

OPTIMIERTE *IN-VITRO*-TESTUNG VON FREMDSTOFFEN AUF
HAUTSENSIBILISIERENDES POTENZIAL DURCH CRISPR/CAS9-
VERMITTELTEN KNOCKOUT DES ARYLHYDROCARBON-REZEPTORS
UND ANTIKÖRPERBLOCKADE DES INHIBITORISCHEN MOLEKÜLS
PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND1

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

ANNA SONNENBURG

Berlin, 2021

Angefertigt am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité-
Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhold Kreutz,
betreut von PD Dr. Matthias Peiser, Bundesinstitut für Risikobewertung und Institut
für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin

1. Gutachter*in: _____ PD Dr. Matthias Peiser _____

2. Gutachter*in: _____ Prof. Dr. Sigmar Stricker _____

Disputation am: _____ 29.06.2021 _____

Selbständigkeitserklärung:

Hierdurch versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und
ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank richtet sich an die Personen, die diese Arbeit ermöglicht und mich bei der Umsetzung unterstützt haben.

Privatdozent Dr. Matthias Peiser danke ich für das herausfordernde Thema und die kompetente und fürsorgliche Betreuung.

Professor Dr. Reinhold Kreutz danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin anzufertigen, und den unkomplizierten Umgang mit allerlei administrativen Hürden.

Professor Dr. Sigmar Stricker danke ich für die kurzfristige Übernahme der Zweitgutachtertätigkeit.

Professor Dr. Ralf Stahlmann danke ich für das Angebot, die Arbeit zur Korrektur zu lesen, und für das Interesse an den Ergebnissen der experimentellen Phase.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Klinische Pharmakologie danke ich für das angenehme und produktive Arbeitsumfeld und die wertschätzende Atmosphäre.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	5
INHALTSVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	13
SUMMARY	19
I EINLEITUNG	23
I.1 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	23
I.2 DER ENDPUNKT SENSIBILISIERUNG DURCH HAUTKONTAKT	24
<i>I.2.1 Der Adverse Outcome Pathway (AOP)</i>	24
I.2.1.1 Was ist ein AOP?.....	24
I.2.1.2 Molekulares initiiierendes Ereignis: Haptenisierung	25
I.2.1.3 Key Event 1: Aktivierung von Keratinozyten	27
I.2.1.4 Key Event 2: Aktivierung dendritischer Zellen.....	28
I.2.1.5 Key Event 3: Aktivierung von T-Zellen.....	31
<i>I.2.2 Die allergische Kontaktdermatitis als klinisches Bild einer vorangegangenen Sensibilisierung</i>	35
I.3 <i>IN-VITRO</i> -TESTUNG AUF SENSIBILISIERUNG – STAND DER WISSENSCHAFT	36
I.3.1 <i>OECD-validierte Methoden</i>	36
I.3.2 <i>T-Zell-Assays</i>	40
I.3.3 <i>Methoden im Validierungsprozess der Europäischen Referenzlabore für Alternativmethoden (EURL ECVAM)</i>	42
I.3.4 <i>Der Loose-fit Coculture-based Sensitization Assay (LCSA)</i>	43
I.3.4.1 Kokultur aus primären humanen Zellen.....	43
I.3.4.2 Ersatz primärer Keratinozyten durch HaCaT	44
I.3.4.3 Neuer Endpunkt: T-Zell-Antwort	45
I.4 DIE IN DIESER ARBEIT EINGESETZTEN ZELLINIEN	45
I.4.1 <i>HaCaT – eine Keratinozyten-Zelllinie</i>	45
I.4.2 <i>MUTZ-3 – differenzierbare dendritische Zellen</i>	46
I.4.3 <i>THP-1 – der monozytäre Standard</i>	47

1.4.4	<i>Jurkat – eine T-Zelllinie</i>	48
I.5	<i>PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND1 – EIN IMMUNMODULIERENDER REZEPTOR</i>	49
1.5.1	<i>Entdeckung und Nomenklatur von PD-L1</i>	49
1.5.2	<i>Proteinstruktur und Expression von PD-L1</i>	49
1.5.3	<i>Die PD-1/PD-L1-Interaktion bei der Kontaktsensibilisierung</i>	50
I.6	<i>DER ARYLHYDROCARBON-REZEPTOR (AhR) – EIN IMMUNOLOGISCHES MULTITALENT</i>	51
1.6.1	<i>Proteinstruktur und Expression des AhR</i>	51
1.6.2	<i>Funktionen des AhR</i>	53
1.6.3	<i>Der AhR bei der Kontaktsensibilisierung</i>	53
I.7	<i>CRISPR/CAS9 – DIE GENSCHERE</i>	55
1.7.1	<i>Nobelpreis für Chemie 2020</i>	55
1.7.2	<i>Das CRISPR/Cas-System in Prokaryoten</i>	56
1.7.3	<i>Genomeditierung mit CRISPR/Cas9</i>	57
II	MATERIAL UND METHODEN	59
II.1	<i>VERWENDETE ZELLEN, MEDIEN, CHEMIKALIEN UND SOFTWARE</i>	59
II.2	<i>ZELLKULTUR: ALLGEMEINE METHODEN</i>	62
II.2.1	<i>Auftauen und Aussäen von Zellen</i>	62
II.2.2	<i>Passage von in Suspension wachsenden Zellen</i>	62
II.2.3	<i>Passage von adhären wachsenden Zellen</i>	63
II.2.4	<i>Kryokonservieren von Zellen</i>	63
II.3	<i>ZELLKULTUR: VERMEHRUNG DER EINGESETZTEN ZELLTYPEN</i>	64
II.3.1	<i>5637 und MUTZ-3</i>	64
II.3.2	<i>THP-1, Jurkat und HaCaT</i>	64
II.4	<i>ZELLKULTUR: DIFFERENZIERUNG VON MUTZ-3 ZU MUTZ-LC</i>	65
II.5	<i>ZELLKULTUR: BLOCKADE VON PROGRAMMED CELL DEATH-LIGAND1 (PD-L1) MITTELS ANTIKÖRPER</i> ...	66
II.6	<i>DURCHFLUSSZYTOMETRIE</i>	67
II.6.1	<i>Für durchflusszytometrische Messungen verwendete Puffer und Chemikalien</i>	67
II.6.2	<i>Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen</i> ...	68
II.6.3	<i>Durchflusszytometrische Bestimmung intrazellulär exprimierter Proteine</i>	71
II.6.4	<i>Einstellung des Durchflusszytometers</i>	72
II.6.5	<i>Auswertung der durchflusszytometrischen Daten inklusive Gating-Strategie</i>	73

II.7	AHR-KNOCKOUT IN MUTZ-3 UND THP-1 MITTELS CRISPR/CAS9-TECHNOLOGIE.....	78
II.7.1	<i>Etablierung des Knockout-Protokolls</i>	78
II.7.2	<i>Genomic Cleavage Detection Kit – Überprüfung der Editierungseffizienz</i>	80
II.7.3	<i>Überprüfung des Editierungserfolgs bei HPRT-Kontrollen mittels 6-Thioguanin-Behandlung</i>	83
II.7.4	<i>Selektionsprotokoll für AhR-defiziente Zellen</i>	83
II.8	IMMUNCHEMISCHE BESTIMMUNG VON ZYTOKINEN IN ZELLKULTURMEDIEN: ELISA UND MULTIPLEX-ASSAY	84
II.8.1	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	84
II.8.2	<i>Multiplex-Analyse von T-Zell-Zytokinen</i>	86
II.9	KOKULTUREN.....	88
II.9.1	<i>MUTZ-LC und HaCaT (Kokultur A)</i>	88
II.9.2	<i>Vorversuche zur Kokultur von CCT und HaCaT</i>	90
II.9.3	<i>THP-1/CCT und HaCaT (Kokultur B)</i>	91
II.9.4	<i>THP-1/CCT und Jurkat (Kokultur C)</i>	92
II.9.5	<i>Auswertung der Ergebnisse aus Kokultur B und C mittels Heatmap</i>	93
II.10	STATISTISCHE METHODEN	93
II.11	VERÖFFENTLICHUNG VON DATEN ALS SCHLUSSBERICHT ZUM BMBF-GEFÖRDERTEN PROJEKT	94
III	ERGEBNISSE	97
III.1	CHARAKTERISIERUNG VON MUTZ-3 UND MUTZ-LC.....	97
III.2	BLOCKADE-EXPERIMENTE MIT UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN VERSCHIEDENER ANTI-PD-L1-ANTIKÖRPER.....	102
III.3	KOKULTUR A: MUTZ-LC UND HACAT	103
III.3.1	<i>Regulation von CD86 und CD54 auf Testsubstanz-behandelten MUTZ-LC in Kokultur mit HaCaT</i>	103
III.3.2	<i>Regulation der PD-L1-Expression auf MUTZ-LC mit und ohne PD-L1-Blockade nach Behandlung mit starken Allergenen</i>	110
III.4	AHR-KNOCKOUT IN MUTZ-3 UND THP-1 MITTELS CRISPR/CAS9	114
III.4.1	<i>AhR-Knockout in MUTZ-3</i>	114
III.4.2	<i>AhR-Knockout in THP-1</i>	117
III.4.3	<i>Nachweis des HPRT-Knockouts in mitgeführten Kontrollen mittels Inkubation mit 6-Thioguanin (6-TG)</i>	119
III.4.4	<i>Überprüfung der Editierungseffizienz mittels Genomic Cleavage Detection Kit</i>	120

III.4.5	<i>Selektionsprotokoll für AhR-defiziente Zellen</i>	124
III.4.5.1	<i>Selektionsprotokoll 1: Behandlung mit Dibutylphthalat</i>	124
III.4.5.2	<i>Selektionsprotokoll 2: Behandlung mit Dibutylphthalat und anschließende magnetische Depletion apoptotischer Zellen</i>	127
III.5	BLOCKADE VON PD-L1 AUF THP-1 UND CCT	131
III.6	KOKULTUR B: AHR-KNOCKOUT-ZELLEN (CCT) MIT UND OHNE PD-L1-BLOCKADE UND HACAT	132
III.6.1	<i>Vorversuche</i>	132
III.6.2	<i>Regulation von Reifungsmarkern auf THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade</i>	135
III.6.3	<i>AhR-Expression in THP-1 und CCT vor und nach Kokultur mit HaCaT</i>	138
III.6.4	<i>ELISA: IL-8 in Überständen der Kokultur von THP-1/CCT mit HaCaT</i>	139
III.7	KOKULTUR C: THP-1/CCT UND JURKAT	141
III.7.1	<i>Proliferation von Jurkat nach Kokultur mit THP-1 und CCT</i>	141
III.7.2	<i>CD3-Expression auf Jurkat nach Kokultur mit THP-1 und CCT</i>	144
III.7.3	<i>ELISA: Zytokine, die nicht im Medium von Kokultur C nachgewiesen werden konnten</i>	146
III.7.4	<i>Multiplex-Assay: Zytokinsekretion ins Medium von Kokultur C</i>	147
III.7.5	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Jurkat-Kokultur</i>	155
III.8	GESAMTERGEBNIS DER ARBEIT: CELL LINE CO-CULTURE BASED SENSITISATION ASSAY (CLCSA)	156
IV	DISKUSSION	165
IV.1	MUTZ-3 UND MUTZ-LC ALS MODELL FÜR DENDRITISCHE ZELLEN	165
IV.1.1	<i>Differenzierung von MUTZ-3 führt zur Expression DC-typischer Oberflächenmarker</i>	165
IV.1.2	<i>Allergene induzieren Expressionserhöhung von CD86 auf MUTZ-LC in Kokultur mit HaCaT-Keratinocyten</i>	166
IV.1.3	<i>Die Blockade des inhibitorischen Liganden PD-L1 auf MUTZ-LC erhöht die Expression von CD86 und CD54 – Ist PD-L1 zur Signaltransduktion befähigt?</i>	168
IV.1.4	<i>MUTZ-LC regulieren nach Behandlung mit starken Allergenen die Expression von PD-L1</i>	169
IV.1.5	<i>MUTZ-LC eignen sich als Alternative für primäre moDC in der Grundlagenforschung</i>	170
IV.2	DER AHR-KNOCKOUT MITTELS CRISPR/CAS9 UND DIE ENTWICKLUNG EINES SELEKTIONSPROTOKOLLS FÜR AHR-DEFIZIENTE ZELLEN	171
IV.3	AHR-KNOCKOUT UND BLOCKADE DES PD-L1 REGULIEREN IMMUNOREZEPTOREN VON THP-1 IN KOKULTUR MIT HACAT	174

IV.4	DAS WEITERENTWICKELTE TESTSYSTEM: <i>CELL LINE CO-CULTURE BASED SENSITISATION ASSAY (CLCSA)</i>	176
	176
IV.4.1	<i>Stufe 1: HaCaT-Kokultur</i>	176
IV.4.2	<i>Stufe 2: Jurkat-Kokultur</i>	179
	IV.4.2.1 Proliferation von Jurkat.....	179
	IV.4.2.2 CD3-Expression.....	180
	IV.4.2.3 Zytokinsekretion ins Medium der Kokultur.....	183
	<i>IV.4.3 Auswertung der Ergebnisse aus dem CLCSA: PD-L1-Blockade und AhR-Knockout führen zu einer verbesserten Auslesbarkeit der T-Zell-Antwort auf Allergen-Stimulus</i>	186
IV.5	FAZIT UND AUSBLICKE.....	187
V	VERZEICHNISSE	189
V.1	ABKÜRZUNGS- UND EINHEITENVERZEICHNIS.....	189
V.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	194
V.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	195
	LITERATURVERZEICHNIS	205
VI	ANHANG	I
VI.1	VORARBEITEN.....	I
VI.2	ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	II
	<i>VI.2.1 Genomic Cleavage Detection Kit, molekularbiologische Messung gespaltener DNA in AhR-Knockout-Zellen</i>	ii
	<i>VI.2.2 Selektionsprotokoll für AhR-defiziente Zellen mit Dibutylphthalat</i>	iv
	<i>VI.2.3 ELISA, IL-8 in Überständen der HaCaT/THP-1 bzw. THP-1/Jurkat-Kokulturen</i>	iv
VI.3	VERWENDETE LABORVERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE.....	V
VI.4	KOMMENTIERTES ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII

ZUSAMMENFASSUNG

Aus tierschutzrechtlichen und ethischen Gründen werden seit einigen Jahren vermehrt Alternativen zu den regulatorisch verbindlichen Tierversuchen entwickelt. Einer der standardmäßig zu testenden Endpunkte in der Chemikalienzulassung ist die Sensibilisierung durch Hautkontakt. Für diesen Endpunkt existieren bereits mehrere Alternativmethoden, doch bisher deckt keine das *in vivo* entscheidende Schlüsselereignis der Sensibilisierungsphase – die Aktivierung von T-Zellen – ab. Das hängt mit der im Experiment limitierten Stimulierbarkeit von T-Zellen durch aktivierte dendritische Zellen zusammen; bei der Verwendung von primären T-Zellen kommt eine hohe Spendervariabilität hinzu. Beide Faktoren beeinflussen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stark und insbesondere schwache Hautsensibilisierer werden von den Systemen nicht zuverlässig erkannt. Eine mögliche Ursache für die eingeschränkte Stimulierbarkeit könnte die immunologische Gegenregulation der Aktivierung über immunsupprimierende Rezeptoren sein. Zielstellung der Arbeit war es daher, ein *In-vitro*-Testsystem zu entwickeln, das auf Grundlage von Zelllinien auch den letzten, T-Zell-vermittelten, Schritt der Sensibilisierungsphase abdeckt. Dazu sollten die immunsuppressiven Rezeptoren Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) und *Programmed Cell Death-Ligand 1* (PD-L1) in dendritischen/monozytären Zellen gentechnisch oder mittels Antikörper ausgeschaltet bzw. blockiert werden, um die nachfolgende Aktivierung von T-Zellen im System zu verstärken.

Das entwickelte Testsystem basierte auf dem in der Arbeitsgruppe etablierten *loose-fit coculture-based sensitization assay with lymphocyte endpoint* (LCSA-ly), in dem jedoch mit primären Zellen gearbeitet worden war. Die Experimente wurden zunächst parallel mit zwei monozytären Zelllinien (MUTZ-3 und THP-1) durchgeführt, wobei MUTZ-3 zu Langerhans-Zellen (MUTZ-LC) differenziert wurden. In beiden Zelltypen wurde der PD-L1 mit einem monoklonalen Antikörper blockiert und der AhR mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt. Zur Reduktion des Prozentsatzes AhR-positiver Zellen in den Knockout-Populationen wurde ein Selektionsprotokoll für AhR-negative Zellen entwickelt. Dazu wurden die Populationen zunächst mit Dibutylphthalat behandelt, welches AhR-vermittelt Apoptose auslöst. Danach wurden die apoptotischen Zellen mit Hilfe magnetischer Annexin V-Beads aus der Kultur

entfernt. Da sich die monozytäre Zelllinie THP-1 als susceptibler für die vorgenommenen Modifikationen erwies, wurden Zellen dieser Linie im Testsystem eingesetzt. Das Testsystem wurde als Stufensystem entwickelt, bei dem in Stufe 1 unterschiedlich modifizierte THP-1 mit HaCaT-Keratinocyten kokultiviert und mit Testsubstanzen (Dinitrochlorbenzol [DNCB] als extremes Allergen, Mercaptobenzothiazol [MBT] als moderates Allergen und Natriumlaurylsulfat [SLS] als nicht allergene Substanz) behandelt wurden. Daran angeschlossen erfolgte in Stufe 2 eine Kokultur der Testsubstanz-stimulierten THP-1 mit Zellen der T-Zelllinie Jurkat. Die Aktivierung der beteiligten Zelltypen wurde durchflusszytometrisch über die Messung der Expression des Reifungsmarkers CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 auf THP-1 sowie der Proliferationsaktivität (über den Mitosemarker Ki-67) und der Expression des T-Zell-Rezeptor-Korezeptors CD3 auf Jurkat ermittelt. Außerdem wurde die Sekretion von Zytokinen in das Medium der Kokulturen mit Sandwich-ELISA und Multiplex-Assay untersucht. Zur Verdeutlichung des Gesamtergebnisses aus dem neuen Testsystem wurde eine *Heatmap* angelegt, in die die Veränderungen der gemessenen Parameter bezogen auf unbehandelte Kontrollen anhand eines Farbcodes eingetragen wurden (rot: Reduktion eines Parameters im Vergleich zur Kontrolle, grün: Erhöhung eines Parameters im Vergleich zur Kontrolle).

Aus der Differenzierungskultur von MUTZ-3 gingen Zellen eines Phänotyps mit Charakteristika von Langerhans-Zellen und dermalen dendritischen Zellen des Typs 2 hervor. Diese regulierten nach Stimulation mit DNCB und MBT in Kokultur mit HaCaT CD86 konzentrationsabhängig hoch. Die Blockade von PD-L1 mit einem spezifischen Antikörper war erfolgreich und reduzierte den Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen statistisch signifikant. Die Blockade führte auch ohne Testsubstanz-Behandlung zu einer Hochregulation von CD86 und CD54. Der CRISPR/Cas9-vermittelte AhR-Knockout reduzierte den Prozentsatz AhR-positiver Zellen in der MUTZ-3-Population um rund 10 %. In THP-1 wurde mit dem Knockout-Protokoll eine Reduktion der AhR-positiven Zellen um 15 % erreicht. Das Selektionsprotokoll reduzierte den Anteil auf im Median 33 %, lieferte also eine ganz überwiegend AhR-negative Population. Auch der Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen konnte in Populationen von THP-1 und geneditierten THP-1 mittels Antikörperblockade statistisch signifikant gesenkt werden. Die Behandlung der unterschiedlich modifizierten THP-1 (mit und ohne PD-L1-Blockade, mit und ohne AhR-Knockout) mit den Allergenen DNCB und MBT

induzierte konsistent eine Erhöhung der Expression gemessener Marker bezogen auf die Expressionen auf unbehandelten, nicht modifizierten THP-1. Dabei wurde die CD54-Expression nach DNCB-Behandlung auf AhR-Knockout-Zellen im Vergleich zu nicht geneditierten Zellen stärker erhöht. Die Behandlung mit dem Irritant SLS führte in nicht geneditierten Zellen zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung der CD86-Expression und zu keiner Veränderung der Expression von CD54. Auf geneditierten Zellen wurden die Expressionen beider Marker nach Behandlung mit SLS reduziert, für CD54 war dies statistisch signifikant. Damit ergab sich mit dem Einsatz geneditierter Zellen eine Möglichkeit, das Irritant deutlicher von den Allergenen zu unterscheiden als mit nicht geneditierten Zellen. In der nachgeschalteten Kokultur Testsubstanz-aktivierter THP-1 verschiedener Modifikationen mit Jurkat-T-Zellen zeigten sich ebenfalls ausgeprägte Effekte der PD-L1-Blockade und/oder des AhR-Knockouts. Insbesondere in den Kokulturen mit AhR-defizienten und/oder PD-L1-blockierten THP-1 konnten nach vorangegangener Behandlung mit Allergenen signifikante Expressionsveränderungen von CD3 auf Jurkat sowie eine Regulation der Proliferation der T-Zellen gemessen werden, nach Behandlung mit dem Irritant jedoch nicht. Auch für die Konzentrationen der vier in den Überständen der Jurkat-Kokultur nachgewiesenen Zytokine MIP-1 β , MIP-3 α , TNF- α und IL-8 wurden in Kokulturen mit Allergen-behandelten, modifizierten THP-1 verglichen mit Kokulturen unbehandelter THP-1 markantere Unterschiede gemessen als in Kokulturen mit unmodifizierten THP-1. So führte die PD-L1-Blockade konsistent zu einer Hemmung der Zytokin-Produktion bezogen auf Kokulturen mit unbehandelten Kontrollen, wenn die monozytären Zellen mit Allergenen behandelt worden waren. In Kokulturen mit AhR-defizienten THP-1 wurden die Zytokinkonzentrationen hingegen nach Allergen-Behandlung der monozytären Zellen meistens gegenüber Kokulturen mit unbehandelten Kontrollen erhöht. In der Gesamtauswertung mit Hilfe der *Heatmap* zeigte sich, dass der Einsatz AhR-defizienter und/oder PD-L1-blockierter THP-1 im Testsystem zu einer Verschiebung des Farbschemas abhängig von der allergenen Potenz der eingesetzten Testsubstanz führte. Dabei induzierte die alleinige PD-L1-Blockade eine Verschiebung in Richtung Rot (Hemmung der gemessenen Parameter) und die gleichzeitige Blockade mit AhR-Knockout eine Verschiebung in Richtung Grün (Induktion der gemessenen Parameter). Dies war vor dem Einsatz modifizierter THP-1 nicht der Fall.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die myelomonozytäre Zelllinie MUTZ-3 im optimierten Differenzierungsprotokoll zu Langerhans-ähnlichen Zellen differenzieren ließ, die auf den Stimulus mit Allergenen mit der Regulation von CD86 reagierten. Der entstehende Phänotyp ließ sich über die Differenzierungsdauer modulieren, so dass sich differenzierte MUTZ-3 als Alternative für primäre Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen in der Grundlagenforschung eignen. Die Blockade des PD-L1 erbrachte zudem Anzeichen für ein sog. *reverse signalling* über diesen Rezeptor. Zusammen mit der gezeigten Regulation von PD-L1 durch Behandlung von MUTZ-LC mit starken Allergenen kann das für die Untersuchung der Funktionen dieses Rezeptors von Interesse sein. Vermutlich aufgrund ihres hohen Anspruchs an die Kulturbedingungen waren MUTZ-3 jedoch weniger suszeptibel für den AhR-Knockout mittels CRISPR/Cas9 als THP-1.

Die monozytäre Zelllinie THP-1 erwies sich als sinnvolle Alternative zu differenzierten MUTZ-3. Zum einen war der AhR-Knockout in diesen Zellen erfolgreicher und zum anderen wird PD-L1 auf THP-1 zu einem geringeren Anteil exprimiert, so dass die Blockade des Rezeptors unter Verwendung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers eine zu 95 % PD-L1-negative Population hervorbrachte. Beim Einsatz der AhR-Knockout-Zellen im entwickelten Testsystem wurde deutlich, dass der AhR an der Regulation der Expression von CD86, CD54 und PD-L1 beteiligt ist. Gleichzeitig konnte auch ein Einfluss der PD-L1-Blockade auf die AhR-Expression gezeigt werden, was interessante Perspektiven auf eine mögliche Koregulation der beiden Rezeptoren in THP-1 eröffnet. In der Kokultur mit HaCaT wurde die Aktivierung von AhR-Knockout-Populationen durch die Behandlung mit Testsubstanzen stärker moduliert als die nicht geneditierter Zellen. In den Jurkat-Kokulturen zeigte sich, dass die PD-L1-Blockade allein und in Kombination mit dem AhR-Knockout die Stimulierbarkeit von Jurkat durch Allergen-aktivierte THP-1 erhöht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der AhR-Knockout und die PD-L1 Blockade in THP-1 die nachfolgende Stimulation von T-Zellen *in vitro* verstärkten und zu einer erhöhten Sensitivität des entwickelten Testsystems in Bezug auf die Schlüsselereignisse „Aktivierung von dendritischen Zellen“ und „Aktivierung von T-Zellen“ führten. Auf diese Weise wurde ein praktikables *In-vitro*-System molekularbiologisch weiterentwickelt, was eine Verfeinerung gegenüber den etablierten Testmethoden darstellt. Das System ist nach Validierung für den regulatorischen Einsatz in EU-Zulassungsverfahren von Chemikalien und

Arzneimitteln qualifiziert. Somit konnten alle Ziele der Dissertation experimentell adressiert und erfüllt werden.

SUMMARY

Due to ethical and animal welfare considerations, more and more alternative methods are recently being developed to replace mandatory animal testing in regulatory context. One of the standard endpoints to be tested in chemical registration is skin sensitisation. There are several OECD-validated alternative methods for this endpoint. However, none of these covers the last crucial key event of the sensitisation phase *in vivo* – the activation of T cells. This is due to the poor stimulation of T cells by activated dendritic cells *in vitro*. A high donor variability when using primary human cells adds to the problem, leading to major reproducibility issues. Thus, weak sensitisers in particular are seldomly recognized by the respective test systems. One possible cause for the limited stimulation of T cells is the counter regulation by immunosuppressive receptors. Therefore, the aim of this thesis was to develop an *in vitro* assay based on cell lines that also covers the last, T cell-mediated, key event of the sensitisation phase. To achieve this aim, the immunosuppressive receptors aryl hydrocarbon receptor (AhR) and programmed cell death ligand1 (PD-L1) in dendritic or monocytic cells were to be knocked out genetically or blocked using antibodies to facilitate the following activation of T cells in the test system.

The developed test system was based on the coculture-based sensitization assay with lymphocyte endpoint (LCSA-ly) established in the working group. However, the LCSA-ly used primary human cells. Experiments were conducted with two the monocytic cell lines MUTZ-3 and THP-1, and MUTZ-3 were differentiated to Langerhans cell resembling cells. In both cell types, PD-L1 was blocked using a monoclonal antibody, and AhR was knocked out by CRISPR/Cas9. To further reduce the percentage of AhR-positive cells in knockout populations a selection protocol was developed. It made use of dibutyl phthalate which causes apoptosis in AhR-positive cells. Apoptotic cells were removed from the culture with Annexin V magnetic microbeads. Cells of the monocytic cell line THP-1 were more susceptible to these modifications than MUTZ-3. Therefore, THP-1 were used in the newly developed assay system. A two tiers system was established. In the first tier, differently modified THP-1 were cocultured with HaCaT keratinocytes and treated with test substances (dinitrochlorobenzene [DNCB] as an extreme sensitiser, mercaptobenzothiazole [MBT] as a

Summary

moderate sensitiser, and sodium lauryl sulfate [SLS] as a non-sensitiser). In tier 2, test substance stimulated THP-1 were cocultured with Jurkat T cells. Activation of the involved cell types was determined by flow cytometric measurement of surface antigen expression. The expression of CD86 as maturation marker, and CD54 as adhesion molecule was assessed on THP-1. For Jurkat cells, T cell receptor coreceptor CD3 expression and proliferation (*via* mitosis maker Ki-67) were measured. Moreover, cytokine secretion into the culture media was determined by sandwich ELISA and multiplex assay. The overall result of these measurements was aggregated in a heatmap showing the alteration of all parameters relative to controls in a colour code (red: reduction of a particular parameter, green: increase of a particular parameter).

Differentiation culture of MUTZ-3 produced cells of a mixed phenotype with characteristics of Langerhans cells and type 2 dermal dendritic cells. These upregulated CD86 in coculture with HaCaT upon treatment with DNCB and MBT. Blockade of PD-L1 with a specific antibody was successful and significantly reduced the percentage of PD-L1-positive cells. Even without test substance treatment, blockade of PD-L1 led to an upregulation of CD86 and CD54. Knockout of AhR using CRISPR/Cas9 technique decreased the number of AhR-positive MUTZ-3 by approximately 10 %. In THP-1, knockout decreased the percentage of AhR-positive cells in the population by 15 %. The selection protocol further reduced the proportion of AhR-positive THP-1 to a median of 33 %, yielding a predominantly AhR-negative population. After incubation with the monoclonal blocking antibody, the percentage of PD-L1-positive cells was also statistically significantly reduced in THP-1 and genetically edited THP-1 populations. Treatment of the various THP-1 modifications (with and without AhR-knockout, with and without PD-L1 blockade) with DNCB and MBT led to consistent upregulation of both examined markers (CD86, CD54). On genetically edited cells, upregulation of CD54 expression after DNCB treatment was more pronounced than on wildtype cells. Treatment with the irritative substance SLS led to a slight, statistically not significant upregulation of CD86 on wildtype cells. Expression of CD54 was not altered by SLS treatment on these cells. On genetically edited cells, expression of both markers was reduced after SLS treatment, this was statistically significant for CD54. Thus, the use of modified THP-1 helped to discriminate more clearly between sensitisers and non-sensitisers. In the subsequent coculture of test substance-activated THP-1 modifications with Jurkat T cells marked effects of AhR knockout and PD-L1 blockade were

observed. In cocultures with AhR knockout cells or cells with blocked PD-L1 treated with allergens, there were significant changes in the CD3 expression and the proliferation of Jurkat compared to untreated or SLS treated controls. Allergen treatment also induced changes in cytokine concentrations (MIP-1 β , MIP-3 α , TNF- α , and IL-8) in Jurkat culture supernatants as compared to untreated control cocultures when THP-1 were modified by AhR knockout or PD-L1 blockade. Thus, in cocultures with PD-L1 blocked THP-1, cytokine production was consistently inhibited after allergen treatment as compared to untreated controls. Allergen treatment of AhR knockout cells mostly induced cytokine production in Jurkat cocultures compared to untreated controls. The overall assessment of results using a heatmap showed a colour shift depending on sensitisation potency of the test substance. With PD-L1 blocked THP-1, the colours shifted to red, revealing an inhibition of measured parameters. Whereas additional AhR knockout led to a colour shift to green, signalling an induction of the measured parameters. This colour shift was not observed using unmodified THP-1 in the test system.

Results show that in an optimised protocol myelomonocytic MUTZ-3 cells were differentiated to a Langerhans cell-related cell type (MUTZ-LC) that upregulated CD86 upon stimulation with allergens. The emerging phenotype could be modulated by differentiation culture duration. This makes differentiated MUTZ-3 a viable alternative to primary monocyte-derived dendritic cells in basic research. Upregulation of CD86 und CD54 on these cells after blockade of PD-L1 suggested reverse signalling *via* this receptor. Together with the demonstrated regulation of PD-L1 upon allergen treatment, this offers a means to study biological functions of this receptor. However, possibly due to their need for special culture conditions MUTZ-3 were less susceptible to AhR knockout by CRISPR/Cas9 than THP-1.

The monocytic cell line THP-1 proved to be a useful alternative to MUTZ-LC. Knockout of AhR was more successful in these cells, and PD-L1 was expressed to a lesser extent facilitating blocking by a specific monoclonal antibody which led to a 95 % PD-L1-negative population. When using AhR knockout cells in the newly established test system, it became clear that AhR is involved in the regulation of CD86, CD54, and PD-L1 expression. At the same time, PD-L1 blockade had an influence on the AhR expression, which opens interesting perspectives to a possible co-regulation of both receptors in THP-1. In the coculture with

Summary

HaCaT AhR-knockout THP-1 showed increased activation by sensitisers as against wildtype cells. In coculture with Jurkat, PD-L1 blockade alone and in combination with AhR knockout led to an enhanced stimulability of the T cells.

In summary, PD-L1 blockade and AhR knockout in THP-1 boosted stimulation of T cells *in vitro* and enhanced sensitivity regarding key events “activation of dendritic cells” and “activation of T cells”. In this manner, a feasible *in vitro* test system was refined as compared to well-established methods using molecular biological techniques. After validation, the newly developed test system will be qualified for regulatory use in the scope of EU registration processes for chemicals and drugs. Thus, all defined aims of this thesis were addressed experimentally, and all objectives were attained.

I EINLEITUNG

I.1 Zielstellung der Arbeit

Für die Chemikaliientestung im Zuge der regulatorischen Bewertung und Marktzulassung im Rahmen der REACH- (*Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals*) Verordnung wird seit einigen Jahren aufgrund ethischer und tierschutzrechtlicher Überlegungen die Entwicklung von Alternativmethoden zu den gängigen Tierversuchsverfahren gefordert. Es gilt das Russell-Burch-Prinzip der „3R“: *Refine, Reduce, Replace*, also der methodischen Verbesserung, der Reduktion und des Ersatzes von Tierversuchen als Beitrag zum Tierwohl [1].

Einer der Endpunkte, die für die Zulassung von Chemikalien für den europäischen Markt zwingend getestet werden müssen, ist die Sensibilisierung durch Hautkontakt (I.2). Für diesen stehen bereits mehrere OECD-validierte Alternativmethoden zur Verfügung (I.3.1). Ein bisher ungelöstes Problem dieser Methoden besteht darin, dass sie nur die ersten Schritte der *in vivo* zur Ausbildung einer Sensibilisierung ablaufenden zellulären Kaskade abbilden und keins der validierten Systeme den letzten, aber entscheidenden, Schritt – die Aktivierung von T-Zellen – beinhaltet. Es wurden bereits mehrere Testsysteme entwickelt, die die Aktivierung von T-Zellen nach Kokultur mit monozytären oder dendritischen Zellen, die mit Allergenen oder anderweitig immunmodulierenden Substanzen aktiviert wurden, messen (I.3.2). Allerdings erweist sich die Nachbildung der T-Zell-Aktivierung *in vitro* als komplexe experimentelle Herausforderung. Zum einen sind die Ergebnisse unter Verwendung von primären humanen T-Zellen schlecht reproduzierbar, da nur wenige antigenspezifische Zellen auf die Stimulation reagieren, zum anderen scheint die Aktivierung dendritischer Zellen *in vitro* durch applizierte Chemikalien allein nur sehr schwach zu erfolgen [2].

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es daher, auf Basis eines in der Arbeitsgruppe entwickelten Assays (I.3.4) ein Testsystem zu entwickeln, das unter Einsatz einer T-Zell-Linie alle Schritte der zellulären Kaskade abdeckt. Grundlage war dabei die Hypothese, dass immunmodulierende Rezeptoren, wie der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) und der

Programmed Cell Death Ligand1 (PD-L1), die Stimulation dendritischer Zellen supprimieren und durch die Blockade oder den genetischen Knockout dieser Rezeptoren die Stimulation *in vitro* verstärkt und die nachfolgende Aktivierung von kokultivierten T-Zellen ebenfalls verstärkt werden könnte.

I.2 Der Endpunkt Sensibilisierung durch Hautkontakt

I.2.1 Der Adverse Outcome Pathway (AOP)

I.2.1.1 Was ist ein AOP?

Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (*Organisation for Economic Co-operation and Development* – OECD) entwickelt seit 2012 sogenannte *Adverse Outcome Pathways* (AOPs) für die wichtigsten adversen Wirkungen, die durch den Kontakt des Menschen mit Xenobiotika induziert werden können. Die AOPs sind systematisierte, hierarchisch aufgebaute Fließdiagramme, die den biologisch plausiblen Weg vom ersten molekularen Ereignis bis hin zur Ausbildung eines klinischen Effekts auf Organismus-Ebene abbilden sollen. Diese sollen dabei helfen, alternative Methoden zu entwickeln, wie etwa computergestützte Modelle zur quantitativen Bestimmung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (*quantitative structure-activity relationship* – QSAR) oder *In-vitro*-Testsysteme, die in einem sogenannten integrierten Ansatz zur Testung und Bewertung von Chemikalien (*integrated approach to testing and assessment* – IATA oder *defined approach* – DA) zum Einsatz kommen können [3,4].

Als einer der ersten AOPs wurde der AOP:40: „Kovalente Proteinbindung, die zu Hautsensibilisierung führt“ entwickelt [5]. In diesem sind die molekularen und zellulären Vorgänge zusammengefasst, die zur Hautsensibilisierung (mit dem klinischen Bild Kontaktdermatitis) führen (**Abbildung 1**). Diese sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

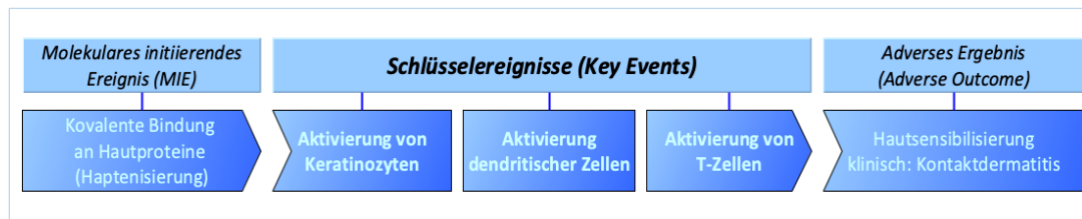


Abbildung 1. Schematische Darstellung des AOP für Hautsensibilisierung nach [5]. Ausgehend von der kovalenten Bindung eines Fremdstoffs an Hautproteine über die drei zellulären Schlüsselereignisse „Aktivierung von Keratinozyten“, „Aktivierung dendritischer Zellen“ und „Aktivierung von T-Zellen“ bis hin zum Endpunkt Hautsensibilisierung.

