

Aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung

**In vitro Testsysteme zur Detektion des  
sensibilisierenden Potentials von Substanzen:**

Untersuchungen über die Funktion von PD-L1 bei  
Interaktionen von Dendritischen Zellen mit T-Zellen

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

**Manuel Hitzler**

aus Ulm

Berlin 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2008 bis Juni 2013 unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Andreas Luch am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Andreas Luch

2. Gutachter: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

Tag der Disputation: 02.04.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	ALLERGISCHE KONTAKTDERMATITIS.....	1
1.2	IN VITRO TESTSYSTEME ZUR DETEKTION VON SENSIBILISIERENDEN SUBSTANZEN .....	3
1.3	INDUKTION UND REGULATION DER T-ZELL-ANTWORT .....	6
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>12</b>
3.1	EVALUATION OF NEW BIOMARKERS FOR THE DETECTION OF CHEMICAL SENSITIZATION IN HUMAN SKIN: A COMPARATIVE STUDY APPLYING THP-1, MUTZ-3 AND PRIMARY DENDRITIC CELLS IN CULTURE .....	12
3.2	HUMAN LANGERHANS CELLS CONTROL TH CELLS VIA PROGRAMMED DEATH-LIGAND 1 IN RESPONSE TO BACTERIAL STIMULI AND NICKEL-INDUCED CONTACT ALLERGY .....	24
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>35</b>
4.1	VERGLEICH NEUER UND ETABLIERTER BIOMARKER FÜR DIE DETEKTION VON KONTAKTALLERGENEN AUF THP-1, MUTZ-3 UND PRIMÄREN DENDRITISCHEN ZELLEN .....	35
4.1.1	<i>Vorhersage eines sensibilisierenden Potentials anhand von Oberflächenmarkern .....</i>	<i>36</i>
4.1.2	<i>Vorhersage eines sensibilisierenden Potentials anhand von löslichen Biomarkern.....</i>	<i>37</i>
4.2	DIE REGULATION DER T-ZELL-ANTWORT BEI DER NICKEL INDUZIERTEN KONTAKTALLERGIE DURCH PD-L1 AUF LANGERHANS-ZELLEN .....	40
4.2.1	<i>Expression von PD-L1 auf LC und in Hautbiopsien von Nickelallergikern.....</i>	<i>40</i>
4.2.2	<i>Konsequenzen der erhöhten PD-L1 Expression auf die T-Zell Antwort.....</i>	<i>40</i>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b> .....	<b>61</b>
10.1	PUBLIKATIONEN ENTSTANDEN IM RAHMEN DER PROMOTION.....	61
10.2	WEITERE PUBLIKATIONEN .....	62

# 1 Einleitung

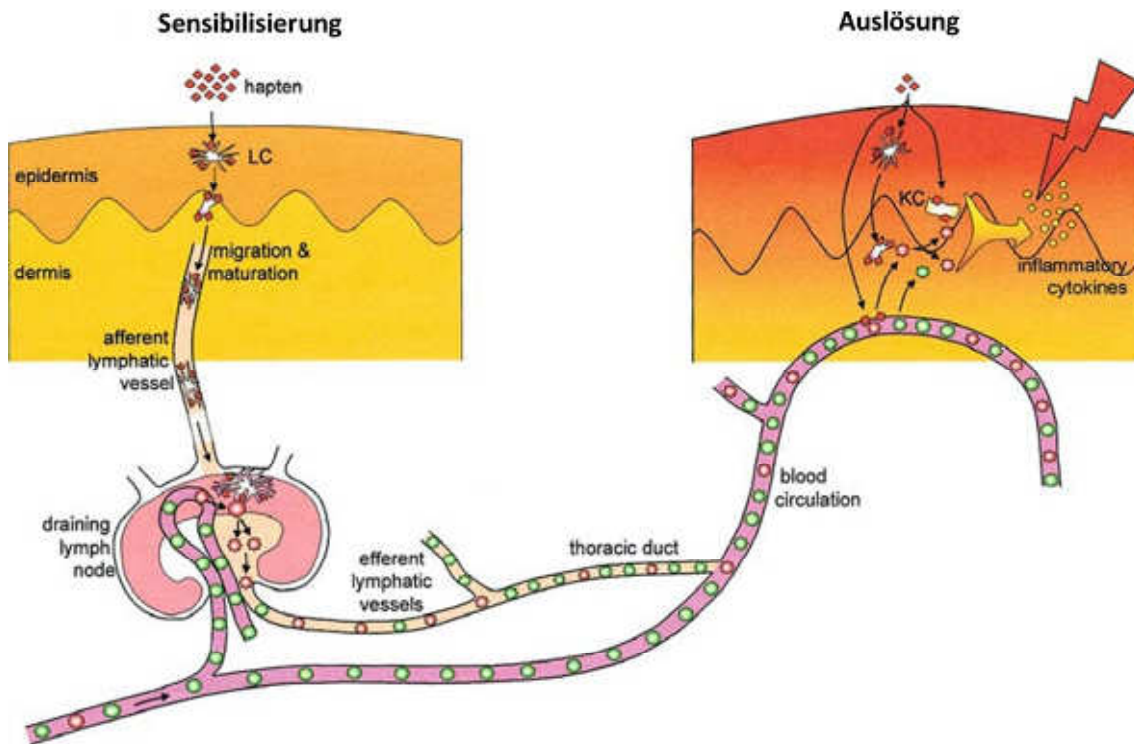
## 1.1 Allergische Kontaktdermatitis

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine weit verbreitete inflammatorische Hauterkrankung, die durch den Kontakt mit niedermolekularen Xenobiotika ausgelöst wird. Epidemiologische Untersuchungen haben ergeben, dass ca. 15-20% der Bevölkerung in den westlichen Industrieländern unter einer allergischen Kontaktdermatitis leiden (Nielsen et al., 2001; Ring et al., 2010) und in der Arbeitsmedizin die Prävalenz mit ca. 20% besonders hoch ist (Diepgen und Conrads, 1999; Diepgen, 2003). Die allergische Kontaktdermatitis ist eine durch T-Zellen vermittelte Immunreaktion des Typs IV (Gell and Coombs, 1963). Sie wird von kleinen, reaktiven Molekülen (< 500 Dalton) ausgelöst (Bos and Meinardi, 2000; Merk et al., 2007), die sowohl das angeborene Immunsystem aktivieren als auch nach Bindung an Proteine (Haptenisierung) die adaptive Immunantwort mit antigenspezifischen T-Zellen induzieren (Kaplan et al., 2012; Martin, 2012; Rustemeyer et al., 2011).

Die Manifestation einer allergischen Kontaktdermatitis erfolgt in zwei Phasen, der Sensibilisierungsphase und der Auslösephase (Abb. 1). In der Sensibilisierungsphase werden nach dem Erstkontakt mit dem Allergen die Langerhans-Zellen (LC) und die Keratinozyten in der Epidermis sowie Dendritische Zellen (DC) in der Dermis aktiviert. Diese antigenpräsentierenden Zellen wandern von der Haut zu den lokalen Lymphknoten und präsentieren dort den naiven T-Zellen das haptenisierete Peptid (Kaplan et al., 2012). Die antigenspezifisch aktivierten T-Zellen können unter anderem zu T-Helfer-1 ( $T_H1$ ),  $T_H2$ ,  $T_H17$ , regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen differenzieren (Cavani et al., 2012; Vocanson et al., 2009), wandern

## Einleitung

dann entlang eines Chemokingradienten in die Haut ein und persistieren dort (Kaplan et al., 2012; Kupper und Fuhlbrigge, 2004).



**Abb. 1: Entstehung einer allergischen Kontaktdermatitis.** Während der Sensibilisierung (links), löst der Kontakt eines Allergens mit der Haut die Migration der Langerhans-Zellen (LC) aus. Diese wandern über die afferenten Lymphgefäße zu den lokalen Lymphknoten. Hier präsentieren sie naiven T-Zellen haptenisierte Proteine über den MHC Komplex. Daraufhin proliferieren allergenspezifische T-Zellen und differenzieren zu Effektor- und Gedächtniszellen, welche wiederum über die efferenten Lymphgefäße in den Blutkreislauf gelangen. Aufgrund ihrer neu erworbenen Rezeptorausstattung wandern diese Zelle wiederum in die Haut ein und persistieren dort. Ein erneuter Allergenkontakt löst daraufhin die Effektorphase aus (rechts). Die haptenenspezifischen T-Zellen können durch eine Vielzahl von Zellen, einschließlich Langerhans-Zellen und Keratinozyten (KC) aktiviert werden und produzieren dann proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Dies führt zur Infiltration weiterer Immunzellen und damit zur Entwicklung eines Kontaktekzems (Rustemeyer, Contact Dermatitis, 2011, modifiziert).

Bei einem erneuten Kontakt mit dem Allergen (Auslösephase) werden die in der Haut persistierenden T-Gedächtniszellen aktiviert und lösen dort das, für die Kontaktdermatitis typische, Ekzem aus. An dieser Auslösephase sind verschiedene T-Zell Subpopulationen beteiligt. Beiden, sowohl den CD4 positiven T-Helferzellen, wie  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  und  $T_H22$  Zellen, als auch den

CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen wird eine grundlegende Funktion bei der allergischen Kontaktdermatitis zugeschrieben (Cavani et al., 2012).

### **1.2 In vitro Testsysteme zur Detektion von sensibilisierenden Substanzen**

Um potentiell human sensibilisierende Substanzen zu identifizieren, werden bis zum heutigen Zeitpunkt vor allem Tierversuche durchgeführt. Um diese zu reduzieren bzw. zu vermeiden, werden aktuell neue wissenschaftliche Strategien entwickelt. Dabei kristallisieren sich folgende drei Ansätze heraus:

1. Durch die Verwendung von *in silico* Modellen soll das sensibilisierende Potential einer Substanz mittels „Quantitativer Struktur- Wirkungsbeziehungen“ (QSAR) vorhergesagt werden. Aufgrund ihrer chemischen Struktur und Reaktivität soll auf das allergene Potential einer Substanz geschlossen und eine Klassifizierung vorgenommen werden (Roberts and Patlewicz, 2007). Vorhersagen aufgrund dieser Grundlagen können für Substanzen, welche die gleichen Reaktionsmechanismen teilen, sehr genau sein. Sie sind jedoch schwierig bei Substanzen einzusetzen die auf mehrere Arten mit ihrem Reaktionspartner interagieren können (Patlewicz et al., 2004).
2. *In chemico* Ansätze nutzen die Korrelation zwischen der Proteinreaktivität einer Substanz und dem sensibilisierenden Potential einer Substanz. Sie spiegeln die Haptenisierung während der Sensibilisierungsphase wider, das heißt die Bindung dieser niedermolekularen Substanz an ein Protein (Haptenisierung). Die Reaktivität des Agens wird dabei zum Beispiel über die Bindungsfähigkeit an Glutathion oder an drei verschiedene synthetische

Peptide, welche Lysin, Histidin oder Cystein enthalten, bestimmt (Gerberick et al., 2004). Die Schwierigkeit bei diesen Ansätzen liegt dabei in der korrekten Klassifizierung von Prohaptenen, wofür allerdings schon Weiterentwicklungen in Arbeit sind, die einen vorherigen Aktivierungsschritt mittels Peroxidasen integrieren (Gerberick et al., 2009). Prohaptene werden definiert als niedermolekulare Substanzen, welche erst durch eine metabolische Reaktion in der Zelle aktiviert werden und nur dadurch eine allergene, beziehungsweise haptenisierende Eigenschaft entwickeln (Bergström et al., 2006; Pichler et al., 2011).

3. Sehr komplex und herausfordernd ist die Entwicklung von zellbasierten *in vitro* Testverfahren. Bei zellbasierten Verfahren müssen die vielfältigen pathophysiologischen Interaktionen zwischen den Testsubstanzen und den verschiedenen Immunzellen *in vitro* nachvollzogen werden (Basketter et al., 2012; Kimber et al., 2013; Mehling et al., 2012). Einer der ersten Schritte, der für eine Sensibilisierung notwendig ist, ist die Aktivierung von antigen-präsentierenden Zellen, die in die lokalen Lymphknoten wandern und dort über das MHC-Molekül den Hapten-Peptidkomplex T-Zellen präsentieren. Diese leiten daraufhin eine spezifische Immunantwort ein (Banchereau und Steinman, 1998; Freudenberg et al., 2009; Kapsenberg et al., 1998).

Die Aktivierung von DC oder myeloiden Zelllinien wird in mehreren Ansätzen zur Detektion eines sensibilisierenden Potentials genutzt. So wird im MUSST (*myeloid U937 skin sensitization test*) die erhöhte Expression von CD86 in U937 Zellen zur Bestimmung eines sensibilisierenden Potentials genutzt (Ade et al., 2006; Python et al., 2007). Der MUSST wies in Studien mit 54 Substanzen eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 100% im Vergleich mit humanen

Daten auf (Bauch et al., 2012). Ein anderes Testsystem, welches auf der Aktivierung von DC beruht, ist der h-CLAT (*human cell line activation test*). Dieser verwendet die THP-1 Zelllinie und als Aktivierungsmarker die Oberflächenmoleküle CD86 und CD54 (Ashikaga et al., 2002; Yoshida, 2003). Die Sensitivität im Vergleich zu Humandaten wird in einer Studie mit 38 Substanzen mit 83% angegeben, die Spezifität mit 63% (Nukada et al., 2011). Der MUSST befindet sich zur Zeit in der Prävalidierung beim Europäischen Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM), für den h-CLAT ist diese Phase schon fast abgeschlossen (Basketter et al., 2012; Mehling et al., 2012). Andere Testsysteme, die auf dem Prinzip einer Aktivierung von DC basieren, sind der GARD (*genomic allergen rapid detection*) Test, welcher auf einem transkriptionellen Profiling von MUTZ-3 Zellen beruht und Testsysteme, die die Migrationsfähigkeit von DC oder DC ähnlichen Zelllinien als funktionellen Marker der DC Aktivierung verwenden (Ouwehand et al., 2010).

Keratinocyten sind die dominierenden Zellen in der Epidermis und spielen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von DC (Enk and Katz, 1992; Uchi et al., 2000). Der KeratinoSens Test verwendet die aus Keratinocyten gewonnene HaCaT Zelllinie, die mit einem Luciferase Reportergen unter Kontrolle des antioxidant response elements (ARE) stabil transfiziert ist, und eine Aktivierung des Nrf2-Keap1-ARE Signalweges über Luciferaseaktivität nachweisen kann (Natsch und Emter, 2008; Natsch et al., 2011). Die Schlüsselrolle bei dem Prozess der Sensibilisierung kommt jedoch der klonalen Expansion von antigenspezifischen T-Zellen zu (Vocanson et al., 2009). Es liegt daher nahe, dass der Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen ein vielversprechender Ansatz zum Nachweis des allergenen Potentials einer Substanz wäre. Trotz erster erfolgversprechender Arbeiten, die



eine spezifische T-Zell Antwort auf Kontaktallergene *in vitro* nachweisen konnten (Dietz et al., 2010; Guironnet et al., 2000; Rustemeyer et al., 1999), ist die Zuverlässigkeit und Praktikabilität dieser Testsysteme noch sehr gering. Auf diesem Gebiet besteht daher noch weitreichender Bedarf an der Erforschung grundlegender Mechanismen der T-Zellaktivierung bei der humanen Kontaktallergie.

