signalwege bzw. derer Effektorproteine die Mechanismen der Autophagie nachhaltig modulieren und damit die Transkription, intrazelluläre Prozessierung sowie Freisetzung immunregulatorischer Zytokine verändern [231]. Hierzu gehören die intermediären Signalmoleküle TAK1 (*TGF- β -activated protein kinase 1*) sowie IKK, welche die Aktivität der Autophagie über eine AMPK-abhängige Inhibition von mTOR verringern [330, 331]. Auch NF κ B selbst induziert die Transkription wichtiger Induktoren bzw. Repressoren der Autophagie. Die Aktivierung des IL-1 Rezeptors führt dagegen zur Rekrutierung des Signalmoleküls TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor 6*), welches die Ubiquitinierung von Beclin-1 vermittelt und somit die Bildung des Phagophors initiiert. Letzterer Mechanismus wurde bereits für die Stimulation von TLR4 in Makrophagen postuliert und dient möglicherweise einer effektiveren Prozessierung pathogener Organismen [229].

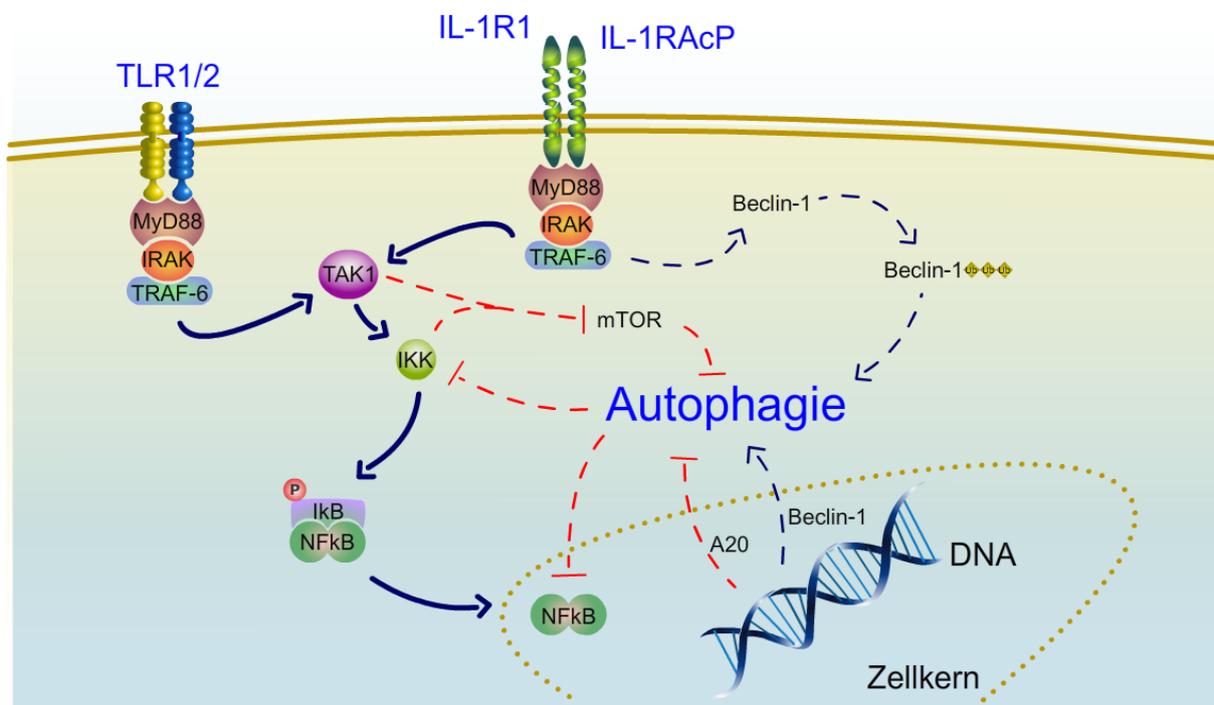


Abbildung 4-3: Die komplexe Modulation der Aktivität der Autophagie durch NF κ B-abhängige Signalwege. Die Signaltransduktionswege des IL-1 Rezeptors sowie des TLR2/1 Heterodimers interagieren über diverse molekulare Regulatoren mit den Mechanismen der Autophagie und führen zur Induktion bzw. Repression ihrer Aktivität. Darüber hinaus reguliert die Autophagozytose durch Proteolyse der beteiligten Signalmoleküle die Prozesse der Signaltransduktion. Inwiefern diese Kreuzregulationen die immunologische Funktionalität humaner DC beeinflussen, ist aufgrund der Komplexität der beteiligten Mechanismen noch nicht abschließend geklärt.

Wie bereits beschrieben, dienen die Prozesse der Autophagie aber auch der Degradation NFκB-assoziiertes Signalmoleküle. Eine Inhibition eben jener autolysosomalen Proteolyse durch CHQ, Hydroxy-CHQ und Bafilomycin A1 erklärt möglicherweise, warum die Dysregulation der Transkription pro-inflammatorischer Zytokine bei gleichzeitiger Aktivierung der Autophagie durch TRAF-6 überwiegt. Die initialen Beobachtungen dieser Arbeit lassen bisher noch keine näheren Rückschlüsse auf die genauen molekularen Mechanismen zu, die in direkter Kausalität zu der induzierten Dysregulation der Freisetzung Th1- bzw. Th17-typischer Zytokine stehen könnten. Daher sind bereits nachfolgende Arbeiten in Planung, um die komplexen immunregulatorischen Wechselwirkungen der späten Prozesse der Autophagie mit IL-1 Rezeptor- bzw. TLR2/1-abhängigen Signaltransduktionen zu analysieren. Tatsächlich weisen erste Versuche an aktivierten MoDC und MoLC auf eine distinktive Induktion von c-Rel hin, einem spezifischen Transkriptionsfaktor der NFκB-Familie (*Daten nicht abgebildet*). Die Tatsache, dass dieses pro-inflammatorische Signalmolekül an der Pathogenese einer Vielzahl chronisch-entzündlicher Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, lässt auf eine mögliche Relevanz dieser dysregulativen Mechanismen in deren Pathogenese schließen [332].

Die Frage nach den regulativen Prozessen, welche einerseits die Unterschiede im Sekretionsprofil von IL-12p70, IL-23 und IL-6 vermitteln bzw. zu der konträren Freisetzung der immunregulatorischen Zytokine in beiden *ex vivo* generierten DC Subtypen beitragen sowie andererseits die Diversität der inflammatorischen Reaktion nach selektiver Modulation der Autophagie durch 3-MA im Gegensatz zu CHQ, Hydroxy-CHQ sowie Bafilomycin A1 verantworten, wird demnach in nachfolgenden Studien geklärt werden müssen.

4.2.4 Zusammenfassende Interpretation der Beobachtungen und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll, dass die Inhibition der späten Prozesse der Autophagie durch CHQ, Hydroxy-CHQ bzw. Bafilomycin A1 zu einer distinktiven Dysregulation der Produktion sowie Freisetzung immunregulatorischer Zytokine führt. Die reduzierte oder erhöhte Sekretion Th1- bzw. Th17-assoziiertes Zytokine durch aktivierte MoDC und MoLC beeinflusst womöglich auch deren Kapazität zur Induktion spezifischer effektorischer T-Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen daher ebenfalls eine besondere Beteiligung der Autophagie an den regulativen Prozessen der adaptiven Immunantwort vermuten. Neueste Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass die spezifische Aktivität diverser Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie in direkter Kausalität zu den beobachteten Prozessen steht.

Diese Arbeit verweist daher auf eine mögliche regulative Funktion der Autophagie in inflammatorischen Prozessen und stellt insbesondere epidermale LC in den Fokus der Modulation einer IL-1-vermittelten Immunantwort während der Therapie mit lysosomotropen Arzneistoffen. Tatsächlich existieren mehrere Fallberichte, welche eine Induktion bzw. Verschlimmerung inflammatorischer Hauterkrankungen wie Psoriasis vulgaris während einer Behandlung mit CHQ bzw. Hydroxy-CHQ beobachteten. Für Patienten mit psoriatischen Hauterkrankungen gilt daher besondere Vorsicht bei der Therapie mit alkalisierenden Aminochinolinderivaten, wobei die Mechanismen dieser unerwünschten Arzneimittelwirkung bis heute nicht vollständig geklärt sind [293, 333]. Während die pathophysiologischen Grundlagen in der Inhibition der Transglutaminase vermutet werden [334], verweist diese Arbeit erstmalig auf die dysregulative Beeinflussung IL-1 Rezeptor-abhängiger Signalwege durch Blockade der Autophagie. Die beobachteten Unterschiede in der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine lassen auf eine mögliche Verschiebung der adaptiven Immunantwort schließen und sind ggf. unabhängig von mikrobiellen Einflüssen. Entzündliche Hautläsionen wie Psoriasis vulgaris gehen mit einer erhöhten Produktion an IL-1 Zytokinen einher und erhöhen dadurch womöglich die Produktion und Sekretion von IL-23 sowie IL-6 durch kutane DC Populationen in Anwesenheit von CHQ, wodurch die Aktivität und Expansion einer Th17-Antwort induziert bzw. stabilisiert wird. Epidermale LC sowie DDC sind damit vermutlich direkt an der Pathogenese dieser Arzneimittel-induzierten Exazerbation chronisch-inflammatorischer Hauterkrankungen beteiligt. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus fokussiert sich dabei auf die regulatorischen Prozesse der Autolysosomen, deren ausreichende Azidifizierung die enzymatische Degradation immunrelevanter Signalmoleküle garantiert und deren Funktionalität somit ein potentielles Ziel in der kausalen Immuntherapie Autophagie-abhängiger Entzündungsprozesse darstellen.

Tabelle 5: Kernaussagen der CHQ-abhängigen Zytokinfreisetzung *in vitro*.

Beobachtung	Aussage (Interpretation <i>in vivo</i>)
CHQ verändert die Zytokinfreisetzung in MoDC und MoLC	Die Produktion und Sekretion von IL-12p70, IL-23 und IL-6 nach Aktivierung unreifer DC und LC mit IL-1 β bzw. TLR2/1 Agonisten wird durch die Anwesenheit bestimmter Autophagozytose-Inhibitoren nachhaltig moduliert.
Die IL-23 Sekretion hängt von der IL-1 Rezeptoraktivität ab	Die immunmodulatorische Kapazität der Autophagie fokussiert sich auf mögliche Wechselwirkungen mit Signalmolekülen des IL-1 Rezeptors. Als Grund gilt hier die veränderte Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren.
CHQ verschiebt die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen	Eine resultierende Modulation der Freisetzung immunregulatorischer Zytokine durch DC bzw. LC verändert vermutlich nachhaltig deren Kapazität zur Einleitung einer adaptiven Th1- bzw. Th17-abhängigen Immunantwort.