1.2.1.2 Molekulares initiiertes Ereignis: Haptensierung

Damit die zelluläre Kaskade für die Sensibilisierung in Gang gesetzt werden kann, müssen zunächst eigentlich nicht immunogene Substanzen die Hautbarriere überwinden und um für Zellen des Immunsystems erkennbar zu sein, an körpereigene Proteine gebunden werden. Die Bindung an Hautproteine wird auch Haptensierung genannt. Die Haptensierung stellt das molekulare initiierte Ereignis (*molecular initiating event* – **MIE**) dar.

Als potenziell sensibilisierende Substanzen kommen vor allem niedermolekulare, lipophile Stoffe in Frage, da diese die Hautbarriere leicht durchdringen können. Dabei galt lange eine Molekülmasse von 500 Da als obere Grenze für die Größe von sensibilisierenden Molekülen. Eine Betrachtung der im Rahmen der REACH-Verordnung bisher auf ihr sensibilisierendes Potenzial getesteten etwa 3.000 Substanzen zeigte von 197 Substanzen mit einer Molekülmasse über 500 Da 33 Substanzen mit sensibilisierendem Potenzial auf. Von diesen enthielten 14 keine Metallallergene (wie Nickel, Kobalt oder Chrom), die für das sensibilisierende Potenzial verantwortlich sein könnten. Diese 14 Substanzen wiesen Molekülmassen zwischen 502,79 und 2285,61 Da auf und enthielten molekulare Strukturen, die für die Reaktion mit Hautproteinen notwendig sind [6].

Auch das Paradigma, dass stark hydrophile Substanzen keine Sensibilisierer sein können, wurde inzwischen erfolgreich in Zweifel gezogen. Fitzpatrick, Roberts und Patlewicz haben am oben beschriebenen Datensatz auch untersucht, ob Substanzen mit einem Octanol-Wasser-Koeffizienten (LogK_{ow}) unter 1, der bisher als Grenzwert für die Hydrophilie sensibilisierender Substanzen galt, als Sensibilisierer eingestuft worden

sind. Dabei zeigte sich, dass die LogK_{ow} -Werte in den Gruppen der Sensibilisierer und der nicht sensibilisierenden Substanzen grundsätzlich gleich verteilt waren, wobei Substanzen mit extremen Werten über 12 und unter -5 eher nicht sensibilisierend waren. Auch hierbei spielten offenbar reaktive Zentren in den Molekülen eine größere Rolle für die sensibilisierende Wirkung als der mehr oder weniger arbiträr festgelegte Grenzwert für den LogK_{ow} . Daraus ließ sich ableiten, dass die elektrophile Reaktivität der Moleküle der bestimmende Faktor für das sensibilisierende Potenzial einer Substanz ist [7].

Die Penetration von Substanzen durch die Hornschicht der Haut, das *stratum corneum*, erfolgt also nicht nur auf dem Wege der passiven Diffusion, wie es für kleine, lipophile Substanzen der Fall ist, sondern kann offenbar für große, eher hydrophile Substanzen auch über Öffnungen wie Haarfollikel in einem ausreichenden Maß stattfinden [6,7]. Außerdem spielen Defekte der Hautbarriere, die genetisch oder pathologisch bedingt sein können, eine Rolle. So können Mutationen des Filaggrin-Gens zu einer gestörten Ausbildung des Hautfilaments führen und bestimmte Polymorphismen des Claudin-1-Gens, das für den Aufbau von *tight junctions* (Zell-Zell-Verbindungen) wichtig ist, sind mit der Sensibilisierung gegenüber Nickel und organischen Verbindungen assoziiert [8]. Auch entzündliche Erkrankungen der Haut, wie etwa die atopische Dermatitis, können zu Defekten der Hautbarriere führen [9].

Nach Penetration der Hautbarriere binden sensibilisierende Substanzen nun kovalent oder – etwa im Fall von Metallionen – über Koordinationsbindungen an nukleophile Zentren körpereigener Proteine. Funktionelle Gruppen innerhalb der potenziellen Allergene sind sog. Michael-Akzeptoren (β , α -ungesättigte Ketone, Aldehyde, Nitrile oder Carbonsäurederivate), Acylierungsmittel (z.B. Carbonsäuren mit guter Abgangsgruppe), Schiff-Basen-Bildner (Verbindungen, die unter Reaktion mit primären Aminen Imine bilden) sowie Elektrophile, die zur nukleophilen (aromatischen) Substitution geeignet sind (häufig [aromatische] Halogenverbindungen) [10]. Die entsprechenden Nukleophile in Proteinen finden sich in Cystein, Lysin, Methionin, Tyrosin oder Histidin [11,12]. Dabei scheint die Affinität des Allergens zu diesen nukleophilen Zentren proportional zu dessen allergener Potenz zu sein: Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die extremen Sensibilisierer 2,4-Dinitrochlorbenzol (DNCB) und Methylchlorisothiozolinon (MCI) zahlenmäßig mehr nukleophile Zentren in humanem Serumalbumin binden als der starke Sensibilisierer Zimtaldehyd [8]. Die kovalente Bindung mit ihrer im Vergleich zu etwa ionischen Verbindungen hohen Bindungs-

energie wird benötigt, um die Hapten-Protein-Komplexe gegenüber der zellulären Prozessierung (Spaltung in kleinere Peptide) stabil zu machen [10].

Neben Substanzen, die direkt als Haptene fungieren, existieren außerdem sogenannte Prä- und Prohaptene. Prähaptene werden außerhalb des Körpers durch Oxidation oder Photoreaktionen zum Hapten aktiviert, Prohaptene benötigen eine enzymatische Umwandlung innerhalb des Körpers. Vor allem Duftstoffe sind häufig Prä- und/oder Prohaptene; so wird zum Beispiel Limonen durch Oxidation an der Luft aktiviert und Eugenol metabolisch oxidiert, Geraniol hingegen kann über beide Wege oxidiert werden [13]. Die Art der metabolischen Umwandlung spielt dabei eine Rolle für die allergene Potenz von Prohaptenen. So konnte für das Prä- und Prohaptene *para*-Phenylendiamin (PPD) gezeigt werden, dass die Muttersubstanz zwar eine Sensibilisierung in Mäusen verursachte, aber *in vitro* keine Aktivierung von dendritischen Zellen. Wurde PPD chemisch oxidiert oder Luftsauerstoff ausgesetzt und die oxidierte Form mit dendritischen Zellen inkubiert, erfolgte eine Hochregulation von Reifungsmarkern und pro-inflammatorischen Zytokinen. Ein *N*-acetyliertes PPD-Derivat hingegen aktivierte weder dendritische Zellen *in vitro*, noch induzierte es eine Sensibilisierung in der Maus [14].

1.2.1.3 Key Event 1: Aktivierung von Keratinozyten

Als erstes Schlüsselereignis (*key event 1* – **KE1**) nennt der AOP die Aktivierung von Keratinozyten (KC). Keratinozyten sind die häufigste Zellart der menschlichen Epidermis. Während sie von der unteren Schicht der Epidermis – dem *stratum basale* – bis zur Hornschicht – dem *stratum corneum* – wandern, durchlaufen sie eine Transformation. Sie proliferieren und differenzieren und bilden eine wasserdichte Hülle, bevor sie schließlich Enzyme aus ihren Lysosomen entlassen, die die Zellorganellen degradieren und ein festes Schuppengeflecht aus verhornten Zellen hinterlassen [15]. Bei der Sensibilisierung übernehmen sie zum einen die Aufgabe der enzymatischen Umwandlung von Prohaptenen [16] und zum anderen schütten sie nach dem Kontakt mit Haptenen pro-inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin-18 (IL-18) aus, die die inflammatorische Kaskade und Migration epidermaler dendritischer Zellen induzieren [11,17,18]. Ein möglicher Mechanismus der Aktivierung von Keratinozyten führt über den Kontakt von Keratinozyten mit Haptenen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* – ROS), die wiederum Bestandteile der Extrazellulärmatrix, wie hochmolekulare Hyaluronsäure, in niedermolekulare Fragmente spalten, die als sog. *danger*

associated molecular patterns (DAMPs, auch allgemein Gefahrensignale oder *danger signals* genannt) fungieren. Diese DAMPs können an Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) auf Keratinozyten und dendritischen Zellen binden und diese aktivieren [19]. Metallallergene, wie Nickel oder Kobalt, hingegen binden direkt an TLR4, während Chromverbindungen offenbar die Bildung von ROS und die Aktivierung des Inflammasoms induzieren [8]. Das Inflammasom ist ein zytosolischer Proteinkomplex, der eine Vielzahl von DAMPs erkennt und das Enzym Caspase-1 reguliert, welches die inaktiven Formen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 in ihre aktiven Formen spaltet und damit zur Ausbildung einer entzündlichen Umgebung beiträgt, die für die weiteren Schritte der Sensibilisierung unerlässlich ist [20,21].

1.2.1.4 Key Event 2: Aktivierung dendritischer Zellen

Das zweite Schlüsselereignis (**KE2**) im AOP:40 ist die Aktivierung dendritischer Zellen. Dafür bedarf es einer ganzen Reihe von Signalen, beginnend mit der oben beschriebenen entzündlichen Umgebung, in der Gefahrensignale und von Keratinozyten sezernierte Zytokine für die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Neutrophilen, Mastzellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), verantwortlich sind. Diese tragen ebenfalls zur Entzündung bei [8]. Einigkeit herrscht darüber, dass diese Entzündung eine Voraussetzung für die vollständige Aktivierung dendritischer Zellen ist [20,22–25], gleichzeitig gibt es widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen der irritativen, entzündungsfördernden Wirkung einer Substanz und deren allergener Potenz. Bonneville und andere haben gezeigt, dass bei der Behandlung von Mäusen mit dem extremen Allergen 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) die Stärke der Entzündungsreaktion während der Sensibilisierung mit der Stärke der nachfolgend auftretenden allergischen Kontaktdermatitis korreliert und zum Teil durch die genetische Suszeptibilität für die entzündliche Wirkung der Testsubstanz bestimmt wird. Demnach reagierten C57BL/6-Mäuse sowohl mit einer stärkeren Entzündungsreaktion der Haut (bestimmt über die Ohrdicke nach einmaliger Auftragung der Testsubstanz und die mRNA-Level pro-inflammatorischer Zytokine) als auch mit einer deutlich ausgeprägteren allergischen Kontaktdermatitis als BALB/C-Mäuse. In beiden Stämmen war die Reaktionsstärke außerdem abhängig von der verwendeten DNFB-Konzentration [23]. Basketter und seine Arbeitsgruppe fanden hingegen für 55 Substanzen nur eine schwache Korrelation zwischen der im Meerschweinchen mittels *Guinea Pig Maximization Test* (GPMT) festgestellten irritativen Wirkung und der in der Maus mittels *local lymph node assay* (LLNA) ermittelten

allergenen Potenz. So zeigte etwa Methylidibromglutaronitril eine starke allergene Wirkung, aber eine nur sehr schwache irritative. Im Gegensatz dazu existieren potente Irritantien, wie Essigsäure, die keine allergene Wirkung haben [26]. Bei einer genaueren Untersuchung des Zytokinprofils des starken Allergens 2,4,6-Trinitrochlorbenzol (TNCB) und zweier schwach allergener Arnikatinkturen (zentraleuropäische Variante und spanische Variante mit unterschiedlicher Zusammensetzung) konnte gezeigt werden, dass TNCB die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und Interferon (IFN)- γ stark induzierte, während dies für die Arnikatinkturen nicht der Fall war. Gleichzeitig induzierten die spanische Arnikatinktur und TNCB gleichermaßen stark das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, während diese Induktion durch die zentraleuropäische Tinktur nicht ausgelöst wurde. Die spanische Tinktur zeigte verglichen mit der zentraleuropäischen zudem eine schwächere allergene Potenz. Aufgrund dieser Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass nicht nur die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine eine Rolle für die allergene Wirkung einer Substanz spielt, sondern auch die Stärke der Induktion anti-inflammatorischer Zytokine [25].

Nachdem also über die Sekretion verschiedener Zytokine durch Keratinozyten und Zellen des angeborenen Immunsystems eine Umgebung geschaffen wurde, die dendritische Zellen anlockt, erfolgt deren Aktivierung durch Bindung der Zytokine an die entsprechenden Rezeptoren auf dendritischen Zellen sowie die Aufnahme und Prozessierung der Hapten-Protein-Komplexe, die als sog. Neo-Antigene fungieren [27–29]. Die Gesamtheit der dendritischen Zellen der Haut besteht aus verschiedenen Subtypen, deren spezifische Funktionen erst nach und nach aufgeklärt und teilweise kontrovers diskutiert werden.

Man unterscheidet heute im Wesentlichen sechs Subtypen dendritischer Zellen (DC) in der menschlichen Haut [30]. Die beiden Hauptpopulationen sind dabei Langerhans-Zellen (LC) und dermale dendritische Zellen (dDC bzw. cDC für *conventional dendritic cell* [31,32]). Langerhans-Zellen machen etwa 3 % der epidermalen Zellen aus und sind gleichmäßig in der gesamten Epidermis verteilt [28], sie exprimieren das C-Typ-Lektin Langerin (auch CD207, *cluster of differentiation*, Reifungsmarker) und CD1a. In ihrem Zytosol findet man sog. Birbeck-Granula, die offenbar an der Prozessierung und Präsentation von Antigenen beteiligt sind, da man zeigen konnte, dass Langerin Antigene von der Zelloberfläche zu diesen Strukturen weiterleitet [33]. Langerhans-Zellen sind über Adhäsionsmoleküle wie EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) und E-Cadherin an die umgebenden Keratinozyten gebunden [29]. Bei den der-

Einleitung

malen cDC lassen sich zwei Subtypen unterscheiden: cDC1 sind CD141-positiv (CD141⁺) und exprimieren spezifisch TLR3 und TLR10 sowie weitere TLR [30,32], cDC2 sind stark CD1c-positiv und exprimieren die TLR1 bis 8. Außerdem findet man in der Haut CD14⁺ DC, die monozytären Ursprungs sind und sowohl Makrophagen- als auch DC-Marker sowie die TLR1 bis 9 tragen [30,31]. Ebenfalls monozytären Ursprungs sind sog. inflammatorische DC (iDC), die deshalb auch *monocyte-derived-* (mo-)DC genannt werden, die jedoch keine TLR aufweisen. Diese exprimieren neben den DC-Markern CD1a und CD1c auch den Makrophagenmarker CD206 [32]. Plasmazytoide DC (pDC) sind phänotypisch eher Plasmazellen ähnlich und verfügen nicht über die typischen DC-Marker, sondern exprimieren etwa CD123 (IL-3-Rezeptor) und den für diesen Zelltyp spezifischen Marker CD303. Man findet sie vor allem in pathologisch entzündeter Haut (bei Psoriasis) [31]. Aufgrund ihrer Fähigkeit, bei Aktivierung Typ-I-Interferone auszuschütten, nimmt man zudem eine Funktion bei der antiviralen Abwehr an [30].

Die Funktion vor allem der Langerhans-Zellen bei der Sensibilisierung durch Hautkontakt wird immer wieder neu diskutiert, da unterschiedliche experimentelle Modelle zu teils widersprüchlichen Ergebnissen kommen [29]. Zu einer entscheidenden Wendung in der Diskussion hatte die Entdeckung beigetragen, dass Langerin nicht exklusiv von Langerhans-Zellen exprimiert wird, sondern auch zu einem geringeren Anteil von dermalen cDC2. *In vitro* lassen sich auch cDC2 des Blutes über Stimulation mit dem Wachstumsfaktor *transforming growth factor* (TGF)- β zur Expression von Langerin und Birbeck-Granula anregen; es ist allerdings nicht bekannt, ob diese *in vivo* zur Differenzierung zu LC befähigt sind [32], allerdings werden depletierte dermale Langerin⁺ cDC2 aus Blutvorläufern aufgefüllt [34].

Mit Hilfe von murinen Knockout-Modellen, die selektiv entweder gar keine Langerin-positiven Zellen oder lediglich Langerin⁺ cDC, aber keine LC aufweisen, ließ sich nachweisen, dass die Stärke der allergenen Reaktion auf den (Re-)Stimulus mit Haptene weniger vom beteiligten Zelltyp während der Sensibilisierungsphase als von der Menge Langerin-exprimierender Zellen mit Zugang zum Hapten und der verwendeten Haptendosis abhängt. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigten sowohl Mäuse, denen alle Langerin-exprimierenden Zellen fehlten, als auch solche, denen lediglich LC fehlten, eine verringerte Reaktion, wenn die Dosis des Allergens Oxazolon gering war. Mit hohen Dosen Oxazolon war die Reaktion jedoch nur noch in den Mäusen verringert, denen alle Langerin-positiven Zellen fehlten, was den Schluss zuließ, dass hohe Haptendosen die Dermis und damit die dermalen Langerin⁺ cDC in ausreichendem Maß erreichen, um eine

vollständige Sensibilisierung der Tiere hervorzurufen [35].

Grundsätzlich erkennen sowohl LC als auch dermale cDC als sog. professionelle antigen-präsentierende Zellen (APC) die Hapten-Protein-Komplexe, phagozytieren und prozessieren sie, wonach die Bindung der entstehenden Antigenpeptide an den Haupthistokompatibilitätskomplex- (*major histocompatibility complex* – MHC) II erfolgt. Dabei sind, wie bereits erwähnt, Langerin und die Birbeck-Granula beteiligt [27,28]. Damit hat die Aktivierung der dendritischen Zellen begonnen. Nun verlieren LC TNF- α -vermittelt E-Cadherin und lösen sich damit von den Keratinozyten. Sie schütten IL-1 β aus, das DC autokrin über den IL-1-Rezeptor weiter aktiviert und parakrin KC zur Bildung von TNF- α anregt, das die Migration der DC zum regionären Lymphknoten über den TNF-Rezeptor II (TNFR2) vorantreibt [11,28]. Die dendritischen Zellen beginnen außerdem einen Reifungsprozess, bei dem Langerin herunterreguliert und Reifungsmarker und Adhäsionsmoleküle wie CD54, CD80, CD83 und CD86 hochreguliert werden [30]. Aktivierte dendritische Zellen produzieren zudem Basalmembran-degradierende Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen (MMP), die die Passage der Zellen durch die epidermale Basalmembran und das Dermisgewebe ermöglichen, indem sie Typ IV Kollagen spalten [28]. Bei ihrer Wanderung zum nächstgelegenen Lymphknoten exprimieren LC den Chemokin-Rezeptor (CCR) 7, der die Chemokinrezeptor-Liganden CCL19 und CCL21 bindet, welche auf Endothelzellen der afferenten Lymphbahnen (CCL21) und im Parakortex (CCL19 und CCL21) des Lymphknotens exprimiert werden [11]. Auf ihrem Weg differenzieren die dendritischen Zellen vollständig aus und präsentieren nun die MHC-II-Antigenkomplexe auf ihrer Oberfläche.

1.2.1.5 Key Event 3: Aktivierung von T-Zellen

Im Lymphknoten treffen die reifen DC auf naive T-Zellen. Letztere exprimieren ebenfalls CCR7, so dass sich DC und T-Zellen im Parakortex des Lymphknotens treffen und dort die sog. immunologische Synapse bilden (**Abbildung 2**). Für die vollständige Aktivierung von T-Zellen werden drei verschiedene Signale benötigt, deren Zusammenwirken man Kostimulation nennt [28,36].

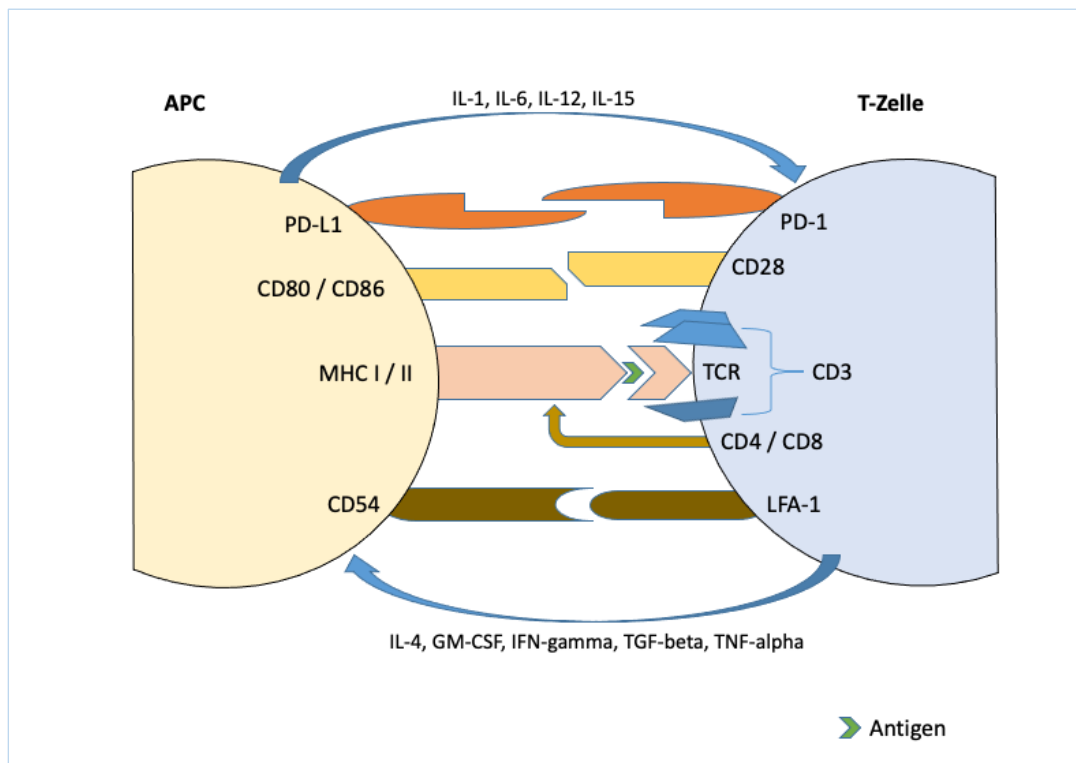


Abbildung 2. Vereinfachte schematische Darstellung der immunologischen Synapse zwischen aktivierter dendritischer Zelle und naiver T-Zelle mit kostimulatorischen Signalen. Für die Aktivierung von T-Zellen werden sowohl die Bindung des MHC-Antigen-Komplexes an einen entsprechenden T-Zell-Rezeptor (TCR)-CD3-Komplex (Signal 1) als auch die Bindung weiterer Oberflächenmarker und Adhäsionsmoleküle (Signal 2) und die beidseitige Stimulation durch Zytokine (Signal 3) benötigt (Kostimulation); APC: Antigen-präsentierende Zelle, LFA-1: *lymphocyte function associated antigen-1*, PD: *programmed cell death*, PD-L1: PD-Ligand, MHC: *major histocompatibility complex*, CD: *cluster of differentiation*. Modifiziert nach [36,37].

Initial binden die aktivierten dendritischen Zellen über Adhäsionsmoleküle an die T-Zellen, da die Affinität des T-Zell-Rezeptors (TCR) zum MHC-Antigen-Komplex gering ist und für eine Aktivierung eine ausreichend stabile Bindung notwendig ist. Eines dieser Adhäsionsmoleküle ist CD54; dieses wird auch *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) genannt und wird auf APC exprimiert, der korrelierende Rezeptor auf T-Zellen ist *leucocyte-function associated antigen-1* (LFA-1). Wird LFA-1 blockiert, verhindert dies die Aktivierung von T-Zellen. Andersherum erhöht sich die Affinität von LFA-1 gegenüber seinem Liganden, wenn die T-Zelle aktiviert wird [37].

Als Signal 1 bei der Aktivierung von T-Zellen gilt die Bindung des antigenspezifischen TCR an den MHC-Antigen-Komplex, der von APC präsentiert wird. Dabei ist vor allem MHC II beteiligt, an das CD4 entsprechender CD4⁺ T-Zellen bindet, unter Umständen kommt es aber auch zur sog. Kreuzpräsentation über MHC I, das wiederum von CD8⁺ T-Zellen erkannt

wird. Bei der Kreuzpräsentation kommt es zur Bindung von Peptiden aus dem Zytosol an MHC I, das üblicherweise für Eigenantigene verantwortlich ist [37]. Außerdem tritt mit Lipid-Antigenen ein dritter möglicher Weg der TCR-Aktivierung auf. Diese werden über CD1a, das z.B. auf Langerhans-Zellen in großen Mengen exprimiert wird, präsentiert [8]. Interessanterweise führten einige ungesättigte (teilweise endogene) Fettsäuren auch zur Hochregulation von CD86 auf *in vitro* generierten DC in Kokultur mit primären humanen KC [38]. Die Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe zum Zeitpunkt der Publikation als falsch-positiv bewertet, doch auch im Tierversuch führen diese Substanzen konsistent zu positiven Ergebnissen [39] und das obwohl Maus-DC kein CD1a exprimieren [40].

In jedem Fall löst die Bindung einer ausreichenden Anzahl (10 bis 200) von MHC-Antigen-Komplexen an die entsprechenden TCR eine Signalkaskade aus, die über den Ko-Rezeptor CD3 vermittelt wird, da der TCR selbst keine Fähigkeit zur Signaltransduktion besitzt [37]. Der TCR ist daher stets fest mit den drei Heterodimeren von CD3 assoziiert. Diese enthalten im zytosolischen Abschnitt ihrer ζ -Kette sog. *immunoreceptor tyrosine-based activated motifs* (ITAMs), die über die Tyrosin-Kinase Lck (*leucocyte-specific tyrosine kinase*), die mit CD4 bzw. CD8 assoziiert ist, phosphoryliert werden [36]. Die Phosphorylierung der ITAMs führt nun zur Bindung der Proteinkinase ZAP70 (*zeta-associated protein*), die die Signale des TCR-CD3-Komplexes weiterleitet und amplifiziert. Durch ZAP70 werden weitere signaltransduzierende Moleküle phosphoryliert, die wiederum Transkriptionsfaktoren (wie NF-AT [*nuclear factor of activated T cells*] und NF- κ B) aktivieren, die dann in den Zellkern translozieren und die differentielle Transkription von Genen induzieren, die für die Proliferation und Differenzierung der spezifischen T-Zellen notwendig sind [36,37].

Als Signal 2 in der Kostimulation von T-Zellen wird die Bindung kostimulatorischer Moleküle wie CD80/86 auf APC an CD28 auf T-Zellen bezeichnet. In direkter Nachbarschaft zu CD28 befindet sich der Rezeptor CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein*), der auf aktivierten T-Zellen hochreguliert wird und ebenfalls und mit höherer Affinität an CD80/86 bindet und zur Terminierung der T-Zell-Antwort führt, also als regulatorisches Molekül fungiert [37]. Ein weiterer Regulator der T-Zell-Antwort ist PD-L1 (*programmed cell death ligand*) auf APC, der an den entsprechenden PD-Rezeptor auf T-Zellen bindet [27,41]. Beide verhindern ein Überschießen der T-Zell-Antwort. Die Kostimulation über CD86 führt letztlich ebenfalls zur Aktivierung von NF-AT, das die Transkription von IL-2 anregt, welches autokrin zur T-Zell-Proliferation beiträgt. Die Produktion von IL-2 wird dabei transient für ein bis zwei Tage angeregt, während der hochaffine IL-2-Rezeptor für etwa eine Woche

exprimiert wird. Zusammen mit der Expression von CTLA4 wird somit die Proliferation der aktivierten T-Zellen reguliert [36,37].

Signal 3 der Kostimulation – die Sezernierung von Zytokinen sowohl von DC als auch autokrin von T-Zellen – ist entscheidend für die Richtung der Differenzierung der T-Zelle. So führt IL-12 zur Bildung von Effektor-T-Zellen (T-Helfer-Zellen – Th), IL-10 induziert die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen (Treg). Kommt zu IL-12 IFN- γ hinzu, entwickeln sich vor allem T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen vom Typ 1, während IL-6, TGF- β , IL-23, IL-21 und IL-1 β T-Zellen in Richtung Th17 und Th22 polarisieren. Ein Th2-Phänotyp entwickelt sich unter der Einwirkung von IL-4 und IL-10 [16]. Das klassische Paradigma, dass eine Kontaktsensibilisierung ausschließlich über Th1 vermittelt ist, ist überholt. Man geht inzwischen davon aus, dass abhängig von der Art des Sensibilisierers lediglich das Gleichgewicht zugunsten des einen oder anderen Effektor-T-Zelltyps verschoben wird und die Sensibilisierung grundsätzlich eine gemischte T-Zell-Antwort induziert [8]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass vornehmlich CD8⁺ T-Zellen die Effektorzellen bei der Kontaktallergie sind, während CD4⁺ T-Zellen regulatorisch wirken [27]; in Mäusen, deren CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden, induzierte das starke Allergen Trinitrophenyl (TNP) dennoch eine Kontaktallergie, die nicht ausgelöst wurde, wenn auch CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD4⁺ T-Zellen ebenfalls die Effektorfunktion übernehmen können [11].

Da Langerhans-Zellen große Mengen IL-10 produzieren und direkt mit CD4⁺ T-Zellen interagieren, wodurch die Bildung von Treg induziert wird, wird für sie teilweise eine suppressive Rolle bei der Kontaktsensibilisierung angenommen [8]. Dazu passt, dass – wie mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs in der Maus gezeigt werden konnte – die Migration von dermalen cDC deutlich vor der Migration von LC einsetzt, so dass cDC vor den LC im regionären Lymphknoten ankommen. Andererseits reichern sich dermale cDC im Lymphknoten in der Nähe von B-Zellfollikeln an, während LC (wie oben beschrieben) im T-Zell-reichen Paracortex zu finden sind, was dafür spricht, dass dermale cDC eher für die B-Zell-Aktivierung zuständig sind [28]. Bei B-Zell-defizienten Mäusen induzierte das Allergen Picrylchlorid eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich verminderte Kontaktallergie, was zeigt, dass dieser Zelltyp ebenfalls an der Ausbildung des klinischen Bilds der Sensibilisierung beteiligt ist [11].

Die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen führt außerdem zur Expression von sog. *homing*-Rezeptoren (*cutaneous lymphocyte antigen* – CLA, CCR4 und CCR10),

Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen, deren Liganden sich im Zielgewebe (in diesem Fall in der Haut) befinden, so dass diese zum „Ort des Geschehens“ migrieren [16]. Neben der Aktivierung von Effektor- und regulatorischen T-Zellen werden antigenspezifische Gedächtnis-T-Zellen differenziert. Dabei entstehen aus dem gleichen naiven Vorläufer sowohl Haut-ständige (*skin resident memory T cells* – T_{RM}) als auch im Lymphknoten verbleibende Gedächtniszellen (*lymph node central memory T cells* – T_{CM}). Die Population der T_{RM} reichert sich am Kontaktort des Haptens in der Haut an und sorgt für eine schnelle T-Zell-Antwort nach erneutem Kontakt, während die T_{CM} eine verzögerte Antwort gewährleisten [8]. Damit ist etwa zehn bis 15 Tage nach dem Erstkontakt mit dem Allergen die Sensibilisierungsphase abgeschlossen. Diese verläuft üblicherweise klinisch stumm. Es ist aber das Phänomen der primären allergischen Kontaktdermatitis bekannt, bei der starke Allergene wie DNFB etwa fünf bis 15 Tage nach dem initialen Kontakt mit dem Hapten eine entzündliche Hautreaktion auslösen. Diese wird von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen vermittelt [16].

1.2.2 Die allergische Kontaktdermatitis als klinisches Bild einer vorangegangenen Sensibilisierung

Die allergische Kontaktdermatitis (*allergic contact dermatitis* – ACD), auch Kontaktallergie oder allergisches Kontaktekzem genannt, ist eine weitverbreitete Erkrankung. Etwa 25 % der deutschen Bevölkerung haben nach aktuellen Schätzungen eine Sensibilisierung gegen eins der häufigen Kontaktallergene [42], vor rund zehn Jahren lag diese Zahl noch bei 15 % [43]. Die Kontaktallergie ist außerdem eine der häufigsten berufsbedingten Erkrankungen mit Inzidenzen von bis zu 19 Fällen pro 10.000 Berufstätige im Jahr [44]. Die individuelle Suszeptibilität für diese Erkrankung wird dabei von genetischen Faktoren, Störungen der Hautbarriere und Umwelteinflüssen bestimmt.

Klinisch äußert sich die ACD mit Ödemen, Erythemen und Juckreiz der Haut. Diese werden nach einer abgeschlossenen Sensibilisierung durch den erneuten Kontakt mit dem Hapten ausgelöst. Dabei treten die Symptome etwas zeitversetzt ein bis drei Tage nach Allergenkontakt auf, weshalb die ACD auch zu den Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ (Typ IV) zählt. Wie schon bei der Sensibilisierungsphase durchdringen Kontaktallergene die Hornschicht der Haut und werden von dort ansässigen dendritischen und Langerhans-Zellen nach Haptenisierung erkannt, phagozytiert und über MHC

präsentiert. Die nun anwesenden spezifischen Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen werden so aktiviert; gleichzeitig erfolgt die Antwort des angeborenen Immunsystems wie für die Sensibilisierungsphase beschrieben. Keratinozyten und LC sezernieren IL-1 β , TNF- α und IL-18 sowie T-Zell-Chemokine wie CCL20, wodurch weitere T-Zellen angelockt werden [16]. Antigen-spezifische T-Zellen proliferieren an Ort und Stelle und initiieren die entzündliche Reaktion. Natürliche Killer-Zellen produzieren IL-4, das B-Zellen aktiviert, die spezifische Antikörper (Immunglobulin M – IgM) ausschütten, welche wiederum das Komplementsystem aktivieren. Das führt dazu, dass Mastzellen vasoaktive Zytokine sezernieren [27]. Infiltrierende T-Zellen sezernieren vor allem IFN- γ , was zur weiteren Aktivierung von KC führt, die weitere Neutrophile, Makrophagen und NK-Zellen rekrutieren [24]. Durch diese gegenseitige Stimulation erreicht die Entzündung einen kritischen Punkt, an dem Antigen-modifizierte Keratinozyten letztlich in Apoptose treten, was zur Desintegration des Gewebes und damit zum klinischen Bild der ACD führt [16].

Nach einigen Tagen wird die Entzündung durch antigen-spezifische Treg und deren Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β graduell beendet. Die Sekretion von IL-10 verhindert die weitere Reifung von DC, was die Produktion von IL-12 hemmt, so dass keine weiteren Effektor-T-Zellen aktiviert werden. Auch KC können IL-10 und andere immunsuppressive Zytokine sowie CCL1, für das Treg den entsprechenden Rezeptor (CCR8) tragen, sezernieren, wodurch die Entzündung weiter gehemmt und schließlich beendet wird [28].

I.3 *In-vitro*-Testung auf Sensibilisierung – Stand der Wissenschaft

I.3.1 OECD-validierte Methoden

Für das molekulare initiierende Ereignis und die zwei ersten zellulären Schlüsselereignisse hat die OECD bereits alternative Testmethoden validiert und in Form einer Testrichtlinie (*test guideline* – TG) veröffentlicht. Dies sind zwei *In-chemico*-Tests (*direct peptide reactivity assay* [DPRA] und *amino acid derivative reactivity assay* [ADRA]) für das MIE, zwei ARE-Nrf2 (*antioxidant response element, nuclear factor erythroid-related factor-2*) Luciferase-Assays (KeratinoSens™ und LuSens) für KE1 und die Assays *human cell line activation test* (h-CLAT), *U937 cell line activation test* (U-SENS™) sowie der IL-8

Reporter-Gen-Assay IL-8 Luc für KE2. Diese sollen im Folgenden kurz beschrieben und diskutiert werden.

OECD TG 442C: Für das molekulare initiiierende Ereignis, die Bindung von potenziellen Allergenen an körpereigene Proteine, stehen mit der OECD TG 442C zwei Testmethoden zur Verfügung, die die Fähigkeit von Molekülen messen, an Aminosäuren zu binden. Der DPRA wurde erstmals 2004 publiziert [45], der ADRA folgte zehn Jahre später [46]. Beide Tests beruhen auf der Reaktivität von Substanzen mit den Aminosäuren Cystein und Lysin, wobei beim ADRA Naphthylacetyl-Derivate eingesetzt werden, wodurch die Menge der eingesetzten Reagenzien stark reduziert werden konnte [47]. In beiden Systemen werden die Testsubstanzen mit Lysin- oder Cystein-enthaltenen Peptiden inkubiert und die Abnahme der freien Peptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography* - HPLC) bestimmt. Anhand des Prozentsatzes ungebundener Peptide in der Probe werden Substanzen als sensibilisierend oder nicht-sensibilisierend eingestuft, wobei der DPRA schwache, moderate und starke Sensibilisierer unterscheidet [48]. Die Prädiktionsgenauigkeiten (bezogen auf Humandaten) werden mit 84 bis 91 % für den DPRA angegeben [45,49,50] und mit 88 % für den ADRA [46,47].