### **1.3 Induktion und Regulation der T-Zell-Antwort**

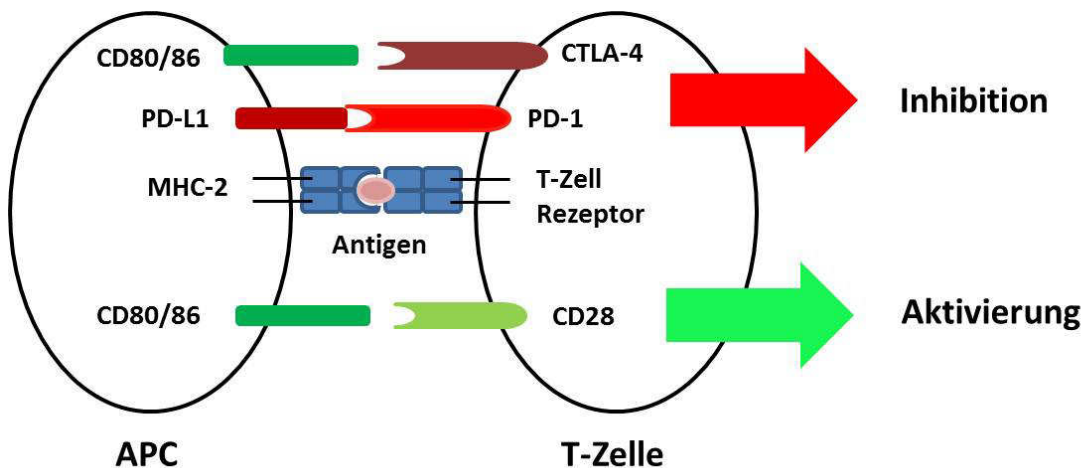
Für eine funktionelle T-Zell-Antwort sind drei verschiedene Signale notwendig, die von aktivierten DC ausgehen können. Signal eins wird über den T-Zell-Rezeptor vermittelt, sobald dieser einen passenden Peptid-MHC Komplex auf der DC erkennt. Signal eins alleine führt zu keiner funktionellen T-Zell-Antwort, vielmehr führt es gar zu einer T-Zell-Inaktivierung, einer Anergie oder induziert regulatorische T-Zellen und antigenspezifische Toleranz. Signal zwei wird als sogenanntes kostimulatorisches Signal bezeichnet. Dieses zusätzliche Signal führt zu einer Aktivierung und klonalen Expansion der T-Zellen (Kearney et al., 1994). Als Signal zwei wird klassischerweise die Aktivierung der T-Zelle über CD28 durch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bezeichnet (Lafferty und Cunningham, 1975; Linsley et al., 1990). Mit der späteren Entdeckung von CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), einem koinhibitorischen Rezeptor der auch an CD80 und CD86 bindet, wurde jedoch klar, dass sich für die T-Zellaktivierung ein komplexes regulatorisches Modell ergibt (Azuma et al., 1993; Hathcock et al., 1993; Linsley et al., 1991). Das Signal drei ist ein lösliches Signal, etwa ein Zytokin oder Wachstumsfaktor, und sorgt für die Differenzierung der T-Zelle in die jeweilige Effektorzelle, wie zum Beispiel in T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 Zellen) oder in zytotoxische T-Lymphozyten (Curtsinger et al., 2003; Hilkens et al., 1999;

Veldhoen et al., 2006). Von TH-17 Zellen produziertes IL-17 aktiviert Epithelzellen, Endothelzellen und Makrophagen und stimuliert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Kolls und Linde, 2004). Die Nickelallergie zählt zu den häufigsten Kontaktallergien, und T-Gedächtniszellen aus dem Blut von Nickelallergikern enthalten sowohl TH-17 als auch TH-1 Zellen, die nach Kontakt mit Nickel stimulierten DC proliferieren. In Hautbiopsien von Nickelallergikern wurden T-Zellen nachgewiesen, welche IL-17, IL-22 und CCR6 exprimieren (Larsen et al., 2009). Frühere Studien konnten zeigen, dass IL-17 von humanen nickelspezifischen CD4 positiven T-Zell Klonen produziert wird und die Zytokinexpression von Keratinozyten maßgeblich beeinflusst (Albanesi et al., 1999).

Im Zuge der T-Zell Aktivierung wird durch die Kostimulation von CD3 und CD28 eine Kaskade von Ereignissen ausgelöst, die sowohl den Zellmetabolismus als auch die Zellteilung betreffen. So wird durch Aktivierung von CD28 auf der T-Zelle der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweg ausgelöst, wodurch wiederum die Proteinkinase B (PKB) aktiviert wird und dadurch sowohl die Zytokinsekretion als auch die Proliferation der T-Zellen induziert wird (Barthel et al., 1999).

Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) ist ein koinhibitorisches Molekül, das unter anderem auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird und einen Ausgleich zwischen T-Zell Aktivierung und Toleranz vermittelt (Abb. 2) (Sharpe et al., 2007). Es bindet an seinen Bindungspartner PD-1 auf der T-Zelle und führt zu einer Inhibierung der PKB Phosphorylierung indem es in die CD28 vermittelte PI3K Aktivierung eingreift. Dadurch wird sowohl die Zytokinexpression als auch die T-Zell Proliferation vermindert (Francisco et al., 2010).

CTLA-4 ist ein inhibitorisch wirkendes Molekül auf der T-Zelle welches nach Bindung an CD80 oder CD86 die Aktivierung der PKB reduziert und dadurch einen inhibitorischen Effekt auf die Zytokinsynthese und Proliferation der T-Zellen ausübt.



**Abb. 2: Regulation der T-Zell-Aktivierung.** PD-L1 Inhibiert die T-Zell-Aktivierung durch Bindungen an seinen Liganden PD-1 auf der T-Zelle. CD80 und CD86 wirken bei Bindung an CD28 aktivierend, bei Bindung an CTLA-4 jedoch inhibierend.

Sowohl PD-1 als auch CTLA-4 wirken inhibitorisch auf die Aktivierung von PKB, inhibieren die T-Zell-Aktivierung jedoch auf verschiedenen Wegen. Die Aktivierung von PD-1 wirkt direkt auf PI3K und hat somit einen breiteren inhibitorischen Effekt auf die T-Zell-Funktion als CTLA-4. CTLA-4 wirkt hingegen der PKB Phosphorylierung entgegen indem es die Proteinphosphatase 2 (PP2A) aktiviert (Gianhecchi et al., 2013; Parry et al., 2005, 1997).

PD-L1 übt im funktionierenden Immunsystem nicht nur eine hemmende Wirkung auf potenziell pathogene, autoreaktive T-Zellen aus, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Induktion von regulatorischen T-Zellen (Francisco et al., 2009). Des Weiteren kommt PD-L1 eine wichtige Rolle bei der Immunevasion von Tumoren und Viren zu (Iwai et al., 2003a,

2002). Sowohl bei der Behandlung von Tumorerkrankungen als auch bei der Behandlung chronischer Viruserkrankungen gibt es mehrere therapeutische Ansätze, die auf den PD-L1-PD-1 Signalweg gerichtet sind (Sakthivel et al., 2012; Topalian et al., 2012).

Bemerkenswerterweise führte die Blockierung der Wechselwirkung zwischen PD-L1 und PD-1 mit neutralisierenden Antikörpern zu einer verstärkten Kontakthypersensitivitätsreaktion (Tsushima et al., 2003) im Mausmodell. Dagegen ist die Beteiligung des PD-L1-PD-1 Signalweges in der humanen allergischen Kontaktdermatitis bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. An dieser Stelle setzt der zweite Teil der vorliegenden Arbeit an.

### 2 Fragestellung und Zielsetzung

Aufgrund der hohen Prävalenz von Kontaktallergien in der allgemeinen Bevölkerung ist Identifizierung und Klassifizierung von potentiell sensibilisierenden Substanzen, die zum Beispiel in Kosmetika und anderen verbrauchernahen Produkten eingesetzt werden, dringend notwendig.

Bis zum heutigen Zeitpunkt basiert die Testung von potentiell sensibilisierenden Substanzen vorwiegend auf Tierversuchen wie dem Buehler guinea pig sensitization test und dem guinea pig maximization test (GPMT) in Meerschweinchen (Buehler, 1965; Magnusson and Kligman, 1968) sowie dem *local lymph node assay* (LLNA) in Mäusen (Kimber and Weisenberger, 1989; Kimber, 2003, OECD TG 429). Da die EU ein Verbot von Tierversuchen für die Testung von Inhaltsstoffen von Kosmetika erlassen hat, welches im März 2013 im vollen Umfang in Kraft getreten ist (Directive 2003/15/EC), ist die Entwicklung von neuen prädiktiven und robusten *in vitro* Tests dringend notwendig.

Um die Entwicklung neuer *in vitro* Testsysteme voranzutreiben ist es wichtig, funktionelle Zellkultursysteme zu entwickeln, die die zellulären und molekularen Ereignisse bei der Entstehung einer Kontaktallergie widerspiegeln. Sowohl Dendritische Zellen (DC) als auch T-Zellen determinieren die Immunantwort bei der allergischen Kontaktdermatitis.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher differentiell untersucht werden wie unterschiedliche primäre antigenpräsentierende Zellen und DC-ähnlich Zelllinien auf sensibilisierende Substanzen reagieren:

- Es sollten neue potentielle Biomarker sowohl auf der Ebene von Oberflächenmolekülen als auch auf Zytokinebene identifiziert werden.

## Fragestellung und Zielsetzung

---

- Zusätzlich sollten diese mit den bereits gut charakterisierten Markern CD86 und Interleukin (IL) -8 verglichen werden
- Es sollte das am besten geeignete Zellkultursystem für Detektion eines sensibilisierenden Potentials identifiziert werden

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die zentrale Rolle der allergenspezifischen T-Zellantwort untersucht werden. Mit dem Ziel ein neuartiges, prädiktives und robustes in vitro Testsystem zu entwickeln, sollte erstmalig die Wirkung eines zentralen inhibitorischen Signals, hier PD-L1, im Kontext der humanen allergischen Kontaktdermatitis untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass dem PD-L1 Molekül eine signifikante immunregulatorische Funktion in verschiedenen anderen humanen Krankheitsbildern, wie Virusinfektionen und Krebserkrankungen zugeschrieben wird, (Cao et al., 2011; Sharpe et al., 2007) sollte folgendes untersucht werden:

- Zunächst sollte analysiert werden, ob PD-L1 auf Langerhans-Zellen und auf Organebene in gesunder, humaner Haut nachweisbar ist.
- Da Nickel eines der häufigsten humanen Kontaktallergene darstellt, sollte mit Nickel als Modellschubstanz der Einfluss von einem potentiellen Kontaktallergen in Bezug auf die Expression von PD-L1 in Langerhans-Zellen und in der Haut untersucht werden.
- Darüber hinaus sollte die Funktion von der PD-L1 Expression bezüglich der nachfolgenden T-Zellantwort und T-Zellpolarisierung analysiert werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Evaluation of new biomarkers for the detection of chemical sensitization in human skin: A comparative study applying THP-1, MUTZ-3 and primary dendritic cells in culture

Manuel Hitzler, Antje Bergert, Andreas Luch and Matthias Peiser

Evaluation of new biomarkers for the detection of chemical sensitization in human skin: A comparative study applying THP-1, MUTZ-3 and primary dendritic cells in culture

Toxicology in Vitro, 2013 Apr 26;27(6):1659-1669.doi:10.1016/j.tiv.2013.04.009

In dieser Publikation wurden neue Biomarker identifiziert und zusammen mit bekannten Biomarkern auf ihre Eignung, ein potentiell allergenes Potential von Substanzen vorherzusagen, getestet. Ein Teil der Arbeit konzentrierte sich dabei auf die Oberflächenmarker CD86, DCIR und PD-L1, der andere Teil auf die löslichen Faktoren und Biomarker IL-8, Mip-1 $\alpha$ , Nap-2 und IL-16. Des Weiteren wurde die Eignung dieser Biomarker sowohl auf zwei primären Zelltypen, monozytär gewonnenen Dendritischen Zellen (MoDC) und Langerhans-Zellen (MoLC), als auch auf zwei Zelllinien, THP-1 und MUTZ-3 getestet. Im Gegensatz zu primären DC, die schon im nicht aktivierten Zustand eine Grundexpression von CD86 und PD-L1 sowie eine hohe Expression von DCIR aufwiesen, zeigten sowohl MUTZ-3 Zellen als auch THP-1 Zellen eine deutlich geringere Expression von CD86 und PD-L1 und keine messbare Expression von DCIR. Nach Inkubation mit den Kontaktallergenen Nickel, Zimtaldehyd und Eugenol, konnte auf den

## Ergebnisse

---

primären Zellen eine stark erhöhte Expression von CD86 und PD-L1 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Oberflächenexpression von DCIR. Auch auf den Zelllinien war eine Zunahme der Expression von CD86 und PD-L1 zu beobachten, wenngleich auch in deutlich geringerem Ausmaß. Aufgrund der fehlenden Expression von DCIR auf den Zelllinien ist die Nutzung dieses Biomarkers allerdings auf primäre Zellen beschränkt. Um neue lösliche Biomarker zu finden, wurden Zellkulturüberstände von aktivierten MoDC mittels eines sogenannten *proteome profilers* untersucht. Dabei stellten sich vier Proteine heraus, die als potentielle Biomarker für die Testung auf ein sensibilisierendes Potential in Frage kamen. Diese löslichen Biomarker, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , NAP-2 und IL-16 wurden wiederum mit allen vier Zelltypen getestet. Auch hier zeigte sich eine Zytokinantwort nach Zugabe von Kontaktallergenen in primären Zellen mit einem breiten dynamischen Bereich und damit das Testsystem als sehr robust.

Anteil des Autors an der Publikation: Projektplanung (80%), Projektdurchführung (80%), Datenanalyse (100%), Schreiben des Manuskriptes (50%).

Link zum Originaldokument:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.04.009>



### **3.2 Human Langerhans cells control Th cells via programmed death-ligand 1 in response to bacterial stimuli and nickel-induced contact allergy**

Manuel Hitzler, Otto Majdic, Guido Heine, Margitta Worm, Grit Ebert, Andreas Luch, Matthias Peiser

Human Langerhans Cells Control Th Cells via Programmed Death-Ligand 1 in Response to Bacterial Stimuli and Nickel-Induced Contact Allergy

PLoS One. 2012;7(10):e46776. doi: 10.1371/journal.pone.0046776. Epub 2012 Oct 9.

In dieser Publikation wurde die Expression von PD-L1 auf LC und in Hautbiopsien von Nickel-Allergikern vor und nach Aktivierung mit Nickel untersucht. Nach Aktivierung von MoLC mit Nickel konnte eine deutlich höhere Expression von PD-L1 als im unstimulierten Zustand festgestellt werden. Auch in Hautbiopsien von Nickelpatienten, die 72 h mit Nickel behandelt wurden, war eine deutlich höhere PD-L1 Expression zu beobachten als in den unbehandelten. Die Konsequenzen der erhöhten PD-L1 Expression auf LC nach Stimulation mit bakteriellen Liganden und Nickel wurden mit Blockierungsexperimenten in Kokulturen von T-Helferzellen mit DC untersucht. Dazu wurde die Interaktion von PD-L1 mit seinen Bindungspartnern auf der T-Zelle mittels blockierender Antikörpern gegen PD-L1 verhindert. Wurden die MoLC mit LPS oder PGN stimuliert so zeigte sich nach Blockierung von PD-L1 eine stark erhöhte Sekretion von IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in T-Helferzellen. Mit Nickel als Stimulus führte die Blockierung von PD-L1 zu großen Mengen von sekretiertem TNF- $\alpha$  und IL-22, nicht jedoch von IL-17 und IFN- $\gamma$ . Untersuchungen einer weiteren speziellen T-Zell Subpopulation zeigten dass es CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> T Gedächtnis-

## Ergebnisse

---

zellen waren, die nach Nickel-Stimulation IL-17 und IFN- $\gamma$  sezernierten. Bei Kontrollversuchen in Gegenwart von anti-PD-L1 Antikörpern wurde durch PGN, aus der Zellwand von Bakterien, die Sekretion von IL-17 und IFN- $\gamma$  in CCR6<sup>+</sup> Zellen induziert, während dieser Effekt mit Nickel nur in der CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> T-Zell Population auftrat.