4.3 Die Integration unreifer MoLC in humane Hautmodelle ermöglicht die Entwicklung immunkompetenter Alternativmethoden

Bereits 1959 vertraten William Russell und Rex Burch in ihrem Buch "The principles of humane experimental technique" die ethischen Grundsätze der 3R-Regel zu Reduktion (*reduce*), Ersatz (*replace*) und Verbesserung (*refine*) von experimentellen Tierversuchen [258]. Zum Umgang mit Versuchstieren hat der Europarat im Jahr 1986 die Richtlinie 86/609/EWG zum „Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere“ beschlossen und erklärt hierin die ethische Verpflichtung des Menschen, die Leidensfähigkeit und das Erinnerungsvermögen von Versuchstieren zu berücksichtigen. Darüber hinaus verabschiedeten im November 2005 Industrieverbände und die Europäische Kommission die „3R Declaration“ und bekundeten somit den Willen für die Entwicklung und Durchsetzung alternativer Versuchsmethoden [335].

Alternativ- und Ergänzungsmethoden dienen der Reduzierung der Anzahl bzw. der Belastungen von lebenden Versuchstieren oder stellen Verfahren zum vollständigen Ersatz von Tierversuchen durch *in vitro* Methoden sowie Computersimulationen dar. Die durch Politik, Wissenschaft und Industrie eingeleiteten regulatorischen Maßnahmen forcieren die heutigen Bemühungen zur Entwicklung von Alternativmethoden für eine Vielzahl von Fragestellungen, wie bsw. der prädiktiven Beurteilung allergisierender Potentiale von Chemikalien, jedoch gelten noch immer *in vivo* Prüfverfahren, wie der Meerschweinchen-Maximierungstest bzw. der murine LLNA, als anerkannte Goldstandards. Dennoch gelangen in den letzten Jahren Fortschritte in der Entwicklung selektiver *in vitro* Methoden zur Identifizierung sensibilisierender Stoffe sowie deren Unterscheidung zu irritativen Noxen mit der erforderlichen Richtigkeit, Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit zu *in vivo* Assays und wurden bereits dem Prävalidierungsverfahren der ECVAM vorgeschlagen [264]. Diese sind Teil einer, dem Haut-assoziierten Immunsystem entsprechenden, gestaffelten Betrachtung aller relevanten Schritte der primären Sensibilisierungsreaktion, wohingegen die Möglichkeit der Entwicklung *in vitro* generierter Vollhautäquivalente nach Integration humaner DC Populationen als denkbare Ersatzmodell zu humanen Vollhautbiopsien gilt, dem physiologisch relevantesten Testsystem zur funktionellen Charakterisierung des Immunsystems menschlicher Haut. Die Etablierung eines *in vitro* generierten Hautmodells mit integrierten Immunzellen erfordert die Inkorporation aller relevanten Zellpopulationen, sodass nach Exposition mit potentiell sensibilisierenden Substanzen eine komplexe molekulare Kommunikation ermöglicht werden kann und dies die Aktivierung und Migration von DC Typen, entsprechend den Mechanismen der adaptiven Immunantwort, vermittelt. Tatsächlich bestätigt die vorliegende Arbeit, dass die Integration allogener MoLC in

rekonstruierte humane Vollhautäquivalente gelingt und die Verteilung sowie intraepidermale Lokalisation dieser Zellen den physiologischen Maßstäben entspricht. Allein die Reaktivität der MoLC wurde bisher ausschließlich anhand vorheriger *in vitro* Stimulationsversuche in Monokultur abgeleitet, sodass die immunologische Funktionalität der Zellen innerhalb des Vollhautäquivalents noch in nachfolgenden Studien evaluiert werden muss.

4.3.1 Das etablierte Testsystem besitzt physiologische Charakteristika humaner Vollhaut

Die hier vorliegende Arbeit demonstriert, dass die Entwicklung eines rekonstruierten Vollhautäquivalents analog bereits etablierter Arbeitsanweisungen auch die simultane Integration unreifer LC Populationen erlaubt. Die langjährige Erfahrung und Expertise der Arbeitsgruppe ermöglichte dabei eine umfassende und vergleichende phänotypische Charakterisierung der Modelle und bestätigte, dass der Prozess der gemeinsamen Integration unterschiedlichster Zelltypen aus allogenen Quellen nicht zu einer Störung des morphologischen Differenzierungsstatus des Hautäquivalents führte (*Daten nicht abgebildet*). Gemäß der Fragestellung der vorliegenden Arbeit bedurfte die Entwicklung einer immunkompetenten Alternativmethode der Auswahl einer geeigneten Immunzellpopulation. Diesbezüglich stehen unterschiedliche DC Typen humanen Ursprungs zur Verfügung, die jeweils individuelle Charakteristika aufweisen, welche die Funktionalität eines solchen Testsystems maßgeblich beeinflussen. Der Verwendung isolierter epidermaler LC aus operativ entfernter Humanhaut steht die allgemeine Tatsache entgegen, dass hierfür große Mengen an menschlichem Material benötigt werden und die Bereitstellung mit hohem logistischem Aufwand sowie großer Spendervariabilität verbunden ist. Letztere Problematik besteht prinzipiell auch für *ex vivo* differenzierte DC Populationen, jedoch weisen diese eine höhere phänotypische bzw. funktionelle Übereinstimmung zu humanen DC auf, als solche, die mittels Zelllinien lymphoiden bzw. myeloiden Ursprungs generiert wurden. Die Integration *in vitro* differenzierter LC der MUTZ-3 Zelllinie konnte bisher erstmalig auch immunologische Funktionalität beweisen und die Reifung sowie Migration inkorporierter MUTZ-LC nach Allergenexposition nachstellen [272]. Der hohen Robustheit dieses Testsystems aufgrund anerkannter Kultivierungsprotokolle sowie geringer Anfälligkeit gegenüber Spender-abhängigen Faktoren, steht jedoch die Frage nach der physiologischen Relevanz der prädiktiven Ergebnisse gegenüber, die sich aus der phänotypischen bzw. funktionellen Diversität der MUTZ-LC zu primären Zellen ergibt.

Die letzte Verwendung *ex vivo* generierter MoLC begründete sich aus der praktikablen Möglichkeit der Isolierung ausreichender Mengen monozytärer Vorläufer aus allogenen

Quellen und der hohen Übereinstimmung in der Expression wichtiger Differenzierungsmarker sowie der Reaktivität gegenüber mikrobiellen Antigenen im Vergleich zu humanen LC *in vivo*, die sich bereits in den vorhergehenden Ergebnissen bestätigte. Die erneute Frage nach der physiologischen Relevanz des gewählten Testsystems orientiert sich dabei an der Ontogenese epidermaler LC in humaner Haut. In der Tat verläuft die Repopulation hier partiell über monozytäre Vorläufer, welche im Blut zirkulieren bzw. abhängig von der jeweiligen Chemokinexpression in periphere Gewebe einwandern und zu CD14⁺ DDC bzw. LC ausdifferenzieren [42]. Die gerichtete Migration in epidermale Schichten passiert *in vivo* jedoch ausschließlich unter entzündlichen Bedingungen und vermittelt hier vermutlich eine nur limitierte Neubesiedlung der LC Populationen, unabhängig vom Pool langlebiger, hämatopoetischer Vorläufer welche normalerweise die Immunhomöostase der Epidermis regulieren [44]. Die begründete Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser kurzfristig existenten LC Subtypen konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden, jedoch sind bereits phänotypische und morphologische Unterschiede beider LC Populationen bekannt. Inwiefern dieser Aspekt die Funktionalität des Testsystems beeinflusst werden zukünftige Studien klären müssen, jedoch bestätigten bisherige immunhistochemische Analysen des Hautmodells eine vornehmlich suprabasale Verteilung der integrierten MoLC nach 10 tägiger Kulturdauer und eine nur geringfügige Rate an Spontanmigration.

Die bisherigen Ergebnisse lassen daher darauf schließen, dass die Lokalisation *ex vivo* generierter MoLC in rekonstruierter Epidermis trotz ihrer primären Relevanz unter entzündlichen Bedingungen *in vivo*, in keiner exzessiven Vermittlung inflammatorischer Reize resultiert. Dies mag auf dem Einfluss des kritischen Wachstumsfaktors TGF- β beruhen, dem Schlüsselzytokin der Generierung von MoLC, welcher in definierter Konzentration dem Differenzierungsmedium beigesetzt wurde und vermutlich für die attenuierte Reaktivität der Zellen gegenüber diversen mikrobiellen Stimuli verantwortlich ist. Gleichzeitig geschieht die Expression von TGF- β durch Keratinozyten in humaner Epidermis und reguliert hierbei deren Differenzierung und Epithalisierung [336]. Die nachgewiesene Integration *ex vivo* generierter MoLC in rekonstruierte humane Vollhautäquivalente weist damit auf eine funktionierende Kommunikation der relevanten Populationen innerhalb des Zellverbandes hin, welche in einer gegenseitigen Anpassung ihrer Funktionalität resultiert, analog der physiologischen Bedingungen *in vivo*.

4.3.2 Zusammenfassende Interpretation der Beobachtungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Methodik zur Integration unreifer MoLC in *in vitro* generierte humane Vollhautäquivalente funktioniert und

dieses Hautmodell möglicherweise als zukünftiges Alternativsystem zur prädiktiven Analyse sensibilisierender Stoffe dient. Epidermale LC sind integraler Bestandteil der Vermittlung einer adaptiven Immunantwort nach Kontakt mit sensibilisierenden Noxen, doch inwiefern die inkorporierten MoLC auch immunologische Funktionalität beweisen und die Aktivierung sowie Migration nach Allergenexposition induzieren, werden erst nachfolgende Studien evaluieren können. Erste Resultate bestätigten bereits eine Erhöhung der IL-6 Sekretion nach 48 stündiger Applikation von 2,4-Dinitrochlorbenzol, einem starken Kontaktallergen [337] und lassen daher eine induzierte Zellreifung vermuten (*Daten nicht abgebildet*).

Die umfassenden Möglichkeiten eines funktionierenden Testmodells zur Charakterisierung des Immunsystems menschlicher Haut beinhaltet nicht nur die prädiktive Bewertung von Sensibilisierungspotentialen, sondern ebenfalls die Analyse vielfältiger immunologischer Mechanismen *in situ* unter kontrollierten experimentellen Bedingungen, bspw. bei Verwendung definierter Krankheitsmodelle der Haut. Hierzu gehören humane Infektionsmodelle für lokalisierte Candidosen bzw. Vollhautäquivalente, die durch gezielte genetische Manipulation einem chronisch-inflammatorischen Phänotyp entsprechen [338, 339]. Diese Modelle ermöglichen Untersuchungen zur funktionellen Immunität humaner LC in pathologisch veränderter bzw. entzündeter Haut und besitzen daher enorme Relevanz in der medizinisch-immunologischen Grundlagenforschung. Sogar im Rahmen der präklinischen Bewertung von Wirksamkeitsprofilen potentieller, topisch applizierbarer Immuntherapeutika ist der Einsatz dieses Testsystems in Zukunft denkbar.