Beide Methoden sind nicht für die Subkategorisierung von Substanzen nach dem Globalisierten Harmonisierten System (GHS) geeignet, da sie keine zuverlässige Potenzabschätzung erlauben. Sie können jedoch zusätzliche Informationen in einem System aus mehreren Testsystemen (IATA) liefern. Die Ansätze enthalten kein metabolisches System, was die Detektion von Prohaptenen ausschließt. Substanzen, die die eingesetzten Peptide oxidieren, aber keine kovalente Bindung mit ihnen eingehen, können falsch-positive Ergebnisse liefern und stark lipophile oder anderweitig wasserunlösliche Substanzen entziehen sich aus Löslichkeitsgründen allen Testsystemen, die mit wässrigen Lösungen arbeiten (also auch allen *In-vitro*-Systemen) [48].

OECD TG 442D: Für den KE1 „Aktivierung von Keratinozyten“ liegen ebenfalls zwei OECD-validierte Methoden vor, diese sind in der OECD TG442D zusammengefasst; die Erstpublikationen erfolgten 2010 (KeratiNoSens™) und 2014 (LuSens) [51]. Beide Assays beruhen auf Luciferase-Reporter-Keratinozyten der Zelllinie HaCaT. Diese enthalten ein Luciferasegen unter der Kontrolle des ARE, welches aktiviert wird, wenn Nrf2 an ARE bindet [52]. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 liegt unter physiologischen Bedingungen im Zytosol an das Sensorprotein Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein* [siehe V.1]) gebunden vor,

welches reich an reaktiven Cysteinresten ist. Werden unter oxidativem Stress (etwa durch ROS) oder durch entsprechend reaktive Substanzen wie Haptene diese Cysteinreste gebunden, spaltet sich Nrf2 ab und transloziert in den Kern, wo es an ARE in der Promoterregion verschiedener Gene bindet [52]. In den Testsystemen wird auf diese Weise nach der Bindung der Testsubstanzen an Keap1 Luciferase produziert. Nach Lyse der Zellen werden diese mit einem Luciferase-Substrat inkubiert, dessen Umsetzung photometrisch bestimmt werden kann und proportional zur Menge der produzierten Luciferase ist [53]. Die Prädiktionsgenauigkeiten werden mit 77 bis 87 % für den KeratinoSens™ und mit 77 bis 84 % für den LuSens angegeben [50,52–54].

Auch diese Methoden sind nicht als alleinstehende Assays im regulatorischen Kontext geeignet, da sie keine Subkategorisierung nach GHS oder eine Potenzabschätzung ermöglichen. Wobei Ergebnisse aus dem KeratinoSens™ für die Ableitung einer Dosis-Wirkungsbeziehung geeignet sind. Testsubstanzen, die lediglich eine Reaktivität gegenüber Lysinresten aufweisen, liefern falsch-negative Ergebnisse. Hier können Ergebnisse aus den *In-chemico-Methoden* Aufschluss geben. Andererseits können Substanzen mit der Fähigkeit, die Bildung von ROS zu induzieren, ohne sensibilisierend zu sein, falsch-positive Ergebnisse liefern. Eine weitere Limitation ergibt sich durch Substanzen, die die Luciferaseaktivität modulieren, wie etwa Phytoöstrogene; diese führen zur Überaktivierung der Luciferase und damit zu falsch-hohen Signalen [51].

OECD TG 442E: Für KE2 „Aktivierung dendritischer Zellen“ sind in OECD TG 442E drei Assays beschrieben. Von diesen beruhen zwei auf der Messung der Expression von Reifungsmarkern auf monozytären Zellen (h-CLAT und U-SENS™) und der dritte auf der Induktion der IL-8-Produktion in einer monozytären Reporter-Zelllinie (THP-G8 aus der humanen akuten monozytären Leukämie-Zelllinie THP-1) [55].

Als erster Test wurde 2006 der h-CLAT vorgestellt, der 2008 in die Validierung durch die Europäischen Referenzlabore für Alternativmethoden zum Tierversuch (EURL ECVAM) aufgenommen wurde [56,57]. Beim h-CLAT werden THP-1 über 24 Stunden mit Testsubstanzen in acht Konzentrationsstufen inkubiert und anschließend die relative Expression der Reifungsmarker CD86 und CD54 im Vergleich zur mitgeführten Lösemittelkontrolle durchflusszytometrisch bestimmt [50,55]. Die Testung von mehreren Konzentrationsstufen erlaubt die Ableitung von Effektkonzentrationen (EC), die zur Potenzabschätzung innerhalb eines IATA verwendet werden können [55]. Für den h-CLAT werden Prädiktionsgenauigkeiten von 79 bis 89 % angegeben [50,52,54,58]. Falsch-

negative Ergebnisse ergeben sich häufig mit Substanzen, deren LogK_{ow} über 3,5 liegt. Negative Ergebnisse mit solchen Substanzen sollen nicht berücksichtigt werden. Wegen der limitierten metabolischen Aktivität von THP-1 können außerdem Prohaptene falsch-negative Ergebnisse liefern. Falsch-positive oder verfälschte Ergebnisse können mit Substanzen auftreten, deren Eigenfluoreszenz mit der der verwendeten Fluorochrome in der Durchflusszytometrie überlappt [55].

Der U-SENS™-Assay wurde aus dem *myeloid U937 skin sensitization test* (MUSST) abgeleitet, dessen Validierung bei den EURL ECVAM 2012 gestoppt wurde. Der Assay wurde 2013 unter den Namen U-SENS™ mit neuem Protokoll erneut eingereicht und 2017 in die OECD TG 442E aufgenommen [57]. Beim U-SENS™ wird die Regulation des Markers CD86 auf der histiozytischen Lymphom-Zelllinie U937 nach Inkubation mit mindestens vier Konzentrationen der Testsubstanzen über 42 bis 48 Stunden relativ zur Lösemittelkontrolle durchflusszytometrisch bestimmt [55]. Für den U-SENS™ konnte mit 105 Testsubstanzen eine Prädiktionsgenauigkeit von 77 % verglichen mit Humandaten ermittelt werden [59]. Prä- und Prohaptene konnten im U-SENS™ korrekt identifiziert werden. Tenside können aufgrund der membranschädigenden Eigenschaften zu einer unspezifischen Hochregulation von CD86 und damit falsch-positiven Ergebnissen führen. Substanzen mit einer Eigenfluoreszenz im Emissionsbereich der verwendeten Fluorochrome können mit der Messung interferieren [55].

Der IL-8 Luciferase Assay IL-8 Luc wurde 2011 erstpubliziert [60], durch das japanische Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden evaluiert und schließlich 2017 in die OECD TG 442E aufgenommen [55]. In diesem Assay wird die Zelllinie THP-G8 verwendet, die das Luciferasegen SLO (*stable luciferase orange*) unter der Kontrolle des IL-8-Promoters und das Luciferasegen SLR (*stable luciferase red*) unter der Kontrolle des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GADPH)-Promoters tragen. Diese Zellen werden für 16 Stunden mit zehn verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert und danach die Luciferaseaktivität photometrisch bestimmt, wobei die SLO-Aktivität auf die SLR-Aktivität normalisiert und mit unbehandelten Kontrollen verglichen wird [61]. Die Prädiktionsgenauigkeit für den IL-8 Luc wird mit 82 bis 86 % angegeben [60,62]. Der Assay erkannte in den Validierungsstudien auch Prä- und Prohaptene korrekt, schwer wasserlösliche Substanzen können jedoch falsch-negative Ergebnisse liefern, da im Assay ein serumfreies Zellkulturmedium als Lösungsmittel verwendet wird. Eine hohe Rate falsch-negativer Ergebnisse ergab sich für Anhydride, Tenside hingegen erbrachten durchweg falsch-positive Ergebnisse, weshalb

für diese Substanzgruppen andere Assays bevorzugt werden sollten. Wie schon für LuSens und KeratinoSens™ beschrieben, können Substanzen, die mit der Luciferase-Aktivität interferieren, falsche Ergebnisse produzieren [55].

Für den KE3 „Aktivierung von T-Zellen“ existieren bis dato keine OECD-validierten Alternativmethoden. Dieser wird daher bisher nur im murinen LLNA (OECD TG 429) oder im Meerschweinchentest GPMT (OECD TG 406) erfasst. Für Kosmetikinhaltstoffe, die in der Europäischen Union hergestellt werden oder auf den Markt kommen, ist die Testung im Tierversuch jedoch seit 2013 verboten [63]. Das folgende Kapitel gibt daher einen Überblick über Methoden, die sich derzeit in der Entwicklung befinden.

1.3.2 T-Zell-Assays

Die Entwicklung von Assays für den KE3 des AOP:40, die Aktivierung von T-Zellen, steckt trotz zahlreicher Bemühungen noch in der Prävalidierungsphase. Starke Aktivierungssignale wie durch immunmodulierende Medikamente oder mikrobielle Stimuli scheinen für die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen *in vitro* geeigneter zu sein, für diese Endpunkte existieren mehrere, auch kommerziell erhältliche, Systeme [vgl. 64–66].

Vier Assays sind speziell für die Testung potenzieller Hautallergene in den letzten Jahren entwickelt worden. Im Jahr 2013 wurde der *human T cell priming assay* (hTCPA) vorgestellt [67]. Dieser Assay verwendet primäre Monozyten, die *in vitro* zu DC differenziert werden (moDC), und naive T-Zellen aus dem Blut gesunder Menschen. Dabei werden die moDC zunächst mit nicht zytotoxischen Konzentrationen der Testsubstanz und dem TLR4-Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert. Nach dieser Aktivierungsphase werden die gereiften moDC mit naiven T-Zellen kokultiviert. Es erfolgen mehrere Restimulationen der T-Zellen mit aktivierten moDC, bevor die Proliferation der T-Zellen, Zytokinproduktion (IFN- γ , IL-4 und TNF- α) und T-Zell-spezifische Oberflächenantigene gemessen werden. Der Test wurde kontinuierlich weiterentwickelt, zeigte jedoch weiterhin eine hohe Spendervariabilität und recht ausgeprägte Hintergrundsignale – Probleme, die bis dato offenbar nicht gelöst werden konnten [2,68].

Ein weiterer Test mit ähnlichem Prinzip aus moDC und autologen Lymphozyten wurde von einer Arbeitsgruppe aus Newcastle upon Tyne im Vereinigten Königreich entwickelt. Auch dabei werden Testsubstanz-aktivierte moDC mit autologen Lymphozyten aus dem peripheren Blut kokultiviert, danach erfolgt allerdings noch eine Kultur mit Hautbiopsien,

um die Auswirkungen der T-Zellaktivierung auch auf Organebene messbar zu machen. Als Endpunkte dienen die Proliferation von T-Zellen, IFN- γ -Sekretion und histopathologische Veränderungen in den Hautbiopsien. Während letzterer Endpunkt gut mit der Sensibilisierungspotenz von Substanzen *in vivo* korrelierte, waren die T-Zell-Endpunkte nicht so aussagekräftig [69]. Jüngere Publikationen zu dem Testsystem legen nahe, dass auch hier der Fokus auf Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Medikamenten verschoben wurde [70]. Als Screening-Test in der Chemikalienzulassung dürfte dieser Assay aufgrund der benötigten primären Gewebebiopsien und autologen Blutspenden ohnehin nicht geeignet sein.

Als alleinstehender Assay für den gesamten AOP wurde die THP-1 *cell toolbox* entwickelt und 2019 erstmals publiziert. Dieser verwendet die monozytäre Zelllinie THP-1 als DC-Surrogat. Diese werden mit nicht zytotoxischen Konzentrationen von Testsubstanzen für 24 Stunden inkubiert und danach hinsichtlich der Reifungsmarker CD86 und CD54 durchflusszytometrisch untersucht (KE2). Außerdem wird nach Lyse der Zellen der intrazelluläre Gehalt von Glutathion als Surrogatparameter für die Proteinbindung der Testsubstanz photometrisch bestimmt (MIE). Als Marker für oxidativen Stress wird die Bildung von ROS mittels eines spezifischen Farbstoffs intrazellulär durchflusszytometrisch bestimmt. Die Genexpression (nach dem Protokoll des unten beschriebenen SENS-IS-Tests, s. I.3.3) und die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs werden als Ausleseparameter für KE1 herangezogen. Für KE3, die Aktivierung von T-Zellen, werden die Testsubstanz-behandelten THP-1 mit CD4⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut kokultiviert und anschließend die Proliferation der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse waren in den ersten Versuchen besonders für starke Allergene vielversprechend, Prä- und Prohaptene wurden wegen der fehlenden metabolischen Kompetenz von THP-1 nicht zuverlässig erkannt, eine Proliferation von T-Zellen konnte jedoch für alle sechs getesteten Allergene nachgewiesen werden [71].

Ganz aktuell wurde ein T-Zell-Assay unter Verwendung der T-Zelllinie Jurkat in Solokultur vorgestellt. Bei diesem werden Jurkat direkt mit Testsubstanzen in aufsteigenden Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert und die Expression von CD69 als frühem Aktivierungsmarker von T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Bei einer relativen Expression von über 1,5 bezogen auf unbehandelte Kontrollen und einer Viabilität von über 50 % gilt das Ergebnis als positiv. Auf diese Weise konnte für 52 getestete Substanzen mit bekannter allergener Wirkung eine Prädiktionsgenauigkeit von rund 83 % erreicht werden.

Auf Grundlage der Effektkonzentration, die zu einer 1,5-fachen Erhöhung der CD69-Expression führt, lässt sich auch eine Potenzabschätzung vornehmen. Allerdings waren auch die Ergebnisse mit den reinen Irritanzen Natriumlaurylsulfat und Salicylsäure positiv [72].

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Verwendung von primären T-Zellen mit der Problematik der Beschaffung von Spenderblut und – wichtiger – mit einer hohen Spendervariabilität einschließlich sog. *non-responder*, also Spenderzellen, die gar nicht reagieren, verbunden ist, was dem Einsatz für das Chemikalien-Screening entgegensteht. Mit dem zuletzt beschriebenen System wurde erstmals ein Zelllinien-basierter Assay vorgestellt, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich erhöhen sollte. Falsch-positive Ergebnisse mit Irritanzen müssen allerdings noch adressiert werden. Hier könnte die Kombination mit anderen, bereits validierten, Methoden Abhilfe leisten.

1.3.3 Methoden im Validierungsprozess der Europäischen Referenzlabore für Alternativmethoden (EURL ECVAM)

Für eine ganze Reihe Assays für den Endpunkt Sensibilisierung durch Hautkontakt sind Validierungsprozesse bei den EURL ECVAM begonnen worden, die jedoch inzwischen gestoppt sind, darunter ein Test an einem Epidermismodell (*reconstructed human epidermis* – RHE), der die IL-18-Konzentration in der Kultur sowie Zytotoxizität als Endpunkte misst [57].

Drei Testsysteme befinden sich jedoch derzeit an verschiedenen Punkten der Validierung und sollen hier daher Erwähnung finden. In der ersten Phase der Validierung befindet sich ein weiterer *In-chemico*-Test, der *electrophilic allergen screening assay* (EASA); dabei wird, ähnlich wie im DPRA oder ADRA, die Abnahme von freien Proteinsurrogaten nach Inkubation mit Testsubstanzen gemessen [57]. Weiter fortgeschritten sind der SENS-IS [73] und der *genomic allergen rapid detection* – GARD™ [74].

Beide Assays beruhen auf der Messung der Aktivierung bestimmter Genbatterien, die bei der Sensibilisierung eine Rolle spielen. Im SENS-IS werden zunächst 23 Gene für die irritative Wirkung einer Substanz in dem mit Testsubstanzen behandelten RHE-Modell EpiSkin gemessen; wenn von diesen mehr als 20 positiv reagieren, wird die Testsubstanz in niedrigeren Konzentrationen getestet, um falsch-positive Ergebnisse durch eine überschießende Genaktivierung zu minimieren. Zwei weitere Genbatterien aus 21 Sensibilisierungs-assoziierten Genen und 17 sog. Redox-Genen werden für die Prädiktion

der sensibilisierenden Wirkung herangezogen und erlauben die Kategorisierung einer Testsubstanz in die Klassen schwach, moderat, stark oder extrem sensibilisierend. Die Prädiktionsgenauigkeit wird mit 79 % verglichen mit Humandaten angegeben [59].

Der GARD™ verwendet die myelomonozytäre Zelllinie MUTZ-3, die auch in dieser Arbeit untersucht wurde, und misst nach 24-stündiger Inkubation mit Testsubstanzen in nicht-zytotoxischen Konzentrationen die Gensignatur von 200 Sensibilisierungs-Biomarkern [75]. Dabei werden Gene betrachtet, die für die Antwort auf oxidativen Stress, die Bildung des Inflammasoms, die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die Aktivierung, Reifung und Migration von DC und für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems verantwortlich zeichnen [76]. Der Test besteht aus zwei Teilen: GARD™skin zur Unterscheidung von Sensibilisierern und nicht sensibilisierenden Substanzen, für den eine Prädiktionsgenauigkeit von bis zu 96 % angegeben wird [54,74,75], und GARD™potency, der anhand von 52 Genen die Kategorisierung in die GHS-Kategorien Skin Sens. 1A und 1B erlaubt [57]. Die Prädiktionsgenauigkeit für diesen Teil wird mit 88 % angegeben [77].

Im Februar 2021 befinden sich jedoch weiterhin keine *In-vitro*-Assays mit dem Endpunkt Aktivierung von T-Zellen in der Validierung durch die europäischen Behörden [57].

1.3.4 Der Loose-fit Coculture-based Sensitization Assay (LCSA)

1.3.4.1 Kokultur aus primären humanen Zellen

Das im Zuge dieser Arbeit entwickelte Testsystem beruht auf dem Prinzip des *loose-fit coculture-based sensitization assay* (LCSA). Der LCSA wurde von Wanner und Schreiner, ursprünglich als Kokultursystem aus primären humanen Keratinozyten und primären DC-verwandten Zellen (*dendritic cell-related cells* – DC-rc), die *in situ* aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes differenziert werden, entwickelt [78].

Dazu wurden die mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC) aus *Buffycoats* (den vom Serum getrennten Blutbestandteilen) aus Blutspenden gewonnen und primäre KC aus Hautresten aus der plastischen Chirurgie isoliert. Die Keratinozyten wurden in Kulturplatten ausgesät und zur Adhärenz inkubiert, wonach die PBMC auf die KC gegeben und die darin enthaltenen Monozyten mit einem Zytokincocktail für zwei Tage zu

DC-rc differenziert wurden. Diese DC-rc sind CD11c⁺, HLA-DR⁺ (*human leukocyte antigen* Isotyp DR– ein Rezeptor der MHC II-Familie), CD86⁺, aber negativ für den Monozytenmarker CD14 und die Langerhans-Zell-Marker CD1a und CD1c [79]. Nach der Differenzierungsphase wurden nun die Testsubstanzen zugegeben und die Kultur für weitere zwei Tage inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Expression des Reifungsmarkers CD86 auf den schwimmenden Zellen bezogen auf unbehandelte Kontrollen. Das System erkennt zuverlässig Allergene verschiedenster chemischer Substanzklassen und nicht sensibilisierende Substanzen und kann über die Messung von IL-6 und MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein*) auch Metallallergene detektieren [78–81].

Der LCSA wurde seit seiner Etablierung stetig weiterentwickelt. Mehrere Publikationen aus der Arbeitsgruppe Stahlmann am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, in der auch die vorliegende Arbeit entstand, berichten über eingeführte Modifikationen (Liste der entsprechenden Publikationen im Anhang unter Vorarbeiten).

1.3.4.2 Ersatz primärer Keratinozyten durch HaCaT

Wenngleich die Verwendung primärer humaner Zellen die Situation *in vivo* am genauesten *in vitro* umsetzt, ist ihr Einsatz auch mit einigen Nachteilen verbunden. Zunächst muss eine Ethikkommission der Verwendung in der Forschung zustimmen und zusätzlich erfolgt für alle spendenden Personen eine Aufklärung (sog. *informed consent*) mit Bedenkzeit von mindestens 24 Stunden. Insbesondere Haut aus der plastischen Chirurgie ist nicht unbegrenzt verfügbar. Außerdem ist die Isolation und Kultivierung primärer KC aufwendig und kostenintensiv; die Zellen teilen sich nur über etwa 10 bis 20 Passagen und benötigen ein teures Spezialmedium, welches serumfrei bleiben muss, da die Kultur sonst mit Fibroblasten überwächst, die sich bei der Isolation nicht vollständig entfernen lassen. Aus diesen Gründen wurde der LCSA schließlich auf die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT umgestellt, was die Verwendung eines Standardmediums mit Serum-Zugabe ermöglichte. Diese Umstellung führte zu einer verbesserten Erkennung schwacher Allergene, da die Serum-Zugabe sich positiv auf die Reifung von DC-rc auswirkte. Die Dc-rc Population in serumhaltigem Medium enthielt nun auch CD1a⁺/CD1c⁺-Zellen, ähnelte damit also klassischen moDC. Diese erkannten im Gegensatz zu den DC-rc aus dem LCSA mit primären KC das schwache Allergen Resorcinol [82].

Der Ersatz der primären dendritischen Zellen durch eine Zelllinie wurde in der vorliegenden Arbeit umgesetzt.

I.3.4.3 Neuer Endpunkt: T-Zell-Antwort

Das Original-Protokoll des LCSA mit primären Zellen wurde außerdem um einen T-Zell-Endpunkt erweitert. Dazu wurden Ausleseparameter für die Aktivierung der in den eingesetzten PBMC ohnehin enthaltenen autologen T-Zellen untersucht. Dazu wurde zunächst der LCSA wie oben beschrieben durchgeführt und anschließend wurden die schwimmenden Zellen mit CD3/CD28-Dynabeads zur Stimulation der T-Zellen über sieben Tage subkultiviert. Danach wurde die Expression von T-Zell-typischen Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch untersucht und die ins Medium abgegebenen Zytokine gemessen. So konnten nach der Stimulation mit starken Kontaktallergenen vermehrt CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen in der Kultur nachgewiesen werden. Außerdem war in den Kulturen mit starken Allergenen auch die IL-4-Konzentration erhöht, mit gleichzeitiger Erhöhung der Expression des IL-4-Rezeptors CD124. Dies deutet auf eine Polarisation in Richtung T-Helferzelle Typ 2 (Th2) aus CD4⁺ Effektor-T-Zellen in diesem System hin. Auch in diesem Assay mit primären T-Zellen ergaben sich die bereits beschriebenen Probleme mit einer hohen Spendervariabilität und der Erkennung von schwachen Allergenen [83].

In der vorliegenden Arbeit wurde daher für den T-Zell-Endpunkt ebenfalls auf eine Zelllinie zurückgegriffen.

I.4 Die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien

I.4.1 HaCaT – eine Keratinozyten-Zelllinie

Die Zelllinie HaCaT wurde 1988 als erste humane Keratinozyten-Zelllinie etabliert. Die Zellen stammen aus der Peripherie eines Melanoms eines 62 Jahre alten Patienten. Der Name HaCaT leitet sich von den Kulturbedingungen zur Etablierung der Linie ab: *Human adult skin keratinocytes propagated under low Ca^{2+} conditions and elevated Temperature*, also humane adulte Keratinozyten, die in einem Medium mit niedrigem Kalziumgehalt (0,2 mmol/l) unter erhöhter Temperatur (38,5 °C) gezogen wurden [84]. Die Zellen wachsen adhärent und sind morphologisch primären KC sehr ähnlich (**Abbildung 3**).

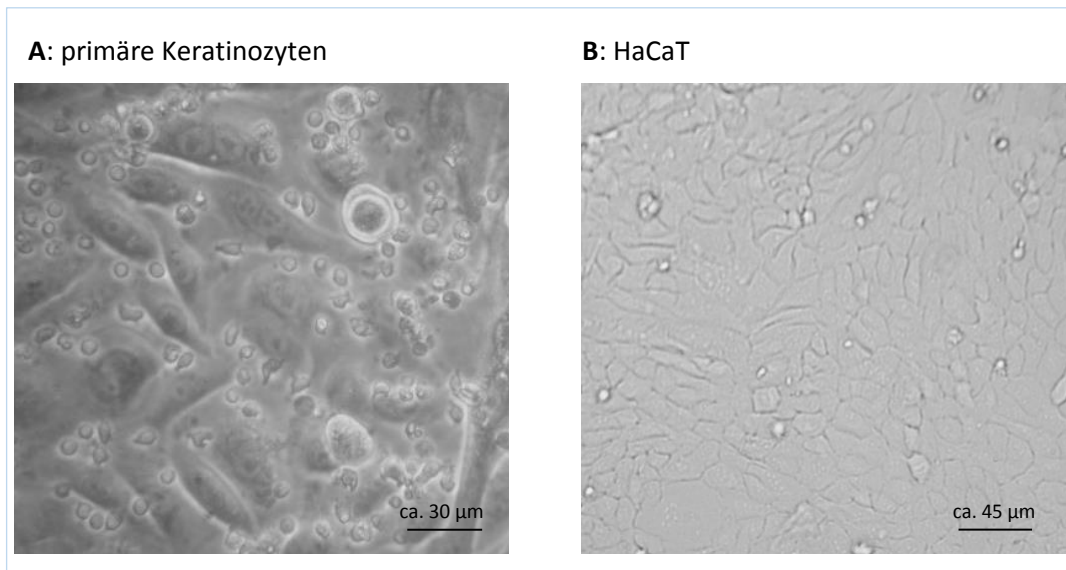


Abbildung 3. A: Primäre humane Keratinozyten (große, längliche Zellen als einschichtiger Zellrasen im Hintergrund) in Kokultur mit PBMC (runde Zellen im Vordergrund). B: HaCaT-Zellrasen in Monokultur. Eigene lichtmikroskopische Aufnahmen.

Die Zellen exprimieren Keratine und Filaggrin und proliferieren nach Transplantation auf Nacktmäuse nicht invasiv, sind nicht tumorigen und bilden eine normale epidermale Schicht [84]. Sie produzieren nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 den Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (*granulocyte/ macrophage colony stimulating factor*) GM-CSF, der die Differenzierung von Vorläuferzellen in reife Granulozyten, Makrophagen, aber auch dendritische Zellen stimuliert [85]. Unter Einfluss von IFN- γ exprimieren sie auf ihrer Oberfläche zudem das T-Zell-Adhäsionsmolekül ICAM-1 (CD54) [86]. Die sind damit für den Einsatz in einem Assay zur Kontaktsensibilisierung bestens geeignet.

I.4.2 MUTZ-3 – differenzierbare dendritische Zellen

Die Zelllinie MUTZ-3 wurde 1996 das erste Mal vorgestellt. Sie wurde aus dem peripheren Blut eines 29-jährigen Patienten mit akuter myeloider Leukämie isoliert. Die Zellen exprimieren HLA-DR und myelomonozytäre Marker wie CD13, CD33 und zu einem geringen Anteil CD14 und wurden daher als monozytäre Zellen charakterisiert [87]. Sie lassen sich unter Einfluss von Zytokinen zu dendritischen Zellen differenzieren und

exprimieren dann typische Marker wie CD86 und CD54 und verlieren gleichzeitig CD14 [88]. Auch eine Differenzierung zu Langerhans-Zellen ist mit diesen Zellen möglich; sie exprimieren dann im Gegensatz zu den naiven Zellen CD1a und Langerin [89]. Die Differenzierung lässt sich auch lichtmikroskopisch beobachten: Die Zellen verlieren ihre ursprünglich runde Form und entwickeln deutlich sichtbare Dendriten (**Abbildung 4**). Ein Nachteil der Zelllinie ist die aufwendige Kultivierung, die hochsupplementiertes Wachstumsmedium und zusätzlich ein konditioniertes Medium einer weiteren Zelllinie benötigt (siehe II.3.1).

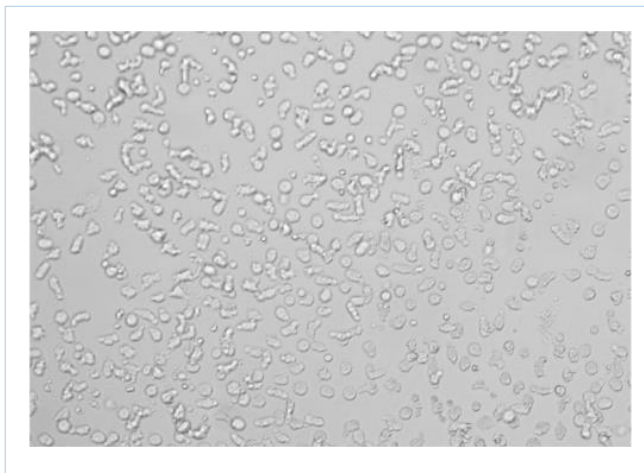


Abbildung 4. Zellen der Linie MUTZ-3 nach siebentägiger Differenzierung mit Zytokinen. Die Zellen verlieren ihre runde Form und bilden Dendriten aus. Eigene lichtmikroskopische Aufnahme.

I.4.3 THP-1 – der monozytäre Standard

Wesentlich anspruchsloser ist die 1980 erstmals beschriebene monozytäre Zelllinie THP-1. Die Zellen stammen aus dem Blut eines Jungen mit akuter monozytärer Leukämie und lassen sich in Standardmedium kultivieren. Sie exprimieren ebenfalls HLA-DR und sind zur Phagozytose befähigt [90]. Die Expression der konstitutiv exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD54 lässt sich auf THP-1 mit immunmodulierenden Substanzen regulieren, weshalb sie häufig als Surrogat für dendritische Zellen eingesetzt werden [71,91]. Genau genommen sind THP-1 jedoch Monozyten; wie Blutmonozyten produzieren sie etwa unter serumfreien Kulturbedingungen IL-1 [92] und unter Behandlung mit LPS wird der Monozytenmarker CD14 auf diesen Zellen hochreguliert [93].

Einleitung

Morphologisch unterscheiden sie sich von MUTZ-3 vor allem durch ihre Größe (**Abbildung 5**).

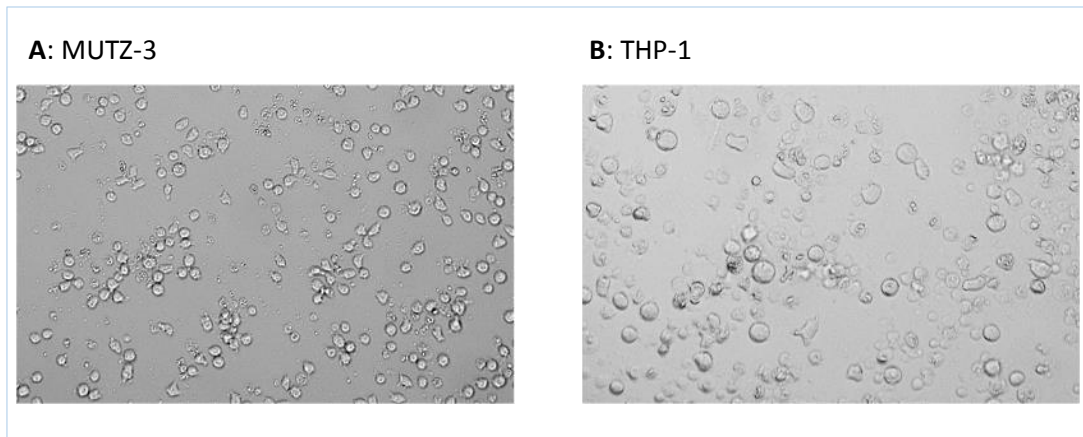


Abbildung 5. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien MUTZ-3 (A) und THP-1 (B) mit etwa gleicher Vergrößerung (eigene Aufnahme).

1.4.4 Jurkat – eine T-Zelllinie

Die Zelllinie Jurkat wurde unter dem Namen JM (Initialen des Patienten) erstmals 1975 beschrieben. Sie wurde aus dem Blut eines 14-jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie isoliert und aufgrund ihrer Fähigkeit, bei der Inkubation mit Schafserythrozyten sog. Rosetten (Höfe um die Zellen, die eine immunologische Reaktion anzeigen) zu bilden, als T-Zelle charakterisiert [94,95]. Bei JM und Jurkat handelt es sich vermutlich um Schwesterklone, allerdings wird Jurkat in manchen Publikationen auch als Überbegriff verwendet und JM als Sublinie beschrieben [vgl. 96,97]. Die Zellen exprimieren CD3 und nach Aktivierung mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) produzieren sie vermehrt IL-2, IL-8 und TNF- α [98].

I.5 *Programmed Cell Death-Ligand1* – ein immunmodulierender Rezeptor

I.5.1 Entdeckung und Nomenklatur von PD-L1

Der Rezeptor *programmed cell death* (PD)-1 wurde 1992 bei der Suche nach Genen, die bei der Apoptose von T-Zellen eine Rolle spielen, entdeckt [99]. Letztlich stellte sich heraus, dass PD-1 nicht direkt an der Induktion der Apoptose beteiligt ist, sondern möglicherweise indirekt über die Herabregulation der Produktion von Wachstumsfaktoren und IL-2 [100,101]. Im Jahr 1999 wurde unabhängig davon ein Molekül mit Homologie mit B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) entdeckt und daher B7-H1 genannt. Es wurde zunächst als kostimulatorisches Molekül beschrieben, das T-Zellen über einen anderen als die bisher bekannten Rezeptoren CD28 oder *inducible T cell costimulator* (ICOS) aktiviert und zur Proliferation anregt [102]. In einer anderen Arbeitsgruppe wurde dann gefunden, dass B7-H1 ein Ligand für PD-1 ist, was zur Nomenklatur PD-L1 führte. Es wird außerdem unter dem Namen CD274 geführt [99].

I.5.2 Proteinstruktur und Expression von PD-L1

Bei PD-L1 handelt es sich um ein Typ-I-Transmembran-Glycoprotein, das eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembranregion und einen intrazellulären Teil aufweist, wobei der zytoplasmatische Anteil nur ca. 30 Aminosäuren lang ist [101,103]. Aufgrund seiner Proteinstruktur zählt PD-L1 (wie PD-1) zur Immunglobulin-Superfamilie. Der N-Terminus des Apoproteins von PD-L1 ist verantwortlich für die Bindung an PD-1, wobei ein PD-L1 an ein PD-1 bindet (1:1-Stöchiometrie) [104]. Das PD-L1-codierende Gen PDCDL1 findet sich im humanen Genom auf Chromosom 9 an Position p24.1; das Protein besteht aus 290 Aminosäuren und wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Konstitutiv wird es von APC und Lymphozyten exprimiert, es kann aber auch, etwa auf Epithel- oder Endothelzellen, induziert werden [105]. Auf APC findet man PD-L1 in der Nähe der kostimulatorischen Moleküle Langerin und HLA-DR [41]. Es wird außerdem in immunologischen Barrieregeweben, wie Plazenta und Testes, sowie auf Parenchymzellen von Herz, Lunge und Niere exprimiert, wo es zur immunologischen Toleranz beiträgt [105,106].

Gut erforscht (und als therapeutisches Target eingesetzt) ist auch die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen, die damit der Immunabwehr entkommen. Die Expression auf Tumorzellen wird dabei von diversen Onkogenen gesteuert und zusätzlich durch die physiologische Entzündungsreaktion induziert [107]. So induziert etwa IFN- γ , das von T-Zellen und NK-Zellen nach Aktivierung produziert wird, die Expression von Transkriptionsfaktoren, die unter dem Begriff *interferon-responsive factors* (IRF) zusammengefasst werden. Von diesen gilt IRF1 als zentral für die Regulation der PD-L1-Expression [108].

I.5.3 Die PD-1/PD-L1-Interaktion bei der Kontaktsensibilisierung

Der PD-1-Ligand wird auf Langerhans-Zellen und dermalen cDC konstitutiv in geringen Mengen exprimiert und während ihrer Reifung und Migration zum Lymphknoten IFN- γ -abhängig hochreguliert [100,101]. Nach Blockade von PD-L1 auf diesen Zellen wurden in verschiedenen Studien T-Zellen stärker aktiviert, was für eine regulatorische Funktion der PD-1/PD-L1-Interaktion spricht. Nach der Blockade von PD-L1 auf migratorischen Langerhans-Zellen und dermalen cDC proliferierten CD4⁺ T-Zellen signifikant stärker als ohne Blockade. Denselben Effekt erzielte die Blockade von PD-1 auf T-Zellen [109]. Die Blockade von PD-L1 auf Allergen-aktivierten DC induzierte zudem die verstärkte Sekretion von TNF- α und IL-22 durch kokultivierte T-Helferzellen [41].

Im Allgemeinen führt die Bindung des Liganden an den Rezeptor zur Phosphorylierung der an PD-1 assoziierten *immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM) und *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). Dadurch kommt es zur Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen Src-Homologieregion-enthaltenden Phosphatasen 1 und 2 (SHP; Homologie mit der Src- [*sarcoma*] Tyrosinkinase), die wiederum für die Dephosphorylierung der TCR- und CD28-Signalmoleküle wie ZAP70 (siehe I.2.1.5) sorgen, was den aktivierenden Signalweg unterbricht [103,108]. Ältere Studien haben aber auch eine aktivierende Wirkung von PD-L1 vorgeschlagen. Durch Inkubation ruhender T-Zellen mit niedrigen Konzentrationen anti-CD3 und PD-L1-Immunglobulin konnten zum Beispiel die T-Zell-Proliferation und die Produktion von IL-10 angeregt werden [100]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass PD-L1 die T-Zell-Proliferation anregt, wenn PD-L1-Immunglobulin mit PD-1-negativen T-Zellen inkubiert wird, was darauf hindeutet, dass die kostimulatorische Funktion von PD-L1 nicht PD-1-mediiert ist, sondern über einen bis dahin unbekanntem Rezeptor vermittelt wird [110].