Anteil des Autors an der Publikation: Projektplanung (80%), Projektdurchführung (80%), Datenanalyse (100%), Schreiben des Manuskriptes (50%)

# Human Langerhans Cells Control Th Cells via Programmed Death-Ligand 1 in Response to Bacterial Stimuli and Nickel-Induced Contact Allergy

Manuel Hitzler<sup>1</sup>, Otto Majdic<sup>2</sup>, Guido Heine<sup>3</sup>, Margitta Worm<sup>3</sup>, Grit Ebert<sup>4</sup>, Andreas Luch<sup>1</sup>, Matthias Peiser<sup>1\*</sup>

**1** German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department of Product Safety, Berlin, Germany, **2** Institute for Immunology, Medical University, Vienna, Austria, **3** Department of Dermatology and Allergy, Allergy-Center-Charité, CCM, Charité-University Medicine Berlin, Berlin, Germany, **4** Department of Human Molecular Genetics, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

## Abstract

Langerhans cells (LCs) are suspected to initiate inflammatory immune responses to contact allergens and pathogenic bacteria. In chronic infectious diseases, programmed death ligand (PD-L) 1 exhibits both inhibitory and costimulatory functions on T cell-mediated activation and tolerance. Here, we investigated the effects of contact allergens and bacterial stimuli on PD-L1 expression in LCs and the effects of altered PD-L1 expression on cytokine release of subsequently cocultured T cells. Monocyte-derived LCs (MoLCs), LCs, and skin sections of patients suffering from allergic contact dermatitis were challenged with nickel and then analyzed for PD-L1 expression by confocal laser scanning microscopy and flow cytometry. In blocking experiments, we found that the release of Th cell specific cytokines was dependent on both stimulation of LCs and inhibition of PD-L1-PD-1 interactions. Stimulation with peptidoglycan (PGN) or lipopolysaccharide (LPS) and blockage of PD-L1 with a specific antibody triggered the release of high levels of IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup>T cells. If nickel was used as a stimulus, blockage of PD-L1 led to high amounts of TNF- $\alpha$  and IL-22. A closer look revealed PD-L1-dependent upregulation of IL-17 secretion in FACS-sorted CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> T memory cells. In the presence of anti-PD-L1, PGN induced secretion of IFN- $\gamma$  and IL-17 in total CCR6<sup>+</sup> cells, while nickel triggered secretion of IFN- $\gamma$  and IL-17 exclusively in CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> cells. Our findings suggest that PD-L1 on LCs plays a crucial role in type IV allergic reactions and in response to bacterial stimuli by controlling the nature of inflammatory Th cell responses.

**Citation:** Hitzler M, Majdic O, Heine G, Worm M, Ebert G, et al. (2012) Human Langerhans Cells Control Th Cells via Programmed Death-Ligand 1 in Response to Bacterial Stimuli and Nickel-Induced Contact Allergy. PLoS ONE 7(10): e46776. doi:10.1371/journal.pone.0046776

**Editor:** Hossam M. Ashour, Wayne State University, United States of America

**Received:** July 19, 2012; **Accepted:** September 6, 2012; **Published:** October 9, 2012

**Copyright:** © 2012 Hitzler et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by an intramural grant at the German Federal Institute for Risk Assessment (SFP1322-345) and by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) project 0315724. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: matthias.peiser@bfr.bund.de

## Introduction

Inflammatory responses to bacterial pathogens and allergic contact dermatitis (ACD) have in common that distinct subsets of Th cells are crucially involved. Whereas the involvement of cytotoxic T cells becomes clearly evident in light of the skin lesions induced, nearly all functional subsets of CD4<sup>+</sup>Th cells could also be involved in allergic reactions. In addition to Th1 and Th2 cells [1–3], in the human system Th17 and Th22 were reported to express specific cytokine/chemokine receptors and transcription factors [4,5]. IL-22 and IL-17 have been shown to mediate protection and defense against bacteria such as *Citrobacter rodentium* and *Klebsiella pneumoniae*, and *Mycobacterium tuberculosis* and *Bordetella pertussis*, respectively [6–9]. In experimental models even parts of the bacterial cell wall, such as LPS, were shown to induce IL-22 secretion in T cells [4]. Little is known on the exact role of these Th cell subpopulations in inflammatory skin diseases.

It has been suggested that ACD can be distinguished from other skin disorders like psoriasis and atopic eczema by the specific profile of Th cell subsets involved and Th17 and Th22 were detected in skin lesions of allergic individuals [10,11].

Among environmental contact allergens, nickel is the most important. A new aspect in the mechanism of allergic diseases has been disclosed by the finding that nickel and even the respiratory allergen Der p 2 provide proinflammatory stimuli through facilitating TLR4 signaling [12,13]. Recently, polarization of Th17 in response to LPS-containing allergens has been observed in a murine model [14]. In addition to other costimulatory molecules such as CD86, programmed death ligand (PD-L)1 (B7-H1, CD274) and PD-L2 bind to their cognate receptor PD-1 on activated T and B cells, thereby modulating and fine tuning the balance of immune responses toward pathogens and autoimmune tissue damage [15,16]. PD-L1 controls the T cell stimulatory potential by limiting IL-2 and IFN- $\gamma$  release [17,18]. There is strong evidence for further direct effects of PD signaling on T cell responses such as proliferation, cytolytic activity and exhaustion [19].

In this study we explored PD-L1 expression in human skin biopsies from allergic individuals after challenging with nickel. Our data on LC-Th cell interactions suggest that PD-L1 expressed on the surface of LCs plays a regulatory role in skin's immune

response to bacteria and in ACD by limiting the release of proinflammatory cytokines from Th cells.

## Materials and Methods

### Ethical Approval

For skin biopsies, obtained from patients with a history of nickel mediated ACD, and for skin samples received from plastic surgery we obtained approval by the ethics committee of the Charité - Universitätsmedizin Berlin (ethics-approval no. SI.246). All participants provided their written informed consent to donate their skin for research purposes. Anonymized blood samples were obtained from the German Red Cross blood donation service Berlin with informed written consent from all participants. All studies have been approved by the Institutional Review Board (SFP-Committee of BfR) and were in accordance to the Helsinki guidelines. No part of these studies was conducted outside of Germany.

### Cell Isolation and Culture

Mononuclear cells were prepared from buffy coats of samples from healthy adult donors by Ficoll gradient (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Monocytes were isolated by plastic adherence and differentiated in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 10% v/v heat-inactivated FBS (PAN Biotech, Aidenbach, Germany). Cells were kept in a 6-day culture in the presence of human recombinant GM-CSF (100 ng/ml), IL-4 (10 ng/ml, ImmunoTools, Friesoythe, Germany), and TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) according to a previous protocol [20]. CD4<sup>+</sup>T cells were isolated from density gradient enriched PBMCs by negative selection using CD4<sup>+</sup>T cell isolation Kit II. For analyses of T memory cells CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>T cells were isolated from PBMCs by negative selection using memory CD4<sup>+</sup>T cell isolation Kit (all Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). Cells were stained for 30 minutes with PE-Cy7-labeled anti-CCR4 (1G1) and PE-labeled anti-CCR6 (11A9; all BD Biosciences, Heidelberg, Germany). T memory subpopulations were isolated by an Aria III cell sorter (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Normal human skin was obtained from surgical breast reductions and single cell suspensions were prepared [21]. Briefly, epidermal sheets were peeled off the dermis after dispase treatment (2 U/ml, Roche, Mannheim, Germany). Epidermal disintegration was conducted by trypsin (0.25%; Biochrom, Berlin, Germany) in the presence of DNase I (20 U/ml, Boehringer, Germany). LCs were isolated from total epidermal cells by MACS using anti-CD1c (AD5-8E7, IgG2a) and anti-biotin coated microbeads (Bio3-18E7, IgG1, Miltenyi).

### Blockade Experiments in T Cell Assays

10<sup>4</sup> MoLCs were treated with 20  $\mu$ g/ml PGN (Invivogen, San Diego, CAL), 1  $\mu$ g/ml LPS (Fluka, St. Louis, MO) or 200  $\mu$ M nickel(II)sulfate (NiSO<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) for 24 hours. Then 10<sup>5</sup> allogeneic CD4<sup>+</sup>T cells were added and cells were cocultured in 200  $\mu$ l Xvivo15 (Lonza, Verviers, Belgium) in U-bottom plates for additional 6 days. For PD-L1 and CD86 blockade either of the following antibodies or fusion proteins was added to MoLCs 30 minutes before being pooled with CD4<sup>+</sup>T cells: 10  $\mu$ g/ml of anti-PD-L1 (clone 5-272; generated in the laboratory of O.M.), anti-CD86 (clone IT2.2), IgG1 isotype (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), 10  $\mu$ g/ml of B7-H1/PD-L1 Fc chimera, or IgG1 Fc (R&D Systems). On day-7 supernatants were collected and analyzed for IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by ELISA (DuoSet, R&D Systems).

### Activation of MoLCs

10<sup>5</sup> cells were incubated with NiSO<sub>4</sub>, 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB; Sigma) or sodium dodecyl sulphate (SDS; ROTH, Karlsruhe, Germany; individual concentrations as indicated), 1  $\mu$ g/ml LPS or 20  $\mu$ g/ml PGN in RPMI 1640. Expression of PD-L1, HLA-DR and CD86 was analyzed by FACS 48 hours later. Preparations of NiSO<sub>4</sub> and DNCB contained endotoxin below 0.1 EU/ $\mu$ g compound, as determined by using the Limulus ameocyte lysate assay (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA).

### Flow Cytometry

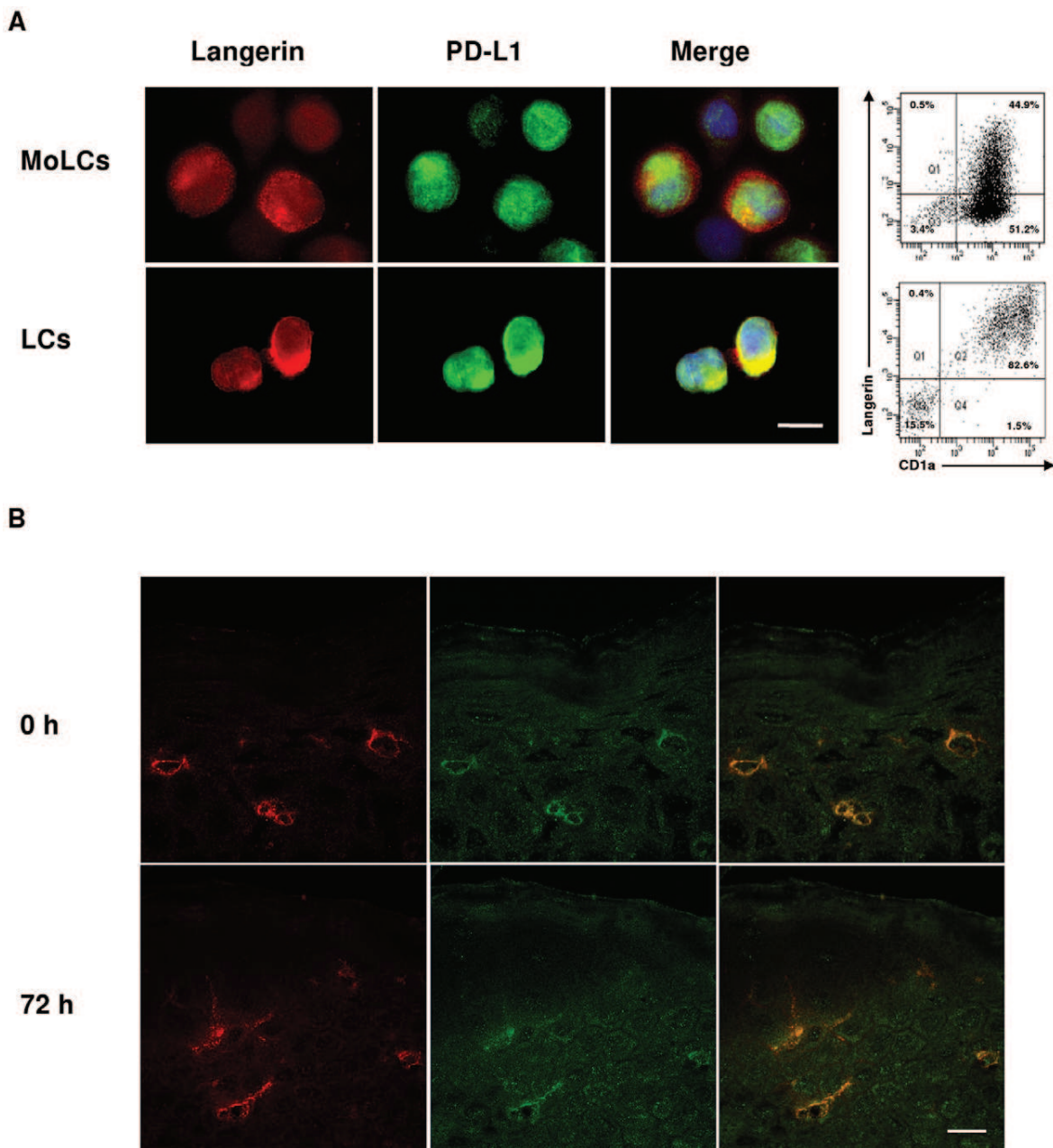
Surface markers were stained with PE-labeled anti-langerin (DCGM4, Immunotech, Marseille, France), APC-labeled anti-CD1a (HI149), FITC-labeled anti-CD86 (FUN-1), PE-labeled anti-PD-L1 (MIH1), and APC-H7-labeled anti-HLA-DR (L243, all BD Biosciences, Heidelberg, Germany) or with isotype controls. Cells were analyzed in the FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) flow cytometer using FACS-Diva software.

### Fluorescence Microscopy, Immunohistochemistry, Laser Scanning Microscopy

Cells were fixed and permeabilized in 3.7% paraformaldehyde and 0.2% Triton-X for 30 minutes on poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) coated coverslips. After blocking with 1% BSA in PBS cells were incubated with primary antibody for 1 hour followed by goat anti-mouse Alexa Fluor 488 antibody. Nuclei were counterstained with 7-AAD (all Invitrogen, Darmstadt, Germany). Skin samples were obtained from patients with a history of nickel-mediated ACD. All participants gave informed consent, and the study was approved by the local medical ethics committee. Nickel challenge was performed with 5% NiSO<sub>4</sub> in vaseline according to international guidelines in 4 mm finn chambers (Almirall, Reinbek, Germany). Biopsies were taken before or 1 to 3 days after nickel exposure and immediately snap frozen. The samples were blocked with 1% BSA in PBS. After incubation with mouse anti-human PD-L1 samples were stained with EnVision+ System-HRP AEC (Dako, Hamburg, Germany) according to manufacturer's protocol. In brief, tissue sections were incubated with labeled polymer-HRP anti-mouse for 30 minutes followed by 30 minutes of incubation with AEC+ chromogen. Sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin Lillie's Modification (Dako) and analyzed by light microscopy. For confocal laser scanning microscopy sections were incubated for 1 hour with mouse anti-human PD-L1, rat anti-human langerin (Dendritics, Lyon, France) and rat anti-human HLA-DR (Abcam, Cambridge, UK), and stained with goat anti-mouse Alexa Fluor 488 and goat anti-rat Alexa Fluor 546 conjugated antibodies (Invitrogen) for 1 hour. The thickness of all skin sections was 6  $\mu$ m.

### Statistical Methods

Mean value, standard deviation (SD) and statistical significance were calculated using SigmaPlot (Systat, Erkrath, Germany). For analysis of differences between experimental groups, two tailed Student's t test for paired data was used. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.