Das enorme Potential dieses Alternativsystems wurde kürzlich auch von Politik und Industrie erkannt und im Jahr 2013 mit dem „Preis des Landes Berlin zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden für Tierversuche“ ausgezeichnet [340].

Tabelle 6: Kernaussagen zur Konstruktion eines *in vitro* generierten Hautmodells mit integrierten Immunzellen.

Beobachtung	Aussage (Interpretation <i>in vivo</i>)
Integrierte MoLC dienen als Surrogat für humane LC	Die gewonnene Erfahrung und Expertise zu <i>ex vivo</i> differenzierten MoLC erlaubte deren Integration in ein rekonstruiertes Vollhautäquivalent. Sie sind dabei funktioneller Teil des immunkompetenten Alternativsystems.
Die Verteilung der MoLC erreicht das Verhältnis <i>in vivo</i>	Die Zielsetzung zur Verteilung der Immunzellen nach physiologischem Vorbild wurde erreicht. Dies umfasste deren Lokalisation in suprabasalen Schichten der Epidermis und ein homogenes Verteilungsmuster der Zellen.
Das Hautmodell erfüllt die nötigen Voraussetzungen	Bisherige Ergebnisse lassen vermuten, dass die integrierten MoLC einen unreifen Phänotyp aufweisen und ähnliche Charakteristika besitzen wie in Monokultur. Das Hautmodell scheint daher für funktionelle Studien geeignet.

5. Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) stellen eine morphologisch sowie funktionell heterogene Population professioneller antigenpräsentierender Zellen (*antigen presenting cell*, APC) dar und agieren als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität. Aufgrund ihrer Fähigkeit die Aktivierung sowie Differenzierung naiver T-Zellen zu stimulieren, gelten DC als wichtige Regulatoren einer primären Immunantwort. Hierzu bedarf es der Erkennung und Internalisierung eingedrungener Erreger, der anschließenden Präsentation der prozessierten Antigenfragmente an naive T-Lymphozyten sowie deren Aktivierung über die Expression kostimulatorischer Moleküle und der Freisetzung immunregulatorischer Zytokine. Im selben Maße nehmen DC auch eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der zentralen und peripheren Toleranz ein, indem sie das Signal für Apoptose oder Anergie an autoreaktive Lymphozyten vermitteln bzw. die Entwicklung regulatorischer T-Zellen induzieren.

Inwiefern die verschiedenen Subtypen auf die Vielzahl unterschiedlicher, potentiell schädigender Einflüsse reagieren, wird von ihrer spezifischen Expression essentieller Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) sowie von ihrer jeweiligen Lokalisation im menschlichen Körper festgelegt. Langerhans Zellen (*Langerhans cell*, LC) repräsentieren DC der Epidermis und unterscheiden sich von anderen Subtypen der menschlichen Haut u.a. durch die Expression des Oberflächenrezeptors CD207. Die Epidermis, als äußerste Grenzschicht des Körpers zur Umwelt, ist hierbei im besonderen Maße pathogenen Belastungen von Außen ausgesetzt. Bezugnehmend auf die bereits nachgewiesene Variabilität der Expression unterschiedlicher PRR in humanen DC der Haut sowie der daraus resultierenden Diversität ihrer immunologischen Funktionalität, postulierten frühere Studien bereits, dass die attenuierte Reaktivität epidermaler LC gegenüber bakteriellen Mikroben die Integrität der kommensalen Hautflora garantiert. Bezüglich viraler Antigene fungieren LC dagegen als potente Initiatoren adaptiver Immunreaktionen. Inwiefern hierdurch das immunologische Verhalten unter akut- bzw. chronisch-entzündlichen Bedingungen beschrieben wird, bleibt jedoch umstritten, da freigesetzte pro-inflammatorische Mediatoren aus umgebenden Keratinozyten bzw. Fibroblasten ihrerseits modulatorisch auf die Funktionalität der DC wirken können. Die Erforschung humaner DC in pathologisch veränderter bzw. entzündeter Haut ist aufgrund ethischer Aspekte nachweislich problematisch, sodass hierfür zumeist auf Studien an induzierten Krankheitsmodellen in genetisch modifizierten Mäusen zurückgegriffen wird. Aufgrund physiologischer Unterschiede in der Ontogenität und spezifischen Verteilung muriner DC im Vergleich zu humanen Populationen, erscheint die Übertragbarkeit dieser Studien auf das menschliche

Immunsystem jedoch zunehmend fragwürdig. Alternativ ermöglicht die Analyse *ex vivo* generierter humaner DC eine näherungsweise Betrachtung ihrer individuellen Funktionalität.

Entsprechend der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung zur distinktiven Reaktivität humaner DC Populationen unter entzündlichen Bedingungen anhand *ex vivo* differenzierter Subtypen untersucht. Hierzu wurden zunächst unterschiedliche Kultivierungsprotokolle etabliert, welche die Differenzierung CD14⁺ Monozyten aus humanen Blutspenden durch Zugabe definierter Zytokine in MoDC (*monocyte-derived dendritic cells*) bzw. MoLC (*monocyte-derived Langerhans-like cells*) beschrieben. Nachfolgende phänotypische und funktionelle Analysen bestätigten dabei eine hohe Übereinstimmung beider Subtypen zu primären DC. Die selektive Aktivierung der humanen Äquivalente mit diversen mikrobiellen TLR Agonisten in Kombination mit TNF- α und IL-1 β diente dabei der Simulation eines präsenten Entzündungsgeschehens und vermittelte einen verstärkten phänotypischen und funktionellen Reifungsgrad der aktivierten DC. Die damit assoziierte Modulation im Sekretionsprofil immunregulatorischer Zytokine bzw. in der Kapazität der Chemokin-abhängigen Migration, offenbarte dabei eine distinktive Funktionalität des kutanen Immunsystems gegenüber mikrobiellen Antigenen und verweist damit auf eine mögliche Konversion der immunmodulatorischen Charakteristika humaner DC Populationen. Während MoDC, entsprechend der Bedeutsamkeit dermalen DC in der Abwehr invasiver Bakterien, eine hohe Reaktivität gegenüber TLR2/1- und TLR4-Agonisten zeigten, verweist die Arbeit zudem auf eine mögliche Beteiligung epidermaler LC an der Regulation einer anti-bakteriellen Th17-Antwort in Anwesenheit pro-inflammatorischer Stimuli. Die selektive Reaktivität epidermaler LC gegenüber bakteriellen Antigenen wurde bereits in früheren Studien mit der fehlenden Expression an TLR2, 4 und 5 begründet. In Anwesenheit pro-inflammatorischer Stimuli erscheint jedoch eine mögliche Forcierung der Interaktion spezifischer Rezeptor-abhängiger Signalmoleküle eine bereits bestehende Vermittlung etwaiger Prozesse der Toleranzentwicklung in Mechanismen der funktionellen Immunität zu konvertieren. Gegenüber dem TLR3 Agonisten poly(I:C) bestätigte sich zudem, dass LC aufgrund ihrer speziellen Lokalisation in epidermalen Schichten als potente Vermittler adaptiver Immunreaktionen gegen virale Pathogene fungieren, wobei die Analyse der spezifischen Genexpression anti-viraler Typ 1 Interferone auch auf eine Beteiligung beider DC Subtypen an den Prozessen der angeborenen Immunantwort hinweist. Das postulierte Zusammenwirken unterschiedlicher DC Populationen unter physiologischen oder entzündlichen Bedingungen definiert daher die Art der induzierten Immunregulation und steht ggf. in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese inflammatorischer Hauterkrankungen.

Einige dieser chronischen-entzündlichen Erkrankungen der Haut zeichnen sich durch eine erhöhte Präsenz effektorischer T Lymphozyten aus und bedürfen daher einer initialen

Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen durch aktivierte DC. Die notwendige Sekretion immunregulatorischer Zytokine, welche u.a. die Differenzierung in verschiedene Th Subtypen steuert, steht seit neueren Erkenntnissen auch in komplexer Wechselwirkung mit den konservierten Prozessen der Autophagozytose. Diese dienen grundsätzlich dem Abbau zelleigener Bestandteile, jedoch weisen neuere Studien auf eine bedeutende regulative Funktion der Autophagie in der Abwehr und intrazellulären Degradierung detektierter Mikroorganismen sowie in der Produktion und Sekretion immunregulatorischer Mediatoren hin. Die Mechanismen der Autophagie nehmen daher vermutlich direkten Einfluss auf die funktionelle Immunität humaner DC, sodass die Modulation Autophagie-abhängiger Mechanismen möglicherweise auch in einer potentiellen Beeinflussung adaptiver Immunantworten resultiert und dadurch mit der Pathogenese einer Vielzahl chronisch-inflammatorischer Erkrankungen assoziiert ist. Die neuen Hypothesen ergänzen die ebenfalls nachgewiesene Korrelation zwischen der Dysfunktionalität der Autophagie und der Pathogenese sowie Progression verschiedenster neurodegenerativer und chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit und Morbus Crohn.

Gemäß der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit dienten Inhibitoren definierter Prozesse der Autophagozytose der Evaluation möglicher Modulationen der angeborenen und adaptiven Immunität. Basierend auf den Erkenntnissen der Vermittlung immunologischer Prozesse demonstriert die vorliegende Arbeit, dass der Zusatz lysosomotroper Agenzien wie Chloroquin (CHQ) selektive Prozesse der Autophagozytose in MoDC und MoLC unterdrückt und dies zu einer nachhaltigen Dysregulation der Zytokinfreisetzung führt bzw. die potentielle Vermittlung adaptiver Immunantworten moduliert. Während sich in Anwesenheit von CHQ die Freisetzung von IL-12p70 reduzierte und gleichzeitig MoLC eine geringere Kapazität der Stimulation einer adaptiven Th1-Antwort aufwies, zeigte sich nach Aktivierung mit IL-1 α oder IL-1 β eine erhöhte Produktion und Sekretion von IL-6, wobei ausschließlich MoLC auch die Sekretion des Th17-spezifischen Zytokins IL-23 erhöhten. Während die zu Grunde liegenden dysregulativen Mechanismen weiterhin nicht vollständig geklärt sind, zeigte sich, dass die Erhöhung der IL-23 Sekretion ausschließlich in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren später Prozesse der Autophagie, wie CHQ, Hydroxychloroquin und Bafilomycin A1 auftrat, jedoch nicht mit Hemmstoffen der Initiation der Autophagozytose, wie 3-Methyladenin. Darüber hinaus resultierten analoge Beobachtungen nach Stimulation mittels TLR2/1 Ligand Pam₃CSK₄, wobei nun auch MoDC eine erhöhte Produktion und Sekretion an IL-23 zeigten. Trotz der signifikanten Homologie der Signaltransduktion des IL-1 Rezeptors und des TLR2/1-Heterodimers, verweisen die bisherigen Resultate auf eine grundlegende Diskrepanz der beteiligten Signalmoleküle bzw. derer regulativen Aktivität in Präsenz von CHQ, vermutlich durch eine verringerte autolysosomale Inaktivierung spezifischer Effektorproteine. Die hier postulierte Modulation verschiedenster zellulärer

Regulationsmechanismen vermittelt nachfolgend die Aktivität bzw. Inaktivität selektiver Transkriptionsfaktoren, wodurch die Sekretion Th1- bzw. Th17-assoziiierter Zytokine durch aktivierte MoDC und MoLC beeinflusst wird und damit auch deren Kapazität zur Induktion adaptiver Immunantworten. Diese Arbeit verweist daher auf eine mögliche regulative Funktion der Autophagie im Rahmen inflammatorischer Prozesse und stellt insbesondere epidermale LC in den Fokus einer vermuteten Dysregulation der Aktivität effektorischer Th17-Zellen während der Therapie mit CHQ.