Neben der Wirkung von PD-L1 auf PD-1 und die nachgeschalteten Signalwege wurde auch eine Signalweiterleitung in die andere Richtung vorgeschlagen, obwohl noch unklar ist, über welche Signalmoleküle ein solches *reverse signalling* vermittelt wird, da bisher keine typischen Strukturen am kurzen zytoplasmatischen Ende von PD-L1 identifiziert wurden. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der glykolytische Metabolismus von Tumorzellen sowie deren Apoptose in Serum-Mangelmedium in Anwesenheit von rekombinanten PD-1-Proteinen reduziert werden, ohne dass dazu eine T-Zell-Beteiligung notwendig wäre [108,111].

1.6 Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) – ein immunologisches Multitalent

1.6.1 Proteinstruktur und Expression des AhR

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) wurde ursprünglich als Mediator der 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD)-Toxizität entdeckt und war daher lange auch unter dem Namen Dioxinrezeptor bekannt [112]. Der AhR ist ein basischer Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor (bHLH) mit zwei sog. PAS-Domänen (Per-ARNT-Sim – für Proteinstrukturen mit Homologie zu den Drosophila-Proteinen *period circadian protein* und *single-minded protein* und dem *arylhydrocarbon receptor nuclear transporter* [113]). Er hat drei funktionale Domänen: die hochkonservierte N-terminale bHLH-Domäne, die an der DNA-Bindung, Dimerisierung und Interaktion mit dem Hitzeschockprotein (HSP) 90 beteiligt ist, den zwei PAS-Domänen PAS.A und PAS.B, die ebenfalls bei der HSP90-Interaktion und Dimerisierung benötigt werden und für die Ligandenbindung zuständig sind, und die wenig konservierte C-terminale Prolin-reiche Transkriptionsaktivierungsdomäne [114,115]. Die Ligandenbindungstasche in der PAS.B-Domäne ist promiskuitiv, d.h. sie kann eine Vielzahl verschiedener Moleküle binden. Die Liganden des AhR sind vor allem exogene planare, hydrophobe Moleküle wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe; es sind inzwischen aber auch endogene Liganden bekannt [114,115].

In Abwesenheit eines Liganden liegt der AhR im Zytosol an Aktinfilamente und eine Reihe Chaperonproteine (wie HSP90, *AhR-interacting protein* – AIP und das Ko-Chaperon p23)

gebunden vor. Die Bindung an die Chaperone erfüllt verschiedene Funktionen. Zum einen maskiert HSP90 die konstitutiv vorhandene DNA-Bindeaktivität des AhR und zum anderen hält es den Rezeptor in einer Konformation, die eine hohe Ligandenbindungsaffinität gewährleistet. Das Ko-Chaperon p23 kontrolliert die zytoplasmatische Lokalisation des AhR und verhindert die unspezifische Interaktion mit ARNT (*arylhydrocarbon receptor nuclear transporter*) ohne eine vorangegangene Ligandenbindung. Das AhR-interagierende Protein AIP wird benötigt, um die Ubiquinierung und den folgenden Abbau des AhR zu verhindern [115].

Kommt es zur Ligandenbindung dissoziiert AIP vom AhR-Chaperon-Komplex und der Komplex wird Transportin- und Importin- β -vermittelt zum Zellkern geleitet. Es ist bisher nicht endgültig aufgeklärt, welche Komplex-Chaperone mit in den Kern translozieren, aber Untersuchungen deuten darauf hin, dass dies Liganden- und Zelltyp-abhängig ist. Im Kern bindet der AhR an ARNT und die Chaperon-Proteine dissoziieren vom Komplex. Der AhR-ARNT-Komplex bindet nun an sog. *xenobiotic response elements* (XRE) in der DNA und induziert damit die Transkription verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme der sog. AhR-Genbatterie, wie Cytochrom P450 (CYP) 1A1, CYP 1B1, Aldehyddehydrogenase (ALDH) 3A1 oder Glutathion-S-Transferase (GST)-Ya und des AhR-Repressors (AhRR). Der AhRR reguliert die Funktion des AhR, indem er mit dem AhR um die Bindung an ARNT konkurriert [116]. Durch die transkribierten Enzyme werden außerdem die AhR-Liganden abgebaut, so dass das Aktivierungssignal verloren geht. Die weitere Regulation erfolgt über den Abbau des freien AhR in Proteasomen der Zelle [114].

Der AhR wird als Fremdstoffsensor vor allem in Barrieregeweben und Zellen des Immunsystems exprimiert. Bekannt ist die Expression des AhR vor allem auf Zellpopulationslevel, einzelne Subpopulationen werden erst nach und nach untersucht. In T-Zellen etwa findet sich eine hohe AhR-Expression in Th17, während keine Expression in Th1 und Th2 und nur eine marginale in Treg gefunden wurde. Der AhR wird auch in B-Zellen, Mastzellen und hämatopoetischen Zellen exprimiert. Auch Epithel-, Endothel- und Stroma-Zellen exprimieren AhR [115]. Außerdem exprimieren primäre humane Monozyten und dendritische Zellen hohe Level an AhR, während in monozytären Zelllinien, wie THP-1, MUTZ-3 und U937, die Expressionslevel geringer ausfallen. Interessanterweise konnte in der Linie U937 die Expression von ARNT nicht nachgewiesen werden, während sie in MUTZ-3 und primären dendritischen Zellen etwa gleich stark und etwas geringer in THP-1 ausgeprägt war [117].

I.6.2 Funktionen des AhR

Neben seiner kanonischen Funktion als Transkriptionsfaktor für fremdstoffmetabolisierende Enzyme, die über die XRE-Bindung vermittelt wird, konnte auch gezeigt werden, dass der AhR mit dem Östrogenrezeptor (*estrogen receptor* – ER)-Signalweg interagiert. Der aktivierte AhR fungiert dabei als Ko-Transkriptionsfaktor für den ER, was die ER-vermittelte Genexpression ohne die Anwesenheit eines ER-Liganden aktiviert. Er kann außerdem als Ubiquitin-Ligase fungieren, die den ER degradiert und somit anti-östrogene Wirkung entfalten. Der AhR interagiert zudem mit NF- κ B, was die Genexpression des Protoonkogens c-Myc (*cellular Myelocytomatosis-homologue*) induziert, das als Transkriptionsfaktor von pro-proliferativen Genen die Zellproliferation und Tumorgenese anregt [114,115].

Weitere Funktionen des AhR im Immunsystem bestehen etwa bei der Proliferation von lymphoiden Zellen des Darms und $\gamma\delta$ T-Zellen der Haut über die membranständige Tyrosinkinase CD117, die als Wachstumsfaktor für eine Reihe von Stammzellen fungiert und ein Zielgen des AhR ist. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Funktion über Indole aus der (pflanzlichen) Nahrung als AhR-Liganden vermittelt wird [112].

Der AhR-Signalweg wechselwirkt auch mit dem antioxidativen Nrf2-Signalweg zum Beispiel in Keratinozyten. So konnte in primären humanen Keratinozyten nachgewiesen werden, dass Cynaropicrin, ein Inhaltsstoff der Artischocke, sowohl AhR als auch Nrf2 aktiviert und zwar in beiderseitiger Abhängigkeit. Die Aktivierung fand nicht statt, sobald einer der beiden Rezeptoren in den Zellen blockiert wurde [118].

Zusätzlich wurden für den AhR Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus, bei der Hämatopoese und der Entwicklung im Mutterleib sowie epigenetische Funktionen, etwa bei der Histonacetylierung und -methylierung, vorgeschlagen [112,114]. Im folgenden Abschnitt soll zudem genauer auf Funktionen des AhR in den an der Kontaktsensibilisierung beteiligten Zelltypen eingegangen werden.

I.6.3 Der AhR bei der Kontaktsensibilisierung

In der Haut exprimieren praktisch alle Zelltypen AhR. Er wurde in Keratinozyten, Melanozyten, Fibroblasten, Langerhans-Zellen, dermalen cDC, Makrophagen, $\gamma\delta$ T-Zellen,

Einleitung

Treg und Th17 gefunden [114,115]. Der AhR reguliert, wie oben beschrieben, fremdstoffmetabolisierende Enzyme, die bei der enzymatischen Umwandlung von Prohaptenen eine Rolle spielen können. Dazu stehen auch sog. *multi drug resistance*-Proteine (MRP) unter der Kontrolle des AhR [24]. Diese fungieren als Efflux-Proteine, die Fremdstoffe aus Zellen ausschleusen. Sie werden in Keratinozyten, Makrophagen, Monozyten und moDC exprimiert und vermitteln den aktiven Transport auch von Kontaktallergenen aus diesen Zellen. Dies konnte an MRP-blockierten humanen Keratinozyten und moDC mit Hilfe radioaktiv markierter Kontaktallergene gezeigt werden [119,120].

Die Prohaptene Eugenol und Isoeugenol können in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT direkt als AhR-Liganden fungieren und dessen Translokation in den Zellkern induzieren. Es konnte zudem gezeigt werden, dass diese Substanzen in HaCaT zum Zellzyklusarrest führen. Beim Vergleich von Wildtyp-HaCaT mit AhR-knockdown-HaCaT stellte sich heraus, dass dieser Effekt AhR-vermittelt war [121,122]. Die Aktivierung des AhR führt zu einer schnelleren terminalen Differenzierung von Keratinozyten in Zellkultur und dreidimensionalen Epidermismodellen und induziert die Expression von Genen, die bei der Verhornung von KC beteiligt sind, hat also eine Funktion bei der Barrierebildung [115].

Mäuse, die aufgrund der Deletion der bHLH-Domäne keinen funktionalen AhR aufwiesen, zeigten eine deutlich abgeschwächte Reaktion gegenüber dem Kontaktallergen Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verglichen mit Wildtyp-Mäusen. In derselben Studie wurde gezeigt, dass reife epidermale Langerhans-Zellen der AhR-defizienten Mäuse signifikant weniger CD24 und CD80 exprimierten, während die Expression von CD86 im Vergleich zu LC aus Wildtyp-Mäusen gleich blieb, was darauf hindeutet, dass die Reifung von LC AhR-vermittelt ist [123].

Einerseits zeigten dendritische Zellen, die aus TCDD-behandelten Mäusen isoliert wurden, eine erhöhte Expression von MHC II, CD54, CD24 und CD40, andererseits führte die Aktivierung des AhR mittels AhR-Liganden in DC zur Induktion von Treg [114]. Außerdem fördert der AhR über die Interaktion mit IRF4 die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen [116]. Insgesamt werden anti-inflammatorische Effekte der AhR-Aktivierung in DC angenommen, so wird zum Beispiel die Produktion von IL-10 durch DC nach AhR-Aktivierung angeregt und in einem Mausmodell für die entzündliche Hauterkrankung Psoriasis wurde gezeigt, dass die Abwesenheit eines funktionalen AhR verstärkte Entzündungsreaktionen hervorrief [115].

In reifenden Th17-Zellen ist die Expression des AhR erhöht und führt zu einer verstärkten Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22. Der AhR-Agonist 6-Formylindolocarbazol (FICZ) führt *in vivo* zur Stimulation der Differenzierung von Th17 [116]. Gleichwohl der AhR in Th1 und Th2 kaum exprimiert wird, führte die Behandlung von Mäusen mit Derivaten des AhR-Liganden Benzimidazol zur Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten von Th1-Zellen und unterdrückte die Produktion von Th2-assoziierten Zytokinen. Die Rolle des AhR bei der Differenzierung von Treg konnte an AhR-defizienten Mäusen gezeigt werden. So ließen sich naive T-Zellen aus diesen Tieren nicht in Richtung Treg differenzieren. Der AhR reguliert zudem die Expression des Treg-assoziierten Transkriptionsfaktors FoxP3 (*forkhead box* P3); die Aktivierung des AhR mit TCDD fördert dessen Bindung an den FoxP3-Promoter und die Expression der entsprechenden Gene [114]. Außerdem steuert der AhR die Expression von IL-10, IL-21 und CD39, die die Differenzierung von Treg vorantreiben [116]. Auch der endogene AhR-Ligand 2-(1'-*H*-indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carboxylsäuremethylester (ITE) induziert die Bildung von Treg und verringert die Produktion von IL-17 durch CD4⁺ T-Zellen [124].

Alles in allem kann die Aktivierung des AhR in allen Phasen oder *key events* der Sensibilisierung eine Rolle spielen und zahlreiche Experimente deuten darauf hin, dass dem AhR dabei eher immunsuppressive, anti-inflammatorische Funktionen zukommen.

1.7 CRISPR/Cas9 – die Genschere

1.7.1 Nobelpreis für Chemie 2020

Die Abkürzung CRISPR steht für *clustered regularly interspaced palindromic repeats*, also Bereiche des prokaryotischen Genoms, die aus sich wiederholenden DNA-Abschnitten (*repeats*) und regelmäßig zwischengeschalteten variablen Sequenzen (*Spacer*) bestehen. Diese wurden erstmals 1987 von Forschenden aus Japan in *Escherichia coli* beschrieben [125,126]. Man nahm früh eine Rolle bei der DNA-Reparatur und Genregulation an, aber erst 2005 erkannte man *Spacer*-Regionen, die viralen Ursprungs waren. Dazu kam die Erkenntnis, dass CRISPR-assoziierte (Cas) Gene für Proteine mit Nuclease- und Helikase-Funktion codieren. Dies führte zu der Annahme, dass das CRISPR/Cas-System als adaptiver Abwehrmechanismus fungiert und die

enthaltenen Spacer als Gedächtnis einer vorangegangenen viralen Infektion dienen. Dies konnte schließlich 2007 an *Streptococcus thermophilus*, die mit lytischen Phagen infiziert wurden, experimentell nachgewiesen werden [125].

Für diese Experimente und damit den Grundstein für die Genomeditierung erhielten die zwei Wissenschaftlerinnen Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier 2020 den Nobelpreis für Chemie [127].

1.7.2 Das CRISPR/Cas-System in Prokaryoten

Bakterien und Archaeen besitzen eine Vielzahl verschiedener CRISPR/Cas-Systeme, die verschiedene Funktionen übernehmen. Diese werden derzeit in zwei Klassen, sechs Typen und mehrere Subtypen unterteilt [128]. Die Systeme bestehen aus zwei Hauptkomponenten: einem Operon, das für das Cas-Protein codiert, und der CRISPR-Region, die als Template für die Synthese von CRISPR-RNAs (crRNA) dient, die wiederum die Nukleaseaktivität steuern. Je nach System erfüllen eins oder mehrere Cas-Proteine verschiedene Funktionen, etwa als RNasen für die crRNA-Reifung oder als Nukleasen, die die Ziel-DNA schneiden [129].

Grundsätzlich erfolgt die CRISPR/Cas-vermittelte Immunität in drei Phasen: Akquisition, Expression und Interferenz. In der ersten Phase werden nach Infektion des Bakteriums Teile der Phagen-DNA (Protospacer genannt) durch die Cas 1 und 2 in den CRISPR-Locus der bakteriellen DNA integriert. Dabei werden Abschnitte gewählt, die in der Nähe von drei bis sechs Basenpaare langen Bereichen mit der Sequenz „[beliebiges] Nukleotid-Guanin-Guanin“ (NGG) liegen. Diese werden *protospacer adjacent motif* (PAM) genannt. Die PAM werden jedoch nicht mit in die Spacer des CRISPR-Locus eingebaut, sondern dienen nur der späteren Erkennung der Phagen-DNA. In der Expressionsphase wird der gesamte CRISPR-Array und die sog. *trans*-aktivierende crRNA (tracrRNA) transkribiert und das Transkript z.B. durch Cas 6 oder Cas 9 und RNase III in einzelne crRNA geschnitten, die jeweils einen *Spacer* und terminale Fragmente der *repeat*-Sequenz enthalten. Dabei bleibt in Klasse-2-Systemen Cas 9 an die *repeat*-Sequenz der crRNA gebunden und bildet zusammen mit dieser und der tracrRNA den Interferenzkomplex. In Klasse-1-Systemen fungieren Cas 6 als Endonucleasen bei der crRNA-Reifung und bleiben an das 3'-Ende der crRNA gebunden, während Cas 7 an die Spacerregion und Cas 5 an das 5'-Ende der crRNA binden. In der Interferenzphase erkennt die crRNA die komplementären Abschnitte der Phagen-DNA und die Anwesenheit

von PAM in der Nähe dieser Abschnitte bewirkt ihren nukleolytischen Abbau durch Cas-Proteine. In Klasse-2-Systemen übernimmt Cas 9 sowohl die Erkennung der PAM als auch die Helikase-Funktion und die Einführung eines Doppelstrangbruchs in der Phagen-DNA etwa drei Basenpaare stromaufwärts des PAM [126,130]. Mit crRNA mit *Spacern* gegen das Wirtsgenom können die CRISPR-Systeme auch zur Genregulierung dienen [126], außerdem werden derzeit weitere Funktionen, wie etwa bei der Biofilm-Bildung, untersucht [127].

1.7.3 Genomeditierung mit CRISPR/Cas9

Das Klasse-2-System mit Cas 9 bietet sich für die biotechnischen Verwendung besonders an, da hier ein einziges Cas-Protein für eine vollständige Funktionalität des Systems ausreicht. Neben der Cas 9 wird außerdem Cas 12a verwendet und kürzlich wurde eine Cas (CasX oder Cas 12e genannt) vorgestellt, die wegen ihrer geringen Größe von unter 1.000 Aminosäuren und der Herkunft aus nicht-pathogenen Mikroorganismen eine vielversprechende weitere Plattform für die Genomeditierung darstellt [131].

Für den Einsatz bei der Genomeditierung wird Cas 9 mit einer RNA-Sonde, der *guideRNA* gekoppelt, die je nach Sequenz jeden beliebigen Genort ansteuern kann. Damit die Cas 9 ihre Nuklease-Aktivität ausüben kann, braucht es auf der Zielsequenz ein PAM, was bei der Synthese von *guideRNAs* beachtet werden muss [132]. Um das System für den Einsatz im Labor zu vereinfachen, wurden *guideRNAs* entwickelt, die sowohl die crRNA- als auch die tracrRNA-Komponenten enthalten und deshalb als *single guide (sg) RNA* bezeichnet werden [129].

Nachdem durch Cas 9 ein Doppelstrangbruch induziert wurde, greifen die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen. Der schnellere und unspezifischere Mechanismus ist die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining – NHEJ*), bei der lediglich die DNA-Enden verknüpft werden, was häufig zur Deletion oder Insertion von einem oder mehreren Nukleotiden führt [129]. Der zweite Mechanismus ist die Homologie-gerichtete Reparatur (*homology directed repair – HDR*), bei der der Doppelstrangbruch unter Anwendung einer Reparaturschablone (etwa vom intakten homologen Chromosom) geschlossen wird [132]. Dieser kann verwendet werden, um spezifische neue DNA-Abschnitte in ein Gen einzubauen [129]. Während also der NHEJ-Mechanismus dazu benutzt werden kann, Gene durch Deletion von Nukleotiden auszuknocken, können mittels

HDR neue Funktionalitäten erzeugt werden. Bei der praktischen molekularbiologischen Anwendung des Systems müssen allerdings einige Punkte beachtet werden [126,129,130]:

- Die **Spezifität der eingesetzten Cas 9** kann geringer sein als vermutet, was zu *off-target*-Effekten führen kann, also Effekten am falschen Genlocus oder die Insertion von Stücken aus einem anderen Chromosomenabschnitt bei der HDR.
- Die **Erreichbarkeit des zu editierenden Gens** hängt etwa von der Stärke der Verdichtung der DNA-Doppelhelix ab und damit auch von der Phase des Zellzyklus.
- Die **Wahl der sgRNA** sollte von der Stabilität der RNA in der Zelle und bei ihrer Verwendung, der Stärke der Bindung an Cas 9 und der Spezifität für die gewünschte Sequenz bestimmt werden.

Neben der Genomeditierung wurden in den letzten Jahren weitere Anwendungen für CRISPR/Cas-Systeme entwickelt. Dazu gehört die gezielte Genregulation mittels inaktivierter Cas 9, die keine Nuklease-Aktivität aufweist, aber dennoch fest an den gewünschten Genlocus bindet und auf diese Weise mit anderen DNA-bindenden Proteinen wie Transkriptionsfaktoren oder RNasen in Konkurrenz tritt. Auch epigenetische Veränderungen wie Methylierungen können mit CRISPR-Systemen hervorgerufen werden, indem inaktivierte Cas-Proteine mit Methyltransferasen gekoppelt werden [133]. Außerdem ist es möglich, einzelne Basen zu modifizieren, ohne einen Doppelstrangbruch zu induzieren (*base editing*) [132].

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Verwendete Zellen, Medien, Chemikalien und Software

In den folgenden Tabellen sind Zellen, Medien und Chemikalien, die im experimentellen Teil der Arbeit verwendet wurden, sowie die Software zur Auswertung der generierten Daten zusammengestellt. Spezielle Reagenzien oder Geräte für einzelne Arbeitsschritte sind in den entsprechenden Kapiteln aufgelistet. Listen der verwendeten Laborverbrauchsmaterialien und Standardgeräte finden sich im Anhang dieser Arbeit unter VI.3.

Tabelle 1. Verwendete Zelltypen. Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

Bezeichnung	DSMZ Nr.	Erläuterungen
5637	ACC 35	humane Blasenkarzinom-Zelllinie, die Wachstumsfaktoren und Kolonie-stimulierende Faktoren sezerniert
HaCaT	Institutsbestände	humane Keratinozyten-Zelllinie aus der Peripherie eines malignen Melanoms
Jurkat	ACC 282	humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie
MUTZ-3	ACC 295	humane akute myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie als Modell für dendritische Zellen
THP-1	ACC 16	akute monozytäre Leukämie-Zelllinie

Tabelle 2. Verwendete Chemikalien und Medien mit Bezugsquelle und Erläuterungen.

Medium/ Chemikalie	Vertrieb/ Artikelnr.	Bemerkungen/ Anwendung
β-Mercaptoethanol CAS Nr. 60-24-2	Sigma-Aldrich (Merck) M3148-25ML	50 µmol/l in Zellkulturmedien
DMEM	Merck KGaA FG0415	mit stabilem L-Glutamin für HaCaT-Kultur: + 10 % FCS
DMSO, Hybri-Max	Sigma-Aldrich (Merck) D2650	Lösungsmittel und Frostschutzmittel
FCS (<i>fetal calf serum</i> – fötales Kälberserum)	Sigma-Aldrich (Merck) F7524-500ML	für 10 %: 5 ml FCS auf 45 ml PBS
L-Glutamin	Life Technologies Ltd. 25030	2 mmol/l für MUTZ-3-Kultur
MEM, <i>alpha</i> <i>modification</i>	Sigma-Aldrich (Merck) M8042	ohne L-Glutamin, mit Ribonucleosiden, Desoxyribonucleosiden und Natriumbicarbonat für MUTZ-3/MUTZ-LC-Kultur: + 2 mmol/l L-Glutamin + 50 µmol/l β-Mercaptoethanol + 20 % 5637 konditioniertes Medium (nur MUTZ-3) als Einfriermedium (ohne konditioniertes Medium): + 10 % DMSO
PBS (<i>phosphate</i> <i>buffered saline</i> – physiologische Salzlösung)	Sigma-Aldrich (Merck) D8637-1L	ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , steril
PBS Pulver, instamed	Biochrom AG (Merck) 4182-05	Pulver zur Herstellung einer phosphatgepufferten Salzlösung ohne Calcium und Magnesium; 9,55 g Pulver auf 5 l Reinstwasser
Penicillin/Streptomycin	Corning Inc. 30-002-CI	10.000 UI/ml / 10 mg/ml

Medium/ Chemikalie	Vertrieb/ Artikelnr.	Bemerkungen/ Anwendung
RPMI 1640	Corning Inc. 10-040-CV	mit stabilem L-Glutamin für THP-1-Kultur: + 10 % FCS, + 50 µmol/l β-Mercaptoethanol für Jurkat- und 5637-Kultur: + 10 % FCS
Trypanblau	Biochrom AG (Merck) L6323	Totfarbstoff zur Verwendung in einer Neubauer-Zählkammer, 0.025 % in PBS
TrypLE Express	Life Technologies GmbH (Thermo Fisher) 12604013	Trypsinersatz, ohne Phenolrot

Tabelle 3. Software, die zur Auswertung der erhobenen Daten verwendet wurde.

Programm/ Version	Firma	ausgewertete Daten/ Anwendung
Bio-Plex Manager	Bio-Rad	Multiplex-Assay
Bio1D 12.12	Vilber Lourmat	<i>Genomic Cleavage Detection</i>
Cell Quest Pro 5.2.1	Beckton Dickinson	Durchflusszytometrie
Excel 2019 v16.41	Microsoft	Datenverwaltung
Microplate Manager 6.1	Bio-Rad	ELISA
Prism 8.4.3 und 9.0.0	GraphPad Software	grafische Darstellung und statistische Berechnungen
WinList 7.0 und 9.0.1 3D	Verity Software House	Durchflusszytometrie
yED 3.20.1	yWorks GmbH	Erstellung von Fließdiagrammen

II.2 Zellkultur: Allgemeine Methoden

II.2.1 Auftauen und Aussäen von Zellen

Nach Erhalt der kryokonservierten Zellen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) wurde der Inhalt der Röhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, quantitativ in 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit warmem PBS überführt und auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur (RT) und 300 · g für vier Minuten zentrifugiert, der Überstand mittels Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet erneut in 50 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Der Überstand wurde abermals abgesaugt und verworfen, das Pellet in Kulturmedium aufgenommen und auf die für den Zelltyp geeignete Konzentration verdünnt. Das Aussäen erfolgte auf Multiwell-Gewebekulturplatten oder Gewebekulturflaschen. Für 24-well-Platten betrug das Volumen 1 ml pro Loch, in 12-well-Platten wurde mit 2 ml pro Loch gearbeitet. Kulturflaschen wurden je nach Größe (25 bis 75 cm²) mit 5 bis 20 ml Zellsuspension in Medium befüllt. Für die ersten fünf bis zehn Passagen wurde Kulturmedium mit Penicillin (10.000 IU/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) verwendet, nach dieser Akklimatisierungszeit wurde auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet. Das Auftauen und Aussäen von Zellen aus der Kältelagerung erfolgten analog.

II.2.2 Passage von in Suspension wachsenden Zellen

In Suspension wachsende Zellen (MUTZ-3, THP-1 und Jurkat) wurden durch Hinzufügen frischen Mediums passagiert. Dazu wurde die dicht gewachsene Zellsuspension gleichmäßig von einer auf zwei Platten oder Flaschen aufgeteilt und mit frischem Medium auf das Ursprungsvolumen aufgefüllt. Die Passage erfolgte alle zwei bis drei Tage oder nach Erreichen einer hohen Zelldichte, die mikroskopisch überprüft wurde. Wenn das Kulturmedium nach einigen Passagen bereits stark verbraucht war (Farbumschlag von Rot nach Gelb), wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt, daraus wurde ein Aliquot abgenommen und in einer Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde für vier Minuten bei 300 · g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Vakuumpumpe oder durch Dekantieren entfernt und das Zellpellet in frischem Medium

aufgenommen, um die für den jeweiligen Zelltyp geeignete Startkonzentration zu erreichen. Danach erfolgte die Aussaat auf neue Kulturplatten oder -flaschen.

II.2.3 Passage von adhärent wachsenden Zellen

Zur Passage adhärent wachsender Zellen (5637 und HaCaT) wurde zunächst der Zellrasen mit PBS abgespült, um tote, abgelöste Zellen zu entfernen. Die Spüllösung wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen mit dem Trypsin-Ersatz TrypLE Express behandelt. Dazu wurde ein möglichst kleines Volumen TrypLE auf die Zellen pipettiert, so dass diese gerade bedeckt waren. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ (nachfolgend: Standardbedingungen). Die Reaktion wurde mit FCS-supplementiertem Medium gestoppt, die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei Raumtemperatur und 300 · g für vier Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal unter denselben Bedingungen in PBS gewaschen und zur weiteren Verwendung wie unter II.2.1 beschrieben auf neue Flaschen ausgesät.

II.2.4 Kryokonservieren von Zellen

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurde zunächst die Zellzahl in einem Aliquot der Zellsuspension mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur und 300 · g für vier Minuten, nach dem der Überstand verworfen und die Pellets in je 1 ml vorgekühltem Einfriermedium pro $1 \cdot 10^7$ Zellen (siehe II.1) resuspendiert wurden. Die in Einfriermedium resuspendierten Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und bei -86 °C in einem Kryobehälter mit 2-Isopropanol eingefroren. Zellen, die nicht im laufenden Betrieb verwendet wurden, wurden nach etwa einer Woche in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur Verwendung gelagert.

II.3 Zellkultur: Vermehrung der eingesetzten Zelltypen

II.3.1 5637 und MUTZ-3

Für die Kultur der Zelllinie MUTZ-3 wird ein konditioniertes Medium der humanen Blasenkarzinom-Zelllinie 5637 benötigt. Die Zelllinie 5637 produziert Kolonie-stimulierende Faktoren (*colony stimulating factors* - CSF), welche für das Wachstum von MUTZ-3 unabdingbar sind [87,134–136]. Zellen der Zelllinie 5637 wurden in einer Dichte von $1 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ in RPMI-1640 mit 10 % FCS und 2 mmol/l L-Glutamin auf Gewebekulturflaschen ausgesät und bei Standardbedingungen (siehe II.2.3) bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Flaschen noch weitere drei Tage im Brutschrank belassen. Sobald das Medium einen Farbumschlag nach gelb zeigte, wurde der Überstand abgenommen, bei $200 \cdot g$ für zehn Minuten zentrifugiert und anschließend über einen $0,22\text{-}\mu\text{m}$ -Filter filtriert. Das konditionierte Medium wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und dem MUTZ-3-Medium kurz vor dessen Verwendung frisch zugesetzt.

Für die Vermehrung der humanen myelomonozytären Leukämie-Zelllinie MUTZ-3 wurde supplementiertes *alpha*-MEM mit 20 % FCS, 2 mmol/l L-Glutamin und $50 \mu\text{mol/l}$ β -Mercaptoethanol verwendet. Diesem wurden zudem 20 % konditioniertes Medium zugesetzt. Die Vermehrung erfolgte in Suspensionskultur in 24-well-Gewebekulturplatten mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert (siehe II.2.2). Das Einfrieren der Zellen für die Lagerung erfolgte wie in II.2.4 beschrieben. Die Zellen wurden bei $-86 \text{ }^\circ\text{C}$ oder für längere Zeitabschnitte in flüssigem Stickstoff gelagert.

II.3.2 THP-1, Jurkat und HaCaT

Zellen der monozytären Zelllinie THP-1 wurden in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in RPMI-1640 (+ 10 % FCS, + $50 \mu\text{mol/l}$ β -Mercaptoethanol) in 12- bis 24-well-Gewebekulturplatten gehalten (nach [137]). Die Passage erfolgte alle zwei bis drei Tage durch Aufteilen der Suspension und Zugabe von frischem Medium (siehe II.2.2). Gelagert wurden die Zellen wie in II.2.4 beschrieben.

Ebenfalls in Suspensionskultur wurden Zellen der T-Zell-Linie Jurkat kultiviert. Dazu wurden die Zellen in RPMI-1640 mit 10 % FCS und 2 mmol/L L-Glutamin in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml bei Standardbedingungen in Zellkulturflaschen für die Suspensionskultur gehalten. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert.

Die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT wurde in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² auf Gewebekulturflaschen ausgesät und bis zur Konfluenz bei Standardbedingungen inkubiert. Die Passage der Zellen erfolgte möglichst vor Erreichen der vollständigen Konfluenz, um dem durch Zell-Zell-Kontakte ausgelösten Zellzyklusarrest zuvorzukommen (siehe II.2.3).

II.4 Zellkultur: Differenzierung von MUTZ-3 zu MUTZ-LC

Zur Differenzierung Langerhans-Zellen-ähnlicher Zellen aus MUTZ-3 (MUTZ-LC) wurde das von I. J. Kosten und anderen beschriebene Protokoll [138] verwendet und im Verlauf dieser Arbeit angepasst. Zunächst wurden MUTZ-3 in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in *alpha*-MEM mit 20 % FCS, 2 mmol/l L-Glutamin und 50 µmol/l β-Mercaptoethanol, ohne konditioniertes Medium, in 12-well-Platten zu 2 ml pro Loch ausgesät. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml GM-CSF (*granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*), 10 ng/ml TGF-β1 (*transforming growth factor*) und 2,5 ng/ml TNF-α (*tumour necrosis factor*) behandelt (Herstellerinformationen siehe **Tabelle 4**) und für fünf Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zytokine in jeweils halber Konzentration zugegeben und die Zellen für weitere zwei Tage inkubiert.

Tabelle 4. Für die Differenzierung von MUTZ-3 zu MUTZ-LC verwendete rekombinante humane Zytokine mit Herstellerangaben.

Zytokin*	Marke (Vertrieb) Artikelnr.	Bemerkungen/ Anwendung
TGF-β1	invitrogen (Thermo Fisher) 14-8348-62	0,1 mg/ml verdünnt auf 10 µg/ml in 4 mM HCl + 1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin)
GM-CSF	eBioscience (Thermo Fisher) 34-8339-82	0,5 mg/ml verdünnt auf 100 µg/ml in PBS
TNF-α	eBioscience (Thermo Fisher) BMS301	10 µg gelöst in 1 ml Reinstwasser auf 10 µg/ml, aliquotiert à 50 µl, Aliquot vor der Verwendung mit 150 µl Reinstwasser verdünnt

* GM-CSF: *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*, TGF-β1: *transforming growth factor-beta*, TNF-α: *tumour necrosis factor-alpha*

Zur Charakterisierung der entstehenden Zellen wurden diese an den Tagen 3, 5 und 7 der Differenzierungskultur durchflusszytometrisch wie in den Kapiteln II.6.2 und II.6.3 beschrieben auf die Expression der folgenden Oberflächenmarker hin untersucht: CD14 (Monozytenmarker), CD86 (Reifungsmarker dendritischer Zellen), CD54 (Adhäsionsmolekül), HLA-DR (Antigenpräsentation), Langerin, CD1a, CD1c (Langerhans-Zellen und cDC), PD-L1 und AhR.

Das Protokoll wurde schließlich auf fünf Tage verkürzt und die zweite Zugabe der Zytokine entfiel, da die Zellen bereits nach dieser Zeit die gewünschten Charakteristika aufwiesen. In die Kokultur mit HaCaT (II.9.1) wurden MUTZ-LC aus dem verkürzten Protokoll eingesetzt.

II.5 Zellkultur: Blockade von *Programmed Cell Death-Ligand1* (PD-L1) mittels Antikörper

Für die Blockade des PD-L1 in Langerhans- oder monozytären Zellen wurden die Zellen mit blockierenden Anti-PD-L1-Antikörpern behandelt. Für die Verwendung in MUTZ-LC wurden verschiedene Konzentrationen von 0,05 µg/ml bis 1 µg/ml des Antikörpers getestet und für die Blockade in Kokultur A (II.9.1) zunächst 0,05 µg/ml verwendet. Da der Vertrieb

des verwendeten Antikörpers eingestellt wurde, wurde der Umstieg auf einen anderen notwendig (siehe **Tabelle 5**). Der Antikörper wurde in beiden Fällen zunächst in PBS auf eine Konzentration von 100 µg/ml gebracht. Von der Stammlösung wurden je 10 bzw. 20 µl auf 2 ml Kulturmedium gegeben, um eine Endkonzentration von 0,5 bzw. 1 µg/ml zu erhalten. Die Zellen wurden für mindestens eine Stunde unter Standardbedingungen inkubiert, bevor sie in den Kokulturen (siehe II.9.1 und II.9.2) zum Einsatz kamen. Eine Isotyp-Kontrolle wurde mitgeführt (siehe **Tabelle 5**). Die erfolgreiche Blockade des Liganden wurde nach II.6.2 durchflusszytometrisch verifiziert.

Tabelle 5. Für PD-L1-Blockade-Versuche eingesetzte Antikörper und Kontrolle mit Herstellerinformationen.

Antigen*	Klon	Isotyp	Eingesetzte Konzentrationen in µg/ml	Hersteller/ Artikelnr.
PD-L1	monoklonal aus HEK293	IgG1	0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 0,5 in Kokultur A	Biozol BYT-ORB348824-100
PD-L1	monoklonal MIH1	IgG1	1	invitrogen/Thermo Fisher 16-5983-82
IgG1	P3.6.2.8.1		1	invitrogen/Thermo Fisher 16-4714-82

*PD-L1: *Programmed Cell Death-Ligand1*, IgG: Immunglobulin G (Wirtsspezies: Maus)

II.6 Durchflusszytometrie

II.6.1 Für durchflusszytometrische Messungen verwendete Puffer und Chemikalien

In **Tabelle 6** sind die für durchflusszytometrische Arbeiten verwendeten Verbrauchsmittel zusammengestellt. Die eingesetzten spezifischen, monoklonalen Antikörper für die Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen und intrazellulären Proteinen sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

Tabelle 6. Für durchflusszytometrische Arbeiten verwendete Puffer, Chemikalien und Laborutensilien (Verbrauchsmittel), deren Hersteller und weitere Angaben.