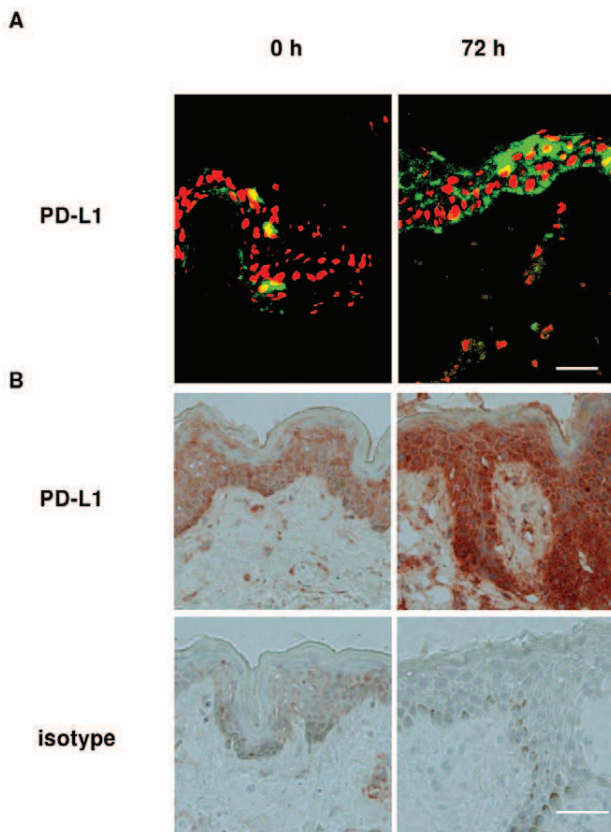
**Figure 1. PD-L1 is expressed on isolated LCs and in LCs *in situ* of ACD patients.** A. Left side: Immunofluorescence microscopy analysis of the expression of langerin and PD-L1 on the surface of human MoLCs and LCs derived from blood monocytes and epidermal tissue of healthy donors, respectively. Right side: Expression of langerin and CD1a in MoLCs (upper chart) and LCs (lower chart) detected by flow cytometry. Bar = 10  $\mu$ m. B. Expression of HLA-DR and PD-L1 in skin sections of ACD donors before and 72 hours after challenge with 5% NiSO<sub>4</sub>, as detected by confocal laser scanning microscopy. Representative images of two stack series in the epidermal layer are shown. Bar = 10  $\mu$ m. doi:10.1371/journal.pone.0046776.g001

**Results**

**PD-L1 is Expressed in ACD Biopsies and Colocalizes with Langerin and HLA-DR**

Initial *in vitro* screening for protein markers revealed increased expression levels of PD-L1 in MoLCs upon treatment with TLR agonists and also after exposure to nickel. To evaluate the role of PD-L1 in chemically induced ACD, PD-L1 and langerin expression was analyzed in skin tissue. Since the viability of

epidermal LCs rapidly decreases upon tissue digestion and transfer into cell culture, we also generated LC-like cells from PBMCs as reported [20]. In LCs and MoLCs PD-L1 was found to colocalize with langerin, with bright signals for PD-L1 especially in epidermal LCs isolated from healthy individuals (Figure 1A). Furthermore, in skin biopsy sections derived from local lesions of ACD patients constitutive PD-L1 expression was demonstrated in HLA-DR positive cells located in the suprabasal and upper epidermal layers (Figure 1B). In these



**Figure 2. Intraepidermal PD-L1 increases in ACD patients after challenge with nickel.** A. PD-L1 and nuclei are visualized by Alexa Fluor 488 (green) and 7-AAD (red) immunofluorescence in sections from lesions of ACD patients after being exposed to 5% NiSO<sub>4</sub> for 0 hours and 72 hours. Bar = 50 μm. B. Biopsies taken from inflamed skin tissue areas of ACD donors. The sections were incubated with anti-PD-L1, stained with EnVision+ System-HRP AEC, and counterstained with hematoxylin. Representative light microscopy images covering the profile from the upper *stratum corneum* down to dermal rete pags are depicted. Bar = 50 μm.  
doi:10.1371/journal.pone.0046776.g002

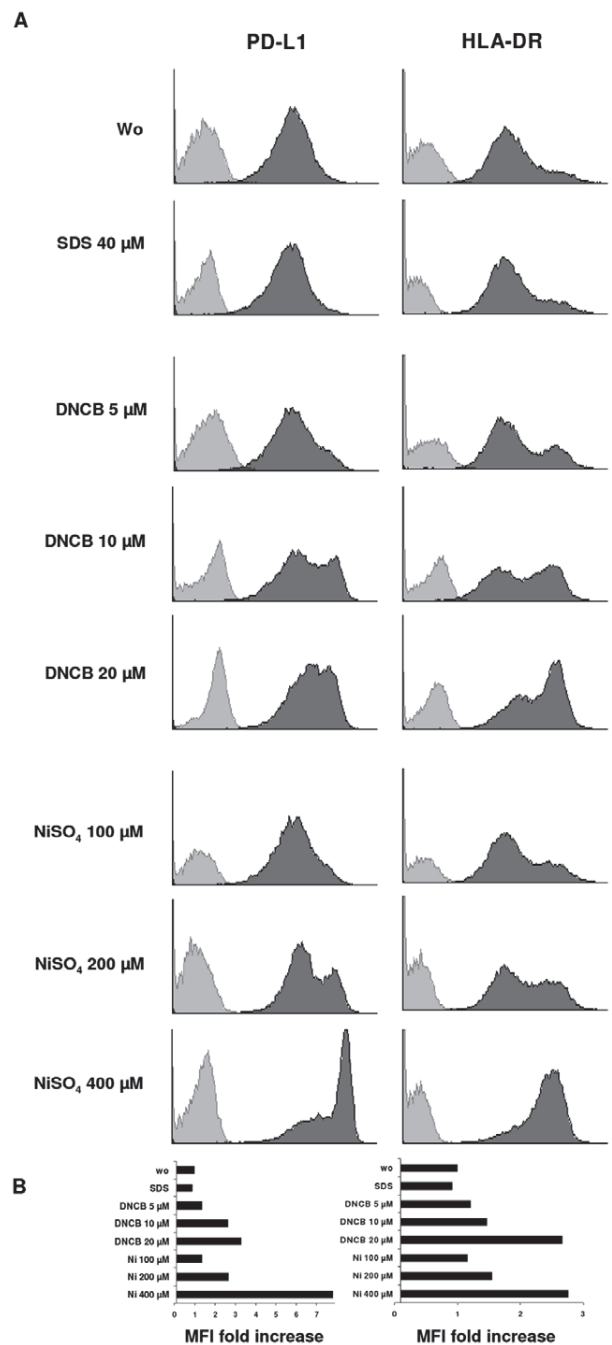
sections the particular keratinocyte interstices highlighted by anti-HLA-DR turned out to be filopodia of LCs embedded between neighboring keratinocytes. Compared to unchallenged skin from ACD patients treatment with nickel for 72 hours led to a further increase in sizes of cell bodies and dendritic protrusions of HLA-DR positive LCs.

**Epidermal PD-L1 Increases after Challenge with Nickel**

PD-L1 tissue expression was analyzed by immunohistochemistry in tissue biopsies taken from ACD patients after nickel exposure (Figure 2). By fluorescence microscopy PD-L1 expression was found greatly enhanced upon challenge with nickel. At the 72 hours time point the majority of cells constituting epidermal layers exhibited strong expression of PD-L1. By contrast, comparably low PD-L1 levels were observed in biopsies of unchallenged ACD patients (time point: 0 h).

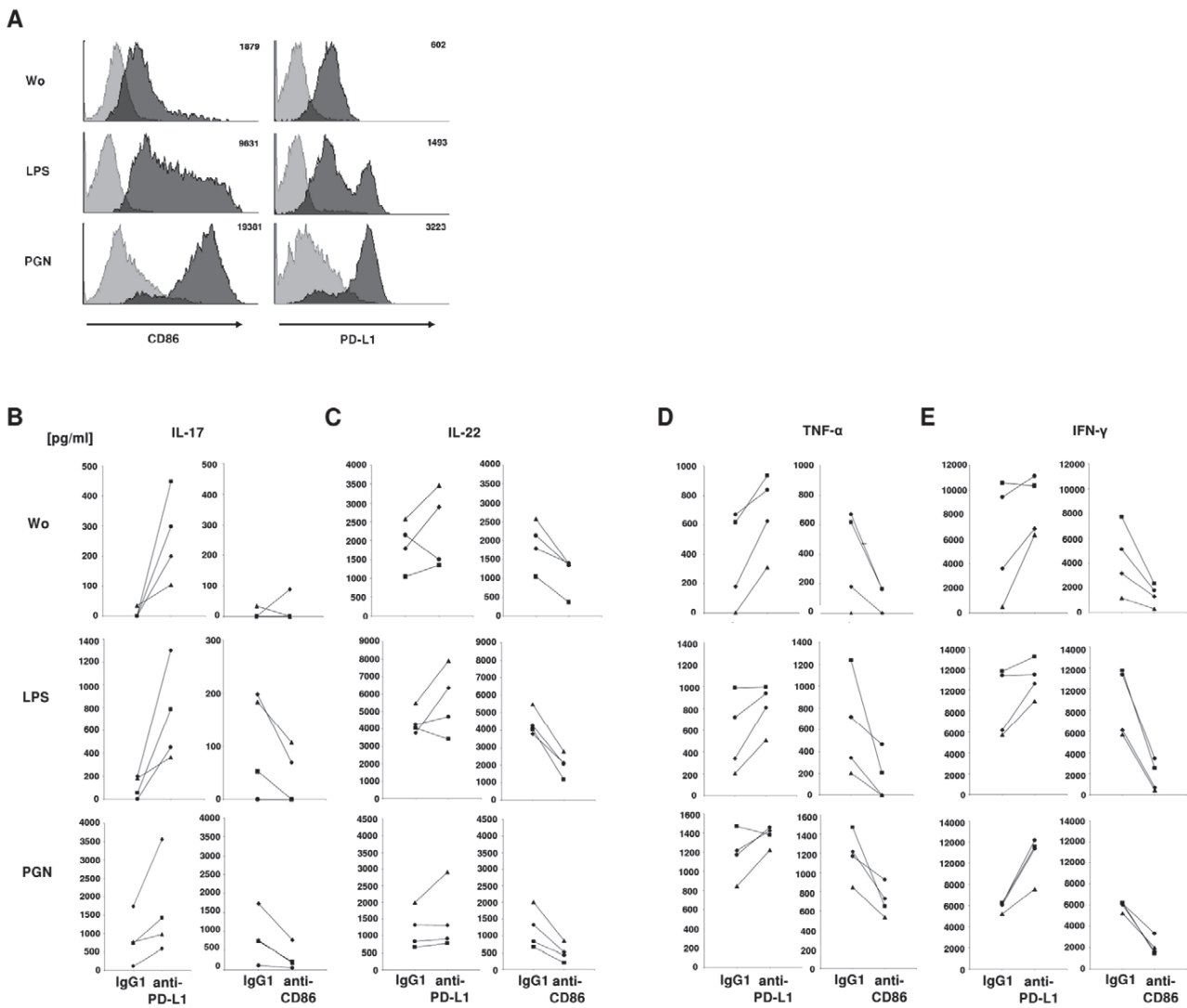
**Nickel and DNCB Elevate PD-L1**

We next questioned whether PD-L1 has a regulatory function in fine tuning ACD effector cell responses. Langerin<sup>+</sup>MoLCs were exposed to graded doses of 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB),



**Figure 3. PD-L1 and HLA-DR are upregulated in MoLCs after stimulation with allergens.** MoLCs were exposed to graded doses of DNCB, nickel or SDS for 24 hours and stained by anti-PD-L1 and anti-HLA-DR, respectively. FACS analyses were gated on viable cells. A. Protein expression is shown as dark gray graphs in overlay histograms. Cells stimulated under the same conditions were stained with isotype-controls and are represented by light gray. B. Bars indicate fold increase of mean fluorescence intensities (MFI) compared to untreated control. Results shown are representative for four independent experiments with different donors.  
doi:10.1371/journal.pone.0046776.g003

nickel or to the irritant sodium dodecyl sulphate (SDS) as control (Figure 3). Both DNCB and NiSO<sub>4</sub> dose-dependently led to increases in PD-L1 levels, with highest expression at 400 μM



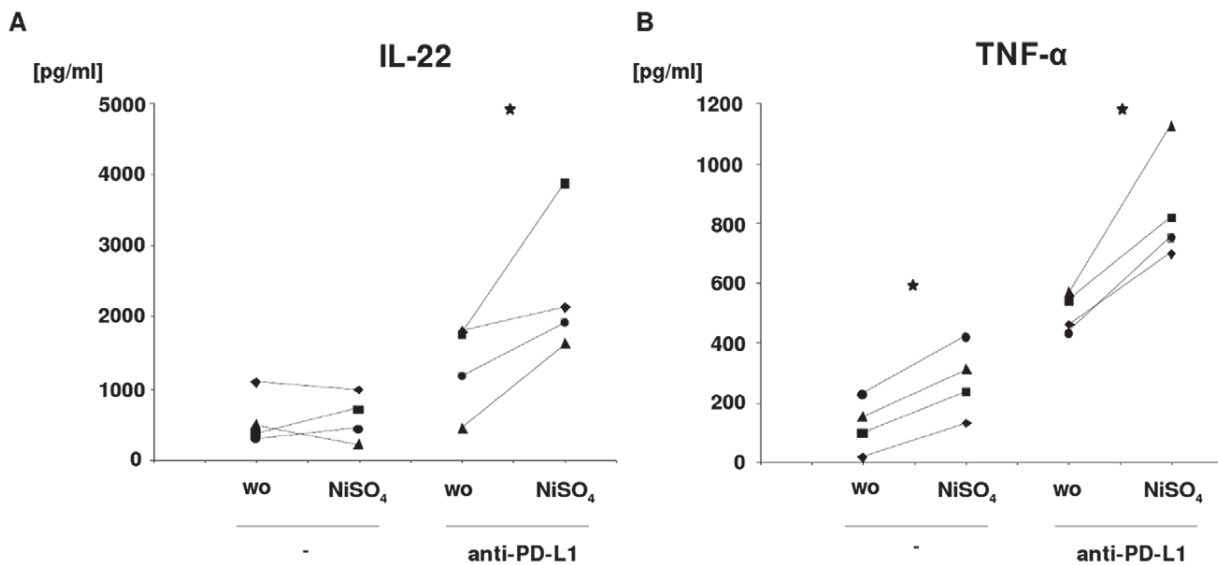
**Figure 4. Blockage of PD-L1 enhances cytokine release from stimulated Th cells.** A. FACS analyses of CD86 or PD-L1 on MoLCs, dark gray, or isotype-controls, light gray. Numbers depicted in the histograms show mean fluorescence intensities. MoLCs were stimulated by LPS or PGN for 24 hours. Histograms shown are from the same donor representative for results obtained with three different donors. B – E. Secretion of cytokines by CD4<sup>+</sup>T cells in coculture with MoLCs. MoLCs were stimulated by LPS or PGN (as in A.), and incubated with IgG1, anti-PD-L1, or anti-CD86. Secretion of IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  in pg/ml was detected via ELISA 7 days after starting the coculture. Data shown are from 4 different donors, indicated by the following symbols:  $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ,  $\bullet$ ,  $\blacklozenge$ . Wo, without stimulus. doi:10.1371/journal.pone.0046776.g004

NiSO<sub>4</sub> and at unaffected viability. HLA-DR was also found dose-dependently upregulated (Figure 3). In comparison to HLA-DR, upregulation of PD-L1 in response to chemical allergens was slightly more pronounced. The irritant (SDS) control confirmed the specificity of this response.

### Blockade of PD-L1 on Bacterial Stimulated MoLCs Induces Th Cell Cytokines

The influence on subsequent effector T cell responses was addressed by PD-L1 neutralization studies. In addition to TCR signals and cytokines, costimulatory molecules could induce a specific pattern of Th cells that contribute to ACD or defense against pathogens. Blocking studies in mice showed that these surface markers essentially contribute to hapten-induced contact sensitivity reactions [22–24]. Recently it could be shown that TLR

agonists or TLR-associated proteins may be mimicked by allergens [13,25]. Thus we examined the effect of TLR2 and TLR4 agonists PGN and LPS on Th cell polarization. Strong upregulation of CD86 and PD-L1 on MoLCs could be demonstrated for PGN and LPS (Figure 4A). To evaluate the impact of PD-L1 on responses of Th cells while being in coculture with MoLCs, PD-L1 and CD86 were blocked by specific antibodies. MoLCs stimulated by LPS failed to induce significant amounts of IL-17 during coculture with allogeneic CD4<sup>+</sup>T cells (Figure 4B). By contrast, the amounts of IL-17 reached high levels when LPS- or PGN-activated MoLCs were first treated with anti-PD-L1. In contrast, blockage of CD86 on the surface of LPS- or PGN-stimulated MoLCs led to a significant decrease of the amounts of IL-17 in MoLC-Th cell cocultures when compared to non-blocked CD86-expressing MoLCs (Figure 4B). These data led us to hypothesize that PD-L1 would be in general an important regulator in the control of



**Figure 5. Nickel induces release of IL-22 and TNF- $\alpha$  after blockage of PD-L1.** A, B. Secretion of cytokines by CD4<sup>+</sup>T cells while being in coculture with MoLCs. MoLCs were either stimulated by nickel for 24 hours (+) or not (–), and incubated with anti-PD-L1 (+) or not (–). Protein secretion was detected via ELISA in the supernatants 7 days after starting the coculture of MoLCs with allogeneic CD4<sup>+</sup>T cells. Secretion levels (in pg/ml) are shown for IL-22 and TNF- $\alpha$ . Data shown are from 4 different donors and visualized by scatter plots; donors 1–4 are indicated by the following symbols:  $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ,  $\bullet$ ,  $\blacklozenge$ .

doi:10.1371/journal.pone.0046776.g005

proinflammatory cytokines secreted by specific Th cell subpopulations. Hence we analyzed the secretion of IL-22, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , each of which is known to contribute to certain forms of skin pathogenesis. In contrast to IL-17, basal secretion levels of these cytokines were already high, but could still be increased if MoLCs were pretreated with LPS or PGN prior to pooling with T cells (Figure 4C–E). Remarkably, antibody-mediated blockage of PD-L1 led to strong increases of these cytokines in the supernatants of MoLC-Th cell cocultures. Further experiments using PD-L1 Fc protein that targets the PD-1 receptor on the surface of T cells confirmed the data obtained in experiments using anti-PD-L1. PD-L1 Fc chimera led to strong and significant increases of the levels of IL-22, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  in the supernatants of subsequent MoLC-Th cell cocultures (Figure S1).