Die langjährige Erfahrung und Expertise der Arbeitsgruppe ermöglichte zudem die Etablierung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Hautäquivalents, wobei die simultane Inkorporation unreifer MoLC innerhalb der rekonstruierten Epidermis der Entwicklung einer immunkompetenten Tierersatzmethodik diene. Den ethischen Grundsätzen der 3R-Regel zu Reduktion (*reduce*), Ersatz (*replace*) und Verbesserung (*refine*) von experimentellen Tierversuchen entsprechend wurde hierdurch die Etablierung einer Alternativmethode zur prädiktiven Identifizierung allergisierender Substanzen gefördert. Die *in vitro* Analyse sensibilisierender Stoffe sowie deren Unterscheidung zu irritativen Noxen muss die vielseitigen immunologischen Vorgänge, angefangen von der Antigenerkennung und -prozessierung bis hin zur Stimulation einer spezifischen Immunantwort umfassen. DC sind wichtiger Bestandteil der Vermittlung adaptiver Immunität und daher essentiell für die prädiktive Bewertung sensibilisierender Chemikalien. Die vorherige phänotypische und funktionelle Analyse der *ex vivo* generierten Zellen diene letztlich der vergleichenden Charakterisierung zu humanen Subtypen und ermöglichte eine Abschätzung ihres komplexen Reifungsprozesses *in vitro*.

Tatsächlich gelang im Rahmen dieser Arbeit die Inkorporation unreifer MoLC in *in vitro* generierte humane Vollhautäquivalente. Die nachgewiesene Lokalisation der Zellen in vornehmlich suprabasalen Schichten des aufgesetzten Epidermisäquivalents bestätigte eine homogene Integration der *ex vivo* differenzierteren Immunzellen gemäß der physiologischen Verteilung humaner LC. Die Arbeit weist damit auf eine funktionierende Kommunikation aller relevanten Populationen innerhalb des Zellverbandes hin und bestätigt das Potential des entwickelten Modells zur Charakterisierung des Immunsystems menschlicher Haut unter standardisiert experimentellen Bedingungen. Inwiefern die inkorporierten MoLC auch immunologische Funktionalität beweisen und die Aktivierung sowie Migration nach gezielter Allergenexposition induzieren, werden zukünftige Studien evaluieren.

5.2 Summary

Dendritic cells (DC) represent a morphologically and functionally heterogeneous population of professional antigen presenting cells (APC) and act as a link between innate and adaptive immune responses. Due to their notable ability to stimulate the activation and priming of naïve T cells, DC are considered as important regulators of primary immune responses. Therefore, DC recognize and internalize foreign antigens and subsequently present the processed fragments to naïve T cells and induce their activation by the expression of co-stimulatory molecules and the release of immune-regulatory cytokines. Besides their important stimulatory function, DC also act as critical regulators of central and peripheral tolerance by mediating the programmed cells death or anergy to autoreactive lymphocytes and induce the development of antigen-specific regulatory T cells.

However, the specific reactivity of the distinct DC subtypes against various harmful foreign antigens is defined by the unique expression of pattern recognition receptors (PRR) and their localization in the human body. Langerhans cells (LC) represent a highly specialized subset of dendritic cells localized in the epidermis. It has been suggested, that in contrast to dermal DC (DDC), resident LC may regulate the immune response to commensal skin flora, thereby inducing immunologic tolerance towards skin resident pathogens, whereas viral antigens strongly induce a functionally mature state and lead to the activation of antigen-specific T cells. How far these suggestions comprise the immunological fate of skin resident DC subsets under inflammatory conditions is questionable, due to the modulatory impact of pro-inflammatory cytokines, secreted by surrounding keratinocytes and dermal fibroblasts, which in turn mediate the activation and maturation of LC and DDC. The analysis of skin-associated immune responses in inflamed or pathologic human explants is hampered due to ethical aspects. Therefore, genetically modified mice serve as alternative disease models to study the distinct contribution of LC and DDC in skin immunity against microbial antigens. However, due to differences in the ontogeny and distribution of DC subsets in human and murine physiology, the transferability of both systems is doubtful. Therefore, the differentiation of distinct DC populations from human monocytic progenitors is a useful tool to examine their individual immunologic functionality *in vitro*.

Accordingly, the present thesis established different protocols to generate primary CD14⁺ monocytes from human blood samples into monocyte-derived dendritic cells (MoDC) and Langerhans-like cells (MoLC) *ex vivo*, by the use of specific cytokines and confirmed the successful differentiation by phenotypic and functional analysis of the obtained subsets in comparison to human DC. The selective stimulation with microbial TLR agonists in presence or absence of TNF- α and IL-1 β enabled a simulation of steady-state or inflammatory

conditions and revealed a distinct disparity in the specific reactivity of both subsets towards bacterial and viral stimuli. The specific experimental setup led to significant modulations in the production and secretion of immune-regulatory cytokines or in the capability of a CCR7-dependent migration. Thus, this study refers to a possible conversion of the immunogenic characteristics of human DC populations, dependent on the respective skin environment. In accordance to the significance of dermal DC in the induction and regulation of antigen-specific immunity against bacterial stimuli, MoDC revealed a high activity against TLR2/1 and TLR4 agonists, whereas MoLC largely remained unaffected and thereby confirmed the postulated inactivity of epidermal LC against commensal microbes due to the loss of the specific PRR TLR2, 4 and 5. However, when TNF- α and IL-1 β were added, MoLC highly developed a phenotypically mature state and induced the release of Th17-related cytokines, indicating that human LC might regulate the activity of this specific Th subset in presence of pro-inflammatory stimuli. Therefore, these findings indicate that the newly obtained immunogenic capacity of MoLC towards bacterial pathogens is achieved by the activation of TLR related signaling pathways, caused by the impact of pro-inflammatory molecules TNF- α and IL-1 β . Considering this influence in presence of viral antigens, the TLR3 agonist poly(I:C) highly induced the secretion of Th1- and Th17-restricted cytokines by MoLC, highlighting epidermal LC as potent inducers of adaptive immune responses in respective skin lesions, whereas the analysis of gene levels in both subsets further indicated that skin resident DC exert a potent innate activity due to the expression of type 1 interferons. Thus, the immunological interaction of various DC subsets in human skin is critically defined by the respective environmental conditions and possibly linked to the pathogenesis of chronic inflammatory skin diseases.

Considering the diverse functional properties of epidermal LC and DDC, their specific contribution in the induction, regulation or aggravation of inflammatory skin disorders, such as psoriasis vulgaris, is still poorly understood. Strong evidence exists that highly reactive Th1 and Th17 cells play an important role in the development of an inflammatory and hyperproliferative tissue within the psoriatic plaques, thus an initial activation of T cells by activated DC is assumed. Importantly, recent studies revealed that the release of pro-inflammatory cytokines, mediating the priming and proliferation of specific Th subtypes, is strongly regulated by the mechanisms of autophagy, a highly conserved homeostatic cellular control system for the deletion of noxious or damaged organelles and proteins. Moreover, a crucial role for autophagy in the clearance of intracellular microbes is widely acknowledged and demonstrates the importance of this cellular process not only in the regulation of innate and adaptive immune responses but also in the functional properties of APC. In accordance, recent studies confirmed that modulations or dysfunctions of autophagy or related genes are

highly correlated to the pathogenesis and progression of neurodegenerative and chronic inflammatory disorders, like Alzheimer's or Crohn's disease.

In regard to the purpose of this thesis, different inhibitors of autophagy were used to evaluate possible variations in the mediation of innate or adaptive immunity by MoDC and MoLC. Lysosomotropic agents, like chloroquine (CHQ), selectively suppressed the formation of autolysosomes, a process of the late phase of autophagy, and additionally has led to a sustainable dysregulation of cytokine release by activated DC. Whilst the secretion of IL-12p70 was reduced in both subsets and consequently MoLC revealed a decrease in Th1 priming capacity, the activation with IL-1 α or IL-1 β together with CHQ mediated an enhanced production and secretion of IL-6, mainly by MoDC, whereas MoLC highly induced the release of IL-23. At present, the exact molecular mechanisms, connecting the initial findings on altered cytokine release and the inhibition of autophagy, remain largely unclear but a subsequent analysis revealed a high dependency on IL-1 receptor activity and a selective induction of IL-23 release, solely obtained by inhibitors of late stage autophagy. Moreover, the similar observations in response of TLR2/1 agonist Pam₃CSK₄ demonstrated an enhanced production of IL-23 also in MoDC, suggesting a fundamental discrepancy of the involved signaling molecules and their specific activity in response to certain stimuli, although a significant homology of TLR2/1 and IL-1 receptor dependent signaling pathways exist. Therefore, the obtained results indicate that the complex interplay of different regulatory processes, including the autolysosomal inactivation of specific effector molecules, leads to a reduced or enhanced release of Th1- and Th17-restricted cytokines by activated MoDC and MoLC. Furthermore, the current thesis highlights epidermal LC as potential critical mediators of Th17 activity during treatment with the anti-malarial agents CHQ or hydroxychloroquine, as inhibitors of selective mechanisms of autophagy, due to enhanced levels of IL-1 cytokines in inflammatory skin lesions.

The wide experience and expertise of the research group facilitated the establishment and substantial characterization of a three-dimensional full-thickness skin equivalent, whilst the concurrent incorporation of immature MoLC within the reconstructed epidermis led to the development of skin model with integrated immune cells. In agreement with the ethical principle of the 3R concept, which includes the reduction, replacement and refinement of animal testing procedures in industry and science, this model possibly serves as an alternative method for the predictive assessment of chemical sensitizers in future. Due to the complex immunological mechanisms leading to allergic contact dermatitis, DC subsets of human skin represent an essential feature in the mediation of adaptive immune responses and the dissociation of sensitizers and irritants. The previous characterization of *ex vivo*

generated MoLC confirmed their phenotypic and functional accordance to human LC and allowed the assessment of their complex maturation profile *in vitro*.