Verbrauchsmittel	Hersteller/ Artikelnr.	Bemerkungen/ Anwendung
Isotypen	BD Biosciences	eingesetztes Volumen entsprach dem des spezifischen Antikörpers (siehe Tabelle 7)
IgG1 PE	555749	
IgG2a FITC	555573	
IgG2a PE	555574	
IgG2b PE	555743	
IgG1 FITC	eBioscience (Thermo Fisher) P3.6.2.8.1	
Fixierungspuffer	eBioscience (Thermo Fisher) 88-8824	zur Fixierung von Zellen für die Bestimmung der Expression intrazellulärer Proteine zusammen mit Permeabilisierungspuffer (s.u.)
10 x Permeabilisierungspuffer	eBioscience (Thermo Fisher) 88-8824	Arbeitsverdünnung: 2 ml Puffer auf 18 ml Reinstwasser
5 ml Polystyrol Röhren	Falcon (Thermo Fisher) 14-959-6	im Text als FACS-Röhren bezeichnet
BD FACSCFlow	Becton Dickinson 342003	Trägerflüssigkeit für das Durchflusszytometer
BD Calibrite Beads	Becton Dickinson 340486	Kalibrierungsbeads für das FACSCalibur Durchflusszytometer, 3-Farben-Set

II.6.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen

Zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen wurden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen die jeweiligen Antigene gefärbt (Auflistung der verwendeten Antikörper in **Tabelle 7**). Dazu wurde die Zellsuspension aus der Kulturplatte in FACS-Röhren überführt und für fünf Minuten bei 300 · g und RT

zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen oder für spätere Zytokinbestimmungen in Eppendorf-Gefäße überführt und bei -20 °C eingefroren. Das Pellet wurde in je 2 ml PBS aufgenommen und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals dekantiert und verworfen und das Pellet in 1 ml 10 % FCS in PBS resuspendiert. Waren die Zellen zur Stimulation mit Anti-CD3/CD28-Beads behandelt worden, wurden diese nun entfernt. Dazu wurden die Zellpellets resuspendiert und die Röhrchen auf einen Magneten gestellt, nach ca. 30 Sekunden wurde der Überstand vorsichtig in neue Röhrchen abpipettiert und die magnetischen Beads blieben zurück. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit anschließendem Verwerfen des Überstands. Das so erhaltene Zellpellet wurde nunmehr in 100 µl 10 % FCS in PBS resuspendiert und mit Antikörpern (Volumina siehe **Tabelle 7**) versetzt. Dabei wurden nur Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- und Phycoerythrin (PE)-gekoppelte Antikörper gegen Antigene kombiniert, die sich aufgrund ihrer Expressionen und damit Fluoreszenzintensitäten gut gegeneinander kompensieren ließen (etwa: CD86-PE/CD14-FITC). Wenn Mehrfachfärbungen erfolgten, wurden zusätzlich Isotyp-Kontrollen mit den entsprechenden Isotyp-Antikörpern (siehe **Tabelle 7** für nähere Informationen) versetzt, wobei gleiche Volumina wie für die jeweiligen spezifischen Antikörper eingesetzt wurden. Ungefärbte Proben wurden als Kontrollen mitgeführt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 bis 60 Minuten bei 4 °C. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal in je 1 ml 10 % FCS in PBS gewaschen wie oben beschrieben und zuletzt in 0,5 ml PBS aufgenommen. Für eine gleichzeitige Viabilitätsbestimmung wurden 5 µl 7-AAD-Lösung (7-Aminoactinomycin D, ein DNA-interkalierender Farbstoff) zugegeben.

Für die Einzelbestimmung der Viabilität mit 7-AAD (z.B. für die HPRT-Kontrollen des Knockout-Protokolls, siehe II.7.1 und II.7.3) wurde das Zellpellet nach der ersten Zentrifugation mit 10 % FCS in PBS direkt in 500 µl PBS aufgenommen und mit 5 µl 7-AAD-Lösung versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei RT erfolgte die Messung.

Tabelle 7. Übersicht über durchflusszytometrisch bestimmte Oberflächenantigene mit den verwendeten gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen sowie deren Hersteller, die entsprechenden Isotyp-Kontrollen und das für eine Probe eingesetzte Volumen. Wirtsspezies aller rekombinanten Antikörper war die Maus.

Antigen*	Farbstoff**	Klon	Isotyp°	Eingesetztes Volumen in µl pro 1 · 10 ⁶ Zellen	Hersteller/ Artikelnr.
CD86	PE	IT2.2	IgG2b	MUTZ-LC: 2,5 THP-1: 5	eBioscience 12-0869-42
CD54	PE/ FITC	HA58/ RR1/1	IgG1 IgG1	2,5 MUTZ-LC: 2,5 THP-1: 5	eBioscience 12-0549-42/ BMS108FI
CD14	FITC	61D3	IgG1	5	eBioscience 11-0149-42
Langerin	FITC	MB22- 9F5	IgG1	2,5	Miltenyi 130-098-349
CD1a	PE	HI149	IgG1	2,5	eBioscience 12-0019-42
CD1c	PE	L161	IgG1	2,5	eBioscience 12-0015-42
PD-L1	PE	MIH1	IgG1	5	eBioscience 12-5983-42
HLA-DR	FITC	L243	IgG2a	5	eBioscience 11-9952-42
CD3	PE	Hit3a	IgG2a	5	PeptoTech 05111-60- 100
Viabilität	7-AAD			5	eBioscience 00-6993-50

*CD: *cluster of differentiation*, PD-L1: *programmed death-ligand 1*, HLA-DR: Humanes Leukozytenantigen DR-Isotyp; **PE: Phycoerythrin, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, 7-AAD: 7-Aminoactinomycin D; °IgG: Immunglobulin G

Die Messung der Fluoreszenzintensität der an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe bzw. des Totfarbstoffs 7-AAD wurde an einem FACSCalibur Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson vorgenommen. Überlappungen in den Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe wurden mittels geeigneter Isotyp-Kontrollen und Einzelfärbungen (Kompensationskontrollen) unter Verwendung der Software CellQuest Pro 5.2.1 manuell

kompensiert und die Einstellungen für die einzelnen Zelltypen individuell vorgenommen und gespeichert (Genauerer dazu siehe II.6.4 und II.6.5).

II.6.3 Durchflusszytometrische Bestimmung intrazellulär exprimierter Proteine

Die Expression des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR) und des Mitose-anzeigenden Proteins Ki-67 wurde mittels intrazellulärer Färbung mit den entsprechenden Antikörpern (anti-AhR und anti-Ki-67) durchflusszytometrisch bestimmt. Für die gleichzeitige Messung der Viabilität bei der intrazellulären Färbung wurde ein fixierbarer Totfarbstoff (*fixable viability dye* – FVD) eingesetzt. Die verwendeten Antikörper und der Farbstoff sind in **Tabelle 8** aufgelistet.

Tabelle 8. Übersicht über durchflusszytometrisch bestimmte intrazelluläre Antigene mit den verwendeten gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen sowie deren Hersteller, die entsprechenden Isotyp-Kontrollen und das für eine Probe eingesetzte Volumen. Wirtsspezies: Maus (AhR) oder Ratte (Ki-67).

Antigen*	Farbstoff**	Klon	Isotyp	Eingesetztes Volumen in μl pro $1 \cdot 10^6$ Zellen	Hersteller/ Artikelnr.
AhR	PE	F3399	IgG2b	5	eBioscience 12-9854-42
Ki-67	FITC	SolA15	IgG2a	0,5	eBioscience 11-5698-82
Viabilität	Fixable Viability Dye eFluor 520			1	eBioscience 65-0867-14

*AhR: Arylhydrocarbon-Rezeptor, Ki-67: Kiel-67; **PE: Phycoerythrin, FITC: Fluoresceinisothiocyanat

Die Zellsuspensionen aus der Zellkultur wurden in FACS-Röhrchen überführt, für fünf Minuten bei RT und $300 \cdot g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen oder für eine spätere Zytokinbestimmung in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die Zellen wurden je einmal in 2 ml 10 % FCS in PBS und in 1 ml PBS gewaschen, d.h.

resuspendiert, für fünf Minuten bei 300 · g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Wurde eine Viabilitätsfärbung durchgeführt, wurden an dieser Stelle 1 ml PBS und 1 µl FVD zugefügt und die Proben für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann der Überstand abzentrifugiert und verworfen. Danach wurden das Zellpellet kurz mittels Vortexmischer aufgelockert und 100 µl Fixierpuffer (siehe **Tabelle 6**) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer (im Folgenden: Perm-Puffer, siehe **Tabelle 6**) zugeben und die Suspension bei 300 · g und RT für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein zweiter Waschschrift unter gleichen Bedingungen angeschlossen. Dann wurde das Pellet in 100 µl Perm-Puffer resuspendiert und der Antikörper hinzugegeben. Ungefärbte Proben dienten als Kontrollen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von erneut 20 Minuten bei RT wurden die Zellen in 2 ml Perm-Puffer und anschließend in 2 ml 10 % FCS in PBS wie oben gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl PBS erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensitäten am Durchflusszytometer.

II.6.4 Einstellung des Durchflusszytometers

Vor Beginn der Arbeiten am Durchflusszytometer erfolgte eine technische Wartung und Kalibrierung des Geräts durch den medizintechnischen Dienst der Charité. Die Kalibrierung mittels Calibrite-Beads (siehe II.6.1) wurde anschließend einmal jährlich nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für jede Messung wurden Isotyp-Kontrollen und ungefärbte Kontrollen mitgeführt. Wurden die Proben Mehrfachfärbungen unterzogen, wurden außerdem Einzelfärbungen als Kontrollen verwendet. Zunächst wurde die ungefärbte Kontrolle zur Grundeinstellung und Bestimmung der Eigenfluoreszenz der zu messenden Zellen verwendet. Dabei wurden die Einstellungen für die Verstärkung der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (*forward scatter* - FSC und *side scatter* - SSC) so gewählt, dass die zu betrachtenden Zellpopulationen im Scatterplot mittig zu sehen waren. Die Zellpopulation für die Anzeige in den Fluoreszenzkanälen (FL-1 bis FL-3) wurde über Definition von Regionen ausgewählt, so dass Zelltrümmer (im Scatterplot unten links) ausgeschlossen wurden. Außerdem wurden die Einstellungen für die einzelnen Fluoreszenzkanäle so vorgenommen, dass die angezeigte Eigenfluoreszenz der Zellen als Winkelhalbierende im unteren linken Quadranten der entsprechenden grafischen *Dot-Plot*-Darstellung (zwei Parameter) erschien. Bei der

Histogramm-Darstellung von Einzelfärbungen (Zellzahl gegen Fluoreszenzintensität) wurde die Einstellung so gewählt, dass das Spektrum der ungefärbten Kontrolle ganz, aber möglichst nah an der y-Achse zu sehen war. Die Isotyp-Kontrolle wurde nun verwendet, um eine eventuelle Überlappung in den Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe mittels Kompensationskontrollen auszugleichen. Die Einstellungen wurden dann mit Hilfe der Einzelfärbungen überprüft und gegebenenfalls adjustiert. Die so vorgenommenen Einstellungen wurden für den gesamten Verlauf einer Messung für einen Zelltyp beibehalten. Von jeder Probe wurden mindestens 10.000 Zellen gemessen.

II.6.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten inklusive *Gating*-Strategie

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messdaten wurde mit WinList 3D der Firma Verity Software House vorgenommen. Dazu wurden Zwei-Parameter-Histogramme erstellt: FSC gegen SSC (Scatterplot), FL-2 gegen FL-1, FL-3 gegen FL-2 und FL-3 gegen FL-1. Wurde lediglich eine Viabilitätsprüfung durchgeführt, wurden neben dem Scatterplot ein Zwei-Parameter-Histogramm FL-3 gegen SSC und ein einfaches Histogramm für FL-3 (dabei wird die Zellzahl auf der y-Achse abgetragen) erstellt.

Die zu betrachtende Zellpopulation wurde im Scatterplot eingegrenzt (Region), so dass Zelltrümmer und übermäßig große Zellen ausgeschlossen wurden. Histogramme für die zu untersuchenden Parameter wurden auf dieses *Gate* eingestellt. Die ungefärbte Kontrolle diente zur Einstellung der Region im Scatterplot und von Quadranten in den Zwei-Parameter-Plots dergestalt, dass der untere linke Quadrant mindestens 97 % der Eigenfluoreszenzsignale enthielt. Dabei wurden rechteckige Regionen gewählt, wenn die untersuchten Antigene stark exprimiert wurden und ein an die Kontrolle anschließendes *Gate* für Antigene, die nur schwach exprimiert wurden (**Abbildung 6**). Der Plot SSC gegen FL-3 für die Viabilitätsbestimmung wurde mit Hilfe der Quadrantenfunktion in zwei Bereiche geteilt, so dass die ungefärbte Kontrolle möglichst vollständig im linken Bereich lag. In der Histogramm-Darstellung wurde der Bereich des Spektrums der ungefärbten Kontrolle, der die meisten Zellen enthielt, aus dem gesetzten *Gate* ausgeschlossen.

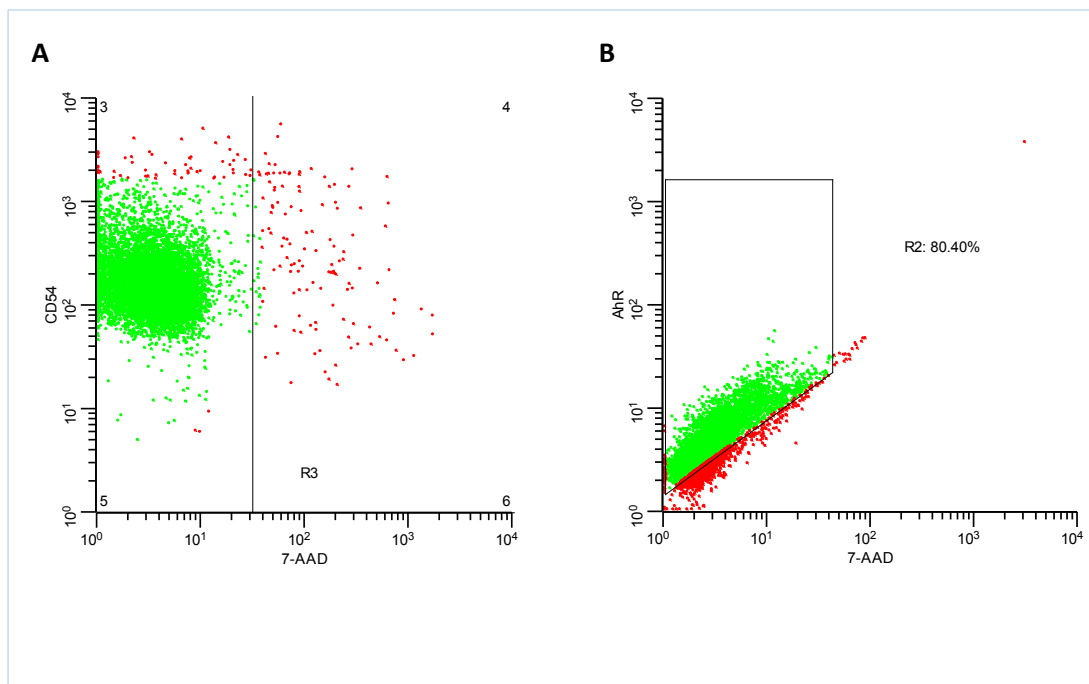


Abbildung 6. *Gating* mittels WinList 7.0 für Antigene, die stark exprimiert wurden (A) sowie Antigene, die schwach exprimiert wurden (B) am Beispiel einer durchflusszytometrischen Messung der Expression von CD54 (A) und AhR (B) in MUTZ-3.

Bei der Analyse der Proliferation von Jurkat (II.9.4) wurden zusätzliche *Gating*-Schritte notwendig, um die in der Zellpopulation ebenfalls enthaltenen monozytären Zellen auszuschließen, da diese im Scatterplot nicht von Jurkat unterscheidbar waren. Außerdem proliferieren Jurkat auch in Solokultur, so dass bei der Auswertung nur der Anteil stark proliferierender Zellen in den Proben betrachtet wurde. Dazu wurde von einer reinen Jurkat-Probe mit CD3-Einzelfärbung im Scatterplot zunächst die distinkte Zellpopulation unter Ausschluss von Zelltrümmern und zu großen Zellen ausgewählt (**Abbildung 7 A**). Diese wiederum wurde nun in einem CD3-vs-FL-3 Plot angezeigt und dort auf CD3-positive Zellen „gaget“ (**Abbildung 7 B**). Nun wurden lediglich diese CD3-positiven Zellen in einem CD3-vs-FSC-Plot ausgewählt, auf diese Weise wurden über *backgating* (also den Abgleich der jeweils in den *Gates* eingeschlossenen Zellen) nur schwach CD3-positive Zellen ausgeschlossen (grüne Punkte in **Abbildung 7 C**). Diese wurden schließlich in der Darstellung von anti-Ki-67-FITC gegen anti-CD3-PE angezeigt (**Abbildung 7 D**); so wurde sichergestellt, dass dort nur definitiv CD3-positive Zellen zu sehen waren und keine Zellen

mit nur starker Eigenfluoreszenz in diesem Kanal. Für die Ermittlung des Anteils stark proliferierender Zellen in Proben und Kontrollen wurde zusätzlich basierend auf dem *Gate* aus **Abbildung 7 D** ein Histogramm (Zellzahl vs. Ki-67) erstellt und darin zunächst mittels der Negativkontrolle (Jurkat in Solokultur) eine Region so eingestellt, dass die stark gefärbten Zellen eingeschlossen wurden (**Abbildung 7 E**). Diese Region wurde anhand der Jurkat-Positivkontrolle (Jurkat, die mit Anti-CD3/CD28-Beads stimuliert worden waren) verifiziert (**Abbildung 7 F**). Die Region wurde beibehalten und darin jeweils der Anteil stark proliferierender Zellen in den behandelten Proben abgelesen. In dieser Population wurde anhand des *Dotplots* **Abbildung 7 D** mit der Ergebnisfunktion von WinList auch die mittlere CD3-Expression auf Zellen in den doppelt gefärbten Kokultur-Proben bestimmt.

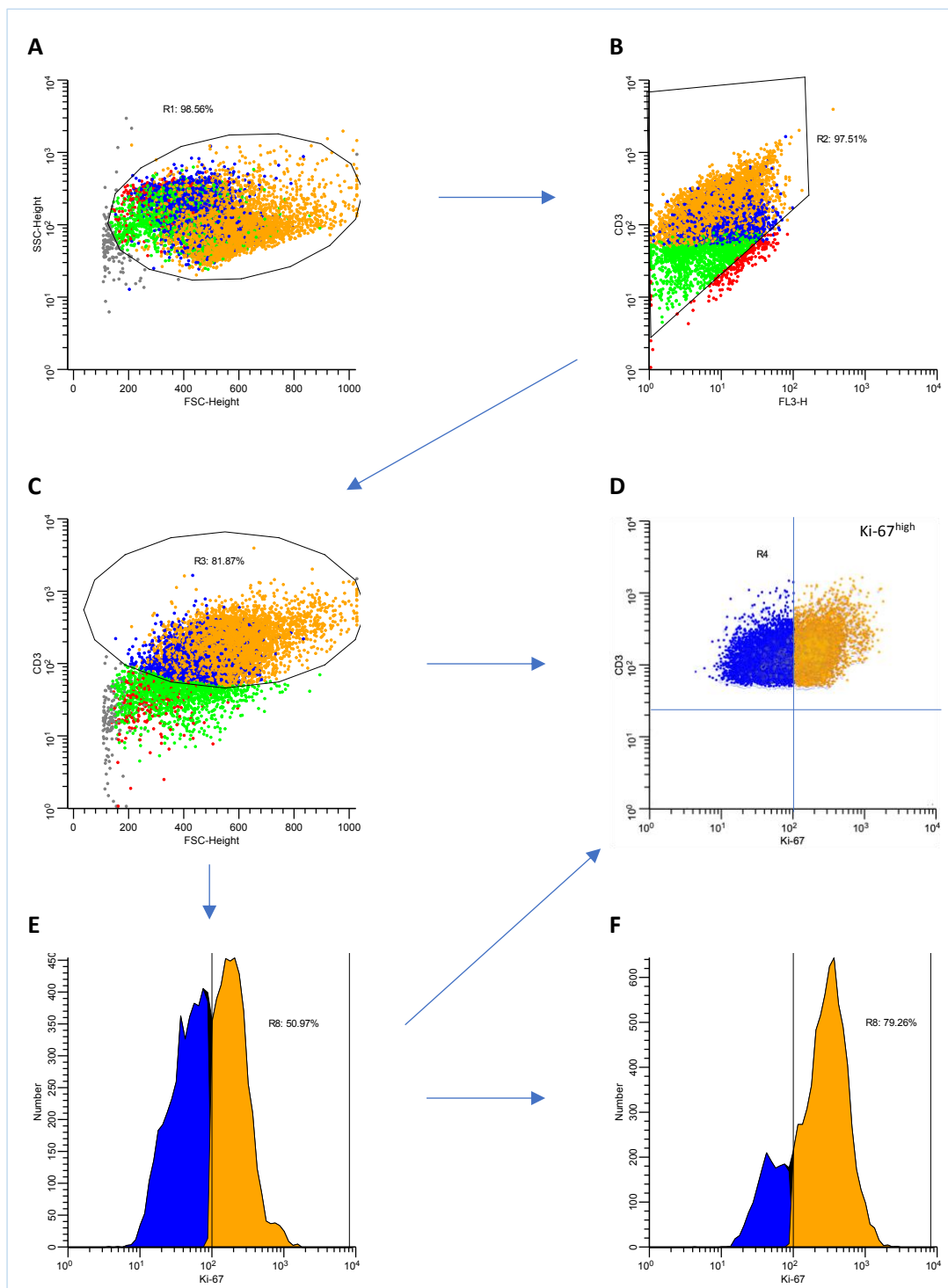


Abbildung 7. Gating-Strategie für die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung der Proliferation von Jurkat-Zellen. **A:** Ausschluss von Zelltrümmern. **B:** Gating auf CD3-positive Zellen **C:** Ausschluss CD3-negativer und schwach positiver Zellen. **D:** Darstellung CD3- und Ki-67-positiver Zellen als Dichteplot. **E:** Histogramm für die Verteilung Ki-67-positiver Zellen in einer Jurkat-Solokultur, der Anteil stark proliferierender Zellen ist orange eingefärbt. **F:** Histogramm für die Verteilung Ki-67-positiver Zellen in einer Jurkat-Kultur nach Stimulation mit Beads, der Anteil stark proliferierender Zellen ist orange eingefärbt. (Punkte in A-C sind für die Darstellung verstärkt.)

Expressionsdaten für Oberflächenantigene wurden als Prozentsatz positiver Zellen von der Zellpopulation im jeweiligen *Gate* sowie als geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) abgelesen. Für die AhR-Expression wurden mediane Fluoreszenzintensitäten abgelesen (medianFI) und Prozentzahlen notiert. Die Auswertung von Expressionsstärken erfolgte stets relativ zu unbehandelten Kontrollen, die in den Kapiteln zu einzelnen Methoden benannt sind. Relative Werte wurden nach Formel (1) berechnet:

$$(1) \text{ relative Expression} = \frac{MFI(\text{Probe})}{MFI(\text{Kontrolle})} \text{ bzw. } \frac{\text{medianFI}(\text{Probe})}{\text{medianFI}(\text{Kontrolle})}$$

Wurden Expressionsdaten auf die einer anders behandelten Kontrolle bezogen (Beispiel: Expression eines Markers auf PD-L1-blockierten Zellen bezogen auf die nicht blockierte Kontrolle), erfolgte eine Korrektur für den Effekt, der sich allein durch den Zelltyp-Wechsel ergab (im Weiteren: Nullkontrolleneffekt). Das heißt, es wurde zunächst der relative Wert für die jeweilige unbehandelte Kontrolle bezogen auf die unbehandelte Kontrolle des Vergleichszelltyps berechnet (im Beispiel: blockierte versus nicht blockierte Zellen ohne Testsubstanzbehandlung) und vom Mittelwert dieser 1 abgezogen. Das jeweilige Ergebnis wurde dann von den auf die Nullkontrolle des Vergleichszelltyps (etwa THP-1 ohne Blockade) bezogenen Werten der Testsubstanz-behandelten Proben subtrahiert. Dadurch konnte der Effekt berechnet werden, der durch die Testsubstanzbehandlung induziert wurde. Führte also *sowohl* der Wechsel des Zelltyps *als auch* die Testsubstanzbehandlung zu einer Erhöhung oder Hemmung der Expression eines Markers, war der Effekt durch die Testsubstanzbehandlung geringer als die direkte Berechnung des Effektwerts bezogen auf den Kontrollzelltyp ergeben würde. Anders herum würde etwa eine Zelltyp-induzierte relative Verringerung der Expression eines Markers bei Testsubstanz-induzierter Erhöhung der Expression zu einer Erhöhung des relativen Werts für die Testsubstanz-behandelten Proben führen. Die grafische Darstellung der so erhaltenen Werte erfolgte mit GraphPad Prism.

II.7 AhR-Knockout in MUTZ-3 und THP-1 mittels CRISPR/Cas9-Technologie

II.7.1 Etablierung des Knockout-Protokolls

Da die CRISPR/Cas9-Technologie neu in der Arbeitsgruppe etabliert wurde, sind verschiedene Ansätze verfolgt worden, die sich in der Menge der eingesetzten Reagenzien und Länge der Inkubationszeiten unterschieden. Im Folgenden soll der Ansatz beschrieben werden, aus dem Knockout-Populationen gewonnen wurden, die im weiteren Verlauf der Arbeiten eingesetzt werden konnten. Die verwendeten Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien sind in **Tabelle 9** aufgelistet.

Tabelle 9. Für die Durchführung von molekularbiologischen Arbeiten verwendete Puffer, Chemikalien und Laborutensilien (Verbrauchsmittel), deren Hersteller und weitere Angaben.

Verbrauchsmittel	Hersteller/ Artikelnr.	Bemerkungen/ Anwendung
TE Puffer	Thermo Fisher AM9849	pH 8,0 zum Rekonstituieren der <i>guideRNAs</i>
sgRNA	Thermo Fisher A35511 (AhR) A35524 (HPRT)	<i>single guide</i> RNA, je 3 nmol für Details siehe Tabelle 10
TrueCut Cas9 Protein v2	Invitrogen/ Thermo Fisher A36498	5 µg/ml
Lipofectamine und Cas9 Plus	Invitrogen/ Thermo Fisher CMAX00003	Lipofectamine CRISPRMAX Cas9- Transfektionsreagenz, enthält 0,3 ml Lipofectamine und 0,5 ml Cas9 Plus Reagenz
Opti-MEM I Medium	Thermo Fisher 31985062	serumreduziertes Medium

Tabelle 10. Sequenzen der für den CRISPR/Ca9-vermittelten AhR-Knockout verwendeten *single guide* (sg)RNAs.

sgRNA: Hersteller-ID	PAM-Sequenz*	Ziel-DNA-Sequenz
A: CRISPR980378_SGM	AGG	CGGTCTCTATGCCGCTTGGGA
B: CRISPR980411_SGM	AGG	GTAAAGCCAATCCCAGCTGA
C: CRISPR980385_SGM	CGG	GGTCCAACCTCTGTATTAAGT
D: CRISPR980382_SGM	GGG	GGCCTCCGTTTCTTTCAGTA

*PAM: *protospacer adjacent motif*

Am Tag vor Zugabe der molekularbiologischen Reagenzien (Tag 0) wurden THP-1 in einer Zellzahl von $1 \cdot 10^4$ Zellen in 100 μ l Opti-MEM pro Loch in 96-well-Rundbodenplatten (TPP) ausgesät. Zellen der Linie MUTZ-3 wurden erst am Tag 1 zu $2 \cdot 10^4$ Zellen in 100 μ l Opti-MEM pro Loch in 96-well-Rundbodenplatten ausgesät.

An Tag 1 wurden zwei Eppendorf-Gefäße mit folgenden Reagenzmengen pro Loch vorbereitet:

Gefäß 1:	Gefäß 2:
5 μ l Opti-MEM, 0,08 μ l (\cong 400 ng) Cas9-Protein, 0,024 μ l (\cong 2,4 pmol) sgRNA, 0,8 μ l Cas9 Plus	5 μ l Opti-MEM, 0,3 μ l Lipofectamine

Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurden die beiden Reagenzienmischungen zusammengeführt und nochmals 15 Minuten bei RT inkubiert. Der so entstandene Transfektions-Komplex wurde nun zu je 10 μ l pro Loch zu den vorbereiteten Zellen gegeben. Es folgte eine zweitägige Inkubationszeit unter Standardbedingungen. Es wurden vier verschiedene *guideRNAs* für das AhR-Gen getestet (siehe **Tabelle 9**).

Aliquots von je mindestens $5 \cdot 10^4$ Zellen wurden für die Überprüfung der Editierungseffizienz mit dem *Cleavage Detection Assay* (siehe II.7.2) abgenommen, in PBS gewaschen, der Überstand abgenommen und das Zellpellet bei -80°C eingefroren. Die restlichen Zellen wurden in ihr jeweiliges Wachstumsmedium überführt und nach drei bis fünf Passagen das erste Mal durchflusszytometrisch auf die Expression des AhR hin überprüft (nach II.6.3).

II.7.2 *Genomic Cleavage Detection Kit* – Überprüfung der Editierungseffizienz

Zur Verifizierung der DNA-Spaltung, die mittels CRISPR/Cas9-Methode erzielt wurde, wurde das vom Hersteller empfohlene *GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit* verwendet. Die dazu benötigten Puffer und Reagenzien sind in **Tabelle 11** zusammengestellt.

Tabelle 11. Puffer, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die für den *Cleavage Detection Assay* (Artikelnr. A24372) verwendet wurden. Die Reagenzien und Puffer waren zum Großteil im Assay-Kit des Herstellers (Thermo Fisher) enthalten, Primer und RNase-freies Wasser wurden ebenfalls von Thermo Fischer bezogen.

Verbrauchsmittel	Artikelnr.	Bemerkungen/ Anwendung
<i>GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit:</i>	A24372	
Zellyse-Puffer		1 ml im Kit, 50 μl pro Probe
<i>Protein Degradier</i>		96 μl im Kit, 2 μl pro Probe
AmpliTaq Gold 360 Mastermix		1 ml im Kit, 25 μl pro Probe
Detektionsenzym		20 μl im Kit, 1 μl pro Probe
10 x Reaktionspuffer		40 μl im Kit, 1 μl pro Probe
Kontroll-Templates und -Primer		10 μl Mix im Kit, 1 μl für PCR-Kontrolle
RNase-freies Wasser	AM9914G	1,75 ml
HPRT1 Primerpaar	A15629/-30	Arbeitskonzentration: 10 $\mu\text{mol/l}$ in RNase-freiem Wasser,

		ID: HS00470570_CE
AhR Primerpaar	A15629/-30	Arbeitskonzentration: 10 µmol/l in RNase-freiem Wasser,
		ID: HS00284447_CE
E-Gel EX 2 % Agarosegele	G4010-02	vorgegossene Gelkartuschen für die Verwendung mit dem E-Gel Power Snap Elektrophoresegerät
PCR-Röhrchen	Biozym Diagnostik GmbH: 710900	0,2 ml, gammasterilisiert

Das Protokoll des Herstellers [139] wurde weitgehend befolgt und wird hier kurz mit Hinweis auf vorgenommene Änderungen zusammengefasst. Das zuvor eingefrorene Zellpellet wurde zunächst lysiert und die enthaltene DNA extrahiert. Dazu wurden jeweils mit 50 µl Zelllyse-Puffer und 2 µl *Protein Degradier* pro Probe vermengt und anschließend jede Probe in 50 µl der Mischung resuspendiert und in ein PCR-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einen Thermocycler (T Personal, biometra) gestellt und das vom Hersteller vorgegebene Programm ausgeführt. Die lysierten Proben wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Je 2 oder 2,1 µl Zelllysat aus geneditieren THP-1 und MUTZ-3 (2,1 µl für die Proben CCM-A, -B und -D) wurden wie in **Tabelle 11** angegeben mit 25 µl AmpliTaq Gold Mastermix und 1 µl Vorwärts-/Rückwärts-Primer-Gemisch (je 10 µmol/l) versetzt und anschließend mit RNase-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR-Kontrollen setzten sich aus 24 µl RNase-freiem Wasser, 1 µl Kontroll-Template/Primer-Mix und 25 µl AmpliTaq Gold Mastermix zusammen. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler laut Angaben im Herstellerprotokoll. Danach wurden die Proben erneut bei -20 °C gelagert.

Als nächster Schritt wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese verifiziert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Geltaschen mit je 5 µl PCR-Produkt mit 15 µl RNase-freiem Wasser beladen (statt 3 + 10 µl), da für die eingesetzten Gelkartuschen laut Hersteller 20 µl Beladevolumen ideal sind. Als Kontrolle dienten 20 µl RNase-freies Wasser. Die Standard-Einstellungen des Elektrophorese-Geräts (siehe **Tabelle 11**) für 2 % Agarosegele wurden verwendet. Ein PCR-Produkt galt als verifiziert, wenn es eine einzelne deutliche Bande auf Höhe der Bande für die PCR-Kontrolle produzierte.

Verifizierte PCR-Produkte wurden im weiteren Schritt der Reaktion für Denaturierung und Hybridisierung unterzogen, wobei je 1 oder 3 μl PCR-Produkt pro Reaktionsansatz verwendet wurden, je nachdem, wie stark die Banden im Verifizierungsschritt ausgebildet waren. So wurde für die editierten THP-1 (CCT)-Proben Nullkontrolle (NK) mit HPRT-Primer, Positivkontrolle (PK, hier: HPRT-Kontrolle aus der Genomeditierung, s. II.7.1), AhR-A und -D und die entsprechende PCR-Kontrolle sowie für die editierten MUTZ-3 (CCM)-Proben NK mit HPRT-Primer, PK und PCR-Kontrolle je 1 μl eingesetzt und für alle weiteren Proben 3 μl PCR-Produkt. Die Proben wurden in Duplikaten in PCR-Röhrchen mit je 1 μl 10 x Reaktionspuffer (siehe **Tabelle 11**) versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 9 μl aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit den vom Hersteller vorgegebenen Parametern im Thermocycler durchgeführt. Hiernach wurden die Proben wieder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Als letzter Schritt erfolgte der Enzymverdau und eine anschließende Gelelektrophorese, um die Spaltprodukte sichtbar zu machen. Dazu wurde je ein Duplikat der Proben mit 1 μl Detektionsenzym und das andere Duplikat als Enzymkontrolle mit 1 μl RNase-freiem Wasser versetzt. Danach wurden die Proben für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermocycler inkubiert. Die Proben wurden mit 10 μl RNase-freiem Wasser gemischt, das gesamte Volumen in die Taschen eines 2 % Agarosegels pipettiert und die Gelelektrophorese mit Standardeinstellungen durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Bio1D der Firma Vilber Lourmat. Dabei wurden die quantifizierbaren Banden automatisch festgelegt; Verunreinigungen im Gel sowie Fotoartefakte wurden manuell von der Auswertung ausgeschlossen. Anhand der prozentualen Anteile der optischen Dichten (OD) der Spaltproduktbanden wurde die Editierungseffizienz mittels Formel (2) ermittelt:

$$(2) \quad \textit{Editierungseffizienz} = 1 - \left((1 - \sum OD \textit{ Spaltbanden})^{\frac{1}{2}} \right).$$

Zur Auswertung wurden ausgehend vom Bandenprofil der PCR-Kontrolle nur Banden eingeschlossen, deren Höhe mindestens 33 % des Mutterpeaks betrug, und die sich im Profil der optischen Dichte deutlich von der Umgebung abhoben.

II.7.3 Überprüfung des Editierungserfolgs bei HPRT-Kontrollen mittels 6-Thioguanin-Behandlung

Eine zusätzliche Überprüfung des Editierungserfolgs in den HPRT-Kontrollen aus dem Knockout-Protokoll erfolgte mittels Behandlung mit 6-Thioguanin (6-TG; Sigma-Aldrich, A488-2), das für HPRT-positive Zellen zytotoxisch ist. Dazu wurden Aliquots aus den Proliferationskulturen nach dem Knockout-Protokoll in 24-well-Gewebekultur-Platten ausgesät und mit 10 µg/ml 6-TG behandelt. Nicht editierte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurde die Viabilität der Zellpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe II.6) und die Viabilität der Zellen aus editierten Populationen mit der der Kontrollen verglichen.

II.7.4 Selektionsprotokoll für AhR-defiziente Zellen

Da AhR-positive Zellen einen Wachstumsvorteil aufwiesen und sich in der Kultur schneller vermehrten als AhR-defiziente, wurde zum Erhalt experimentell geeigneter Prozentsätze AhR-defizienter Zellen in der Population ein Selektionsprotokoll entwickelt. Dazu wurden Ansätze geneditierter Zellen mit jeweils 100 µmol/l Dibutylphthalat (DBP) in DMSO (beides Merck) behandelt und für mindestens drei Tage bei Standardbedingungen inkubiert. Dabei war eine homogene Verteilung des schwerlöslichen Phthalats zu beachten, das mit dem wässrigen Kulturmedium lediglich eine Emulsion bildet.

Danach wurden die Zellen, die den Apoptosemarker Phosphatidylserin exprimierten, magnetisch depletiert. Dazu wurde das Annexin V MACS (*magnetic cell sorting*) Kit der Firma Miltenyi Biotec (Artikelnr. 130-090-201) verwendet. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das auf der Zelloberfläche früh-apoptotischer Zellen erscheint. Auch hierbei wurde das entsprechende Herstellerprotokoll [140] befolgt; die verwendeten Reagenzien waren im Kit enthalten, Standardlaborwaren sind im Anhang aufgelistet. Je nach eingesetzter Zellzahl wurden MS (Artikelnr. 130-042-201) oder LS Säulen (Artikelnr. 130-042-401) und die entsprechenden OctoMACS (MS Säulen) bzw. QuadroMACS (LS Säulen) Magnete verwendet.

Die Zellsuspensionen wurden zunächst bei 300 · g für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in je 80 µl MACS-Puffer pro 1 · 10⁷ Zellen resuspendiert. Dazu wurden 20 µl Annexin V Microbeads pro 1 · 10⁷ Zellen pipettiert. Die

Suspension wurde für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^7$ Zellen gewaschen und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und bis zu $1 \cdot 10^8$ Zellen in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen.