#### PD-L1 Controls IL-22 and TNF- $\alpha$ in Nickel-activated CD4<sup>+</sup>T Cells

If TLR agonists trigger the expression of PD-L1 on the surface of LCs, and PD-L1 becomes crucial in controlling (i.e. restricting) Th cell polarization, then the strong contact allergen nickel, as potent inducer of PD-L1 expression, could be expected to exert similar effects. Consequently, the influence of nickel on the release of Th cell-derived cytokines in MoLC-T cell cocultures was addressed. MoLCs were pre-activated by nickel and, after incubation with anti-PD-L1, cocultured with CD4<sup>+</sup>T cells. Only for basal secretion levels of TNF- $\alpha$ , single administration of nickel induced an increase in protein levels (Figure 5B). For IL-22 (Figure 5A) and IL-17 and IFN- $\gamma$  (not shown), basal secretion levels were low and stayed low even after stimulation of MoLCs by nickel (Figure 5A). However, antibody-mediated blockage of PD-L1 prior to coculture significantly increased the levels of TNF- $\alpha$  and IL-22 when compared to non-blocked or non-stimulated conditions. This effect was also evident for IL-17 and IFN- $\gamma$ , but unreachd the statistical significance threshold of  $p \leq 0.05$ .

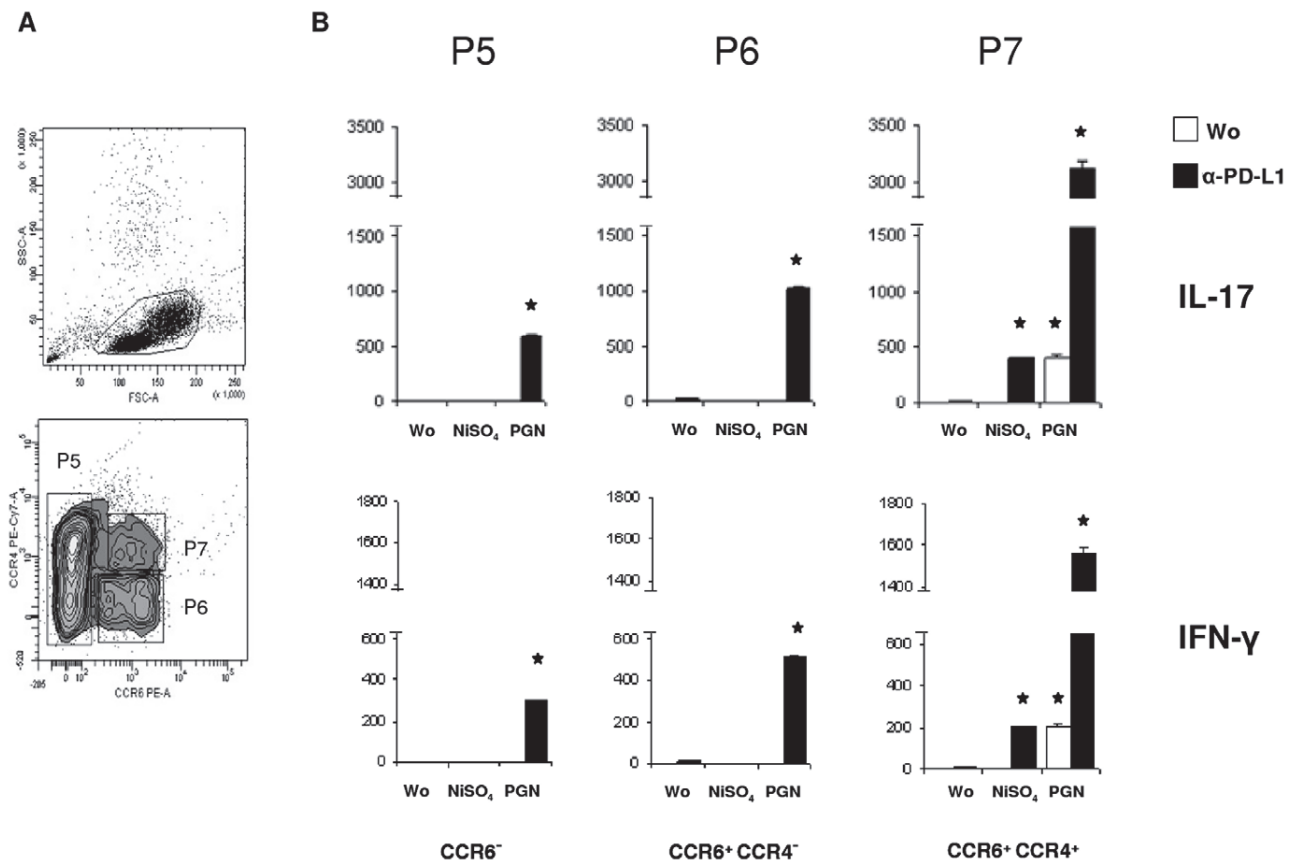
#### PD-L1 Restricts IL-17 and IFN- $\gamma$ in Activated CCR6<sup>+</sup>T Cell Subsets

To examine whether IL-17 and IFN- $\gamma$  were regulated by PD-L1 in specific Th subpopulations, we further separated total CD4<sup>+</sup>T cells based on their expression of chemokine receptors specific for skin homing T memory cells. Human T cells that have been differentiated *in vitro* toward a distinct memory phenotype were shown to release IL-17 and IFN- $\gamma$  after unphysiological stimulation [4,26]. We highly enriched this small T cell subset from pre-sorted CD4<sup>+</sup>T cells by applying combined gating on CCR6 and CCR4 during FACS (Figure 6A). Upon stimulation of MoLCs with anti-PD-L1 and nickel, cocultured CCR6<sup>+</sup> or CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> cells did not release considerable amounts of either IL-17 or IFN- $\gamma$  (Figure 6B). By contrast, a significant release of these cytokines was detectable after co-administration of anti-PD-L1 and PGN in CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> cells. In particular, extremely high amounts of IL-17 were induced by nickel and anti-PD-L1 in the subset of CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> cells. In this particular population, however, no elevated secretion of IL-10 and IL-21 was detectable under similar conditions (not shown). Together these data are in favour of the suggested regulatory role of PD-L1 on the polarization and subsequent cytokine release of Th cells after engaging into physical contacts with bacterial- or nickel-activated LCs that express high levels of this surface molecule.

#### Discussion

In this study we uncovered a regulatory role of the LC surface marker PD-L1 in ACD and bacterial defense. Recently, PD-L1 was detected on mRNA level in dermal DCs and migratory LCs [27]. We demonstrate protein expression of PD-L1 in human ACD skin biopsies, epidermal LCs and MoLCs in response to contact allergens and its specific inhibitory effects on the secretion of IL-22 and TNF- $\alpha$  by Th cells. These findings further support observations on anti-PD-L1 treated DCs that could elevate IFN- $\gamma$  in allogeneic CD4<sup>+</sup>T cells [28]. However, this earlier study was not





**Figure 6. PGN and nickel induce IFN- $\gamma$  and IL-17 in CCR6<sup>+</sup> and CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> cells.** T memory cells were incubated with MoLCs pretreated with anti-PD-L1 (+) or not (-). A. Expression of CCR6 and CCR4 in CD4<sup>+</sup>T cells enriched from the blood of healthy donors by depletion of non-CD4 and naïve (CD45RA<sup>+</sup>)T cells. T memory subpopulations were gated as CCR6<sup>-</sup> (P5), CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>-</sup> (P6), or CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> (P7) cells. B. Release of IFN- $\gamma$  and IL-17 by sorted subpopulations. MoLCs were stimulated by nickel or PGN for 24 hours and incubated or not with anti-PD-L1. Secretion levels (in pg/ml) are shown for IFN- $\gamma$  and IL-17 7 days after starting the coculture. Data reported as mean  $\pm$  SD of triplicates are representative for 3 different donors. Wo, without stimulus. doi:10.1371/journal.pone.0046776.g006

performed in connection with allergen or bacterial stimulation. *In vivo*, contact allergens such as DNCB, 2,4,5-trinitrochlorobenzene (TNCB), oxazolone, and cinnamic aldehyde were reported to modulate the phenotype and function of murine LCs [29]. Apart from direct effects on LCs, the influence on cocultured T cells appeared as enhanced proliferation. Considering this pathbreaking observation made by Aiba and Katz back in 1990, we questioned whether PD-L1 may exhibit a costimulatory function in T cell-mediated bacterial defense and delayed-type hypersensitivity reactions. In skin biopsies of ACD patients we detected high expression of PD-L1 after nickel challenge. Upregulation of PD-L1 in emigrating LCs has been recently reported [27]. We could demonstrate that PD-L1 colocalizes with langerin, thus identifying LCs as PD-L1-expressing cells. DNCB and nickel, but not the irritant SDS, increased the expression levels of PD-L1 and HLA-DR in MoLCs (Figure 3). Since DNCB and nickel were previously proven to augment HLA-DR expression in CD1a<sup>+</sup>-MoDCs stronger than any other chemical allergen [30], we assumed these and bacterial compounds being capable of inducing costimulatory signals on LCs that might be transferable to T cells. Applying cocultures we observed significant secretion of IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 and TNF- $\alpha$  by CD4<sup>+</sup>T cells if PD-L1 was blocked on LPS or PGN stimulated MoLCs. Previous studies could demonstrate proliferation and IL-22 secretion, but no detection of IL-17

in CD4<sup>+</sup>T cells while being in coculture with LPS matured DCs or CpG matured plasmacytoid DCs [4]. In our experiments, for secretion of IL-17 in response to LPS and PGN blocking of PD-L1 was mandatory. While exposure to complete bacterial cells was shown to suffice for induction of Th17 [8,9], in experimental models using cell wall compounds of bacteria additional signals besides LPS or PGN were required for Th17 differentiation [31]. Previous studies demonstrated that inhibition of PD-L1, but not PD-L2, enhanced hapten-induced ear swelling. In the presence of anti-PD-L1 (clone MIH5), both 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-pulsed antigen-presenting cells and the PD-L1-transfected LC cell line XS106 promoted proliferation of lymph node cells or T cells from naïve mice [32,33]. In addition, PD-L1<sup>+</sup>XS106 cells suppressed the release of IFN- $\gamma$  and IL-2 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These observations support the notion that PD-L1 expression not only becomes enhanced during maturation of LCs at inflammatory conditions, but also controls cytokine production in subsequent adaptive immune responses. It becomes tempting to speculate that the detection of IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , IL-17 and IL-22 indicates the presence of Th1, Th17 and Th22 cells. Recently it was shown that Th17 and Th22 cells participate in common skin diseases such as ACD, psoriasis and atopic dermatitis [10,34]. Based on our findings of increased expression levels in epidermal cells of patients suffering from ACD and the restriction of the

secretion of TNF- $\alpha$  and IL-22, an important role of PD-L1 in confining an excessive release of cytokines during skin pathogenesis seems obvious and biologically consistent. In addition, PD-L1-mediated regulation on IL-17 is supposed to represent later events in memory T cell development. Furthermore, cytokine regulation may be ensured through a PD-L1-PD-1 signaling feedback loop or a mechanism induced with time delay to endure positive B7 costimulatory signals. Since 2005 several studies have challenged the notion that skin residential LCs play a crucial role in the initiation of adaptive immune responses subsequent to antigen uptake and migration into draining lymph nodes [35]. In mice lacking LCs, surprisingly intensified or diminished but no abrogated contact hypersensitivity reactions were reported [36,37]. Therefore, LCs might be dispensable for induction of contact hypersensitivity reactions. In contrast to dermal DCs, allergen-challenged LCs reach auricular lymph nodes with delay and then populate in T cell areas rather than in the outer paracortex of B cell follicles [38]. It seems possible that specific localization of LCs in T cell-rich zones of lymph nodes may reflect more likely a function in specific control of cytotoxic T cells and Th cells rather than in initiation of plasma cell differentiation. Congruently, skin reactions upon exposure to contact allergens such as DNFB, TNCB or oxazalone are reported to include cytotoxic T cell and Th cell responses [39]. Along with our results on the effects of PD-L1 in Th cell differentiation and cytokine secretion *in vitro*, the current knowledge indicates that LCs may execute a controlling function in contact allergy, most likely through expression of immunoregulatory members of the B7 protein family including PD-L1. Experiments where LCs were eliminated from murine skin by corticosteroids or tape stripping point to similar conclusions [40]. Instead of LCs, other skin residential DCs may act as relevant antigen-presenting cells in the sensitization phase of contact hypersensitivity reactions. In contrast, LCs more likely induce confining and down-regulatory signaling thereby restricting immune responses to a certain level

## References

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348–2357.
- Murphy KM, Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2: 933–944.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 28: 445–489.
- Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F (2009) Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10: 857–863.
- Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H (2009) Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10: 864–871.
- Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, et al. (2008) Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14: 282–289.
- Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, et al. (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14: 275–281.
- Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, et al. (2007) IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8: 369–377.
- Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH (2006) TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177: 7980–7989.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, et al. (2009) Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119: 3573–3585.
- Larsen JM, Bonefeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L (2009) IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 123: 486–492.
- Nestle FO, Di MP, Qin JZ, Nickoloff BJ (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679–691.

until a disease-specific threshold of integrated proinflammatory signals has been passed.

Collectively, in this study we present data that suggest a crucial role of PD-L1 in skin's immune response to bacterial stimuli and in ACD. LPS, PGN, and the ubiquitous contact allergen nickel were shown to be capable of inducing PD-L1 expression on the surface of LCs which in turn limits the release of proinflammatory IL-22 and TNF- $\alpha$  from Th cells. Thus our data may set the course toward a promising approach aimed at inducing PD-L1 during elicitation of ACD by topical administration of specific stimuli like certain TLR agonists. In addition, synthetic analogues could be used to fine-tune PD-L1 expression for improved treatment of inflammatory skin disorders and infectious diseases.

## Supporting Information

**Figure S1 Fusion protein Fc-PD-L1 elevates release of IL-22, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ .** CD4<sup>+</sup>T cells were incubated with B7-H1/PD-L1 Fc chimera for 2 hours and subsequently cocultured with allogeneic MoLCs. Protein secretion was detected via ELISA in the supernatants 7 days after starting the coculture of MoLCs with CD4<sup>+</sup>T cells. Data shown are from 3 different donors; donors 1–3 are indicated by the following symbols: ▲, ■, ◆. Wo, without stimulus. (TIF)

## Acknowledgments

We thank Antje Bergert and Dennis Ernst for excellent technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MH MP. Performed the experiments: MH GE. Analyzed the data: MH MP. Contributed reagents/materials/analysis tools: OM GH MW. Wrote the paper: MP MH AL.