The obtained results confirmed the successful integration of immature MoLC into a reconstructed skin equivalent. Most importantly, the incorporated immune cells were mainly localized in suprabasal layers of the epidermis and were further distributed homogenously, in accordance to the physiological density of epidermal LC. Thus, the present thesis refers to a functioning communication between the relevant cell populations within the model and confirms the capability of this system as an alternative method for the characterization of skin-associated immunity. Future studies will analyze to which extent the integrated MoLC reveal immunologic functionality to induce the complex maturation process and exhibit migratory capacity in response to chemical sensitizers.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung / ursprüngliche Bezeichnung
3-MA	3-methyladenine (3-Methyladenin)
ACD	allergic contact dermatitis (allergische Kontaktdermatitis)
ActA	actin assembly-inducing protein
AhR	aryl hydrocarbon receptor (Arylhydrocarbonrezeptor)
AICD	activation-induced cell death
AMP	adenosine monophosphate (Adenosin-5-Monophosphat)
AMPK	adenosine monophosphate activated proteinkinase (AMP-induzierte Proteinkinase)
APC	antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATG	autophagy-related genes
ATG16L	autophagy-related 16 like 1
Bcl6	b cell CLL/lymphoma 6
Beclin-1	b cell lymphoma 2 interacting protein 1
BG	Birbeck granules (Birbeck Grnaua)
BLIMP1	B lymphocyte-induced maturation protein 1
BSA	bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)
CCL	CC-Chemokine ligand
CCR	c-c chemokine receptor (Chemokinrezeptoren)
CD40L	CD40 Ligand
cDC	classical DC / conventional DC (konventionelle DC)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CDP	common DC precursor (gemeinsamer DC Vorläufer)
CFU-GM	colony forming unit granulocyte/monocyte (Granulozyten-Makrophagen Vorläufer)
CHQ	chloroquine (Chloroquin)
CLR	c-type lectin receptor (C-Typ Lektin Rezeptor)
CMA	chaperone-mediated autophagy (Chaperon-vermittelte Autophagie)
CMFDA	5-chloromethylfluorescein diacetate (5-chlormethylfluoresceindiacetat)
CMP	common myeloid progenitor (gemeinsamer myeloider Vorläufer)
CPDA	citrate-phosphate-dextrose solution with adenine

CRD	carbohydrate recognition domains
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte antigen
CXCR4	stromal cell derived factor 1 receptor
CXCL12	stromal cell derived factor 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidine (3,3'-Diaminobenzidin)
DAMP	damage-associated molecular patterns (Alarmine, Schaden-assoziierte molekulare Muster)
DC	dendritic cell (Dendritische Zelle)
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DEC-205	lymphocyte antigen 75
DEPC	diethylpyrocarbonate (Diethylpyrocarbonat)
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	desoxy- nucleoside triphosphate (Desoxy-Nukleotid-Triphosphat)
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
DT	diphtheria toxin (Diphtherie-Toxin)
DTR	diphtheria toxin receptor (Diphtherie-Toxin Rezeptor)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
EE	epidermal equivalent cultures (Epidermis-Äquivalent)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmic reticulum (endoplasmatisches Retikulum)
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate (Fluoresceinisothiocyanat)
FKS	Fetales Kälberserum
Flt3	fms-like-tyrosinkinase-3
Flt3L	Flt3 ligand
Foxp3	forkhead box protein 3
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)

GFP	green fluorescent protein (grün-fluoreszierendes Protein)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierende Faktor)
hCLAT	human cell line activation test
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure)
HRP	horseradisch peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSC	hematopoietic stem cell (hämatopoetische Stammzelle)
Hydroxy-CHQ	hydroxychloroquine (Hydroxychloroquin)
ICAM	intercellular adhesion molecule
ICD	irritant contact dermatitis (irritative Kontaktdermatitis)
iDC	interstitial DC (interstitielle DC)
IDEC	inflammatory dendritic epidermal cells
IDO	indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	interferon (Interferon)
IHC	immunohistochemistry (Immunhistochemie)
IKK	I κ B kinase
IL	interleukin
IL-1RA	hydrocinnamoyl-L-valyl pyrrolidin, kompetetiver Antagonist des IL-1 Rezeptors
IL-1RAP	IL-1 receptor accessory protein (akzessorisches IL-1 Rezeptorprotein)
IMPase	inositol monophosphatase (Inositol-Monophosphatase)
iNOS	inducible nitric oxide synthase (induzierbare NO Synthase)
IRF	interferon regulatory factor
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
iTreg	inducible regulatory T cells (induzierbare regulatorische T-Zellen)
IU	international unit (internationale Einheit)
KG-1	human bone marrow-derived acute myelogenous leukemia cell line
KGM	keratinocyte growth medium (Keratinozyten-Wachstumsmedium)
LAMP	lysosomal-associated membrane protein
LC	Langerhans cell (Langerhans Zelle)
LC3	light-chain 3

LFA	leukocyte function-associated antigen
LiCl	lithium chloride (Lithiumchlorid)
LLNA	local lymph node assay (Lokaler Lymphknoten Assay)
LPS-EB	lipopolysaccharide from <i>E. coli</i> , 0111:B4 strain (Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i>)
MACS	magnetic cell sorting (magnetische Zellsortierung)
MAPK	mitogen activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MBL	mannose binding lectin (Mannose-bindendes Lectin)
M-MuLC	moloney murine leukemia virus
MDB	membrane desalting buffer
MDP	monocyte/macrophage and DC precursor (Monozyt/Macrophage und DC Vorläufer)
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mg	milligramm
mL	milliliter
mM	millimolar
MLP	multilymphoid progenitor (multilymphoider Vorläufer)
MMP	matrix metalloproteinase (Matrix-Metalloproteasen)
MMR	macrophage mannose receptor (Makrophage-Mannose Rezeptor)
MoDC	monocyte-derived dendritic cells (aus Monozyten abgeleitete dendritische Zellen)
MoLC	monocyte-derived Langerhans-like cells (aus Monozyten abgeleitete Langerhans-ähnlichen Zellen)
mTEC	medullary thymus epithelial cells (medulläre Thymusepithelzellen)
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
MUSST	myeloid U937 skin sensitisation test
MUTZ-3	CD34+ human acute myeloid leukemia cell line
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
µg	mikrogramm
µL	mikroliter
µM	mikromolar
NFκB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells

NHDF	normal human dermal fibroblasts (Normale humane dermale Fibroblasten)
NHK	normal human keratinocytes (Normale humane Keratinozyten)
NIK	NFκB inducing kinase (NFκB-induzierende Kinase)
NK Zelle	natural killer cell (Natürliche Killerzelle)
NKT Zelle	natural killer T cell (Natürliche Killer T-Lymphozyten)
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain receptors (NOD-like Rezeptor)
nTreg	natural regulatory T cells (natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen)
PAMP	pathogen associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PD-1	programmed cell death protein 1
pDC	plasmacytoid DC (plasmazytoide DC)
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin-chlorophyll
PFA	paraformaldehyde (Paraformaldehyd)
PGN	peptidoglycan (Peptidoglykan)
PhE	phosphatidylethanolamine (Phosphatidylethanolamin)
PhI	phosphatidylinositol (Phosphatidylinositol)
PhI3P	phosphatidylinositol-triphosphate (Phosphatidylinositol-triphosphat)
PI	propidium iodide (Propidiumiodid)
PRR	pattern recognition receptors (Mustererkennungsrezeptoren)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
QSAR	quantitative structure activity relationship (quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung)
RA	reagent additive
REACH	registration, evaluation and authorization of chemicals
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RORC	retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C
ROS	reactive oxygen species (reactive Sauerstoffspezies)

RPMI	roswell park memorial institute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
siRNA	small interfering RNA
slanDC	6-sulfo N-acetyllactosamin DC
SQSTM1	sequestome 1
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
STAT	signal transducers and activators of transcription
T-bet	T-box transcription factor expressed in T cells
TAK1	TGF- β -activated protein kinase 1
TAP	transporter associated with antigen presentation
TCR	T cell receptor (T-Zell Rezeptor)
Tfh	follicular helper T cells (follikuläre T Helferzellen)
TGF- β 1	transforming growth factor β 1 (transformierenden Wachstumsfaktor- β 1)
Th	T helper cell (T Helferzelle)
THP-1	human monocytic leukemia cell line
TipDC	TNF and iNOS-producing DC
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor (Toll-like Rezeptor)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
Tr1	type 1 regulatory T cells (Typ-1 regulatorische T-Lymphozyten)
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
Treg	regulatory T cell (regulatorische T-Lymphozyten)
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tris-Base	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
Tris-HCl	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochloride (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid)
TNF- α	tumor necrosis factor alpha (Tumornekrosefaktor-alpha)
TROP-2	tumor associated calcium signal transducer 2
TSC1	tuberous sclerosis 1

U	unit (Einheit)
U-937	human histiocytic lymphoma cell line
ULK-1	Unc-51-like kinase 1
UPS	ubiquitin-proteasome system (Ubiquitin-Proteasom-System)
V-ATPase	vacuolar-type H ⁺ -ATPase (H ⁺ -ATPasen vom V-Typ)
Vps34	vesicular protein sorting 34