Die Säulen wurden in den Magneten eingesetzt und mit je 500 μ l (MS) oder 3 ml (LS) MACS-Puffer konditioniert. Dann wurde die Zellsuspension aufgetragen und das Eluat aufgefangen. Die Säulen wurden viermal mit dem entsprechenden Volumen MACS-Puffer gespült und das Eluat ebenfalls aufgefangen. Im Eluat befanden sich nun die nicht markierten, also nicht apoptotischen Zellen. Ein Aliquot der Zellen wurde abgenommen und die Expression des AhR in der selektierten Population wie in II.6.3 beschrieben durchflusszytometrisch überprüft. Die Zellen wurden dann weiter in Selektionsmedium kultiviert oder in die HaCaT-Kokultur (II.9.3) eingesetzt.

II.8 Immunchemische Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturmedien: ELISA und Multiplex-Assay

II.8.1 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Für die Bestimmung der Konzentration einzelner Zytokine im Kulturmedium wurden DuoSet ELISA Kits der Firma R&D Systems verwendet. Die benötigten Puffer und Lösungen wurden nach Herstellerangaben aus vorgefertigten Stammlösungen (*Ancillary Kit*) hergestellt. Die verwendeten Verbrauchsmittel sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die entsprechenden Antikörper („Fang-Antikörper“ – *capture antibody* und biotinylierter Detektionsantikörper) und Standards wurden laut Herstellerprotokoll in PBS oder Reagenzpuffer gelöst und aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Aus den Stammlösungen wurden die jeweils benötigten Arbeitskonzentrationen kurz vor Einsatz im Assay verdünnt. Dabei wurden für eine 96-well-Platte jeweils 10 ml der Arbeitslösung hergestellt und diese mit Hilfe einer Multipette Pipettierhilfe in die Löcher gegeben.

Tabelle 12. Für die Durchführung von ELISAs verwendete Puffer, Chemikalien und Laborutensilien (Verbrauchsmittel), deren Hersteller und weitere Angaben.

Verbrauchsmittel	Hersteller/ Artikelnr.	Bemerkungen/ Anwendung
MaxiSorp Flachboden 96-well-Platten	nunc/ Thermo Fisher 44-2404-21	
DuoSet ELISA <i>Ancillary Reagent Kit</i> 1 und 2	R&D Systems DY007/ DY008	enthalten 25 x Waschpuffer-Konzentrat, Farbreagenzien (H ₂ O ₂ + TMB*), Reagenzpufferkonzentrat, Blockpuffer (proteinreicher Puffer), Stopplösung (2N H ₂ SO ₄), PBS, Abdeckfolien und ELISA-Platten
DuoSet ELISA human CXCL8/IL-8	R&D Systems DY208	für Überstände aus Kokultur B
DuoSet ELISA human IL-17	R&D Systems DY317	für Überstände aus Kokultur C
DuoSet ELISA human IL-2	R&D Systems DY202	für Überstände aus Kokultur C

*TMB: 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin

Am Tag vor der Durchführung des Assays wurde eine MaxiSorp Flachboden-Multiwellplatte mit dem Fang-Antikörper beschichtet, indem dieser mit PBS auf die Arbeitskonzentration verdünnt und zu je 100 µl in die einzelnen Löcher pipettiert wurde. Die Platte wurde über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst überschüssiger, nicht gebundener Antikörper mit Waschpuffer (siehe Tabelle 12) abgewaschen. Dazu wurden etwa 400 µl Waschpuffer pro Loch aus einer Spritzflasche auf die Platte gegeben, der Überstand dekantiert und die Platte auf einem Laborpapiertuch ausgeschlagen. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal durchgeführt und dabei darauf geachtet, dass die Löcher nach Abschluss trocken waren. Nun wurden je 300 µl proteinreicher Blockpuffer in die Löcher gegeben und die Platte für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurden die Standardreihe vorbereitet und die Proben bei RT aufgetaut. Für die Standardreihe wurde zunächst die Standard-Stammlösung (das zu bestimmende Zytokin in bekannter Konzentration) mit Reagenzpuffer auf die höchste im

Material und Methoden

Assay eingesetzte Konzentration verdünnt. Nun wurde eine siebenstufige Verdünnungsreihe angelegt. Dazu wurde in sechs Eppendorf-Gefäßen je 250 µl Reagenzpuffer vorgelegt und dann durch Zugabe von jeweils 250 µl der nächsthöheren Konzentration die nächste Konzentrationsstufe hergestellt.

Nach der Inkubationszeit wurde die Platte wie oben beschrieben gewaschen. Als nächstes wurden je 100 µl der Standardreihe und Proben in Duplikaten pipettiert. Reagenzpuffer diente als Leerwertkontrolle. Dem schloss sich eine weitere einstündige Inkubationszeit bei RT an.

Auch der biotinylierte Detektionsantikörper wurde in Reagenzpuffer auf die im Herstellerprotokoll angegebene Arbeitskonzentration verdünnt und nach abermaligem Waschen der Platte zu je 100 µl pro Loch pipettiert, gefolgt von einer weiteren einstündigen Inkubationszeit bei RT. Die Platte wurde erneut gewaschen und anschließend mit 100 µl Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung pro Loch bestückt.

Nach einer zwanzigminütigen Inkubationszeit bei RT wurde die Platte gewaschen und danach das Farbregenz (eine 1:1-Mischung aus Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin) zu 100 µl pro Loch zugegeben. Während der anschließenden etwa zwanzigminütigen Inkubationszeit im Dunkeln wurde der Farbumschlag der Standardreihe von farblos nach blau beobachtet und bei minimaler Blaufärbung der Standardlösung mit der niedrigsten eingesetzten Konzentration die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N Schwefelsäure gestoppt.

Die optische Dichte wurde an einem Plattenphotometer bei 450 nm bestimmt (Subtraktionsmodus mit Referenzwellenlänge 570 nm). Eine 4-Parameter logistische Regression der optischen Dichten der Standardreihe aufgetragen gegen die bekannten Konzentrationen diente als Standardkurve, auf die die optischen Dichten der Proben bezogen wurden. Die Berechnung und Ausgabe der entsprechenden Zytokinkonzentrationen in den gemessenen Proben erfolgte mit dem Programm Microplate Manager 6.1.

II.8.2 Multiplex-Analyse von T-Zell-Zytokinen

Für die Bestimmung der ins Medium der Kokultur aus aktivierten monozytären Zellen und T-Zellen (Jurkat) sezernierten Zytokine wurde das Milliplex®-System der Firma

Millipore (Merck) mit dem MagPix®-Analysegerät verwendet. Zunächst wurde zur Ermittlung der in der Kokultur detektierbaren Zytokine ein Kit mit 21 T-Zell-assoziierten Zytokinen (Katalognummer: HSTCMAG28SPMX21) eingesetzt. Für weitere Messungen wurden Kits individuell zusammengestellt (mit den Zytokinen MIP-1 β , MIP-3 α , TNF- α , IL-8). Die benötigten Puffer waren in den Assaykits enthalten und sind daher nicht gesondert aufgeführt. Das Protokoll des Herstellers [141] wurde befolgt und soll hier kurz zusammengefasst werden.

Beim Multiplex-Verfahren werden farbcodierte Mikrosphären (*Beads*) verwendet, die mit spezifischen Antikörpern für die zu detektierenden Zytokine beschichtet sind. Nach Bindung des Antigens werden auch hier biotinylierte Detektionsantikörper eingesetzt und diese mit Hilfe von Streptavidin-gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht. Auf diese Weise wird das Prinzip des klassischen ELISA auf jeder Mikrosphäre angewandt. Im Analysegerät werden die Mikrosphären mittels lichtsensibler photoelektrischer Sensoren einzeln identifiziert. So können in einer Probe gleichzeitig mehrere verschiedene Antigene nachgewiesen werden. Mitgeführte Standards bekannter Konzentration dienen ebenfalls wie beim ELISA zur Rückrechnung auf die Konzentration der zu bestimmenden Analyten.

Für das Verfahren wurden vorgefertigte 96-well-Platten verwendet. Diese wurden in einem ersten Schritt mit 200 μ l Waschpuffer befüllt und für zehn Minuten auf einem Plattenschüttler bei RT inkubiert. Nach Dekantieren der Flüssigkeit wurden die Löcher durch Ausschlagen auf Laborpapiertüchern getrocknet. Danach erfolgte die Zugabe von entsprechend verdünnten Standards und Qualitätskontrollen. Kulturmedium diente als Leerwert-Kontrolle. Lediglich 25 μ l Probenmedium pro Replikat wurden benötigt, was ein weiterer Vorteil gegenüber dem klassischen ELISA ist. Die Proben wurden auf der Platte mit 25 μ l Puffer verdünnt, was bei der Berechnung der gemessenen Konzentrationen berücksichtigt werden musste. Nun wurden die vorgemischten Mikrosphären zugegeben, die Platte abgedeckt und in Folie eingewickelt und zur Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einen Plattenschüttler gestellt.

Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit je 200 μ l Waschpuffer gewaschen, wobei die Platte auf einem Magneten fixiert wurde, um die magnetischen Mikrosphären zurückzuhalten. Nach Zugabe der Detektionsantikörper folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bei RT, wonach ohne Waschschrift Streptavidin-Phycoerythrin zugegeben wurde. Dem schloss sich eine weitere Inkubation bei RT für 30 Minuten im Dunkeln an. Nach

dieser wurde die Platte erneut auf dem Magneten fixiert und wie oben gewaschen. Es folgte die Zugabe der Trägerflüssigkeit für das Messgerät und die Messung der medianen Fluoreszenzintensität. Die Standardreihe wurde als 5-Parameter logistische Regression ausgewertet und zur Ermittlung der Konzentrationen an Analyten in den Proben verwendet. Die Endkonzentrationen in Proben ergaben sich nach Multiplikation mit Zwei, um dem Verdünnungsschritt beim Auftragen der Proben auf die Platte Rechnung zu tragen. Die so berechneten Zytokinkonzentrationen wurden auf das Probenvolumen abzüglich des aus der Kokultur B zugegebenen Volumens normiert, um der leicht unterschiedlichen Verdünnung des Jurkat-Mediums mit bereits zytokinhaltigem Medium Rechnung zu tragen. Danach wurden Probenkonzentrationen auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

II.9 Kokulturen

II.9.1 MUTZ-LC und HaCaT (Kokultur A)

Für die Kokultur aus HaCaT-Keratinocyten und MUTZ-LC wurden zunächst MUTZ-3 wie in II.4 beschrieben über fünf Tage zu MUTZ-LC differenziert. Dabei wurden so viele 12-well-Platten angesetzt wie später in der Kokultur verwendet wurden. Auf diese Weise wurden unter Berücksichtigung einer Verdopplungszeit von knapp zwei Tagen etwa $1,4 \cdot 10^7$ MUTZ-LC pro 12-well-Platte in die Kokultur eingesetzt. Am vierten Tag der Differenzierungskultur wurden $2,5 \cdot 10^6$ HaCaT in je 12 ml DMEM pro 12-well-Platte aufgenommen und zu je einem Milliliter pro Loch ausgesät. Am fünften Tag wurde das Medium über den nun adhärent wachsenden HaCaT abgesaugt und die ausdifferenzierten MUTZ-LC gleichmäßig auf die Löcher verteilt. Die Löcher wurden mit frischem alpha-MEM auf je 2 ml aufgefüllt. Nun erfolgte bei der Hälfte der Zellen die Zugabe des PD-L1-blockierenden Antikörpers (siehe II.5). Eine Isotyp-Kontrolle wurde mitgeführt. Alle Platten wurden nun für mindestens eine Stunde unter Standardbedingungen inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen in aufsteigenden Konzentrationen (**Tabelle 13**) und Duplikaten. Die Konzentration des verwendeten Lösungsmittels im Kulturmedium betrug maximal 0,2 %. Unbehandelte Kontrollen dienten als Nullkontrollen und Isotyp-Kontrollen für die durchflusszytometrische Messung. Dem schloss sich eine weitere Inkubation über zwei Tage an. Danach wurden die schwimmenden

Zellen abgenommen und wie unter II.6.2 beschrieben durchflusszytometrisch auf den Reifungsmarker CD86 und das Adhäsionsmolekül CD54, die Expression von PD-L1 sowie ihre Viabilität hin untersucht.

Tabelle 13. Konzentrationen und Lösungsmittel der in Kokultur A eingesetzten Testsubstanzen.

Testsubstanz*	Lösungsmittel: Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$	Bezugsquelle Artikelnr.
DNCB (extremes Allergen) CAS Nr. 97-00-7	DMSO: 5, 10, 15, 20, 25	Sigma-Aldrich 138630
TNBS (starkes Allergen) CAS Nr. 2508-19-2	H ₂ O: 50, 100, 200, 500, 1000	Sigma-Aldrich P2297-10ML
MBT (moderates Allergen) CAS Nr. 149-30-4	DMSO: 250, 500, 1000	Sigma-Aldrich M330
SLS (Irritanz) CAS Nr. 1335-72-4	PBS: 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000	Sigma-Aldrich L5750

*DNCB: 2,4-Dinitrochlorbenzol, TNBS: Trinitrobenzolsulfonsäure, MBT: 2-Mercaptobenzothiazol, SLS: Natriumlaurylsulfat

Zur Ermittlung der Konzentration einer Testsubstanz, die den halbmaximalen Anstieg der CD86-Expression verursachte ($EC_{50_{\text{sens}}}$) wurde zunächst aus dem Mittelwert des maximalen Anstiegs der y-Wert des halbmaximalen Anstiegs berechnet. Für den dazugehörigen Grafenabschnitt wurde nun mittels der Funktion *linear regression* in GraphPad Prism die Geradengleichung ($y = mx + n$, mit Steigung m und y-Achsenabschnitt n) ermittelt. Aus dieser wurde dann durch Umstellung nach x (Formel (3)) die gesuchte Konzentration berechnet.

$$(3) \quad x = \frac{y-n}{m}$$

Die Zuordnung zu Sensibilisierungskategorien nach Potenz erfolgte nach [80] wie in **Tabelle 14** gezeigt.

Tabelle 14. Sensibilisierungskategorien nach [80].

EC50 _{sens} (µmol/l)	Kategorie Sensibilisierung
0 - 12.5	extrem
12.6 - 50	stark
50.1 - 100	moderat
> 100	schwach

II.9.2 Vorversuche zur Kokultur von CCT und HaCaT

Die nach II.7.1 editierten THP-1 (CCT) wurden zunächst einem Vorläufer des unter II.7.4 beschriebenen Selektionsprotokolls für AhR-defiziente Zellen unterzogen. Dabei wurden die Zellen lediglich mit 50 µmol/l DBP behandelt und es folgte keine Depletion der apoptotischen Zellen mittels MACS. Hierfür wurden die zwei Linien bezogen auf die im Knockout-Protokoll verwendete *guideRNA* ausgewählt, die über mehrere Passagen und Messungen hinweg konsistent die niedrigsten AhR-Expressionen gezeigt hatten. Die Zellen, die beim Knockout-Protokoll als unbehandelte Kontrollen mitgeführt wurden, wurden zur Kontrolle ebenfalls mit DBP behandelt und dienten als Nullkontrollen für die Kokultur. Die Zellen wurden für zwei Passagen im Selektionsmedium kultiviert, bevor sie in RPMI aufgenommen und in die Kokultur mit HaCaT eingesetzt wurden. Die verwendeten Zellzahlen entsprachen dabei denen aus Kokultur B (II.9.3). Da dies als erster Test der editierten Zellen im Kokulturmodell konzipiert war, wurde keine PD-L1-Blockade durchgeführt und als Testsubstanz nur DNCB als extremes Allergen in den Konzentrationen 10 und 15 µmol/l eingesetzt. In den anderen Punkten folgte das Protokoll den für Kokultur B beschriebenen Schritten. Nach der zweitägigen Inkubationszeit wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD86 und CD54 und die Viabilität untersucht (siehe II.6.2). Zur Auswertung wurden die Expressionsdaten auf die jeweilige Nullkontrolle der eingesetzten Linie bezogen und für die weiteren Arbeiten die Population ausgewählt, die nach Stimulation mit DNCB die höchsten Expressionen von CD86 und CD54 erzielte.

II.9.3 THP-1/CCT und HaCaT (Kokultur B)

Editierete THP-1 (CCT) wurden zunächst für mindestens drei Tage dem in II.7.4 beschriebenen Selektionsmedium gehalten. Es folgte die magnetische Depletion apoptotischer Zellen und die Expression des AhR in den Populationen wurde in einem Aliquot der magnetisch selektierten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten THP-1 durchflusszytometrisch überprüft (siehe II.6.3). Auch THP-1 und HaCaT wurden vor dem Einsatz in der Kokultur in Kultur gehalten (siehe II.3.2). Zellen der Linie HaCaT wurden zu $2,5 \cdot 10^6$ Zellen in 12 ml DMEM pro 12-well-Platte aufgenommen und zu je einem Milliliter pro Loch ausgesät. Die Platten wurden für mindestens 90 Minuten bei Standardbedingungen inkubiert und die Adhärenz der Zellen vor dem Absaugen des Mediums mikroskopisch überprüft; war diese noch nicht gegeben, wurden die Zellen für weitere 60 Minuten inkubiert. Sobald die Keratinozyten adhärent waren, wurde das Medium mittels Vakuumpumpe abgesaugt. In RPMI suspendierte THP-1 und selektierte CCT wurden zu $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Loch in je 2 ml Medium auf die adhärennten HaCaT gegeben. Jeweils die Hälfte der CCT und THP-1 wurde mit $1 \mu\text{g/ml}$ anti-PD-L1 versetzt, die andere Hälfte mit dem entsprechenden Isotypen in gleicher Konzentration (siehe II.5). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde unter Standardbedingungen wurden die Zellen mit Testsubstanzen behandelt. Dabei wurden die drei in **Tabelle 15** gelisteten Substanzen in Konzentrationen verwendet, die sich als möglichst wenig zytotoxisch und gleichzeitig aktivierend auf THP-1 ausgewirkt hatten. Unbehandelte Proben wurden als Nullkontrollen mitgeführt. Alle Ansätze erfolgten in Duplikaten.

Tabelle 15. Konzentrationen und Lösungsmittel der in Kokultur B eingesetzten Testsubstanzen. Für Herstellerangabe und CAS Nummern siehe **Tabelle 13**.

Testsubstanz*	Lösungsmittel: Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$
DNCB (extremes Allergen)	DMSO: 10
MBT (moderates Allergen)	DMSO: 200
SLS (Irritans)	PBS: 150

*DNCB: 2,4-Dinitrochlorbenzol, MBT: 2-Mercaptobenzothiazol, SLS: Natriumlaurylsulfat

Die Aktivierung und Viabilität wurde nach zwei Tagen Inkubationszeit unter Standardbedingungen in einem Aliquot der schwimmenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe II.6.2). Die Expression der Oberflächenantigene CD86 und CD54 in behandelten Proben wurde mit der auf unbehandelten, nicht modifizierten THP-1 verglichen. Dazu wurden die Expressionen von CD86 und CD54 auf Testsubstanz-behandelten und PD-L1-blockierten und/oder geneditierten Populationen für den Nullkontrolleneffekt korrigiert (siehe II.6.5). Auf diese Weise wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass bereits unbehandelte, aber genetisch veränderte oder PD-L1-blockierte Zellen sich gegenüber Wildtyp-THP-1 unterschiedlich verhielten. Außerdem wurden Kontrollproben auf die Expression von PD-L1 und AhR geprüft. Zellen mit starker Aktivierung und hoher Viabilität wurden in Kokultur C (II.9.4) eingesetzt.

II.9.4 THP-1/CCT und Jurkat (Kokultur C)

Jurkat T-Zellen wurden aus der laufenden Kultur entnommen (siehe II.2.2) und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Kulturmedium wurde bei 300 · g für vier Minuten abzentrifugiert und verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Pro Loch einer 96-well-Rundbodenplatte (TPP) wurden $2,5 \cdot 10^4$ Jurkat Zellen ausgesät. In den Ansätzen, die in Kokultur B die stärkste Aktivierung bei gleichzeitig hoher Viabilität gezeigt hatten, wurden THP-1 und CCT mittels Neubauerammer gezählt und ein Volumen, das 5.000 Zellen enthielt, wurde in je vier Löcher pro Ansatz zu den ausgesäten Jurkat gegeben, so dass maximal 11 % des Endvolumens von Kokultur C aus Kokultur B stammte. Als Negativ-Kontrollen dienten Jurkat allein und als Positiv-Kontrollen Jurkat, die mit 10 µl Anti-CD3/CD28-Beads versetzt wurden. Zum Schluss wurden alle Löcher mit RPMI auf ein Volumen von 250 µl aufgefüllt. Die Kokultur wurde für fünf Tage bei Standardbedingungen inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen aus den vier Löchern pro Ansatz zusammen in ein FACS-Röhrchen abgenommen, bei 300 · g für vier Minuten zentrifugiert und das Medium in Eppendorf-Gefäßen für die Untersuchung mittels Multiplex-Analyse (II.8.2) bei -20 °C eingefroren. Danach erfolgte die Oberflächenfärbung mit Anti-CD3-PE und eine intrazelluläre Färbung mit Anti-Ki-67-FITC. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in II.6.2 beschrieben mit Anti-CD3-PE gefärbt und nach der Inkubationszeit mit dem

Antikörper zweimal in einem Milliliter 10 % FCS in PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Fixierpuffer aufgenommen und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde im Weiteren das unter II.6.3 beschriebene Protokoll für Ki-67 befolgt.

II.9.5 Auswertung der Ergebnisse aus Kokultur B und C mittels *Heatmap*

Zum Vergleich der Gesamtergebnisse aus den Kokulturen mit HaCaT und Jurkat mit den unterschiedlichen Modifikationen von THP-1 wurde eine *Heatmap* angelegt, in die die Veränderungen der gemessenen Parameter gegenüber den entsprechenden Kontrollen mittels eines Farbcodes eingetragen wurden. Dabei wurden statistisch signifikante Veränderungen oder solche, die mindestens 20 % betragen, jeweils stark eingefärbt (rot für Reduktion, grün für Erhöhung). Veränderungen, die weniger als 20 % (bzw. nicht signifikant) und mindestens als 5 % betragen wurden mit hellrot bzw. hellgrün eingetragen und Parameter, die keine messbare Veränderung (< 5 % gegenüber der Kontrolle) zeigten, gelb.

II.10 Statistische Methoden

Alle Datensätze wurden zunächst mit der *Identify Outliers*-Funktion (ROUT-Methode, $Q = 0,1\%$) von GraphPad Prism auf Ausreißer hin untersucht und die identifizierten Ausreißer aus den weiteren Berechnungen sowie der grafischen Darstellung ausgeschlossen.

Statistische Berechnungen wurden nur durchgeführt, wenn für jede der zu vergleichenden Gruppen Werte aus mindestens drei unabhängigen Messungen vorlagen. Mittelwerte, die aus Werten zweier unabhängiger Experimente gebildet worden waren, wurden demnach aus der statistischen Betrachtung ausgeschlossen. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde ein ungepaarter *t*-Test angewendet, bei stark unterschiedlichen (Faktor 2) Standardabweichungen ein ungepaarter *t*-Test mit Welch-Korrektur. Ungepaarte *t*-Tests wurden eingesetzt, wenn voneinander unabhängige Gruppen verglichen wurden (also etwa Nullkontrollen versus behandelte Proben) und eine Gauß-Verteilung der Populationswerte angenommen wurde. Einseitige P-Werte wurden nur berechnet, wenn dies biologisch sinnvoll war; diese sind im Ergebnisteil dieser Arbeit entsprechend bezeichnet. In allen anderen Fällen wurden zweiseitige P-Werte berechnet und angegeben.

Für den Vergleich von mehreren Gruppen, etwa für absolute Prozentsätze markerpositiver Zellen, wurde eine Einweg-Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und Dunnett's Test zur *Post-hoc*-Analyse verwendet, wobei ein paarweiser Vergleich der behandelten Messwertgruppen mit der entsprechenden Kontrolle erfolgte. Für MUTZ-LC in der Differenzierungskultur wurden Messwerte an Differenzierungstagen drei bis sieben mit den Messwerten für undifferenzierte MUTZ-3 verglichen.

Für Werte, die auf eine Kontrolle normalisiert wurden, also relative Expressionen von Reifungsmarkern und Zytokinkonzentrationen oder Prozentsätze markerpositiver Zellen, wurde ein Einstichproben-*t*-Test durchgeführt und die behandelten Gruppen mit dem Wert 1 bzw. 100 verglichen.

Standardabweichungen sind grafisch dargestellt, wenn für einen Mittelwert mindestens drei Werte aus zwei unabhängigen Messungen vorlagen.

Berechnete, jedoch nicht-signifikante Werte sind, wenn nicht anders angegeben, in dieser Arbeit entsprechend markiert. In den Grafiken wird folgende Nomenklatur (nach *New England Journal of Medicine*) verwendet: ns = nicht signifikant; * = signifikant, $p \leq 0,05$; ** = signifikant, $p \leq 0,01$; *** = signifikant, $p \leq 0,001$. Die Berechnungen erfolgten mit den integrierten Statistik-Modulen von GraphPad Prism, Versionen 8.4.3 und 9.0.0.

II.11 Veröffentlichung von Daten als Schlussbericht zum BMBF-geförderten Projekt

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten und Ergebnisse sind zum Teil im vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) über den Projektträger Jülich (PTJ) finanzierten Projekts mit dem Förderkennzeichen 031L0069 entstanden. Dementsprechend sind die Ergebnisse ganz oder in Teilen im Schlussbericht zu diesem Projekt enthalten. Dieser ist nach Vorgabe des Projektträgers veröffentlicht, bei der Universitätsbibliothek des Leibniz-Informationszentrums Technik und Naturwissenschaften (Technische Informationsbibliothek – TIB) hinterlegt und dort unter dem Förderkennzeichen einsehbar [142]. Der Schlussbericht wurde von der Verfasserin dieser Arbeit ebenfalls selbständig unter der Leitung des Projektleiters Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, angefertigt. Abbildungen, die aus dem Schlussbericht übernommen wurden, sind im Anhang dieser Arbeit unter

Kommentiertes Abbildungsverzeichnis (VI.4) mit Anmerkungen zu den vorgenommenen Modifikationen aufgelistet.

III ERGEBNISSE

III.1 Charakterisierung von MUTZ-3 und MUTZ-LC

Unter der Prämisse, dendritische Zellen einer Zelllinie in das bestehende Kokultursystem aus HaCaT-Keratinocyten und dendritischen Zellen zu integrieren, wurden zunächst Zellen der Linie MUTZ-3 durch Inkubation mit Zytokinen zu Langerhans-ähnlichen Zellen (MUTZ-LC) differenziert. Bei diesen Differenzierungsexperimenten wurden die Zellen einem der Literatur entlehnten Protokoll unterzogen und an mehreren Tagen der Differenzierungskultur durchflusszytometrisch auf die Expression typischer Marker untersucht.

Die Zellen blieben über die gesamte Zeit der Differenzierungskultur vital, wie mittels 7-AAD-oder FVD-Färbung gezeigt wurde (**Abbildung 8**). Die im Mittel erkennbare leichte Abnahme der Viabilität war statistisch nicht signifikant.

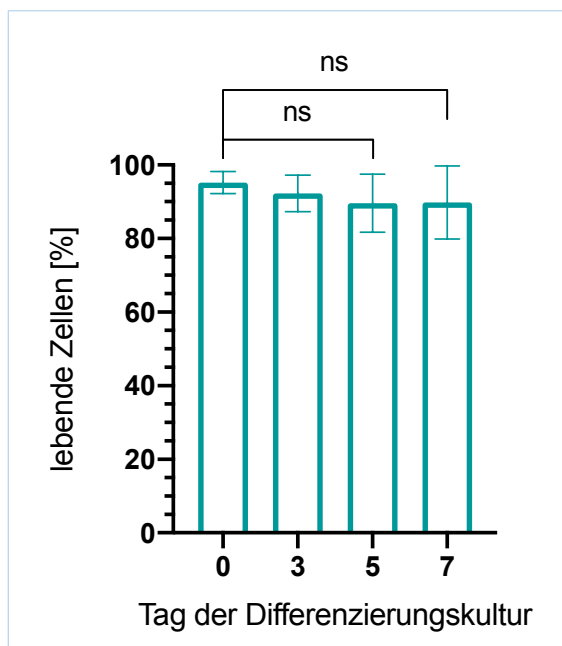


Abbildung 8. Anteil lebender Zellen in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis fünf unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen und Standardabweichungen.

Ergebnisse

Die Zellen wurden zunächst auf die Expression der Marker Langerin und HLA-DR hin untersucht. Diese zeigen den Differenzierungsgrad der Zellen in Richtung Langerhans- und antigenpräsentierende Zellen an. Der Prozentsatz Langerin-positiver Zellen stieg im Verlauf der Differenzierungskultur statistisch signifikant an, auf rund 68 % der Zellen an Tag 7 (**Abbildung 9 A**). Auch die Expression dieses Markers vervielfachte sich statistisch signifikant bezogen auf den Grundwert an Tag 0 der Kultur: von sechsfach an Tag 3 bis im Mittel zwölfmal an Tag 7, wobei letzterer Wert einer großen Variabilität unterlag. Der Prozentsatz HLA-DR-positiver Zellen blieb hingegen im Verlauf der Differenzierungskultur nach einem leichten Absinken um etwa 10 % stabil, gegenüber dem Mittelwert an Tag 0 war der Mittelwert an Tag 7 statistisch signifikant niedriger (**Abbildung 9 B**). Die relative Expression des Markers stieg bis Tag 7 auf das Anderthalbfache des Ausgangswerts an Tag 0 an. Dieser Anstieg war statistisch signifikant mit $p \leq 0,05$.

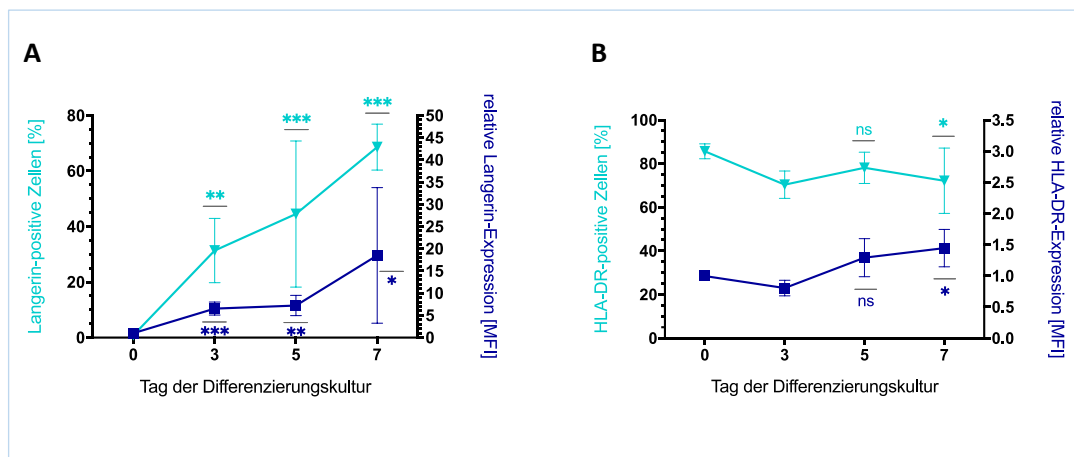


Abbildung 9. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von Langerin (**A**) und HLA-DR (**B**) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

Ähnlich wie für Langerin verhielt es sich mit der Expression von CD1a und CD1c als Marker von Subtypen dermalen dendritischer Zellen. Während der Prozentsatz CD1a-positiver Zellen in der Differenzierungskultur bis Tag 7 auf rund 95 % anstieg, verlief der Anstieg des Prozentsatzes CD1c-positiver Zellen etwas flacher auf im Mittel 83 % an Tag 7

der Kultur (**Abbildung 10**). Die ebenfalls statistisch signifikanten Anstiege der relativen Expressionen der beiden Marker bezogen auf Tag 0 der Kultur verliefen parallel dazu auf bis zu zehnfach für CD1c und bis zu fünfzehnfach für CD1a.

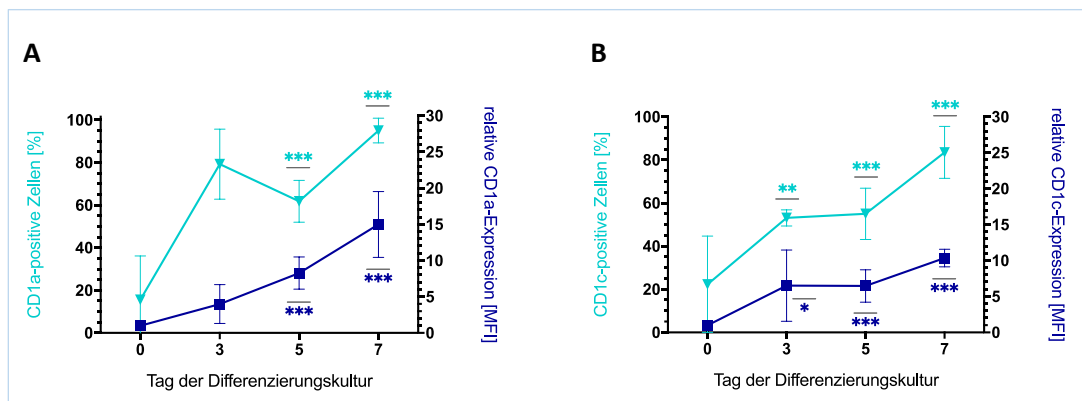


Abbildung 10. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von CD1a (**A**) und CD1c (**B**) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

Des Weiteren wurde die Veränderung der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 untersucht, die auf allen dendritischen Zellen einschließlich Langerhans-Zellen exprimiert werden. Die Expression der beiden Marker stieg im Verlauf der Differenzierungskultur auf MUTZ-LC deutlich an: bis zu viereinhalbfach im Fall von CD86 und bis zu neunfach im Fall von CD54 (**Abbildung 11**). Der prozentuale Anteil CD86-positiver Zellen stieg von etwa 40 % auf rund 70 % statistisch signifikant an, der prozentuale Anteil CD54-positiver Zellen blieb über die gesamte Kulturzeit auf unvermindert hohem Niveau um 95 %.

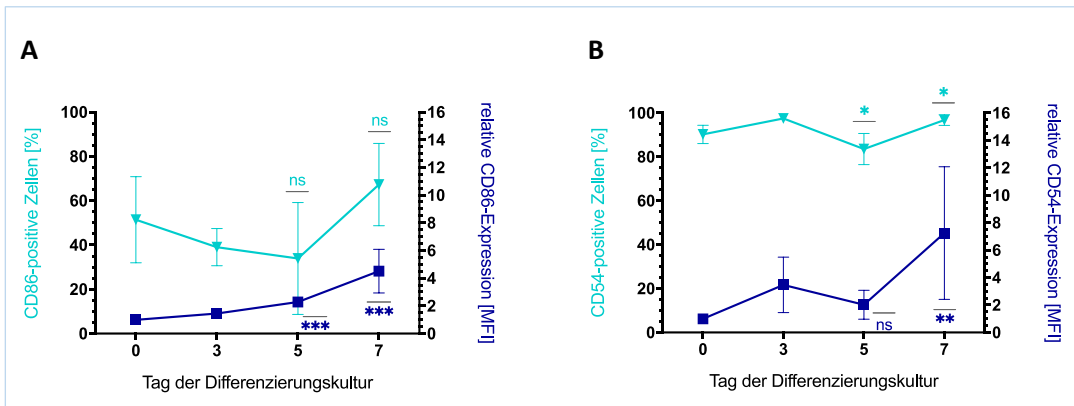


Abbildung 11. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

Die Expression des Monozytenmarkers CD14, der auf MUTZ-3 ohnehin nur auf rund 20 % der Zellen exprimiert wurde, wurde im Verlauf der Differenzierungskultur auf etwa die Hälfte gesenkt und auch der prozentuale Anteil CD14-exprimierender Zellen sank statistisch signifikant auf im Mittel 7 % (**Abbildung 12**). Differenzierte MUTZ-3 entwickelten also in der Kultur einen deutlicher dendritischen als monozytären Phänotyp.

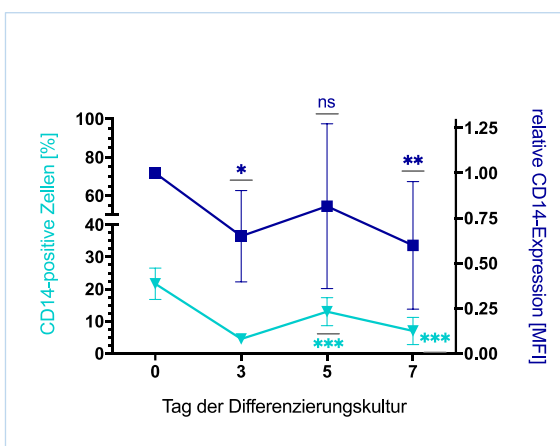


Abbildung 12. Veränderung des Anteils CD14-positiver Zellen und dessen Expression auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achse) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achse) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

Die Expression des immunsupprimierenden Rezeptors PD-L1 und der prozentuale Anteil von Zellen, die diesen Marker exprimierten, stieg im Verlauf der Differenzierungskultur statistisch signifikant an (**Abbildung 13 A**). Der Prozentsatz AhR-positiver Zellen blieb über den gesamten Zeitraum konstant hoch, die Expression des Rezeptors steigerte sich jedoch statistisch signifikant auf das Anderthalbfache an Tag 7 im Vergleich zum Grundwert an Tag 0 (**Abbildung 13 B**).