- Schmidt M, Raghavan B, Muller V, Vogl T, Fejer G, et al. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 11: 814–819.
- Kim YS, Choi SJ, Tae YM, Lee BJ, Jeon SG, et al. (2010) Distinct roles of vascular endothelial growth factor receptor-1- and receptor-2-mediated signaling in T cell priming and Th17 polarization to lipopolysaccharide-containing allergens in the lung. *J Immunol* 185: 5648–5655.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677–704.
- Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 236: 219–242.
- Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Hoffer G, Guthann E, et al. (2003) B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol* 170: 3637–3644.
- Fife BT, Bluestone JA (2008) Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 224: 166–182.
- Riley JL (2009) PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 229: 114–125.
- Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, et al. (2002) Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 196: 417–430.
- Peiser M, Grutzkau A, Waner R, Kolde G (2003) CD1a and CD1c cell sorting yields a homogeneous population of immature human Langerhans cells. *J Immunol Methods* 279: 41–53.
- Reiser H, Schneeberger EE (1996) Expression and function of B7-1 and B7-2 in hapten-induced contact sensitivity. *Eur J Immunol* 26: 880–885. 10.1002/eji.1830260424 [doi].
- Katayama I, Matsunaga T, Yokozeki H, Nishioka K (1997) Blockade of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) down-regulates induction of contact sensitivity by haptenated epidermal cells. *Br J Dermatol* 136: 846–852.
- Tang A, Judge TA, Turka LA (1997) Blockade of CD40-CD40 ligand pathway induces tolerance in murine contact hypersensitivity. *Eur J Immunol* 27: 3143–3150.

25. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, et al. (2009) Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457: 585–588.
26. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, et al. (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204: 1849–1861.
27. Pena-Cruz V, McDonough SM, Diaz-Griffero F, Crum CP, Carrasco RD, et al. (2010) PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen-presenting cell activity. *J Invest Dermatol* 130: 2222–2230.
28. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, et al. (2003) Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 170: 1257–1266.
29. Aiba S, Katz SI (1990) Phenotypic and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells. *J Immunol* 145: 2791–2796.
30. Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27: 3031–3038.
31. McAleer JP, Vella AT (2010) Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. *Trends Immunol* 31: 429–435.
32. Tsushima F, Iwai H, Otsuki N, Abe M, Hirose S, et al. (2003) Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses. *Eur J Immunol* 33: 2773–2782.
33. Kim HK, Guan H, Zu G, Li H, Wu L, et al. (2006) High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals. *J Leukoc Biol* 79: 686–695.
34. Milovanovic M, Drozdenko G, Weise C, Babina M, Worm M (2010) Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J Invest Dermatol* 130: 2621–2628.
35. Kaplan DH, Kissenpfennig A, Clausen BE (2008) Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. *Eur J Immunol* 38: 2369–2376.
36. Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ (2005) Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23: 611–620.
37. Bennett CL, van RE, Jung S, Inaba K, Steinman RM, et al. (2005) Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169: 569–576.
38. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, et al. (2005) Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22: 643–654.
39. Wang S, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, et al. (2000) Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 96: 2808–2813.
40. Grabbe S, Steinbrink K, Steinert M, Luger TA, Schwarz T (1995) Removal of the majority of epidermal Langerhans cells by topical or systemic steroid application enhances the effector phase of murine contact hypersensitivity. *J Immunol* 155: 4207–4217.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vergleich neuer und etablierter Biomarker für die Detektion von Kontaktallergenen auf THP-1, MUTZ-3 und primären Dendritischen Zellen

In der vorliegenden Studie wurden durch die Erhebung experimenteller Daten Antworten auf zwei Fragestellungen gefunden. Erstens sollten neue Biomarker, die in der Lage sind eine Sensibilisierung anzuzeigen, sowohl auf der Ebene von Oberflächenmolekülen als auch auf Zytokinebene identifiziert und mit bereits charakterisierten Biomarkern verglichen werden. Zweitens sollte das am besten geeignete Zellkultursystem für die Detektion von sensibilisierenden Substanzen identifiziert werden. Somit wurden fünf neue Biomarker, DCIR, PD-L1, MIP-1 $\alpha$ , NAP-2 und IL-16 für die Testung von sensibilisierenden Substanzen vorgeschlagen und die Leistungsfähigkeit dieser neuen Biomarker mit den zwei gut etablierten und häufig verwendeten Markern CD86 und IL-8 verglichen. Da bei der Entwicklung einer Kontaktdermatitis DC eine entscheidende Rolle spielen (Silberberg et al., 1976), werden für *in vitro* Testsysteme vor allem aus Monozyten generierte DC und aus Gründen der unkomplizierteren Handhabung Zelllinien verwendet, die bestimmte Charakteristika von DC aufweisen. Oft eingesetzte Zelllinien sind hierbei die THP-1 und die MUTZ-3 Zelllinien, welche ihren Ursprung aus einer monozytischen und einer akuten myeloiden Leukämie haben (Hu et al., 1996; Tsuchiya et al., 1980). Bis jetzt gibt es keine Studien, bei denen die Eignung von primären DC und Zelllinien für die *in vitro* Testung von sensibilisierenden Substanzen im direkten Vergleich untersucht wurde. In dieser Arbeit wurden MoDC und MoLC, stellvertretend für die primären Zellen, und THP-1 und MUTZ-3 Zellen, stellvertretend für die Zelllinien, in Bezug auf die Expression von drei Oberflächenmarkern und vier Zytokinen untersucht.

### **4.1.1 Vorhersage eines sensibilisierenden Potentials anhand von Oberflächenmarkern**

Als etablierten Referenzmarker für die Aktivierung von DC wurde CD86 gewählt. CD86 wird nach Aktivierung der Zelle stark hochreguliert (McLellan et al., 1995; Sakuta et al., 1994) und ist wichtiger Bestandteil in mehreren vorgeschlagenen *in vitro* Tests für die Identifikation von sensibilisierenden Substanzen (Ade et al., 2006; Azam et al., 2006a; Yoshida, 2003). Die Basalexpression von CD86 war sowohl auf den primären Zellen als auch auf den Zelllinien sehr ähnlich. Nach Stimulation mit Kontaktallergenen konnte eine stark dosisabhängige Hochregulation von CD86 auf den primären Zellen beobachtet werden. Dies reichte von einer zweifach erhöhten Expression bei Zimtaldehyd bis zu einer achtfach erhöhten Expression bei Nickel. Die MUTZ-3 Zelllinie zeigte nur eine sehr schwach erhöhte Expression von CD86 nach Behandlung mit Kontaktallergenen, wogegen die THP-1 Zellen, zumindest bei Eugenol und Zimtaldehyd, sowohl eine Erhöhung bis auf das Dreifache als auch eine Dosisabhängigkeit bezüglich CD86 zeigten.

Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch bei den Expressionsmustern von PD-L1. PD-L1 wird als koinhibitorisches Molekül beschrieben (Freeman et al., 2000) und konnte von uns sehr ähnlich exprimiert, sowohl auf MoDC als auch auf MoLC, gefunden werden. MUTZ-3 Zellen zeigten hingegen eine deutlich geringere Expression und auf THP-1 Zellen konnte praktisch keine Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einer früheren Publikation, in der eine verstärkte Expression von PD-L1 auf MUTZ-3 Zellen nach Zugabe von Kontaktallergenen beobachtet wurde (Azam et al., 2006b), konnten wir sowohl auf MUTZ-3 Zellen als auch auf THP-1 Zellen nur eine geringe Zunahme der PD-L1 Expression messen. Übereinstimmend mit Daten aus der Literatur (Williams et al., 2010) konnten wir hingegen eine bedeutende Zunahme der PD-L1 Expression auf MoLC und MoDC feststellen.

DCIR, ein Oberflächenmolekül der C-Typ Lektine, wird von allen DC Subpopulationen exprimiert und hat wahrscheinlich eine inhibitorische Rolle bei inflammatorischen Prozessen (Kanazawa et al., 2002). Im Gegensatz zu CD86 und PD-L1 wird DCIR nach Aktivierung der Zelle herunterreguliert (Bates et al., 1999). Auf diesen Berichten basiert die Annahme, dass DCIR auch bei Sensibilisierungsprozessen eine Rolle spielen könnte und untersucht werden sollte. Auf MoDC und MoLC konnte dementsprechend auch im nicht aktivierten Zustand eine sehr hohe Expression von DCIR nachgewiesen werden. Die Zelllinien zeigten hingegen kaum Expression von DCIR. Die in der Publikation gezeigten Daten demonstrieren tatsächlich eine signifikante Abnahme von DCIR auf der Zelloberfläche von MoDC und MoLC nach Zugabe der Kontaktallergene. Es liegt daher nahe, dass DCIR eine wertvolle Ergänzung zu anderen Allergiemarkern wie zum Beispiel CD86 und CD54, die nach Aktivierung hochreguliert werden, sein könnte. Insbesondere wäre DCIR als einer der wenigen Biomarker, die bei Aktivierung herunterreguliert werden, in der Kombination mit hochregulierten Markern wie CD86 für Testsysteme qualifiziert. Die Nutzung von DCIR als Biomarker in Testsystemen beschränkt sich jedoch auf primäre Zellen, da auf den Zelllinien keine Expression von DCIR festzustellen war.

### ***4.1.2 Vorhersage eines sensibilisierenden Potentials anhand von löslichen Biomarkern***

Da die Messung von Oberflächenmarkern technisch aufwändig ist, und viele Labore nicht über die apparativen Voraussetzungen dafür verfügen, ist die Erhebung von löslichen Biomarkern im Zellkulturüberstand für die Anwendbarkeit von *in vitro* Tests von Vorteil. Um neue, lösliche Biomarker zu finden, wurde deswegen ein sogenannter „proteome profiler“ eingesetzt mit dem bis zu 31 verschiedene Zytokine detektiert werden können. Nach Behand-

lung von MoDC mit Kontaktallergenen konnten stark erhöhte Konzentrationen von MIP-1 $\alpha$ , NAP-2, IL-16 und IL-8 festgestellt werden. Diese vier Zytokine wurden in den vier verschiedenen Zelllinien untersucht. Im Gegensatz zu MIP-1 $\alpha$ , NAP-2 und IL-16 wurde IL-8 schon vorher in Sensibilisierungs-Tests verwendet. Wie frühere Studien in MUTZ-3 LC (Ouwehand et al., 2010) konnten wir in MUTZ-3 Zellen stark erhöhte IL-8 Spiegel nach Zugabe von Kontaktallergenen messen und sowohl in MoDC als auch in MoLC waren noch höhere Zytokinspiegel messbar. Auch die THP-1 Zelllinie erlaubte noch eine Unterscheidung zwischen sensibilisierenden Substanzen und irritierenden Substanzen, die Zytokinkonzentrationen lagen hierbei aber am Detektionslimit der Messmethode. Über die Beteiligung von MIP-1 $\alpha$  bei der Entstehung oder Auslösung einer Kontaktallergie ist bis heute nichts bekannt, es wird jedoch im inflammatorischen Milieu von DC freigesetzt und hat sich als wichtig für die Chemotaxis von T-Zellen zum Entzündungsherd herausgestellt (Maurer und Von Stebut, 2004). In unserem Versuchssystem konnten wir sehr hohe Messwerte von MIP-1 $\alpha$  in MoDC und MoLC nach Inkubation mit Nickel feststellen. Die anderen getesteten Substanzen hatten dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die MIP-1 $\alpha$  Konzentration im Überstand. Erstaunlicherweise war es mit beiden Zelllinien möglich, über die Menge der MIP-1 $\alpha$  Freisetzung, eine Entscheidung zwischen Allergen und irritierender Substanz zu treffen. Die gemessenen Werte lagen jedoch auch hier nur knapp über dem Detektionslimit. Ein weiteres in der Studie detektiertes Zytokin, IL-16, wird von verschiedensten Immunzellen produziert, unter anderem auch von DC. Eine Aufgabe von IL-16 ist die Rekrutierung von anderen Immunzellen (Cruikshank et al., 1987). Interessanterweise wird das Auftreten eines Promotorpolymorphismus im IL-16 Gen verdächtigt, mit dem Auftreten einer Kontaktdermatitis zu korrelieren (Reich et al., 2003). Tatsächlich zeigten die mit Kontaktallergenen behandelten DC, im Gegensatz zu

unbehandelten und mit SDS behandelten Zellen, eine deutlich erhöhte IL-16 Freisetzung. Dieser Effekt konnte verlässlich für alle drei getesteten Kontaktallergene jedoch nur bei den MoDC festgestellt werden. Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass NAP-2 in Monozyten exprimiert wird (Pillai et al., 2006). In MoDC war es mittels NAP-2 Expression möglich, Zimtaldehyd und Eugenol als Kontaktallergene zu identifizieren. Bei Nickel war dies jedoch nicht der Fall. Aufgrund einer sehr hohen Basalexpression von NAP-2 in MoLC war eine Identifizierung der Kontaktallergene bei diesen Zellen nicht möglich und auch mit den Zelllinien ließ sich keine Aussage über das allergene Potential der Substanzen treffen.

Zusammenfassend zeigten die primären DC höhere Expressionswerte der Biomarker und einen größeren dynamischen Messbereich. Die primären Zellen erscheinen den Zelllinien bei der Identifizierung und Klassifizierung von Kontaktallergenen daher überlegen.



### **4.2 Die Regulation der T-Zell-Antwort bei der Nickel induzierten Kontaktallergie durch PD-L1 auf Langerhans-Zellen**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass in Hautläsionen von Nickelallergikern eine erhöhte PD-L1 Expression auftritt und dass auf LC exprimiertes PD-L1 regulierend in die T-Zell-Aktivierung sowohl bei der Nickel-induzierten Kontaktdermatitis, als auch bei bakteriellen Erkrankungen eingreift.

#### ***4.2.1 Expression von PD-L1 auf LC und in Hautbiopsien von Nickelallergikern***

Erst kürzlich wurde PD-L1 auf mRNA Ebene in dermalen DC und migrierenden LC nachgewiesen (Pena-Cruz et al., 2010). Wir konnten PD-L1 sowohl auf aus Hautbiopsien isolierten LC als auch auf *in vitro* generierten MoLC mittels Immunfluoreszenz nachweisen. In Hautbiopsien von Nickelallergikern konnte 72 Stunden nach Behandlung mit einer Nickellösung eine stark erhöhte PD-L1 Expression festgestellt werden. Diese Beobachtung konnte *in vitro* mit aus Monozyten gewonnenen LC bestätigt werden. Bei diesen konnte eine dosisabhängige Erhöhung der PD-L1 Expression auf der Zelloberfläche nach Exposition mit den Kontaktallergenen Nickel und auch DNCB nachgewiesen werden. SDS hingegen, als Modell für eine irritierende Substanz, führte nicht zu einer Erhöhung der PD-L1 Expression. Aufgrund der beschriebenen immunregulatorischen Funktion von PD-L1 bei anderen Krankheitsbildern, wie Tumorerkrankungen und viralen Erkrankungen (Iwai et al., 2003b, 2002), sollte die Rolle der erhöhten PD-L1 Expression auf LC bei der Kontaktdermatitis untersucht werden.

#### ***4.2.2 Konsequenzen der erhöhten PD-L1 Expression auf die T-Zell Antwort***

Kontaktallergene sind in der Lage LC zu aktivieren und dadurch zur Reifung zu bringen. Die Wege, über die eine Aktivierung der Zellen erfolgt, sind für

die meisten Allergene noch nicht bekannt. Im Falle von Nickel konnte jedoch erst kürzlich gezeigt werden, dass Nickelmoleküle an den „Toll-like“ Rezeptor (TLR)4 binden (Schmidt et al., 2010). Eine Aktivierung über die TLR führt zu einer Reifung von DC und dadurch zu einem spezifischen Muster von aktivierenden und regulatorisch wirkenden Oberflächenproteinen, welches die darauffolgende T-Zell Reaktion beeinflusst. So werden nach Aktivierung von DC sowohl kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 als auch koinhibitorische Moleküle wie PD-L1 auf der Zelloberfläche exprimiert. CD80 und CD86 können auf der T-Zelle an das konstitutiv exprimierte CD28 binden und führen somit zu einer Aktivierung der T-Zelle (Freeman et al., 1993; Koulova et al., 1991). Sie können jedoch auch an das erst auf aktivierten Zellen exprimierte CTLA4 binden, was zu einer Unterdrückung der T-Zell Reaktion führt (Linsley et al., 1992). PD-L1 bindet an PD-1 und PD-2 auf der T-Zelle und generiert ebenfalls ein inhibitorisches Signal für die T-Zelle (Sharpe et al., 2007). In Mausstudien konnte durch Blockierungsexperimente gezeigt werden, dass die von diesen Oberflächenmolekülen ausgehenden Signale, wie zum Beispiel PD-L1, eine maßgebliche Rolle bei der Kontakthypersensibilitätsreaktion spielen (Tsushima et al., 2003).