7. Literaturverzeichnis

1. Langerhans, P., *Über die Nerven der menschlichen Haut.* Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med, 1868. **44**: p. 325.
2. Romani, N., B.E. Clausen, and P. Stoitzner, *Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin.* Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 120-41.
3. Schuler, G. and R.M. Steinman, *Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro.* J Exp Med, 1985. **161**(3): p. 526-46.
4. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.* J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
5. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity.* Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.
6. Stagg, A.J. and S.C. Knight, *Antigen-presenting Cells*, in eLS. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
7. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
8. Tan, J.K. and H.C. O'Neill, *Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity.* J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 319-24.
9. Nobelprize.org. "Ralph M. Steinman - Facts" 2014 Web. 23 Jan 2014.
10. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine.* Nature, 2007. **449**(7161): p. 419-26.
11. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
12. Steinman, R.M. and J. Idoyaga, *Features of the dendritic cell lineage.* Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 5-17.
13. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets.* Immunology, 2013. **140**(1): p. 22-30.
14. Jongbloed, S.L., et al., *Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens.* J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1247-60.
15. Perussia, B., V. Fanning, and G. Trinchieri, *A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses.* Nat Immun Cell Growth Regul, 1985. **4**(3): p. 120-137.
16. Poulin, L.F., et al., *Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells.* J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1261-71.
17. McIlroy, D., et al., *Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors.* Blood, 2001. **97**(11): p. 3470-7.
18. Geissmann, F., et al., *Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin.* J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 417-30.
19. Segura, E., et al., *Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes.* J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 653-60.
20. Nestle, F.O., et al., *Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets.* J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6535-45.
21. Hasséus, B., et al., *Langerhans cells from human oral epithelium are more effective at stimulating allogeneic T cells in vitro than Langerhans cells from skin.* Clin Exp Immunol, 2004. **136**(3): p. 483-489.
22. Parr, M.B., L. Kepple, and E.L. Parr, *Langerhans cells phagocytose vaginal epithelial cells undergoing apoptosis during the murine estrous cycle.* Biol Reprod, 1991. **45**(2): p. 252-60.
23. Casolaro, M.A., et al., *Accumulation of Langerhans' cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking.* Am Rev Respir Dis, 1988. **137**(2): p. 406-11.
24. Berman, B., et al., *Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults.* Br J Dermatol, 1983. **109**(5): p. 553-8.
25. Birbeck, M.S., A.S. Breathnach, and J.D. Overall, *An Electron Microscope Study of Basal Melanocytes and High-Level Clear Cells (Langerhans Cells) in Vitiligo1.* J Invest Dermatol, 1961. **37**(1): p. 51-64.
26. Bauer, T., et al., *Identification of Axl as a downstream effector of TGF-beta1 during Langerhans cell differentiation and epidermal homeostasis.* J Exp Med, 2012. **209**(11): p. 2033-47.
27. Eisenwort, G., et al., *Identification of TROP2 (TACSTD2), an EpCAM-like molecule, as a specific marker for TGF-beta1-dependent human epidermal Langerhans cells.* J Invest Dermatol, 2011. **131**(10): p. 2049-57.
28. Wilsmann-Theis, D., et al., *Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC).* Allergy, 2013. **68**(7): p. 890-8.
29. Schäkel, K., et al., *6-Sulfo LacNAc, a Novel Carbohydrate Modification of PSGL-1, Defines an Inflammatory Type of Human Dendritic Cells.* Immunity, 2002. **17**(3): p. 289-301.
30. Haniffa, M., M. Collin, and F. Ginhoux, *Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse.* Adv Immunol, 2013. **120**: p. 1-49.
31. Wollenberg, A., et al., *Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema.* J Invest Dermatol, 1996. **106**(3): p. 446-453.
32. Wu, L. and A. Dakic, *Development of dendritic cell system.* Cell Mol Immunol, 2004. **1**(2): p. 112-8.
33. Merad, M., et al., *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting.* Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 563-604.
34. Tsunetsugu-Yokota, Y. and M. Muhsen, *Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission.* Front Microbiol, 2013. **4**: p. 178.

35. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. Cell, 2001. **106**(3): p. 259-62.
36. Fogg, D.K., et al., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
37. Liu, K., et al., *In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis*. Science, 2009. **324**(5925): p. 392-7.
38. Ardavin, C., et al., *Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 761-3.
39. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3333-41.
40. Kasraie, S. and T. Werfel, *Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 942375.
41. Doulatov, S., et al., *Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 585-593.
42. Caux, C., et al., *Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines*. Springer Semin Immunopathol, 2000. **22**(4): p. 345-69.
43. Merad, M., et al., *Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1135-41.
44. Sere, K., et al., *Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation*. Immunity, 2012. **37**(5): p. 905-16.
45. Chang-Rodriguez, S., et al., *Fetal and neonatal murine skin harbors Langerhans cell precursors*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(3): p. 352-60.
46. Romani, N., G. Schuler, and P. Fritsch, *Ontogeny of Ia-positive and Thy-1-positive leukocytes of murine epidermis*. J Invest Dermatol, 1986. **86**(2): p. 129-33.
47. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin, *Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 935-47.
48. Ginhoux, F., et al., *The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3115-30.
49. Hoeffel, G., et al., *Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages*. J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1167-81.
50. Schulz, C., et al., *A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*. Science, 2012. **336**(6077): p. 86-90.
51. de Jong, M.A. and T.B. Geijtenbeek, *Langerhans cells in innate defense against pathogens*. Trends Immunol, 2010. **31**(12): p. 452-9.
52. Inaba, K., et al., *Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes*. J Exp Med, 1986. **164**(2): p. 605-13.
53. Romani, N., et al., *Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells*. J Exp Med, 1989. **169**(3): p. 1169-78.
54. Watts, C. and S. Amigorena, *Phagocytosis and antigen presentation*. Semin Immunol, 2001. **13**(6): p. 373-9.
55. Lim, J.P. and P.A. Gleeson, *Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(8): p. 836-43.
56. Nobes, C. and M. Marsh, *Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake?* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. R739-41.
57. Clark, G.J., et al., *The role of dendritic cells in the innate immune system*. Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 257-72.
58. Beutler, B.A., *TLRs and innate immunity*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1399-407.
59. Anderson, K.V., G. Jurgens, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product*. Cell, 1985. **42**(3): p. 779-89.
60. Hasan, U., et al., *Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2942-50.
61. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
62. Palm, N.W. and R. Medzhitov, *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 221-33.
63. Schreiberl, G., et al., *Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(10): p. 1573-82.
64. Takeuchi, J., et al., *Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(3): p. 674-9.
65. van der Aar, A.M., et al., *Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 1986-90.
66. Flacher, V., et al., *Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7959-67.
67. Heine, H. and E. Lien, *Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity*. Int Arch Allergy Immunol, 2003. **130**(3): p. 180-92.

68. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
69. Miggin, S.M. and L.A. O'Neill, *New insights into the regulation of TLR signaling*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(2): p. 220-6.
70. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 465-79.
71. de Witte, L., et al., *Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 367-71.
72. Figdor, C.G., Y. van Kooyk, and G.J. Adema, *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 77-84.
73. Martinon, F. and J. Tschopp, *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. Trends Immunol, 2005. **26**(8): p. 447-54.
74. Sahoo, M., et al., *Role of the inflammasome, IL-1beta, and IL-18 in bacterial infections*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2037-50.
75. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
76. Janssens, S. and R. Beyaert, *A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(9): p. 474-82.
77. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
78. Glaser, R., et al., *UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1117-23.
79. Lai, Y. and R.L. Gallo, *AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense*. Trends Immunol, 2009. **30**(3): p. 131-41.
80. Degli-Esposti, M.A. and M.J. Smyth, *Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(2): p. 112-24.
81. Fujii, S., et al., *Innate Valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 183-98.
82. Teunissen, M.B., M. Haniffa, and M.P. Collin, *Insight into the immunobiology of human skin and functional specialization of skin dendritic cell subsets to innovate intradermal vaccination design*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012. **351**: p. 25-76.
83. Garrett, W.S., et al., *Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42*. Cell, 2000. **102**(3): p. 325-34.
84. Lakadamyali, M., M.J. Rust, and X. Zhuang, *Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes*. Cell, 2006. **124**(5): p. 997-1009.
85. Trombetta, E.S., et al., *Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation*. Science, 2003. **299**(5611): p. 1400-3.
86. Delamarre, L., et al., *Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1630-4.
87. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
88. Burgdorf, S., et al., *Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 558-66.
89. Lin, M.L., et al., *The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 353-62.
90. Savina, A., et al., *NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during cross-presentation by dendritic cells*. Cell, 2006. **126**(1): p. 205-18.
91. Guermonprez, P., et al., *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 397-402.
92. Cohen, N.R., S. Garg, and M.B. Brenner, *Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity*. Adv Immunol, 2009. **102**: p. 1-94.
93. Gerlini, G., et al., *Cd1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(3): p. 576-82.
94. Ochoa, M.T., et al., *"Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(9): p. 2225-31.
95. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
96. Villablanca, E.J., V. Russo, and J.R. Mora, *Dendritic cell migration and lymphocyte homing imprinting*. Histo Histopathol, 2008. **23**(7): p. 897-910.
97. Hanahan, D., A. Lanzavecchia, and E. Mihich, *Fourteenth Annual Pezcoller Symposium: the novel dichotomy of immune interactions with tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 3005-8.
98. Bartolome, R.A., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2534-43.
99. Ratzinger, G., 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): p. 4361-71.
100. Ouwehand, K., et al., *CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis*. Eur J Immunol, 2008. **38**(11): p. 3050-9.

101. Villablanca, E.J. and J.R. Mora, *A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN*. Eur J Immunol, 2008. **38**(11): p. 2975-80.
102. Jang, M.H., et al., *CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 803-10.
103. Randolph, G.J., V. Angeli, and M.A. Swartz, *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 617-28.
104. Fujii, S., et al., *The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1607-18.
105. Turley, S.J., et al., *Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells*. Science, 2000. **288**(5465): p. 522-7.
106. Lechmann, M., et al., *CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 273-5.
107. Scholler, N., et al., *Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2599-602.
108. Manickasingham, S. and C. Reis e Sousa, *Microbial and T cell-derived stimuli regulate antigen presentation by dendritic cells in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5027-34.
109. Sporri, R. and C. Reis e Sousa, *Newly activated T cells promote maturation of bystander dendritic cells but not IL-12 production*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6406-13.
110. Schulz, O., et al., *CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 453-62.
111. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
112. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
113. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
114. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 180-90.
115. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
116. Szabo, S.J., et al., *Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 817-24.
117. Murray, H.W., et al., *Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular Toxoplasma gondii*. J Immunol, 1985. **134**(3): p. 1982-8.
118. Vartanian, T., et al., *Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis*. Mol Med, 1995. **1**(7): p. 732-43.
119. Canete, J.D., et al., *Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies*. Ann Rheum Dis, 2000. **59**(4): p. 263-8.
120. Tokura, Y., *Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 2010. **58**(1): p. 1-7.
121. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.
122. Li, Z., Y. Zhang, and B. Sun, *Current understanding of Th2 cell differentiation and function*. Protein Cell, 2011. **2**(8): p. 604-11.
123. Steinke, J.W. and L. Borish, *Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists*. Respir Res, 2001. **2**(2): p. 66-70.
124. Stockinger, B. and M. Veldhoen, *Differentiation and function of Th17 T cells*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 281-6.
125. van de Veerdonk, F.L., et al., *Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview*. BMB Rep, 2009. **42**(12): p. 776-87.
126. Lai, Y., et al., *The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury*. Immunity, 2012. **37**(1): p. 74-84.
127. Ramirez, J.M., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**(9): p. 2450-9.
128. Eyerich, S., et al., *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3573-3585.
129. Tubo, N.J., J.B. McLachlan, and J.J. Campbell, *Chemokine receptor requirements for epidermal T-cell trafficking*. Am J Pathol, 2011. **178**(6): p. 2496-503.
130. Boniface, K., et al., *A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(3): p. 407-415.
131. Gittler, J.K., et al., *Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(6): p. 1344-1354.
132. Zhang, N., H.F. Pan, and D.Q. Ye, *Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention*. Mol Cell Biochem, 2011. **353**(1-2): p. 41-6.
133. Kaplan, M.H., *Th9 cells: differentiation and disease*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 104-15.