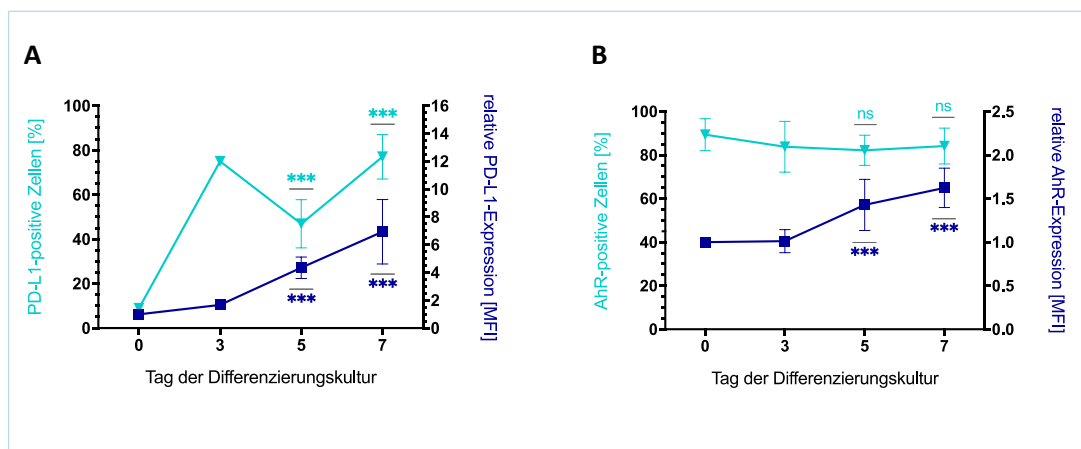


Abbildung 13. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von PD-L1 (**A**) und AhR (**B**) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

Die Differenzierung von MUTZ-3 zu MUTZ-LC brachte über sieben Tage einen Phänotyp hervor, der alle typischen Marker dendritischer Zellen und Langerhans-Zellen deutlich stärker exprimiert als der undifferenzierte Vorläufer. Da bereits an Tag 5 der Differenzierungskultur diese Marker auf einem hohen Niveau exprimiert wurden, wurde mit Blick auf eine für den Routineinsatz wünschenswerte Reduktion der Assayzeit und der entstehenden Kosten das Protokoll der Differenzierungskultur auf fünf Tage gekürzt und die zweite Zugabe der differenzierenden Zytokine entfiel in den anschließenden Experimenten.

III.2 Blockade-Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Anti-PD-L1-Antikörper

Der Hypothese folgend, dass die funktionelle Blockade des immunsupprimierenden Rezeptorliganden PD-L1 zu einer verstärkten Aktivierung von T-Zellen durch Allergen-stimulierte dendritische Zellen beitragen könnte, wurden Experimente unternommen, um zu klären, ob blockierende Antikörper einen messbaren Effekt auf die Expression von PD-L1 verursachen können.

Da die Experimente zur Blockade des PD-L1 zunächst parallel zur Charakterisierung und Differenzierung von MUTZ-3/MUTZ-LC erfolgten, wurden diese in den voll-differenzierten MUTZ-LC an Tag 7 der Differenzierungskultur durchgeführt. Dabei wurde der Anti-PD-L1-Antikörper der Firma Biozol verwendet und 0,5 µg/ml als Konzentration ermittelt, die die Expression von PD-L1 am deutlichsten senken konnte. Zwar ließ sich der Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen auch mit 0,1 µg/ml des Antikörpers im Mittel statistisch signifikant senken, die Variabilität war wegen der geringen Konzentration des eingesetzten monoklonalen Antikörpers jedoch sehr hoch. Der Vertrieb dieses Antikörpers wurde im Verlauf des Bearbeitungszeitraums eingestellt, so dass auf einen anderen umgestellt werden musste (Thermo Fisher, siehe **Tabelle 5**). Dieser war in der Blockadewirkung jedoch deutlich schwächer als der Biozol-Antikörper, weshalb die höhere Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt werden musste, um eine signifikante Reduktion des Prozentsatzes PD-L1-positiver Zellen zu erreichen (**Abbildung 14**). Für den späteren Einsatz in die Kokultur mit HaCaT wurden über fünf Tage differenzierte MUTZ-LC ebenfalls zunächst mit dem Biozol-Antikörper (**Abbildung 14 A**, % NK Tag 5) und im späteren Verlauf der Experimente mit dem Thermo Fisher Antikörper behandelt (**Abbildung 14 B**).

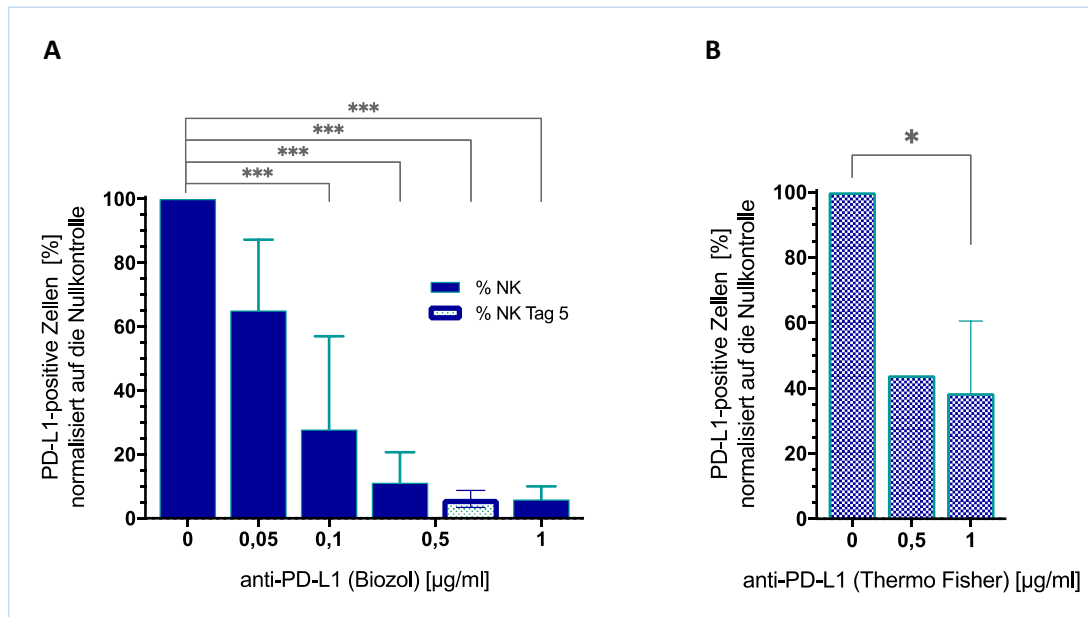


Abbildung 14. A: Auf die unblockierte Kontrolle (Nullkontrolle – NK) normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in MUTZ-LC-Kulturen nach sieben Tagen Differenzierung (% NK) sowie nach fünf Tagen Differenzierung für den Einsatz in Kokultur A (% NK Tag 5, heller Balken) nach Behandlung mit dem Biozol Anti-PD-L1-Antikörper. **B:** Auf die unblockierte Kontrolle normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen nach fünf Tagen Differenzierung und nach Blockade mit dem Thermo Fisher Antikörper. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei bis vier durchflusszytometrischen Messungen (eine Messung für Thermo Fisher 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

Grundsätzlich zeigten Zellen, die mit blockierenden monoklonalen Anti-PD-L1-Antikörpern behandelt worden waren, eine deutlich reduzierte Anfärbbarkeit mit dem Farbstoff-gekoppelten monoklonalen Antikörper derselben Klonalität in der durchflusszytometrischen Messung.

III.3 Kokultur A: MUTZ-LC und HaCaT

III.3.1 Regulation von CD86 und CD54 auf Testsubstanz-behandelten MUTZ-LC in Kokultur mit HaCaT

In einem nächsten Schritt zum Aufbau eines Testsystems zur Abbildung des ganzen AOP für die Sensibilisierung durch Hautkontakt, wurden zu MUTZ-LC differenzierte MUTZ-3 mit und ohne PD-L1-Blockade in Kokultur mit HaCaT-Keratinocyten über zwei Tage mit

Ergebnisse

Testsubstanzen behandelt (II.9.1) und anschließend durchflusszytometrisch auf die Expression von Reifungsmarkern und ihre Viabilität hin untersucht. Die Kokultur mit HaCaT wurde gewählt, da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Anwesenheit von Keratinozyten die Aktivierbarkeit von *in vitro* generierten dendritischen Zellen steigert [82].

Sowohl für CD86 als auch für CD54 erhöhte sich der Grundwert auf unbehandelten MUTZ-LC statistisch signifikant, sobald die Blockade des PD-L1 erfolgte, um im Mittel 25 % für CD86 und rund 10 % für CD54 (**Abbildung 15**).

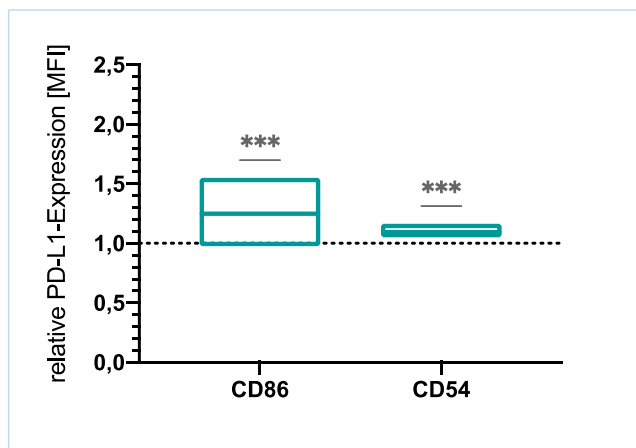


Abbildung 15. Durchflusszytometrisch bestimmte relative Expression der Marker CD86 und CD54 auf PD-L1-blockierten MUTZ-LC in Kokultur A bezogen auf nicht-blockierte MUTZ-LC. Gezeigt sind Mittelwerte und Spannweiten aus fünf unabhängigen Experimenten.

Auf die Korrektur für den Nullkontrolleneffekt wurde in der Darstellung der Ergebnisse aus der Kokultur mit HaCaT (Kokultur A) verzichtet, um die Kurvenverläufe von unblockierten und PD-L1-blockierten Zellen besser vergleichen zu können. Die auf die unblockierte Nullkontrolle bezogenen relativen Expressionen auf Testsubstanzen-behandelten und PD-L1-blockierten Zellen wurden daher mittels ANOVA mit dem Mittelwert der ebenso ermittelten relativen Expression der PD-L1-blockierten Nullkontrolle verglichen.

Eine statistisch signifikante Erhöhung der relativen CD86-Expression bezogen auf die Nullkontrolle wurde mit Konzentrationen zwischen 5 und 20 $\mu\text{mol/l}$ des extremen Allergens DNCB gemessen (**Abbildung 16 A**). Die relative Expression von CD54 bezogen auf die jeweilige Nullkontrolle sank hingegen leicht ab, für Proben, die mit 20 und 25 $\mu\text{mol/l}$ DNCB

behandelt wurden und PD-L1-blockiert waren, war dieser Effekt statistisch signifikant. Auf nicht-blockierten Zellen war nur der Effekt in der höchsten Dosisgruppe statistisch signifikant (**Abbildung 16 B**).

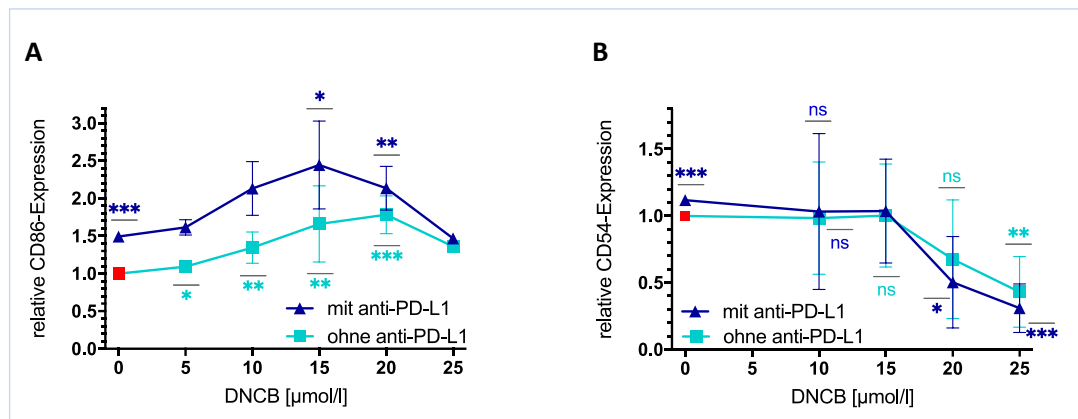


Abbildung 16. Veränderung der Expression von CD86 (**A**) und CD54 (**B**) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des extremen Allergens DNCB. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

Die Viabilität der Zellen sank mit steigenden Konzentrationen von DNCB im Mittel leicht (**Abbildung 17**). Die berechneten Werte für die Konzentration, die zum halbmaximalen Anstieg der Expression von CD86 führte ($EC_{50_{\text{sens}}}$) waren $11,03 \mu\text{mol/l}$ für unblockierte Zellen und $8,54 \mu\text{mol/l}$ für PD-L1-blockierte Zellen; in beiden Fällen würde das zu einer Einstufung als extremes Allergen führen. Die maximale Expressionserhöhung wurde für blockierte Zellen bereits mit $15 \mu\text{mol/l}$ DNCB erreicht, d.h. die PD-L1-Blockade führte zu einer Erhöhung der Sensibilität der Zellen gegenüber dem DNCB-Stimulus.

Ergebnisse

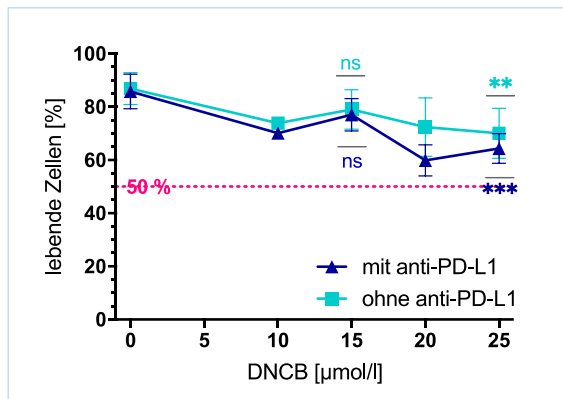


Abbildung 17. Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von DNCB. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen mit Standardabweichungen.

Mit dem starken Allergen TNBS konnte bis zu einer Konzentration von 1.000 µmol/l für die Expression von CD86 (**Abbildung 18 A**) und CD54 (**Abbildung 18 B**) mit und ohne PD-L1-Blockade keine signifikante Veränderung gegenüber der unblockierten Nullkontrolle gemessen werden. Die Zellen blieben bis zur höchsten Konzentration unverändert viabel (**Abbildung 19**). Werte für die $EC_{50_{sens}}$ ließen sich demnach nicht berechnen.

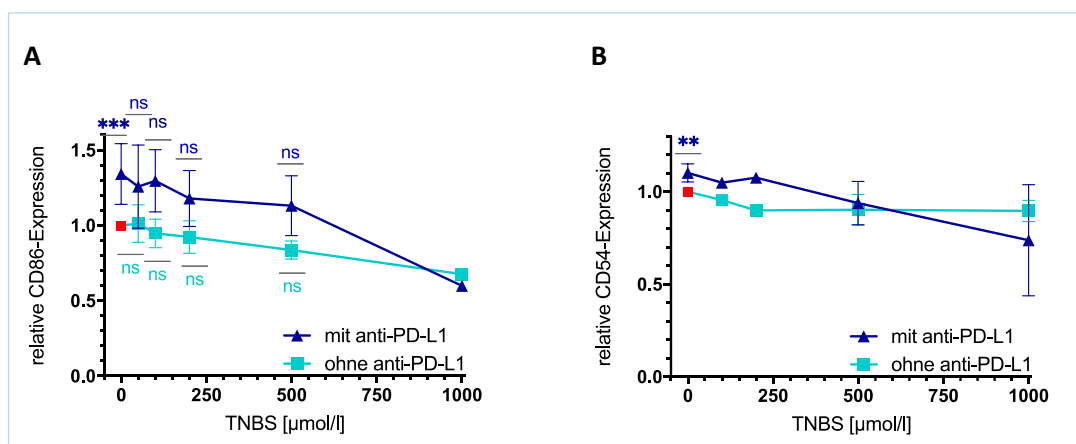


Abbildung 18. Veränderung der Expression von CD86 (**A**) und CD54 (**B**) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des starken Allergens TNBS. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus zwei bis fünf unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen ± Standardabweichung.

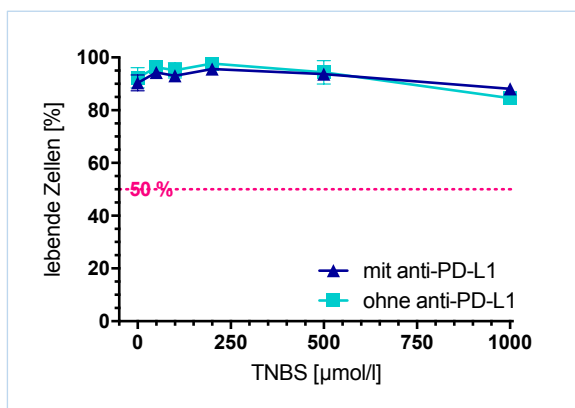


Abbildung 19. Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von TNBS. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

Das moderate Allergen MBT verursachte in der Konzentration 500 $\mu\text{mol/l}$ einen deutlichen Anstieg der relativen CD86-Expression, sowohl in PD-L1-blockierten als auch unblockierten MUTZ-LC (**Abbildung 20 A**). Die relative CD54-Expression stieg hingegen nach Behandlung mit 250 $\mu\text{mol/l}$ MBT leicht an und fiel mit höheren Konzentrationen der Testsubstanz stark ab (**Abbildung 20 B**), wobei die Viabilität der Zellen ab 500 $\mu\text{mol/l}$ MBT stark abnahm, mit 1.000 $\mu\text{mol/l}$ MBT bis auf 30 bis 40 % (**Abbildung 21**). Die berechneten Werte für die $\text{EC}_{50_{\text{sens}}}$ von 389,18 $\mu\text{mol/l}$ für unblockierte Zellen und 383,68 $\mu\text{mol/l}$ für PD-L1-blockierte Zellen würden in beiden Fällen zu einer Einstufung als schwaches Allergen führen. Auch auf den MBT-Stimulus reagierten die PD-L1-blockierten Zellen demnach sensibler.

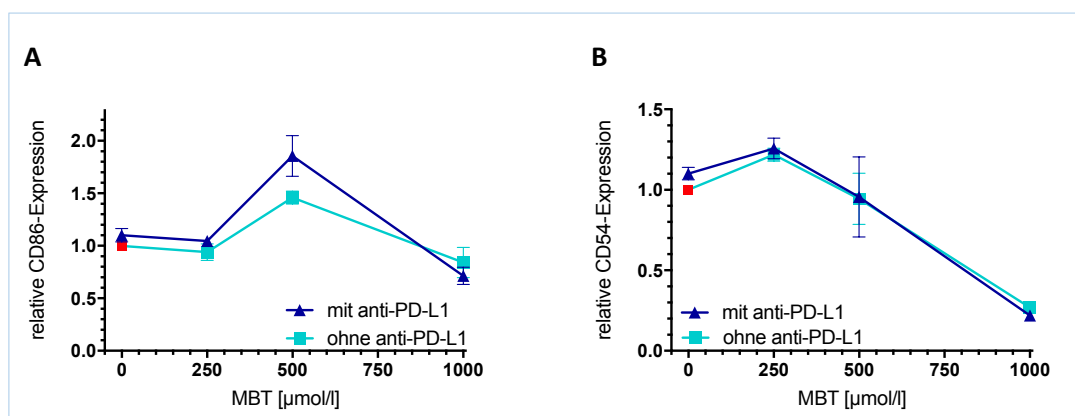


Abbildung 20. Veränderung der Expression von CD86 (**A**) und CD54 (**B**) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des moderaten Allergens MBT. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei

unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

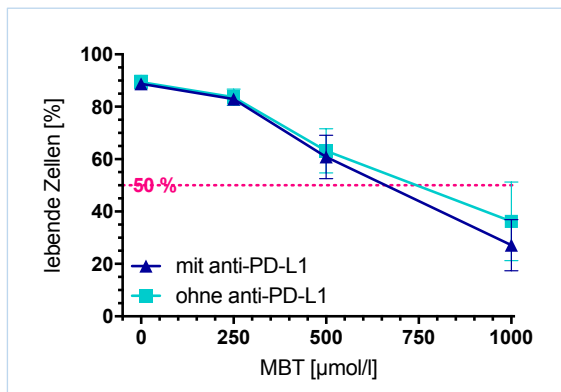


Abbildung 21. Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von MBT. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen mit Standardabweichungen.

Das Irritanz SLS verursachte keine signifikante Veränderung der Expression der beiden Reifungsmarker CD86 und CD54 (**Abbildung 23**), wobei sehr hohe Konzentrationen zwar zu einem leichten Anstieg der Expression von CD86 bezogen auf die unblockierte, unbehandelte Kontrolle führten (**Abbildung 22**), aber in diesen Proben gleichzeitig die Viabilität schon deutlich unter die 50%-Marke gesunken war (**Abbildung 24**).

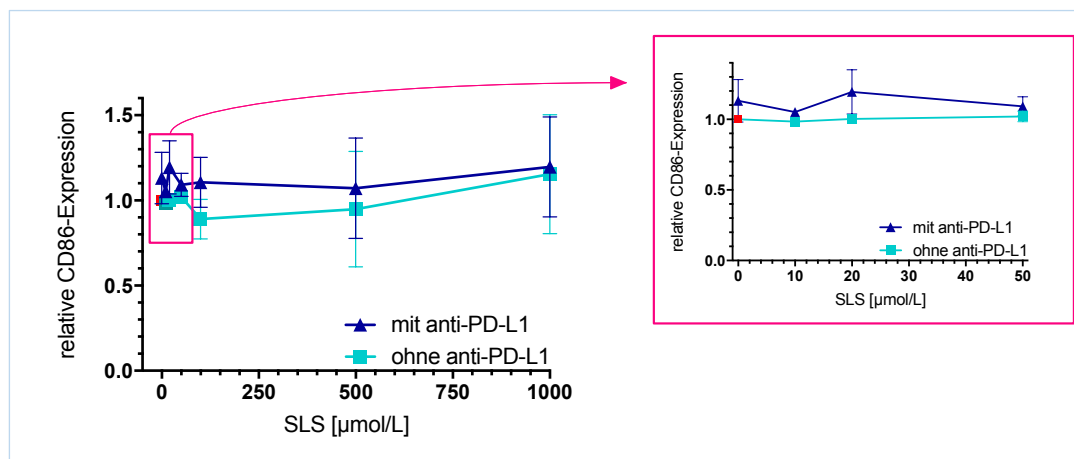


Abbildung 22. Veränderung der Expression von CD86 auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen der irritierenden Substanz SLS. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung. Rechts oben: Vergrößerter Ausschnitt der Grafik für Konzentrationen zwischen 0 und 50 µmol/l.

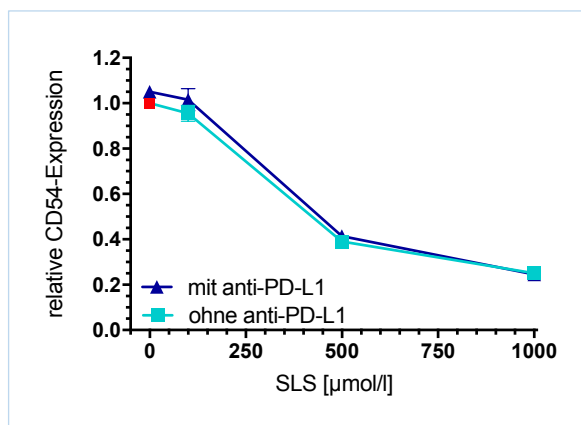


Abbildung 23. Veränderung der Expression von CD54 auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen der irritierenden Substanz SLS. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.

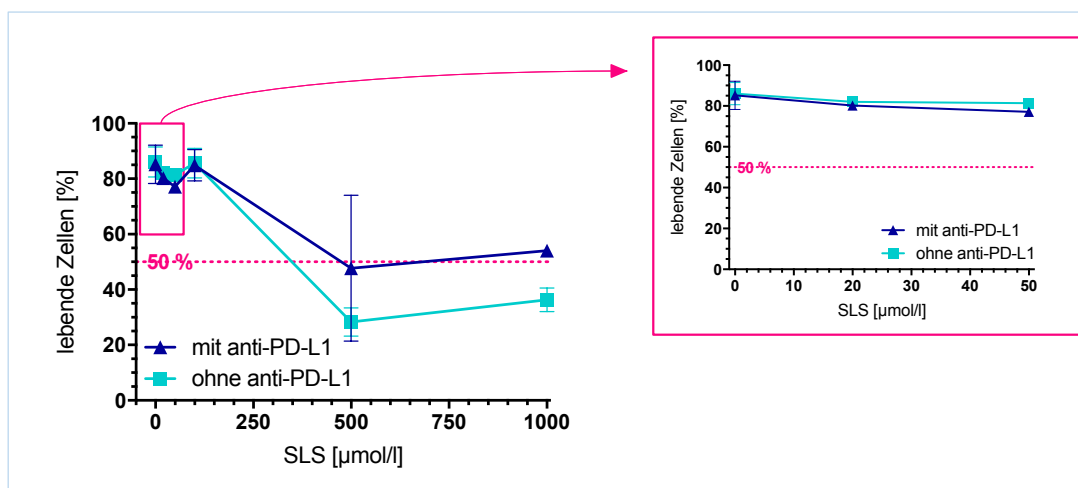


Abbildung 24. Anteil lebender MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von SLS. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung. Rechts oben: Vergrößerter Ausschnitt der Grafik für Konzentrationen zwischen 0 und 50 µmol/l.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl DNCB als auch MBT einen konzentrationsabhängigen Anstieg der CD86-Expression auf PD-L1-blockierten und -unblockierten MUTZ-LC bezogen auf die unblockierte unbehandelte Kontrolle induzierten, das starke Allergen TNBS jedoch nicht. Die Expression des zweiten gemessenen Markers CD54 hingegen fiel mit steigenden Konzentrationen der Allergene leicht ab, dieser Abfall war jedoch nur für die hohen Konzentrationen des extremen Allergens DNCB statistisch signifikant. Die Behandlung mit dem Irritanz SLS führte nicht zu einer

Veränderung der CD86-Expression. Die CD54-Expression fiel mit zytotoxischen Konzentrationen von SLS deutlich ab.

Insgesamt konnte ein induzierender Effekt der PD-L1-Blockade auf die Expression von CD86 und CD54 detektiert werden. Dieser Effekt blieb auch nach Stimulation mit den beschriebenen Modellallergenen MBT, DNCB und TNBS erhalten. So konnte eine Erhöhung der relativen Expressionswerte von CD86 im Vergleich zur Kontrolle im subtoxischen Bereich von Allergenen (DNCB und MBT) gezeigt werden. Berechnete $EC_{50_{sens}}$ -Werte für DNCB und MBT waren für PD-L1-blockierte Zellen jeweils niedriger, was auf eine erhöhte Sensibilität der blockierten Zellen hindeutet.

III.3.2 Regulation der PD-L1-Expression auf MUTZ-LC mit und ohne PD-L1-Blockade nach Behandlung mit starken Allergenen

Ein interessantes Ergebnis im Zusammenhang mit der Blockade des PD-L1 auf MUTZ-LC in Kokultur mit HaCaT war die konzentrationsabhängige Veränderung der mittleren Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in MUTZ-LC-Populationen, die in Kokultur mit HaCaT mit starken Allergenen behandelt worden waren. So stieg der auf die unbehandelte Nullkontrolle normalisierte Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen nach DNCB-Behandlung in Zellpopulationen, die nicht PD-L1-blockiert worden waren (**Abbildung 25 A oben**). Noch deutlicher zu erkennen war dieser Anstieg in anti-PD-L1- und DNCB-behandelten Zellpopulationen, wenn die Prozentsätze auf die anti-PD-L1-behandelte Kontrolle normalisiert wurden (**Abbildung 25 B oben**). Gemäß II.10 wurde nur für Werte nach Behandlung mit 15 $\mu\text{mol/l}$ DNCB ein Einstichproben-*t*-Test durchgeführt, die Mittelwerte dieser Gruppen – 146,8 % ohne Blockade und 158,9 % mit PD-L1-Blockade – waren sowohl mit als auch ohne Blockade von PD-L1 gerade eben nicht signifikant unterschiedlich zu 100 %. Die relative mittlere Expression von PD-L1 stieg zunächst minimal mit niedrigen Konzentrationen von DNCB und leicht steigenden Prozentzahlen PD-L1-positiver Zellen sowohl in unblockierten (**Abbildung 25 A unten**) als auch blockierten Populationen an (**Abbildung 25 B unten**), was auf eine Induktion der PD-L1-Expression auf bereits positiven Zellen hindeutet. Mit hohen Konzentrationen des Allergens und stärkerer Erhöhung der Prozentsätze positiver Zellen, fiel die mittlere PD-L1-Expression jedoch unter den Wert der unbehandelten Kontrolle ab. Auch dieser Effekt war in zuvor PD-L1-blockierten Populationen ausgeprägter (relative MFI 0,9 und 0,7 für die Gruppen 15 und 20 $\mu\text{mol/l}$ DNCB in blockierten Populationen, relative MFI 1 und 0,8 in diesen Gruppen unblockierter

Zellen), was auf eine Induktion der Expression von PD-L1 auf mehr Zellen hindeutet, die bisher negativ für diesen Marker waren und nun nur wenig des Markers exprimierten.

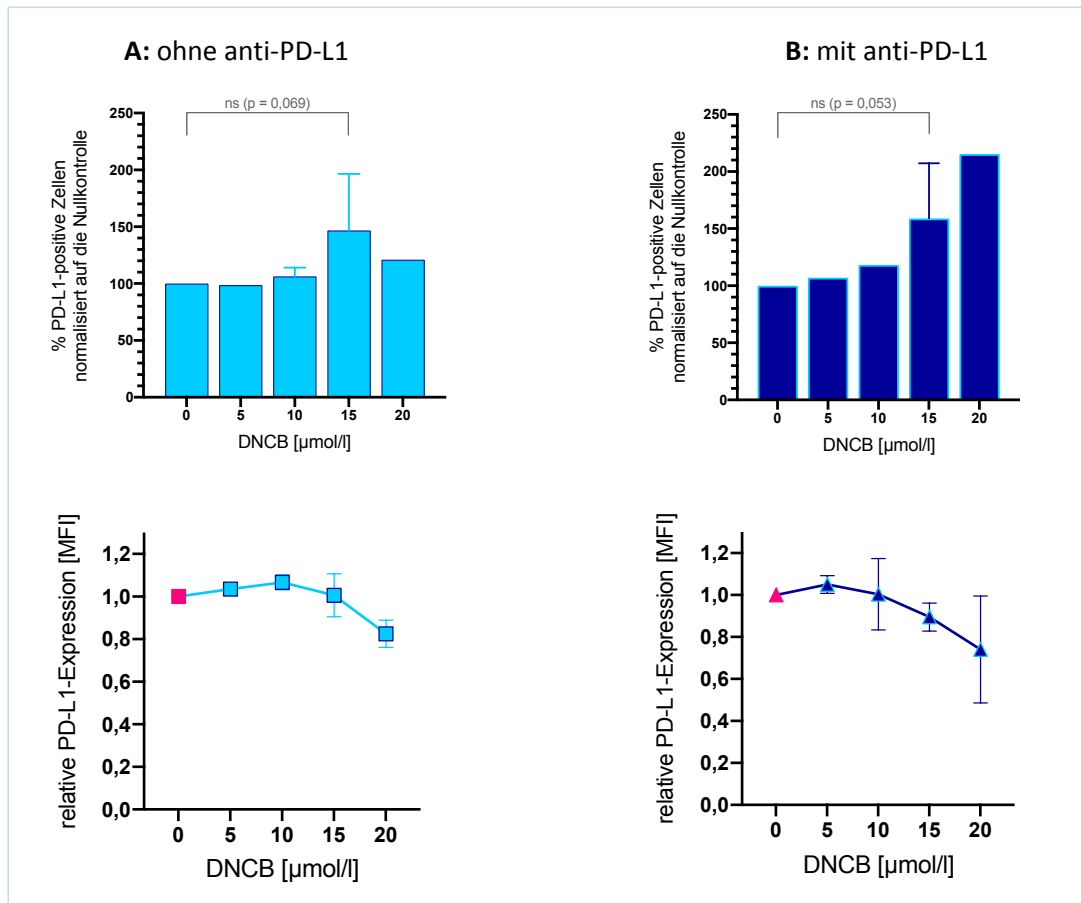


Abbildung 25. Oben: Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in MUTZ-LC-Populationen nach der Behandlung mit dem extremen Allergen DNCB in Kokultur mit HaCaT. **Unten:** Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) bezogene relative PD-L1-Expression auf MUTZ-LC nach der Behandlung mit DNCB in Kokultur mit HaCaT. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer bis drei Messungen ohne (A) und mit PD-L1-Blockade mit dem Biozol-Antikörper oder dem Thermo Fisher-Antikörper (B).

Nach Behandlung mit einem anderen starken Allergen (TNBS) fielen die Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle im Mittel minimal ab, etwas ausgeprägter war dieser Effekt nur in Populationen, die mit 500 $\mu\text{mol/l}$ TNBS behandelt worden waren (**Abbildung 26 A** oben). Wurden die Zellen im Vorfeld mit anti-PD-L1 (Biozol)

Ergebnisse

blockiert, sanken die Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in den Gruppen mit 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ TNBS-Behandlung und erhöhten sich über den Wert der ebenfalls blockierten Nullkontrolle auf im Mittel 152,3 % nach Behandlung mit 200 $\mu\text{mol/l}$ TNBS und 187,9 % mit 500 $\mu\text{mol/l}$ TNBS (**Abbildung 26 B oben**). Anders als mit DNCB fiel in den unblockierten Populationen mit steigender TNBS-Konzentration und sinkendem Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen auch die mittlere Expression des Markers auf einen relativen Wert von 0,8 ab (**Abbildung 26 A unten**), was auf die Hemmung der Expression auf ohnehin positiven Zellen hindeutet. In zuvor PD-L1-blockierten Populationen blieb hingegen die mittlere Expression mit sinkender Prozentzahl positiver Zellen bei Behandlung mit 50 oder 100 $\mu\text{mol/l}$ TNBS gleich (relative MFI 1,04 und 1,08) und sank im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit erhöhten Prozentsätzen positiver Zellen nach Behandlung mit 200 oder 500 $\mu\text{mol/l}$ TNBS leicht auf einen relativen Wert von rund 0,9 ab (**Abbildung 26 B unten**), wie bereits für DNCB beobachtet worden war. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei niedrigeren Konzentrationen von TNBS die auch in unblockierten Populationen beobachtete Hemmung der PD-L1-Expression in blockierten Populationen verstärkt wird, während mit hohen Konzentrationen des Allergens die Expression von PD-L1 auf vorher negativen Zellen induziert wird.

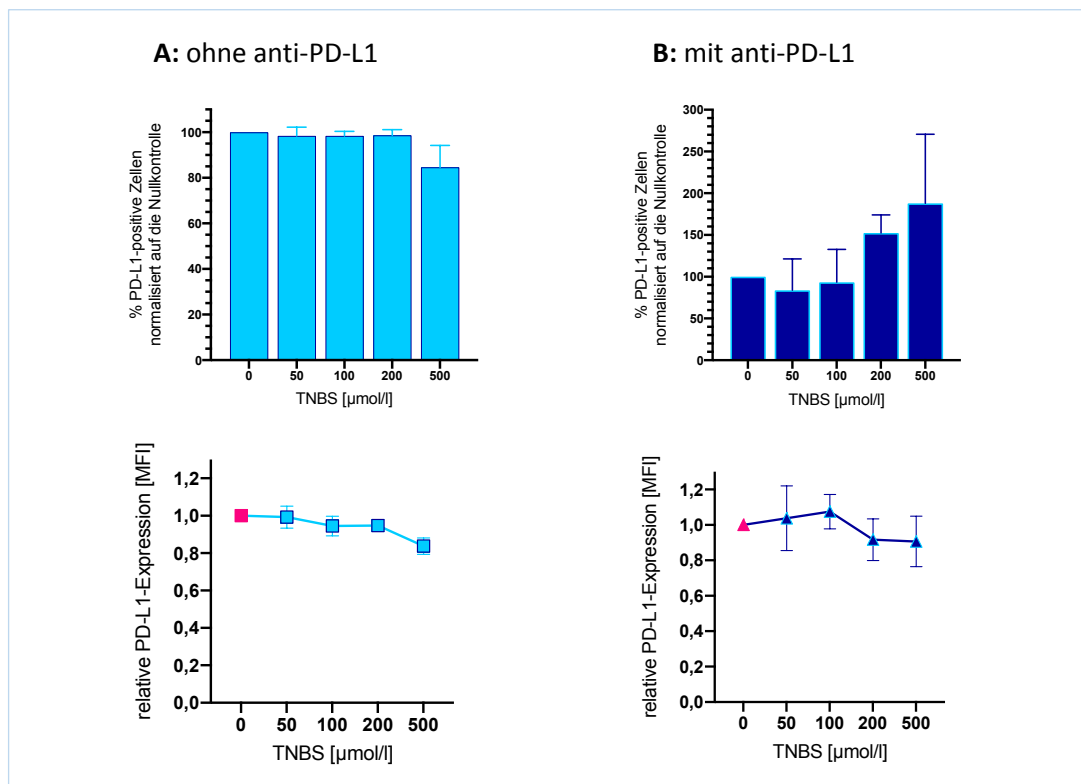


Abbildung 26. Oben: Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in MUTZ-LC-Populationen nach der Behandlung mit dem starken Allergen TNBS in Kokultur mit HaCaT. **Unten:** Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) bezogene relative PD-L1-Expression auf MUTZ-LC nach der Behandlung mit TNBS in Kokultur mit HaCaT. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer bis drei Messungen ohne (A) und mit PD-L1-Blockade mit dem Biozol-Antikörper (B).