Um den Einfluss von PD-L1 auf der Oberfläche von LC auf die nachfolgende T-Zell-Differenzierung zu untersuchen, wurden Neutralisierungsstudien mit einem, spezifisch PD-L1 blockierenden, Antikörper durchgeführt. Da für einige Allergene kürzlich gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von Immunzellen über TLR stattfinden kann (Schmidt et al., 2010; Trompette et al., 2008) wurden der TLR2 Agonist Peptidoglykan (PGN) sowie der TLR4 Agonist Lipopolysaccharid (LPS) gewählt, um die Effekte auf die T-Zell-Polarisierung zu untersuchen. Mit PGN oder LPS aktivierte LC zeigten eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression von PD-L1 und CD86. Der Einfluss der erhöhten PD-L1 Expression wurde in Kokultorexperimenten mit CD4

positiven T-Zellen untersucht. Dabei konnten nach Kokultur von T-Zellen mit LPS stimulierten MoLC keine erhöhten Zytokinspiegel im Vergleich zur Kokultur mit nicht stimulierten MoLC gefunden werden. Wurde jedoch die Interaktion von PD-L1 mit seinem Liganden PD-1 auf der T-Zelle durch blockierende Antikörper verhindert, konnten stark erhöhte IL-17 Spiegel gemessen werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine regulierende Funktion von PD-L1 auf die T-Zell-Antwort unter inflammatorischen Bedingungen hin. Daraufhin wurden weitere Zytokine untersucht, die bei inflammatorischen Erkrankungen der Haut eine entscheidende Rolle spielen. Interessanterweise konnte sowohl bei IL-22 als auch bei TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nach Zugabe von Antikörpern gegen PD-L1 und Stimulation, eine im Vergleich zu ebenfalls mit anti-PD-L1 behandelten, aber unstimulierten Kontrollen, stark erhöhte Zytokinkonzentration im Überstand gemessen werden. Da Nickel ähnlich wie bakterielle Liganden die Zytokinstimulation über Toll-like Rezeptoren stimuliert (Schmidt et al., 2010) schien es möglich, dass auch hier dieselben regulatorischen Mechanismen wie bei den bakteriellen Liganden beteiligt sind. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Nickel stimulierten MoDC auf die Zytokinsekretion von T-Helferzellen untersucht. T-Zellen, die mit Nickel stimulierten LC inkubiert wurden, zeigten eine erhöhte Sekretion von TNF- $\alpha$ . Die Zytokinspiegel von IL-22, IL-17 und IFN- $\gamma$  wurden dagegen nicht beeinflusst. Wurde die Interaktion von PD-L1 mit seinem Liganden durch spezifische Antikörper inhibiert, konnte jedoch eine stark erhöhte Sekretion sowohl von IL-22 als auch von TNF- $\alpha$  gemessen werden. Bei IL-17 und IFN- $\gamma$  konnte zwar eine ähnliche Tendenz festgestellt werden, die Unterschiede waren jedoch zu gering, um eine verlässliche Aussage zu treffen. Die bei einem Kontaktekzem beteiligten T-Zellen gehören vornehmlich zu den sogenannten „skin homing“ T-Gedächtnis Zellen. Diese zeichnen sich durch eine charakteristische Ausstattung von Chemokinrezeptoren wie unter anderem CCR4 und CCR6

aus (Baekkevold et al., 2005; Paradis et al., 2008). Da humane T-Zellen, die mittels spezifischer Zytokine *in vitro* zu T-Gedächtnis-Zellen differenziert werden, nach Stimulation IL-17 und IFN- $\gamma$  produzieren (Annunziato et al., 2007; Duhon et al., 2009) wurde diese spezielle T-Zell-Subpopulation genauer untersucht. Dafür wurde die kleine Subpopulation von CCR4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen aus vorsortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels FACS stark angereichert. Nach Kokultur mit Nickel stimulierten MoLC, die mit PD-L1 Antikörpern vorinkubiert waren, konnte weder in der CCR6<sup>-</sup> noch in der CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>-</sup> Population eine erhöhte Sekretion von IL-17 oder IFN- $\gamma$  beobachtet werden. Dagegen konnte in der CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> Subpopulation eine deutliche Erhöhung sowohl der Sekretion von IL-17 als auch von IFN- $\gamma$  beobachtet werden. In der Studie konnte gezeigt werden, dass PD-L1 auf LC eine entscheidende regulatorische Rolle bei der Immunreaktion gegen Nickel in der Haut spielt. Durch Nickel wird eine erhöhte Expression des regulatorischen Moleküls PD-L1 auf LC induziert, welche wiederum die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen aus T-Helferzellen, wie IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-22 und TNF- $\alpha$ , stark vermindert. Seit mehreren Jahren werden LC aufgrund von verschiedenen Untersuchungen eine wesentliche Rolle bei der Aufnahme und Verarbeitung von Antigenen und der darauf folgenden Initiation von adaptiven Immunantworten zugeschrieben (Kaplan et al., 2008). Überraschenderweise zeigten jedoch LC-defiziente Mäuse immer noch, beziehungsweise sogar verstärkte Symptome einer Kontakt-hypersensibilität (Bennett et al., 2005; Kaplan et al., 2005). Setzt man die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur Funktion von PD-L1 auf die T-Zell Differenzierung und Zytokinfreisetzung von T-Helferzellen *in vitro* in Kontext mit den Ergebnissen aus den LC Ablationsmodellen, deutet dies auf eine regulatorische Rolle der LC bei der allergischen Kontaktdermatitis hin.

### 5 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, die Entwicklung neuer immunologischer *in vitro* Testsysteme für die Evaluierung potentiell human sensibilisierender Substanzen voranzutreiben, wurden neuartige funktionelle Zellkultursysteme entwickelt, welche sowohl zelluläre und als auch molekulare Ereignisse bei der Entstehung einer humanen Kontaktallergie widerspiegeln. Da beide, sowohl antigenpräsentierende Dendritische Zellen (DC) als auch T-Zellen die humane Immunantwort der allergische Kontaktdermatitis maßgeblich determinieren, wurden beide Zelltypen in die Untersuchungen einbezogen.

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurden molekulare Reaktionen von primären antigenpräsentierenden mit Zellen (APC) und DC-ähnlichen Zelllinien auf sensibilisierende Substanzen hin untersucht. Dabei konnte erstmalig in primären humanen DC eine signifikante allergenabhängige Regulation von *programmed death-ligand 1* (PD-L1), DC immunoreceptor (DCIR), Interleukin-16 (IL-16) und *neutrophil-activating protein-2* (NAP-2) detektiert werden. Als neue potentielle Biomarker wurden diese mit den bereits für allergenspezifische *in vitro* Reaktionen gut charakterisierten Markern CD86 und IL-8 verglichen. Um die Eignung von DC-ähnlichen Zelllinien für *in vitro* Testsysteme zur Detektion von Kontaktallergenen zu überprüfen, wurde die Expression dieser Marker zwischen den primären MoLC (aus Monozyten generierte Langerhans Zellen) und MoDC (aus Monozyten generierte DC) sowie den Zelllinien MUTZ-3 und THP-1 verglichen. Abhängig vom Zelltyp konnte gezeigt werden, dass die reziprok regulierten Oberflächenproteine PD-L1 (+) und DCIR (-) sowie die Zytokine MIP-1 $\alpha$ , NAP-2 und IL-16 als neue Marker für ein sensibilisierendes Potential genutzt werden können. Phänotyp und Funktion unterschieden sich erwartungsgemäß deutlich zwischen primären DC und den untersuchten DC-ähnlichen Zelllinien. Aufgrund der höheren absoluten Expres-

sionswerte, als auch der größeren dynamische Bandbreite der ermittelten Markerexpression, erwiesen sich die humanen MoDC als am besten geeignet für die *in vitro* Testung und Identifizierung humaner Kontaktallergene.

Da die T-Zellantwort in der allergischen Kontaktdermatitis, Typ IV Allergie, eine zentrale Rolle einnimmt, sollte sich der zweite Teil der Arbeit auf die durch Kontaktallergene induzierte zelluläre und molekulare T-Zellantwort fokussieren.

So sollte hier die Wirkung des instruierenden inhibitorischen Signals von programmed death-ligand 1 (PD-L1) in der akuten Phase der Kontaktallergie untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass PD-L1 sowohl auf *in vitro* generierten Langerhans-Zellen als auch in der Haut von Nickelallergikern nach Exposition mit Nickel, einem der klinisch bedeutsamsten Kontaktallergene, stark erhöht ist. Mittels blockierender Antikörper, welche die Interaktion zwischen PD-L1 und den entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zelle verhindern, konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von T-Helfer-Zell-spezifischen Zytokinen sowohl von der Aktivierung der Langerhans-Zellen als auch von der PD-L1-PD-1 Interaktion abhängig ist. Die Blockierung von PD-L1 auf Nickel stimulierten MoLC führte zu einer stark erhöhten Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-22 aus kokultivierten, allogenen T-Helfer Zellen. Untersuchungen einer weiteren speziellen T-Zell Subpopulation, der CCR6+/CCR4+ T Gedächtniszellen, ergaben, dass diese nach Kokultur mit Nickel stimulierten MoLC und zusätzlicher Inhibition von PD-L1, die Zytokine IL-17 und IFN- $\gamma$  sezernierten. Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von PD-L1 bei der Kontrolle der inflammatorischen Immunantwort im Verlauf der allergischen Kontaktdermatitis hin. Aus diesem Teil der Dissertationsarbeit könnten sich neuartige therapeutische Ansätze für die Behandlung der humanen Kontaktallergie ergeben, wie z.B. durch den Einsatz PD-L1 induzierender Stimuli oder synthetischer PD-L1 Analoga.

### 6 Summary

In order to develop new immunological *in vitro* test systems suitable for the detection of allergenic chemicals, there is a need for appropriate cell culture systems that depict cellular and immunological events involved in allergic contact dermatitis. Since Dendritic cells (DC) as well as T-cells determine the course of the immune reaction in allergic contact dermatitis, both cell types were investigated in this work.

In the first part of this study we determined the influence of sensitizing chemicals on primary antigen presenting cells and DC-like cell lines. We identified the potential biomarkers programmed death-ligand 1 (PD-L1), DC immunoreceptor (DCIR), Interleukin (IL) -16, and neutrophil-activating-protein-2 (NAP-2), all of which were detectable in primary human DC upon exposure to chemical contact allergens. These molecules were compared to the performance of the well-established markers CD86 and IL-8. To test the applicability of DC-like cell lines for the testing of compounds in *in vitro* test systems, we compared the performance of the potential new biomarkers on MoLC (monocyte derived Langerhans cells) and MoDC (monocyte derived Dendritic cells) as well as on the MUTZ-3 and THP-1 cell line. It was shown that depending on the cell type the reciprocally regulated surface proteins PD-L1 (+) and DCIR (-) as well as the cytokines MIP-1 $\alpha$ , NAP-2 and IL-16 can serve as new markers for the detection of a chemical's sensitizing potential. As expected, primary cells were clearly different in phenotype and function compared to the DC-like cell lines. Therefore, due to higher absolute values and a broader dynamic range in biomarker expression, primary cells seem to be the method of choice for *in vitro* identification of contact allergens.

As the allergen specific T-cell reaction plays a central role in allergic contact dermatitis, Type IV allergies, the second part of the work focused on the cellular and molecular events in the T-cell response induced by contact

## Summary

---

allergens. With the aim of establishing a novel, predictive and robust *in vitro* test system, the effect of the dominant inhibitory signaling molecule, namely PD-L1, was to be addressed. In this thesis, for the first time upregulation of PD-L1 after exposure to nickel, one of the most prominent contact allergens, could be demonstrated on *in vitro* generated Langerhans Cells as well as in skin biopsies of patients allergic to nickel. By using antibodies able to inhibit the interaction of PD-L1 and the corresponding receptors on the T-cells it could be shown that the release of T-helper cell specific cytokines is dependent on both stimulation of LCs and inhibition of PD-L1–PD-1 interactions. Blockage of PD-L1 on nickel stimulated MoLCs resulted in increased release of TNF- $\alpha$  and IL-22 from co-cultured, allogenic T-helper cells. Further examination of the CCR6<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup> T-memory cell subpopulation, revealed that these cells showed enhanced secretion of IL-17 and IFN- $\gamma$  after co-cultivation with nickel stimulated MoLC and blockage of PD-L1. These findings suggest a crucial role of PD-L1 in the control of the inflammatory immune reaction in contact dermatitis. This knowledge may set the course for the development of new therapies in the treatment of contact dermatitis by using PD-L1 inducing stimuli or synthetic PD-L1 analogs.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DC	Dendritische Zellen
DCIR	Dendritic cell immunoreceptor
ECVAM	Europäisches Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GARD	Genomic Allergen Rapid Detection
GPMT	Guinea pig maximization test
h-CLAT	human cell line activation test
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KC	Keratinocyten
LC	Langerhans-Zellen
LLNA	Local lymph node assay

## Abkürzungsverzeichnis

---

LPS	Lipopolysaccharid
MIP	macrophage inflammatory protein
MoDC	<i>in vitro</i> generierte Dendritische Zelle monozytären Ursprungs
MoLC	<i>in vitro</i> generierte Langerhans-Zelle monozytären Ursprungs
MUSST	myeloid U937 skin sensitization test
NAP	Neutrophil activating proteine
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PGN	Peptidoglykan
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
T <sub>H</sub>	Effektorzelle des T-Helfer-Typs
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

### **8 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Luch danke ich für die Möglichkeit meine Promotion am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Fachgruppe "Experimentelle Forschung" anfertigen zu können.

Frau Prof. Dr. Schäfer-Korting danke ich für die Übernahme des Gutachtens und die Vertretung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der FU Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Matthias Peiser, der dieses Projekt initiiert und betreut hat, immer für Diskussionen zur Verfügung stand und mich mit unerschütterlichem Optimismus immer neu motiviert hat.

Herrmann-Josef Thierse danke ich für das kritische Lesen des Manuskripts.

Ein Dankeschön an Antje Bergert die mir all die Jahre eine große Hilfe im Labor war und mit der beim Buffys verarbeiten niemals Langeweile aufkam.

Danke an meine Zimmergenossen Franz Mußotter und Marc Drießen für Diskussionen um wissenschaftliches und nichtwissenschaftliches und natürlich an Kristin Stolpmann, die von Anfang an bis fast zum Ende mit dabei war. Dank auch an Dora Wittke für Unterstützung bei allen Stilfragen.

Danke an das gesamte Team der Abteilung 7 für die schönen Jahre innerhalb und außerhalb des Labors.

Danke an meine Eltern, die immer an mich geglaubt haben und Danke an Hanna und Lara für ihre immense Geduld.

## 9 Literaturverzeichnis

- Ade, N., Martinozzi-Teissier, S., Pallardy, M., Rousset, F., 2006. Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *Journal of immunotoxicology* 3, 189–97.
- Albanesi, C., Cavani, a, Girolomoni, G., 1999. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162, 494–502.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fil, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., Romagnani, S., 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine* 204, 1849–1861.
- Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., Katsumura, Y., Aiba, S., 2002. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicology in Vitro* 16, 711–716.
- Azam, P., Peiffer, J.-L., Chamousset, D., Tissier, M.-H., Bonnet, P.-A., Vian, L., Fabre, I., Ourlin, J.-C., 2006a. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicology and applied pharmacology* 212, 14–23.
- Azam, P., Peiffer, J.-L., Chamousset, D., Tissier, M.-H., Bonnet, P.-A., Vian, L., Fabre, I., Ourlin, J.-C., 2006b. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicology and applied pharmacology* 212, 14–23.
- Azuma, M., Ito, D., Yagit, H., Okumura, K., Phillips, J., Lanier, L., Somoza, C., 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366, 76–79.
- Baekkevold, E.S., Wurbel, M., Kivisäkk, P., Wain, C.M., Power, C.A., Haraldsen, G., Campbell, J.J., 2005. A role for CCR4 in development of mature circulating cutaneous T helper memory cell populations. *Journal of Experimental Medicine* 201, 1045–1051.