134. Hadeiba, H. and E.C. Butcher, *Thymus-homing dendritic cells in central tolerance*. Eur J Immunol, 2013. **43**(6): p. 1425-9.
135. Koble, C. and B. Kyewski, *The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1505-13.
136. Hinterberger, M., et al., *Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance*. Nat Immunol, 2010. **11**(6): p. 512-9.
137. Xing, Y. and K.A. Hogquist, *T-cell tolerance: central and peripheral*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
138. Kim, J.M. and A. Rudensky, *The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells*. Immunol Rev, 2006. **212**(1): p. 86-98.
139. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
140. Cools, N., et al., *Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(6): p. 1365-74.
141. Hawiger, D., et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 769-79.
142. Bonifaz, L., et al., *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1627-38.
143. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
144. Furio, L., et al., *Human langerhans cells are more efficient than CD14(-)CD1c(+) dermal dendritic cells at priming naive CD4(+) T cells*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(5): p. 1345-54.
145. Chikuma, S., et al., *PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6682-9.
146. Kurts, C., et al., *The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1)*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 415-20.
147. Munn, D.H., et al., *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1867-70.
148. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.
149. Jonuleit, H. and E. Schmitt, *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6323-7.
150. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 207-14.
151. Groux, H., et al., *Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 19-29.
152. Wilson, N.S., D. El-Sukkari, and J.A. Villadangos, *Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2187-95.
153. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 233-8.
154. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.
155. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, *Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 610-21.
156. Lundqvist, A., et al., *Mature dendritic cells induce tumor-specific type 1 regulatory T cells*. J Immunother, 2005. **28**(3): p. 229-35.
157. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
158. Borkowski, T.A., 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): p. 2417-22.
159. Ginhoux, F., et al., *Langerhans cells arise from monocytes in vivo*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 265-73.
160. Fainaru, O., et al., *Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation*. Embo J, 2004. **23**(4): p. 969-79.
161. Saito, M., et al., *Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(8): p. 746-50.
162. Naglich, J.G., et al., *Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor*. Cell, 1992. **69**(6): p. 1051-61.
163. Jung, S., et al., *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
164. Kissenpfennig, A., 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): p. 643-54.
165. Segura, E., et al., *Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 336-48.

166. Collin, M. and L. Jardine, *A question of persistence: Langerhans cells and graft versus host disease*. Exp Dermatol, 2014.
167. Fong, L., et al., *Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4254-9.
168. Lodge, P.A., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial*. Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 829-33.
169. Caux, C., et al., *GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 258-61.
170. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *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): p. 1109-18.
171. Strobl, H., et al., *TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1499-507.
172. Geissmann, F., et al., *Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 961-6.
173. Masterson, A.J., et al., *MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors*. Blood, 2002. **100**(2): p. 701-3.
174. Koeffler, H.P. and D.W. Golde, *Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity*. Science, 1978. **200**(4346): p. 1153-4.
175. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer, 1980. **26**(2): p. 171-6.
176. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565-77.
177. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 463-77.
178. Zheng, Q., J. Li, and X. Wang, *Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies*. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2009. **1**(2): p. 127-42.
179. Neufeld, T.P., *Autophagy and cell growth--the yin and yang of nutrient responses*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 10): p. 2359-68.
180. Ravikumar, B., et al., *Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(7): p. 1209-16.
181. Thorburn, A., *Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes*. Apoptosis, 2008. **13**(1): p. 1-9.
182. Yu, L., et al., *Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 4952-7.
183. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 3-12.
184. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-9.
185. Rioux, J.D., et al., *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. Nat Genet, 2007. **39**(5): p. 596-604.
186. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.
187. Liang, X.H., et al., *Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 672-6.
188. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin, *Autophagy in immunity and inflammation*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 323-35.
189. Schmid, D., M. Pypaert, and C. Munz, *Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 79-92.
190. Saftig, P., W. Beertsen, and E.L. Eskelinen, *LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation*. Autophagy, 2008. **4**(4): p. 510-2.
191. Klionsky, D.J., *Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 931-7.
192. Axe, E.L., et al., *Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 685-701.
193. Simonsen, A. and S.A. Tooze, *Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes*. J Cell Biol, 2009. **186**(6): p. 773-82.
194. Diaz-Troya, S., et al., *The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals*. Autophagy, 2008. **4**(7): p. 851-65.
195. Backer, J.M., *The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34*. Biochem J, 2008. **410**(1): p. 1-17.
196. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.
197. Bai, H., et al., *A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers*. Oncogene, 2012. **31**(40): p. 4397-408.

198. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. *Embo j*, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
199. Barth, S., D. Glick, and K.F. Macleod, *Autophagy: assays and artifacts*. *J Pathol*, 2010. **221**(2): p. 117-24.
200. Johansen, T. and T. Lamark, *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*. *Autophagy*, 2011. **7**(3): p. 279-96.
201. Eskelinen, E.L., *To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells*. *Autophagy*, 2008. **4**(2): p. 257-60.
202. Rogov, V., et al., *Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy*. *Mol Cell*, 2014. **53**(2): p. 167-78.
203. Kimura, S., et al., *Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3*. *Methods Enzymol*, 2009. **452**: p. 1-12.
204. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. *Genes Dev*, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
205. Mitchener, J.S., et al., *Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells*. *Am J Pathol*, 1976. **83**(3): p. 485-92.
206. Weber, J.D. and D.H. Gutmann, *Deconvoluting mTOR biology*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(2): p. 236-48.
207. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. *Cell*, 2006. **124**(3): p. 471-84.
208. Egan, D., et al., *The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR*. *Autophagy*, 2011. **7**(6): p. 643-4.
209. Sabatini, D.M., *mTOR and cancer: insights into a complex relationship*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(9): p. 729-34.
210. Mizushima, N., *The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(2): p. 132-9.
211. Shaw, R.J., *LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009. **196**(1): p. 65-80.
212. Qin, L., et al., *ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy*. *Autophagy*, 2010. **6**(2): p. 239-47.
213. Deretic, V. and B. Levine, *Autophagy, immunity, and microbial adaptations*. *Cell Host Microbe*, 2009. **5**(6): p. 527-49.
214. Lee, H.K., et al., *In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells*. *Immunity*, 2010. **32**(2): p. 227-39.
215. Sanjuan, M.A., et al., *Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis*. *Nature*, 2007. **450**(7173): p. 1253-7.
216. Sumpter, R., Jr. and B. Levine, *Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning*. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(7): p. 699-711.
217. Dreux, M. and F.V. Chisari, *Viruses and the autophagy machinery*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(7): p. 1295-1307.
218. Moreau, K., et al., *Autophagosomes can support Yersinia pseudotuberculosis replication in macrophages*. *Cell Microbiol*, 2010. **12**(8): p. 1108-23.
219. Yoshikawa, Y., et al., *Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(10): p. 1233-40.
220. Saitoh, T. and S. Akira, *Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins*. *J Cell Biol*, 2010. **189**(6): p. 925-35.
221. Lee, H.K., et al., *Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells*. *Science*, 2007. **315**(5817): p. 1398-401.
222. Jounai, N., et al., *The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(35): p. 14050-5.
223. Harris, J., *Autophagy and cytokines*. *Cytokine*, 2011. **56**(2): p. 140-4.
224. Petiot, A., et al., *Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(2): p. 992-8.
225. Harris, J., et al., *T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*, 2007. **27**(3): p. 505-17.
226. Salgame, P., *Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(4): p. 374-80.
227. Gutierrez, M.G., et al., *Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages*. *Cell*, 2004. **119**(6): p. 753-66.
228. Suzuki, H.I., K. Kiyono, and K. Miyazono, *Regulation of autophagy by transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling*. *Autophagy*, 2010. **6**(5): p. 645-7.
229. Shi, C.S. and J.H. Kehrl, *MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(48): p. 33175-82.
230. Saitoh, T., et al., *Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production*. *Nature*, 2008. **456**(7219): p. 264-8.
231. Harris, J., et al., *Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(11): p. 9587-97.
232. Qu, X., et al., *Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development*. *Cell*, 2007. **128**(5): p. 931-46.
233. Yang, Y.P., et al., *Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators*. *Acta Pharmacol Sin*, 2013. **34**(5): p. 625-35.

234. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-26.
235. Hochfeld, W.E., S. Lee, and D.C. Rubinsztein, *Therapeutic induction of autophagy to modulate neurodegenerative disease progression*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(5): p. 600-4.
236. Kim, D.S., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in endoplasmic reticulum stress-induced cell death and autophagy in human gingival fibroblasts*. Biol Pharm Bull, 2010. **33**(4): p. 545-9.
237. Kim, D.H., et al., *mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery*. Cell, 2002. **110**(2): p. 163-75.
238. Ravikumar, B., et al., *Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 585-95.
239. Vignot, S., et al., *mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives*. Ann Oncol, 2005. **16**(4): p. 525-37.
240. Sarkar, S., et al., *Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5641-52.
241. Sarkar, S., et al., *Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase*. J Cell Biol, 2005. **170**(7): p. 1101-11.
242. Martelli, A.M., et al., *Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment*. Oncotarget, 2012. **3**(4): p. 371-94.
243. Scarlatti, F., et al., *Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18384-91.
244. Sarkar, S., et al., *Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 46-56.
245. Seglen, P.O. and P.B. Gordon, *3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 1889-92.
246. Takatsuka, C., et al., *3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions*. Plant Cell Physiol, 2004. **45**(3): p. 265-74.
247. Caro, L.H., et al., *3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism*. Eur J Biochem, 1988. **175**(2): p. 325-9.
248. Yamamoto, A., et al., *Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells*. Cell Struct Funct, 1998. **23**(1): p. 33-42.
249. Klionsky, D.J., et al., *Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes?* Autophagy, 2008. **4**(7): p. 849-50.
250. Harhaji-Trajkovic, L., et al., *Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation*. Pharm Res, 2012. **29**(8): p. 2249-63.
251. Thome, R., et al., *Chloroquine: modes of action of an undervalued drug*. Immunol Lett, 2013. **153**(1-2): p. 50-7.
252. Moriyasu, Y. and Y. Inoue, *Use of protease inhibitors for detecting autophagy in plants*. Methods Enzymol, 2008. **451**: p. 557-80.
253. Kimura, T., et al., *Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy*. Cancer Res, 2013. **73**(1): p. 3-7.
254. Li, X., et al., *Autophagy modulation as a target for anticancer drug discovery*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(5): p. 612-24.
255. Smith Pease, C.K., D.A. Basketter, and G.Y. Patlewicz, *Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism*. Clin Exp Dermatol, 2003. **28**(2): p. 177-183.
256. dos Santos, G.G., et al., *Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **236**(3): p. 372-82.
257. Basketter, D.A., F. Gerberick, and I. Kimber, *The local lymph node assay and the assessment of relative potency: status of validation*. Contact Dermatitis, 2007. **57**(2): p. 70-5.
258. Russell, W.M.S., Burch, R.L., *The principles of humane experimental technique*. 1959; Available from: <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/1486173.html>.
259. *European Regulation, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC*. Official Journal of the European Union L396, 2006: p. 1-849.
260. Patlewicz, G., et al., *An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential*. SAR QSAR Environ Res, 2007. **18**(5-6): p. 515-41.
261. Spielmann, H., et al., *The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test*. Altern Lab Anim, 2007. **35**(6): p. 559-601.
262. Gibbs, S., et al., *An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **272**(2): p. 529-41.
263. Antonopoulos, C., et al., *IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(2): p. 361-7.
264. Maxwell, G., et al., *Skin sensitisation: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment*. Altex, 2011. **28**(1): p. 50-5.

265. Neves, B.M., et al., *Differential modulation of CXCR4 and CD40 protein levels by skin sensitizers and irritants in the FSDC cell line*. Toxicol Lett, 2008. **177**(1): p. 74-82.
266. Ouwehand, K., et al., *Epidermis-to-dermis migration of immature Langerhans cells upon topical irritant exposure is dependent on CCL2 and CCL5*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 2026-34.
267. Ouwehand, K., et al., *Comparison of a novel CXCL12/CCL5 dependent migration assay with CXCL8 secretion and CD86 expression for distinguishing sensitizers from non-sensitizers using MUTZ-3 Langerhans cells*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(2): p. 578-85.
268. Rees, B., et al., *Inter-laboratory study of the in vitro dendritic cell migration assay for identification of contact allergens*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(8): p. 2124-34.
269. Martin, S.F., et al., *T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(24): p. 4171-84.
270. Dezutter-Dambuyant, C., et al., *Evolutive skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin*. Biomed Mater Eng, 2006. **16**(4 Suppl): p. S85-94.
271. Bechettoille, N., et al., *Effects of solar ultraviolet radiation on engineered human skin equivalent containing both Langerhans cells and dermal dendritic cells*. Tissue Eng, 2007. **13**(11): p. 2667-79.
272. Ouwehand, K., et al., *Technical advance: Langerhans cells derived from a human cell line in a full-thickness skin equivalent undergo allergen-induced maturation and migration*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(5): p. 1027-33.
273. Zoschke, C., *Produktion organotypischer cSCC Modelle*. Standard operating Procedure (SOP), 2013.
274. Legler, D.F., et al., *Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 966-73.
275. de Jong, M.A., L. de Witte, and T.B. Geijtenbeek, *Isolation of immature primary Langerhans cells from human epidermal skin*. Methods Mol Biol, 2010. **595**: p. 55-65.
276. Kitano, Y. and N. Okada, *Separation of the epidermal sheet by dispase*. Br J Dermatol, 1983. **108**(5): p. 555-60.
277. Boyum, A., *Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media*. Methods Enzymol, 1984. **108**: p. 88-102.
278. Radbruch, A., et al., *High-gradient magnetic cell sorting*. Methods Cell Biol, 1994. **42 Pt B**: p. 387-403.
279. Haller Hasskamp, J., J.L. Zapas, and E.G. Elias, *Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults*. Am J Hematol, 2005. **78**(4): p. 314-5.
280. Sciaky, N., et al., *Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells*. J Cell Biol, 1997. **139**(5): p. 1137-55.
281. Zoschke, C. and H. Gonska, *Keratinocyten- und Fibroblastenisolierung aus humanen Biopsien*. Standard operating Procedure (SOP), 2014.
282. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
283. van der Aar, A.M., et al., *Cutting edge: virus selectively primes human langerhans cells for CD70 expression promoting CD8+ T cell responses*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3488-92.
284. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 476-83.
285. Cooper, A.M. and S.A. Khader, *IL-12p40: an inherently agonistic cytokine*. Trends Immunol, 2007. **28**(1): p. 33-8.
286. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33.
287. Scandella, E., et al., *Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1354-61.
288. Renn, C.N., et al., *TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 298-305.
289. Kuznik, A., et al., *Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4794-804.
290. Zhou, Y., et al., *TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C*. Innate Immun, 2013. **19**(2): p. 184-92.
291. Peral de Castro, C., et al., *Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion*. J Immunol, 2012. **189**(8): p. 4144-53.
292. Karres, I., et al., *Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 2): p. R1058-64.
293. Friedman, S.J., *Pustular psoriasis associated with hydroxychloroquine*. J Am Acad Dermatol, 1987. **16**(6): p. 1256-7.
294. Landewe, R.B., et al., *Cyclosporine and chloroquine synergistically inhibit the interferon-gamma production by CD4 positive and CD8 positive synovial T cell clones derived from a patient with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1992. **19**(9): p. 1353-7.
295. Kobayashi, M., et al., *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 827-45.
296. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
297. Kiyono, K., et al., *Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells*. Cancer Res, 2009. **69**(23): p. 8844-52.
298. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.

299. Mauviel, A., et al., *Induction of interleukin-1 beta production in human dermal fibroblasts by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. Involvement of protein kinase-dependent and adenylate cyclase-dependent regulatory pathways.* J Cell Biochem, 1991. **47**(2): p. 174-83.
300. Bursch, L.S., et al., *Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells.* J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3147-56.
301. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
302. Hemmi, H. and S. Akira, *TLR signalling and the function of dendritic cells.* Chem Immunol Allergy, 2005. **86**: p. 120-35.
303. Ohtani, T., et al., *TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation.* Immunology, 2009. **126**(4): p. 485-99.
304. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
305. Shklovskaya, E., B. Roediger, and B. Fazekas de St Groth, *Epidermal and dermal dendritic cells display differential activation and migratory behavior while sharing the ability to stimulate CD4+ T cell proliferation in vivo.* J Immunol, 2008. **181**(1): p. 418-30.
306. Moodycliffe, A.M., et al., *CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes.* J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 2011-20.
307. Horner, A.A., et al., *gamma/delta T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes.* J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 1239-44.
308. Gauchat, J.F., et al., *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils.* Nature, 1993. **365**(6444): p. 340-3.
309. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 445-9.
310. Peiser, M., R. Wanner, and G. Kolde, *Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking.* J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 616-22.
311. Christensen, H.R., H. Frokiaer, and J.J. Pestka, *Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells.* J Immunol, 2002. **168**(1): p. 171-8.
312. Stoitzner, P., et al., *Langerhans cells cross-present antigen derived from skin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7783-8.
313. Schön, M., et al., *Pathogenic function of IL-1 beta in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice.* Clin Exp Immunol, 2001. **123**(3): p. 505-10.
314. Wang, Q., et al., *Novel approach for interleukin-23 up-regulation in human dendritic cells and the impact on T helper type 17 generation.* Immunology, 2011. **134**(1): p. 60-72.
315. Lukens, J.R., J.M. Gross, and T.D. Kanneganti, *IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 315.
316. Kumar, M.M., et al., *Toll-like receptors 7, 8, and 9 expression and function in primary human cervical cancer Langerhans cells: evidence of anergy.* Int J Gynecol Cancer, 2013. **23**(1): p. 184-92.
317. Epaulard, O., et al., *TLR-3 and TLR-7/8 ligands indirectly activate Langerhans cells when intradermally injected by triggering the recruitment of inflammatory cells.* Retrovirology, 2012. **9**(Suppl 2): p. P7.
318. Olatunde, I.A., *Chloroquine concentrations in the skin of rabbits and man.* Br J Pharmacol, 1971. **43**(2): p. 335-40.
319. Kalia, S. and J.P. Dutz, *New concepts in antimalarial use and mode of action in dermatology.* Dermatol Ther, 2007. **20**(4): p. 160-74.
320. Shafer, B., M.M. Cahn, and E.J. Levy, *Absorption of antimalarial drugs in human skin; spectroscopic and chemical analysis in epidermis and corium.* J Invest Dermatol, 1958. **30**(6): p. 341-5.
321. Rajkovic, I., et al., *Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans'-like cells.* Immunology, 2011. **132**(2): p. 217-25.
322. Frucht, D.M., *IL-23: a cytokine that acts on memory T cells.* Sci STKE, 2002. **2002**(114): p. pe1.
323. Trocoli, A. and M. Djavaheri-Mergny, *The complex interplay between autophagy and NF-kappaB signaling pathways in cancer cells.* Am J Cancer Res, 2011. **1**(5): p. 629-49.
324. Mise-Omata, S., et al., *A proximal kappaB site in the IL-23 p19 promoter is responsible for RelA- and c-Rel-dependent transcription.* J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6596-603.
325. Murphy, T.L., et al., *Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5258-67.
326. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor.* Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
327. Yan, P., et al., *Targeting autophagic regulation of NFkappaB in HTLV-I transformed cells by geldanamycin: implications for therapeutic interventions.* Autophagy, 2007. **3**(6): p. 600-3.
328. Colleran, A., et al., *Autophagosomal I kappa B alpha degradation plays a role in the long term control of tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activity.* J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 22886-93.
329. Qing, G., P. Yan, and G. Xiao, *Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of I kappa B kinase (IKK).* Cell Res, 2006. **16**(11): p. 895-901.
330. Herrero-Martin, G., et al., *TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells.* Embo j, 2009. **28**(6): p. 677-85.
331. Criollo, A., et al., *The IKK complex contributes to the induction of autophagy.* Embo j, 2010. **29**(3): p. 619-31.

332. Gilmore, T.D. and S. Gerondakis, *The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease*. Genes Cancer, 2011. **2**(7): p. 695-711.
333. Tsankov, N., I. Angelova, and J. Kazandjieva, *Drug-induced psoriasis. Recognition and management*. Am J Clin Dermatol, 2000. **1**(3): p. 159-65.
334. Fry, L. and B.S. Baker, *Triggering psoriasis: the role of infections and medications*. Clin Dermatol, 2007. **25**(6): p. 606-15.
335. EFSA, *Opinion on the "Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes"*, E. Commission, Editor. 2005, The EFSA Journal. p. 1-46.
336. Matsumoto, K., et al., *Modulation of growth and differentiation in normal human keratinocytes by transforming growth factor-beta*. J Cell Physiol, 1990. **145**(1): p. 95-101.
337. Wedroff, N.S., *Zur Frage der Sensibilisierung der Haut: Die Sensibilisierung für Dinitrochlorbenzol unter Gewerbebedingungen*. Archiv für Gewerbepathologie und Gewerbehygiene, 1932. **3**(4): p. 509-522.
338. Schaller, M. and G. Weindl, *Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia for the study of host-pathogen interactions*. Methods Mol Biol, 2009. **470**: p. 327-45.
339. KÜchler, S., et al., *Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down*. Altern Lab Anim, 2011. **39**(5): p. 471-80.
340. e.V., V.F.A. *Pressemitteilung: Forschungspreis für künstliche Haut verliehen*. 2013 August, 9th 2013; Available from: <http://www.vfa.de/0x14c87>.