## Literaturverzeichnis

---

- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–52.
- Barthel, A., Okino, S.T., Nakatani, K., Li, J., James, P., Roth, R.A., Barthel, A., Okino, S.T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J.P., Roth, R.A., 1999. Regulation of GLUT1 Gene Transcription by the Serine / Threonine Kinase Akt1. *The journal of biological chemistry* 274, 20281–20286.
- Basketter, D., Crozier, J., Hubesch, B., Manou, I., Mehling, A., Scheel, J., 2012. Optimised testing strategies for skin sensitization – The LLNA and beyond. *Regulatory toxicology and pharmacology* 64, 9–16.
- Bates, E.E., Fournier, N., Garcia, E., Valladeau, J., Durand, I., Pin, J.J., Zurawski, S.M., Patel, S., Abrams, J.S., Lebecque, S., Garrone, P., Saeland, S., 1999. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163, 1973–83.
- Bauch, C., Kolle, S.N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2012. Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regulatory toxicology and pharmacology* 63, 489–504.
- Bennett, C.L., Rijn, E. Van, Jung, S., Inaba, K., Steinman, R.M., Kapsenberg, M.L., 2005. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *The Journal of Cell Biology* 169, 569–576.
- Bergström, M.A., Ott, H., Carlsson, A., Neis, M., Zwadlo-klarwasser, G., Jonsson, C.A.M., Merk, H.F., Karlberg, A., Baron, J.M., 2006. A Skin-Like Cytochrome P450 Cocktail Activates Prohaptens to Contact Allergenic Metabolites 1145–1153.
- Bos, J.D., Meinardi, M.M., 2000. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental dermatology* 9, 165–9.
- Buehler, E. V, 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Archives of Dermatology* 91, 171–175.
- Cao, Y., Zhang, L., Ritprajak, P., Tsushima, F., Youngnak-Piboonratanakit, P., Kamimura, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., 2011. Immunoregulatory molecule B7-H1 (CD274) contributes to skin carcinogenesis. *Cancer research* 71, 4737–41.

## Literaturverzeichnis

---

- Cavani, A., Pennino, D., Eyerich, K., 2012. Th17 and Th22 in skin allergy. *Chemical immunology and allergy* 96, 39–44.
- Cruikshank, W., Berman, J., Theodore, A., Bernardo, J., Center, D., 1987. Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 138, 3817–3823.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., Mescher, M.F., 2003. Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells: Dissociating Proliferation and Development of Effector Function. *J Exp Med* 197, 1141–1151.
- Diepgen, T.L., 2003. Occupational skin-disease data in Europe. *Int Arch of Occup Environ Health* 331–338.
- Diepgen, T.L., Conrads, P.J., 1999. The epidemiology of occupational contact dermatitis. *Int Arch of Occup Environ Health* 496–506.
- Dietz, L., Esser, P.R., Schmucker, S.S., Goette, I., Richter, A., Schno, M., 2010. Tracking Human Contact Allergens: From Mass Spectrometric Identification of Peptide-Bound Reactive Small Chemicals to Chemical-Specific Naive Human T-Cell Priming. *Toxicological Sciences* 117, 336–347.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* 10, 857–63.
- Enk, a H., Katz, S.I., 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1398–402.
- Francisco, L.M., Sage, P.T., Sharpe, A.H., 2010. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews* 236, 219–42.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., Sharpe, A.H., 2009. PD-L1 regulates the development , maintenance , and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 3015–3029.
- Freeman, B.G.J., Borrielloj, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Judy, G.G., Kim, J., Goldberg, J.M., Hathcock, K., Laszlo, G., Lombard, L.A., Wang, S., Gray, I.G.S., Nadler, L.M., Sharpe, A.H., 1993. Murine B7-2, an Alternative

## Literaturverzeichnis

---

CTLA4 Counter-receptor that Costimulates T Cell Proliferation and Interleukin 2 Production. *J Exp Med* 178, 2185–2192.

- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192, 1027–34.
- Freudenberg, M.A., Esser, P.R., Jakob, T., Galanos, C., Martin, S.F., 2009. Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis: analogy with infections. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* 144, 173–85.
- Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., 1963. The classification of allergic reactions underlying diseases, in: Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A. (Eds.), *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Science.
- Gerberick, G.F., Troutman, J. a, Foertsch, L.M., Vassallo, J.D., Quijano, M., Dobson, R.L.M., Goebel, C., Lepoittevin, J.-P., 2009. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase- peroxide oxidation system. *Toxicological Sciences* 112, 164–74.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.-P., 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological sciences* 81, 332–43.
- Gianchecchi, E., Delfino, D., Fierabracci, A., 2013. Autoimmunity Reviews Recent insights into the role of the PD-1 / PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* ePub.
- Guironnet, G., Rousset, F., Schmitt, D., 2000. In vitro human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol in Vitro* 14, 517–522.
- Hathcock, K.S., Laszlo, G., Dickler, H.B., Bradshaw, J., Linsley, P., Hodes, R.J., 1993. Identification of an Alternative CTLA-4 Ligand Costimulatory for T Cell Activation. *Science* 719, 2–4.

## Literaturverzeichnis

---

- Hilkens, C.M.U., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L., 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 5699, 561–567.
- Hu, Z., Ma, W., Zaborski, M., MacLeod, R., Quentmeier, H., Drexler, H., 1996. Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia* 10, 1025.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2–6.
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., Honjo, T., 2003a. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 198, 39–50.
- Iwai, Y., Terawaki, S., Ikegawa, M., Okazaki, T., Honjo, T., 2003b. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *The Journal of experimental medicine* 198, 39–50.
- Kanazawa, N., Okazaki, T., Nishimura, H., Tashiro, K., Inaba, K., Miyachi, Y., 2002. DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *The Journal of investigative dermatology* 118, 261–6.
- Kaplan, D.H., Igyártó, B.Z., Gaspari, A. a, 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature reviews. Immunology* 12, 114–24.
- Kaplan, D.H., Jenison, M.C., Saeland, S., Shlomchik, W.D., Shlomchik, M.J., 2005. Epidermal Langerhans Cell-Deficient Mice Develop Enhanced Contact Hypersensitivity. *Immunity* 23, 611–620.
- Kaplan, D.H., Kissenpfennig, A., Clausen, E., 2008. Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. *European journal of immunology* 38, 2369–2376.
- Kapsenberg, M.L., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., Kalinski, P., 1998. The role of antigen-presenting cells in the regulation of allergen-specific T cell responses. *Current Opinion in Immunology* 10, 607–613.



## Literaturverzeichnis

---

- Kearney, E.R., Pape, K.A., Loh, D.Y., Jenkins, M.K., 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1, 327–339.
- Kimber, I., 2003. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food and Chemical Toxicology* 41, 1799–1809.
- Kimber, I., Dearman, R.J., Basketter, D.A., 2013. Dendritic cells and the assessment in vitro of skin sensitizing potential. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 32, 54–59.
- Kimber, I., Weisenberger, C., 1989. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. *Toxicology* 63, 274–282.
- Kolls, J.K., Linde, A., 2004. Interleukin-17 Family Members. *Immunity* 21, 467–476.
- Koulova, L., Clark, E.A., Shu, G., Dupont, B., 1991. The CD28 Ligand B7 / BB1 Provides Costimulatory Signal for Alloactivation of CD4 + T Cells. *J Exp Med* 173, 22–25.
- Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C., 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature reviews. Immunology* 4, 211–22.
- Lafferty, K.J., Cunningham, A.J., 1975. New Analysis of Allogenic Interactions. *J. Immunol.* 53, 27–42.
- Larsen, J.M., Bonfeld, C.M., Poulsen, S.S., Geisler, C., Skov, L., 2009. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123, 486–92.
- Linsley, B.P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., Ledbetter, J.A., 1991. CTLA4 Is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7. *Journal of Experimental Medicine* 174, 561–569.
- Linsley, P., Wallace, P., Johnson, J., Gibson, M., Greene, J., Ledbetter, J., Singh, C., Tepper, M., 1992. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 257, 792–795.
- Linsley, P.S., Clark, E.A., Ledbetter, J.A., 1990. T-Cell Antigen CD28 Mediates Adhesion with B Cells by Interacting with Activation Antigen B7 / BB-1.

## Literaturverzeichnis

---

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 5031–5035.
- Magnusson, B., Kligman, A., 1968. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. The Journal of Investigative Dermatology 52, 268–277.
- Martin, S.F., 2012. Allergic contact dermatitis : xenoinflammation of the skin. Current Opinion in Immunology 24, 720–729.
- Maurer, M., von Stebut, E., 2004. Macrophage inflammatory protein-1 7. Int J Biochem Cell Biol 36, 1882–1886.
- McLellan, A.D., Starling, G.C., Williams, L.A., Hock, B.D., Hart, D.N., 1995. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. European journal of immunology 25, 2064–8.
- Mehling, A., Eriksson, T., Eltze, T., Kolle, S., Ramirez, T., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2012. Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. Archives of toxicology 86, 1273–95.
- Merk, H.F., Baron, J.M., Neis, M.M., Höller, D., Karlberg, A., 2007. Skin : Major target organ of allergic reactions to small molecular weight compounds. Toxicol Appl Pharmacol 224, 313–317.
- Natsch, A., Bauch, C., Foertsch, L., Gerberick, F., Norman, K., Hilberer, A., Inglis, H., Landsiedel, R., Onken, S., Reuter, H., Schepky, A., Emter, R., 2011. Toxicology in Vitro The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro : Results of a ring-study in five laboratories. Toxicology in Vitro 25, 733–744.
- Natsch, A., Emter, R., 2008. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. Toxicological sciences 102, 110–9.
- Nielsen, N.H., Linneberg, A., Menne, T., Madsen, F., Frolund, L., Dirksen, A., Jorgensen, T., 2001. Allergic Contact Sensitization in an Adult Danish Population : Two Cross-sectional Surveys Eight Years Apart ( The Copenhagen Allergy Study ). Acta Derm Venereol 1990, 31–34.

- Nukada, Y., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Mugita, N., Hirota, M., Miyazawa, M., Ito, Y., Sasa, H., Nishiyama, N., 2011. Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT). *Contact dermatitis* 65, 343–53.
- Ouwehand, K., Spiekstra, S.W., Reinders, J., Scheper, R.J., de Gruijl, T.D., Gibbs, S., 2010. 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. *Toxicology in Vitro* 24, 578–85.
- Paradis, T.J., Cole, S.H., Nelson, R.T., Gladue, R.P., 2008. Essential Role of CCR6 in Directing Activated T Cells to the Skin during Contact Hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology* 128, 628–633.
- Parry, R. V, Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V, Linsley, P.S., Thompson, C.B., Riley, J.L., 2005. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms†. *Society* 25, 9543–9553.
- Parry, R. V, Reif, K., Smith, G., Sansom, D.M., Hemmings, B.A., Ward, S.G., 1997. Ligation of the T cell co-stimulatory receptor CD28 activates the serine-threonine protein kinase protein kinase B. *European journal of immunology* 27, 2495–501.
- Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A., Smith Pease, C.K., Wilson, K., Wright, Z.M., Roberts, D.W., Bernard, G., Arnau, E.G., Lepoittevin, J.-P., 2004. Further evaluation of quantitative structure–activity relationship models for the prediction of the skin sensitization potency of selected fragrance allergens. *Contact Dermatitis* 50, 91–97.
- Pena-Cruz, V., Mcdonough, S.M., Diaz-Griffero, F., Crum, C.P., Carrasco, R.D., Freeman, G.J., 2010. PD-1 on Immature and PD-1 Ligands on Migratory Human Langerhans Cells Regulate Antigen-Presenting Cell Activity. *Journal of Investigative Dermatology* 130, 2222–2230.
- Pichler, W.J., Naisbitt, D.J., Park, B.K., 2011. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127, S74–S81.
- Pillai, M.M., Iwata, M., Awaya, N., Graf, L., Torok-Storb, B., 2006. Monocyte-derived CXCL7 peptides in the marrow microenvironment. *Blood* 107, 3520–3526.

- Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2007. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicology and applied pharmacology* 220, 113–24.
- Reich, K., Westphal, G., König, I.R., Mössner, R., Krüger, U., Ziegler, A., Neumann, C., Schnuch, A., 2003. Association of allergic contact dermatitis with a promoter polymorphism in the IL16 gene. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112, 1191–4.
- Ring, J., Bachert, C., Carl-Peter, B., Wolf, C. (Eds.), 2010. *Weißbuch Allergie in Deutschland*, 3rd ed. Springer Medizin.
- Roberts, D., Patlewicz, G., 2007. TIMES-SS—A mechanistic evaluation of an external validation study using reaction chemistry principles. *Chemical research in Toxicology* 20, 1321–1330.
- Rustemeyer, T., Ligter, S.D.E., Blomberg von, B.M.E., Frosch, P.J., Scheper, R.J., 1999. Human T lymphocyte priming in vitro by haptened autologous dendritic cells, in: *Clinical and Experimental Immunology*. pp. 209–216.
- Rustemeyer, T., van Hoogstraten, I.M.W., Blomberg von, B.M.E., Gibbs, S., Scheper, R.J., 2011. Contact dermatitis, in: Johanson, J.D., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P. (Eds.), *Contact Dermatitis*. pp. 43–90.
- Sakthivel, P., Gereke, M., Bruder, D., 2012. Therapeutic intervention in cancer and chronic viral infections: antibody mediated manipulation of PD-1/PD-L1 interaction. *Reviews on recent clinical trials* 7, 10–23.
- Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P.S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R.J., Steinman, R.M., 1994. No Title 180.
- Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P.J., Galanos, C., Roth, J., Skerra, A., Martin, S.F., Freudenberg, M.A., Goebeler, M., 2010. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature immunology*.
- Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., Freeman, G.J., 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature immunology* 8, 239–45.

- Silberberg, I., Baer, R.L., Rosenthal, S.A., 1976. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *The Journal of investigative dermatology* 66, 210–7.
- Topalian, S., Drake, C., Pardoll, D., 2012. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology* 24, 207–212.
- Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., 2008. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457, 585–588.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*. 26, 171–6.
- Tsushima, F., Iwai, H., Otsuki, N., Abe, M., Hirose, S., Yamazaki, T., Akiba, H., Yagita, H., Takahashi, Y., Omura, K., Okumura, K., Azuma, M., 2003. Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses. *European journal of immunology* 33, 2773–2782.
- Uchi, H., Terao, H., Koga, T., Furue, M., 2000. Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of dermatological science* 24 Suppl 1, S29–38.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B., Hill, M., 2006. TGF $\beta$  in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* 24, 179–189.
- Vocanson, M., Hennino, A., Rozières, A., Poyet, G., Nicolas, J.-F., 2009. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64, 1699–714.
- Williams, E.H., Williams, C.A., McLeod, J.D., 2010. Identification of PDL-1 as a novel biomarker of sensitizer exposure in dendritic-like cells. *Toxicology in vitro* 24, 1727–35.
- Yoshida, Y., 2003. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicology in Vitro* 17, 221–228.

## 10 Publikationsliste

### 10.1 Publikationen entstanden im Rahmen der Promotion

**Hitzler, M.**, Bergert, A., Luch, A., Peiser, M.

Comparative analyses of new biomarkers to detect sensitization in THP-1, MUTZ-3 and in primary human dendritic cells. **Toxicology in Vitro, 2013**

**Hitzler M.**, Majdic O., Heine G., Worm M., Ebert G., Luch A., Peiser M.

Human Langerhans cells control Th cells via programmed death-ligand 1 in response to bacterial stimuli and nickel-induced contact allergy. **PLoS One, 2012.**

Aliahmadi, E., Gramlich, R., Grützkau, A., **Hitzler, M.**, Krüger, M., Baumgrass R., Schreiner M., Wittig B., Wanner R., Peiser M.

TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. **European journal of immunology, 2009**

Peiser M., **Hitzler M.**, Luch A.

On the role of co-inhibitory molecules in dendritic cell – T helper cell co-culture assays aimed to detect chemical induced contact allergy.

(Submitted to Springer Books, "T Lymphocytes as Tools in Chemical and Drug Allergy")

## 10.2 Weitere Publikationen

Raftery, M. J., **Hitzler, M.**, Winau, F., Giese, T., Kaufmann, S. H. E., Schönrich, G.

Inhibition of CD1 antigen presentation by human cytomegalovirus. **Journal of virology, 2008**