So konnte gezeigt werden, dass MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit verschiedenen starken Allergenen die PD-L1-Expression unterschiedlich regulieren, auch dann und teilweise ausgeprägter, wenn zunächst die Blockade des PD-L1 mit monoklonalen Antikörpern erfolgte. Daraus ergab sich die Möglichkeit, auch TNBS als Allergen in der MUTZ-LC/HaCaT-Kokultur über die PD-L1-Expression zu detektieren.

III.4 AhR-Knockout in MUTZ-3 und THP-1 mittels CRISPR/Cas9

III.4.1 AhR-Knockout in MUTZ-3

Die in III.3 beschriebenen Experimente mit PD-L1-blockierenden Antikörpern hatten gezeigt, dass die funktionelle Blockade inhibitorischer Moleküle einen stimulierenden Effekt in einem zellulären Sensibilisierungstest haben kann. Daher sollte in den nachfolgenden Experimenten der Einfluss des genetischen Knockouts eines weiteren inhibitorischen Moleküls, des zytosolisch exprimierten Ah-Rezeptors, untersucht werden. Für den CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout des Ah-Rezeptors in MUTZ-3 wurden verschiedene Ansätze getestet und spezifische methodische Modifikationen ergänzt. Dabei wurde zunächst in 24-well-Platten mit rund 100.000 Zellen pro Loch gearbeitet und im Verlauf auf 96-well-Platten mit rund 20.000 Zellen pro Loch gewechselt. Außerdem wurde die Präinkubation im serumfreien OptiMEM aufgegeben, da die Zellen diese nur schlecht vertrugen. In **Abbildung 27** sind die einzelnen Veränderungen von Ansatz zu Ansatz dargestellt. Ansatz I und IV erfolgten nach Herstellerangabe für 24-well-Platten [143]. Ansatz VII erfolgte wie unter II.7.1 beschrieben. Vom im Methodenteil beschriebenen Protokoll abweichende Parameter in Ansatz V und VI sind in der Abbildung angegeben.

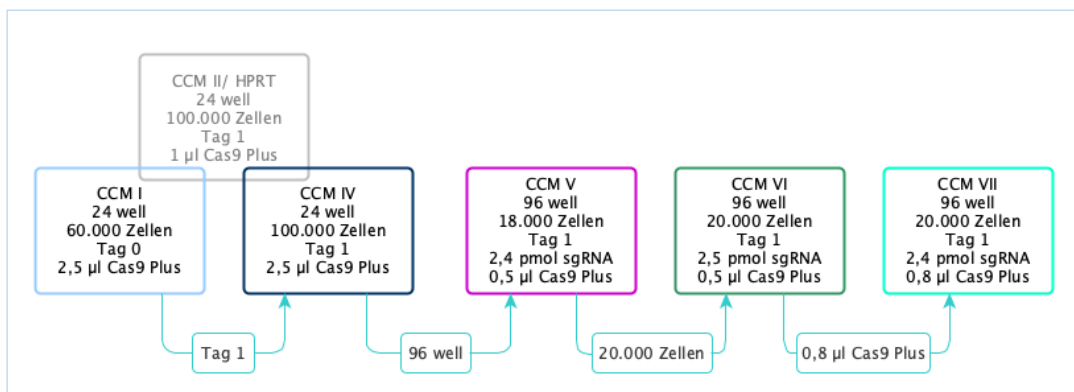


Abbildung 27. Schematische Darstellung der verschiedenen Ansätze, die zum Knockout des AhR in MUTZ-3 (CCM – CRISPR/Cas-editierte MUTZ-3) verfolgt wurden, mit Angabe der jeweils erfolgten Veränderung. In Ansatz II wurde nur die HPRT-Kontrolle verwendet, Ansatz III erbrachte keine Verbesserung der Methode (nicht gezeigt).

Die mit diesen Ansätzen erzielten Ergebnisse sind in **Abbildung 28** zusammenfassend dargestellt. Die verschiedenen *guideRNAs* lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Absenkung des Anteils AhR-positiver Zellen in geneditierten Populationen war jedoch nicht statistisch signifikant.

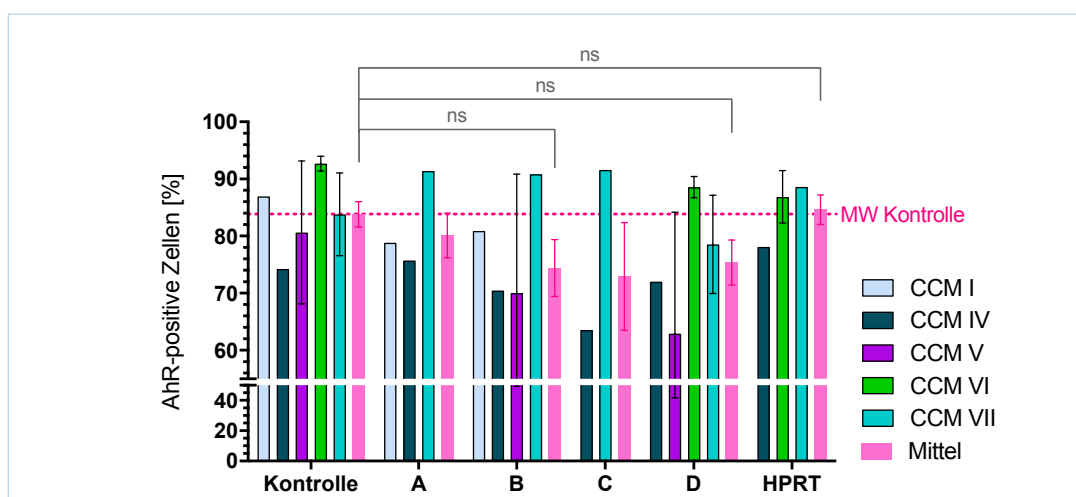


Abbildung 28. Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von MUTZ-3, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Werte aus einer bis drei Messungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung für uneditierte Zellen (Kontrolle), nach Einsatz der *single guide RNAs* (sgRNA) A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT) für die Versuche I-VII (CCM I bis VII). Zur Verdeutlichung des Gesamtergebnisses wurden die Werte über alle Ansätze gemittelt und sind als rosa Balken dargestellt (Mittel). Gestrichelte Linie (MW Kontrolle): Mittelwert aller Kontrollansätze ohne Knockout, CCM: CRISPR/Cas-editierte MUTZ-3

Im Hinblick auf die durchflusszytometrisch bestimmte Effektivität des AhR-Knockouts war Ansatz V am erfolgreichsten, wie die gemessenen Mittelwerte des Prozentsatzes AhR-positiver Zellen zeigten. Mit Zellen, die mit sgRNA B und sgRNA D, die sich in PAM-Sequenz und Ziel-DNA-Sequenz unterscheiden (siehe **Tabelle 9**), behandelt worden waren, wurde im Verlauf weitergearbeitet, da diese konsistent die deutlichere Absenkung der Prozentsätze AhR-positiver Zellen zeigten. Im Mittel war der Knockout unter Verwendung der *guideRNAs* B und D etwa gleich effizient; der Prozentsatz AhR-positiver Zellen wurde um rund 10 % (B: 9,46 %, D: 8,48 %) gesenkt. Gleichzeitig wurde in diesen beiden Ansätzen die relative

Ergebnisse

Expression des AhR in den verbliebenen AhR-positiven Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle leicht statistisch signifikant gesenkt (**Abbildung 29**).

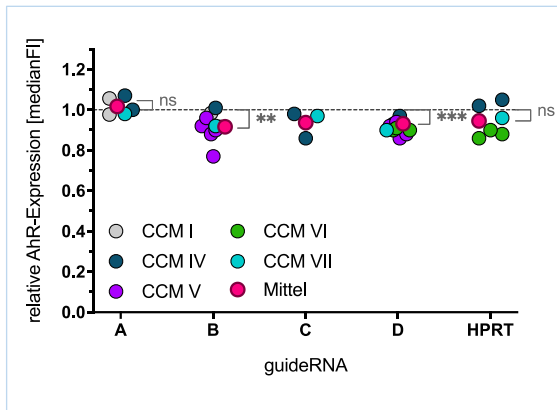


Abbildung 29. Durchflusszytometrisch bestimmte relative AhR-Expression bezogen auf unbehandelte Kontrollen in Populationen von MUTZ-3, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Einzelwerte aus mehreren Messungen nach Einsatz der sgRNAs A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT) für die Versuche I-VII (CCM I bis VII). Zur Verdeutlichung des Gesamtergebnisses wurden die Werte über alle Ansätze gemittelt und sind als rote Punkte dargestellt (Mittel).

Die Absenkung der Expression des AhR in den verbliebenen AhR-positiven Zellen deutet auf einen heterozygoten Knockout in einigen dieser Zellen hin.

Die Zellen blieben über die Behandlung viabel, leichte mittlere Absenkungen im Prozentsatz lebender Zellen waren statistisch nicht signifikant (**Abbildung 30**).

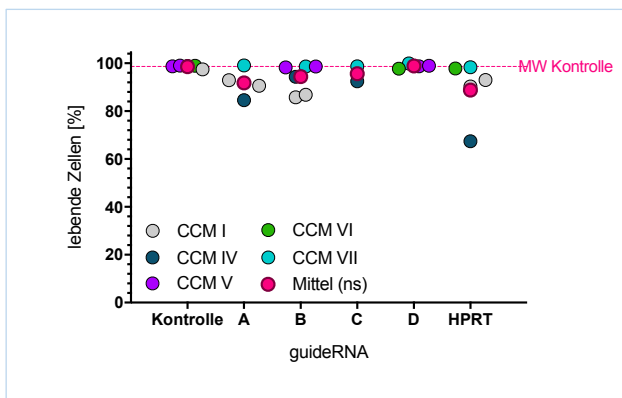


Abbildung 30. Prozentualer Anteil lebender Zellen nach AhR-Knockout in MUTZ-3 mit *guideRNAs* A bis D oder HPRT-Knockout. Gezeigt sind Einzelwerte aus den Ansätzen I bis VII (CCM I-VII) und der Mittelwert über alle Ansätze (rosa). Gestrichelte rosa Linie (MW Kontrolle): Mittelwert des Prozentsatzes lebender Kontrollzellen. ns: nicht signifikant.

Insgesamt ließ sich in Zellen der Linie MUTZ-3 der Ah-Rezeptor in etwa 10 % der zuvor AhR-positiven Zellen mittels CRISPR/Cas9-Methode genetisch ausschalten.

III.4.2 AhR-Knockout in THP-1

Aufgrund der komplexen Kulturbedingungen und der ausgeprägten Empfindlichkeit von MUTZ-3/MUTZ-LC gegenüber Störungen dieser Bedingungen – Eigenschaften, die im Hinblick auf den potenziellen Einsatz in einem Routinetestsystem hinderlich erschienen – sowie aufgrund des wenig effizienten Knockouts des AhR in diesen Zellen, wurden als mögliche Alternative Zellen der Linie THP-1 in Betracht gezogen und diese ebenfalls dem AhR-Knockout unterzogen.

Der AhR-Knockout in THP-1 erwies sich als etwas effizienter als in MUTZ-3. So konnte mit dem in II.7.1 beschriebenen Ansatz der Prozentsatz AhR-positiver Zellen mit allen vier *guideRNAs* um 12 bis 15 % gesenkt werden (**Abbildung 31**).

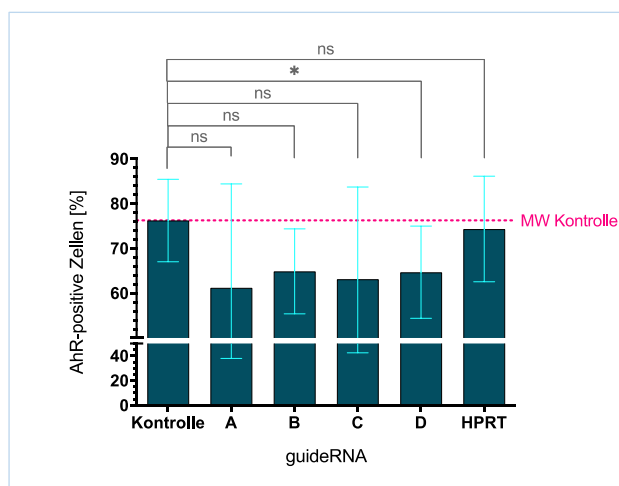


Abbildung 31. Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von THP-1, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Werte aus drei bis fünf Messungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung für uneditierte Zellen (Kontrolle), nach Einsatz der sgRNAs A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT). gestrichelte rosa Linie (MW Kontrolle): Mittelwert aller Kontrollansätze ohne Knockout.

Für Ansätze, für die *guideRNA* D verwendet wurde, war diese Absenkung statistisch signifikant. Anders als bei geneditierten MUTZ-3 wurde die relative Expression des AhR in geneditierten THP-1 im Vergleich zu nicht editierten Zellen nicht gesenkt (**Abbildung 32**).

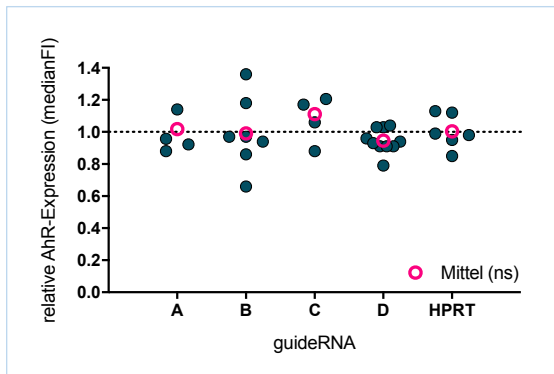


Abbildung 32. Durchflusszytometrisch bestimmte relative AhR-Expression bezogen auf unbehandelte Kontrollen in Populationen von THP-1, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Einzelwerte aus mehreren Messungen nach Einsatz der sgRNAs A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT) sowie Mittelwerte als rote Kreise (Mittel).

Die Zellen blieben über die Behandlung mit CRISPR/Cas-Reagenzien viabel (**Abbildung 33**).

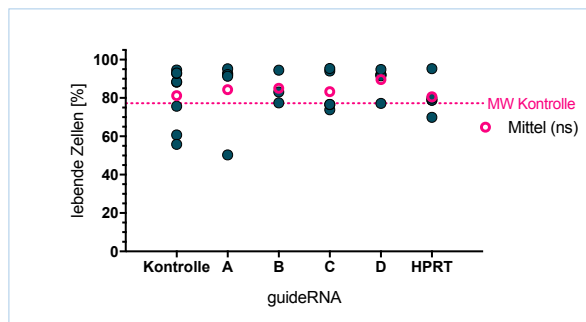


Abbildung 33. Prozentualer Anteil lebender Zellen nach AhR-Knockout in THP-1 mit *guideRNAs* A bis D oder HPRT-Knockout. Gezeigt sind Einzelwerte aus zwei bis drei Messungen und der Mittelwert (rosa). Gestrichelte rosa Linie (MW Kontrolle): Mittelwert des Prozentsatzes lebender Kontrollzellen.

Im weiteren Verlauf wurde nun zunächst vergleichend mit beiden Zelllinien weitergearbeitet.

III.4.3 Nachweis des HPRT-Knockouts in mitgeführten Kontrollen mittels Inkubation mit 6-Thioguanin (6-TG)

Als methodische (Positiv-)Kontrolle für die Knockout-Experimente wurden diese parallel mit einer *guide*RNA für das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1)-Gen durchgeführt, da Veränderungen dieses Gens zuverlässig zum Funktionsverlust des codierten Enzyms führen, der durch die erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber 6-Thioguanin (6-TG) nachweisbar ist.

Zum Nachweis des HPRT-Knockouts wurden Zellen, die in den Knockout-Experimenten mit der *guide*RNA für das HPRT1-Gen inkubiert worden waren, über fünf Tage mit 10 µg/ml 6-Thioguanin behandelt und die Viabilität in diesen Ansätzen mit der in ebenfalls 6-TG-behandelten, aber nicht geneditierten Kontrollen verglichen. Populationen, in denen HPRT ausgeknockt ist, sollten nach der Behandlung mehr lebende Zellen aufweisen, da die Zytotoxizität von 6-TG HPRT-vermittelt ist. Für geneditierte MUTZ-3 war dies in Ansatz II sowie zu einem geringeren Umfang in den Ansätzen IV und VI der Fall (**Abbildung 34**).

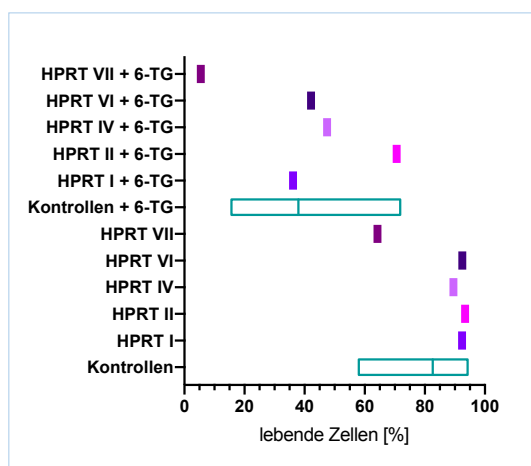


Abbildung 34. Prozentsatz lebender MUTZ-3 in HPRT-Knockout-Kontrollen nach der Behandlung mit 10 µg/ml 6-TG über fünf Tage im Vergleich zu nicht editierten Kontrollen aus den Ansätzen I bis VII. Dargestellt sind Mittelwerte aus einer bis zwei Messungen für HPRT-k.o.-Zellen und Spannbreiten mit Mittelwert über alle Kontrollwerte.

Für CRISPR/Cas-editierte THP-1 (CCT) wurde der HPRT-Knockout in zwei unabhängigen Ansätzen unter gleichen Bedingungen durchgeführt und die erhaltenen Zellen in je drei Experimenten mit 6-TG behandelt; die Ergebnisse sind in **Abbildung 35** zusammengeführt.

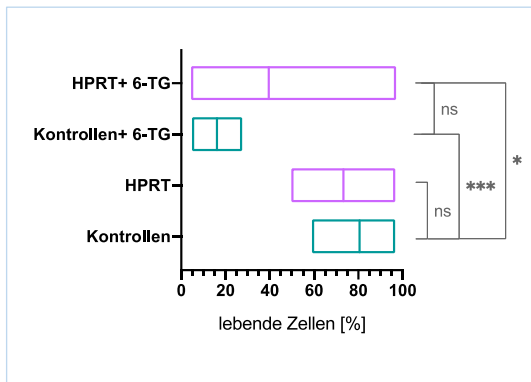


Abbildung 35. Prozentsatz lebender THP-1 in HPRT-Knockout-Kontrollen (violett) nach der Behandlung mit 10 µg/ml 6-TG über fünf Tage im Vergleich zu nicht editierten Kontrollen (blau) aus den Ansätzen I und II. Dargestellt sind Spannbreiten und Mittelwerte über beide Ansätze mit je drei Messungen.

Zwar war der Unterschied im Prozentsatz noch lebender THP-1 zwischen den 6-TG-behandelten Kontroll- und HPRT-Gruppen nicht statistisch signifikant, im Mittel waren die HPRT-k.o.-Populationen nach der Behandlung jedoch deutlich viabler, so dass auf einen Knockouterfolg in beiden Ansätzen geschlossen wurde.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Methode grundsätzlich erfolgreich eingesetzt wurde und in THP-1 auch für den HPRT-Knockout effizienter war als in MUTZ-3.

III.4.4 Überprüfung der Editierungseffizienz mittels *Genomic Cleavage Detection Kit*

Der AhR- und HPRT-Knockouterfolg in den Ansätzen CCM VII und CCT II wurde zusätzlich molekularbiologisch mittels des vom Hersteller der CRISPR/Cas-Reagenzien empfohlenen *Genomic Cleavage Detection Kit* überprüft. Das Herstellerprotokoll wurde, wenn nicht anders angegeben, befolgt und ist in II.7.2 beschrieben. Wenngleich für alle untersuchten Proben die entsprechenden PCR-Produkte nachgewiesen werden konnten (**Abbildung 36**), konnten nur in einigen Proben nach dem Enzymverdau gut sichtbare Banden identifiziert werden, um die Berechnung nach Formel (2) durchzuführen (**Abbildung 37**).

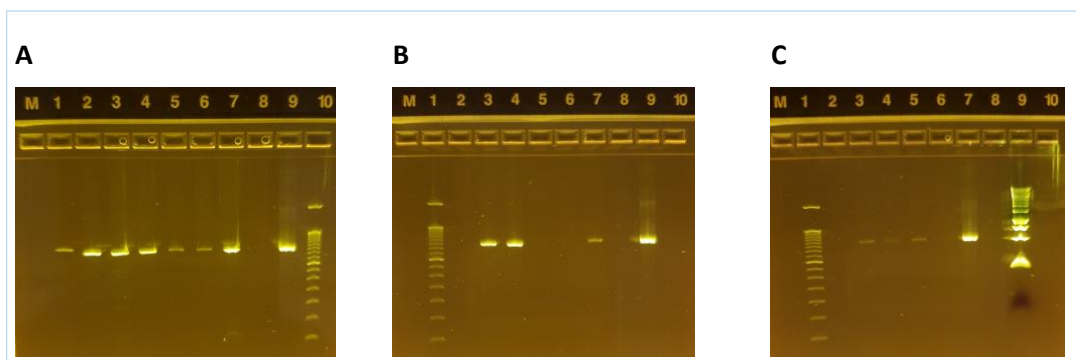


Abbildung 36. Verifikation der PCR-Produkte aus dem *Genomic Cleavage Detection Kit* mittels Gelelektrophorese. Gel **A**: geneditierte THP-1, Gel **B**: geneditierte MUTZ-3, erste PCR, Gel **C**: geneditierte MUTZ-3, zweite PCR; Legende siehe **Tabelle 16**

Tabelle 16. Legende zu **Abbildung 36**

	A (CCT)	B (CCM)	C (CCM)
M	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
1	Kontrolle mit AhR-Primerpaar	Größenstandard	Größenstandard
2	Kontrolle mit HPRT-Primerpaar	Kontrolle mit AhR-Primerpaar	Kontrolle mit AhR-Primerpaar PCR 2
3	HPRT-Kontrolle	Kontrolle mit HPRT-Primerpaar	AhR A PCR 2
4	AhR A	HPRT-Kontrolle	AhR B PCR 2
5	AhR B	AhR A	AhR C PCR 2
6	AhR C	AhR B	AhR D PCR 2
7	AhR D	AhR C	H ₂ O
8	AhR D Passage 4	AhR D	PCR2-Kontrolle
9	PCR-Kontrolle	PCR-Kontrolle	1 kb Größenstandard
10	Größenstandard	H ₂ O	H ₂ O

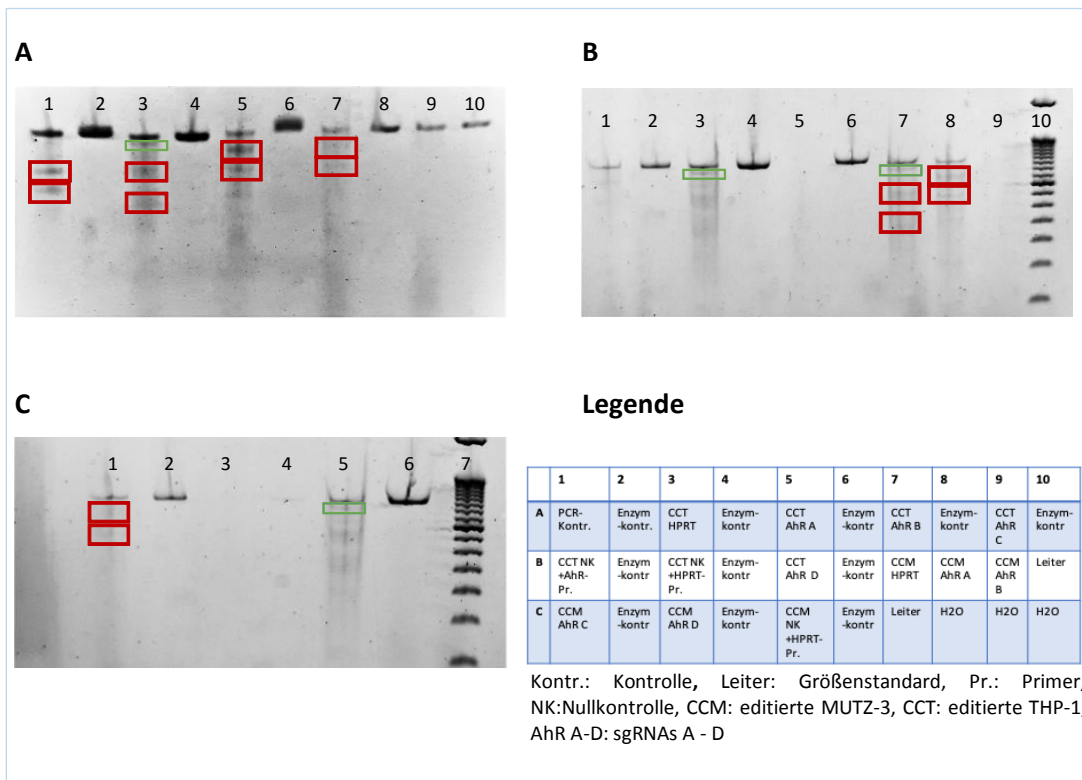


Abbildung 37. Gelelektrophorese des Enzymverdaus gespaltener DNA in Proben von MUTZ-3 (CCM) und THP-1 (CCT) nach CRISPR/Cas9-vermittelter Geneditierung. Rot umrandet: zur Ermittlung der Editierungseffizienz ausgewertete Banden. Grün umrandet: Artefaktbande, die in allen Proben zu sehen war, die in der PCR mit dem HPRT-Primerpaar inkubiert wurden.

Zur Auswertung wurden die Profile der optischen Dichten der jeweiligen Spuren herangezogen. In **Abbildung 38** sind exemplarisch die Spuren für die PCR-Kontrolle (Kontrolle), mittels *guideRNA* A editierte THP-1 (CCT A) und MUTZ-3 (CCM A) dargestellt (Darstellungen aller ausgewerteten Spuren siehe **Abbildung 68** im Anhang).

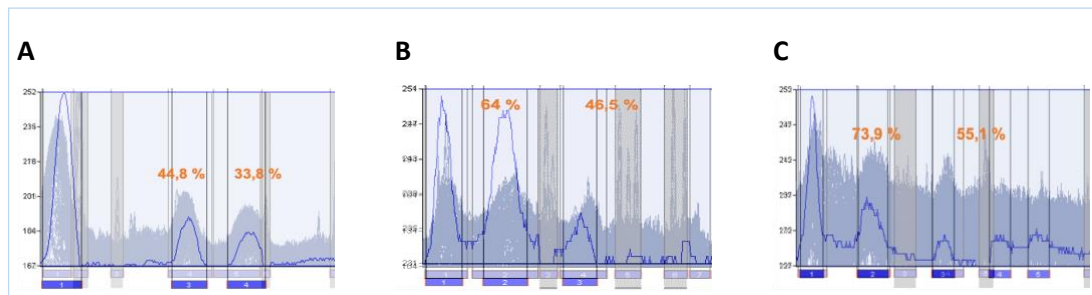


Abbildung 38. Profile ausgewerteter Spuren aus der Gelelektrophorese nach Enzymverdau zu Ermittlung der Editierungseffizienz im CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout des AhR als Überlagerung des Originalprofils mit den Durchschnittswerten für die optische Dichte der Banden. A: PCR-Kontrolle, B: CCT A, C: CCM A. Prozentzahlen geben die Höhe der Peaks im Verhältnis zum Mutterpeak an, graue Zonen kennzeichnen manuell ausgeschlossene Peaks (Verunreinigungen und Fotoartefakte).

So konnten folgende Werte für den Prozentsatz gespaltener DNA in CCT (THP-1)- und CCM (MUTZ-3)-Proben ermittelt werden: 18,3 % in der PCR-Kontrolle, 15,1 % in der CCT HPRT-Kontrolle, 39,7 % in Probe CCT A, 17,8 % in CCT B, 18,8 % in der CCM HPRT-Kontrolle, 20,8 % in der Probe CCM A und 17,7 % in CCM C. Für die Probe CCT C erschien zwar eine Mutterbande, aber keine Spaltproduktbanden, für die Probe CCT D erschien keine Bande in der entsprechenden Spur, obgleich die Enzymkontrolle eine deutliche Bande hervorbrachte. Ähnlich verhielt es sich für die Probe CCM D, für die die Enzymkontrolle eine dünne Bande erbrachte, die Probe selbst jedoch keine; ebenfalls keine Bande lieferte die Probe CCM B.

Insgesamt fällt auf, dass insbesondere für die Probe CCT A ein höherer Prozentsatz gespaltener DNA (rund 40 %) ermittelt wurde, als der durchflusszytometrisch gemessene Prozentsatz AhR-negativer Zellen (Verringerung des Prozentsatzes AhR-positiver Zellen um rund 15 % verglichen mit der nicht editierten Kontrolle) erwarten ließ. Hierbei ist zu bedenken, dass die durchflusszytometrische Messung nach einigen Passagen erfolgte, während die Zellen für den *Cleavage Detection Kit* direkt nach dem Editierungsprotokoll entnommen und lysiert wurden, ohne vorher in Kultur gewesen zu sein.

III.4.5 Selektionsprotokoll für AhR-defiziente Zellen

III.4.5.1 Selektionsprotokoll 1: Behandlung mit Dibutylphthalat

Wie zum Beispiel an der großen Standardabweichung in Ansatz V in **Abbildung 28** oder für die CCT-Ansätze A und C in **Abbildung 31** erkennbar ist, ist der Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Messung entscheidend für das Erfassen des potenziellen Knockouts. So werden für die Manifestation des Knockouts naturgemäß einige Passagen benötigt, gleichzeitig fiel im Verlauf der Arbeiten auf, dass AhR-positive Zellen offenbar einen Wachstumsvorteil aufweisen und sich in der Kultur stärker vermehren. Um einen möglichst hohen Prozentsatz AhR-negativer Zellen in den Populationen über einige Passagen nach dem Knockout zu erhalten, wurde ein Selektionsprotokoll entwickelt.

In einem ersten Ansatz wurden für die Selektion der AhR-k.o.-Zellen die geneditierten Populationen mit Dibutylphthalat (DBP), welches AhR-vermittelt Apoptose induziert, über 48 Stunden behandelt. Dieses Protokoll wurde für geneditierte MUTZ-3 der Ansätze IV, V, VI zunächst mit steigenden Konzentrationen DBP ausgetestet (**Abbildung 39** beispielhaft für CCM V, sgRNA B und D) und für geneditierte MUTZ-3 aus Ansatz VII und geneditierte THP-1 mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DBP durchgeführt (**Abbildung 40** bis **Abbildung 43**).

▪ MUTZ-3:

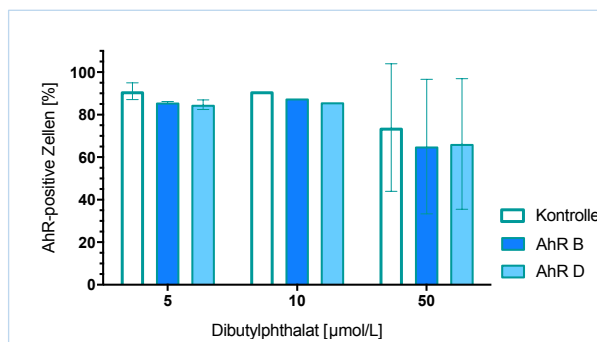


Abbildung 39. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz AhR-positiver Zellen in mit sgRNA B (AhR B) und sgRNA D (AhR D) geneditierten Populationen von MUTZ-3 aus Ansatz V nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen DBP. Gezeigt sind Mittelwerte und Spannbreiten aus einer bis zwei Messungen.

Während mit den niedrigen Konzentrationen von 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ DBP der Prozentsatz AhR-positiver MUTZ-3 in geneditierten Populationen im Vergleich zur mitgeführten, ebenfalls behandelten, aber nicht geneditierten Kontrolle nur geringfügig gesenkt werden

konnte, wurden mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DBP die Prozentsätze um im Mittel 4 % in den mitgeführten Kontrollzellen und um im Mittel 8 % in den editierten Populationen gesenkt. Die Zellpopulationen blieben über die Behandlung viabel, erst mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DBP sank die Viabilität leicht ab (**Abbildung 69** im Anhang).

Eine Absenkung des Prozentsatzes der AhR-positiven Zellen wurde auch nach Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DBP in der Population der mit sgRNA D editierten MUTZ-3 im Ansatz VII erreicht, nicht jedoch in denen, die mit sgRNA B oder der HPRT-*guide*RNA editiert worden waren (**Abbildung 40**). Im Mittel wurde der Prozentsatz AhR-positiver MUTZ-3 in der sgRNA D-editierten Population im Vergleich zur ebenfalls behandelten Kontrolle um rund 14 % gesenkt, diese Veränderung war statistisch signifikant. Die relative mediane AhR-Expression bezogen auf die unbehandelte Kontrolle sank nach Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DBP in den behandelten MUTZ-3 aus Ansatz V leicht ab und stieg in behandelten Zellen aus Ansatz VII minimal an, für MUTZ-3 aus Ansatz VII, die mit sgRNA B editiert worden waren, war der Anstieg statistisch signifikant (**Abbildung 41**).

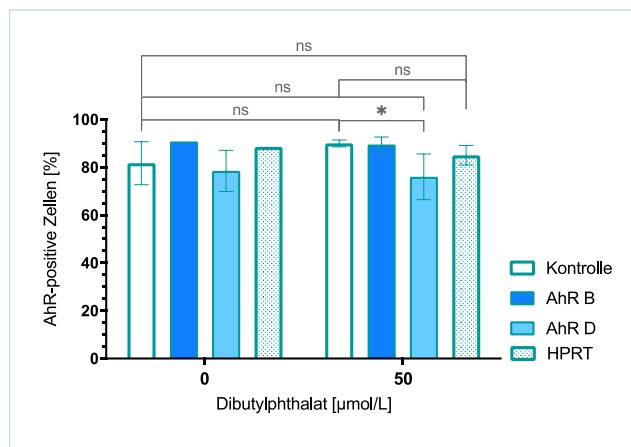


Abbildung 40. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz AhR-positiver Zellen in mit sgRNA B (AhRB) und sgRNA D (AhR D) geneditierten Populationen sowie in nicht-editierten Zellen (Kontrolle) und HPRT-Kontrollen (HPRT) von MUTZ-3 aus Ansatz VII nach Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DBP. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei bis drei Messungen.

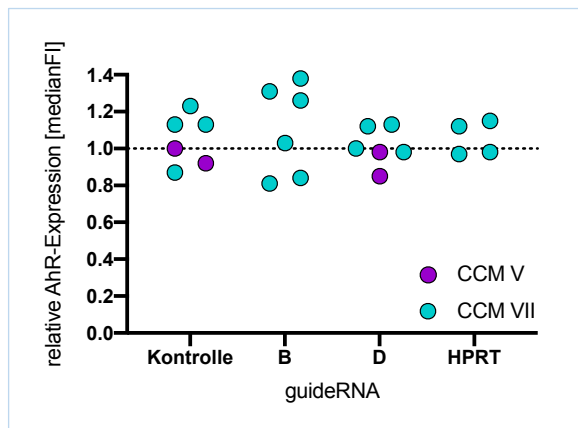


Abbildung 41. Relative mediane AhR-Expression in mit sgRNA B und D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geditierten Populationen von MUTZ-3 aus den Ansätzen V und VII nach Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen. Gezeigt Einzelwerte aus zwei bis drei Messungen.

▪ THP-1:

Etwas stärkere Reduktionen der Prozentsätze AhR-positiver Zellen konnten in sgRNA B und sgRNA D-editierten THP-1-Populationen (CCT B und CCT D) bereits mit 50 $\mu\text{mol/l}$ DPB erreicht werden (**Abbildung 42**). So reduzierten sich die Prozentsätze im Mittel statistisch nicht signifikant um 16,4 % für CCT B und 15,3 % für CCT D bezogen auf den Mittelwert mitgeführter, DBP-behandelter, nicht geditierter Kontrollen. Für CCT A liegen nur Werte aus einer Messung vor; bezogen auf die in dieser Messung mitgeführte, nicht geditierte, Kontrolle verringerte sich der Prozentsatz AhR-positiver Zellen in dieser Population um 9,6 %. Für CCT C lag der Wert im Mittel bei 2,9 %. Im Mittel keine Verringerung ergab sich zwischen unbehandelter und behandelter Kontrolle (74,1 % vs. 77,4 %) und zwischen uneditierter Kontrolle und HPRT-Kontrolle (74,1 % vs. 74,4 % ohne bzw. 77,4 % vs. 79,9 % mit DBP-Behandlung). Die relative AhR-Expression (relative mediane FI) sank in den behandelten Kontrollen sowie in den Populationen B, C und D. Dies war jedoch nur für die Population D statistisch signifikant (**Abbildung 43**). Die Viabilität sank in den behandelten Proben nicht (**Abbildung 69** im Anhang).

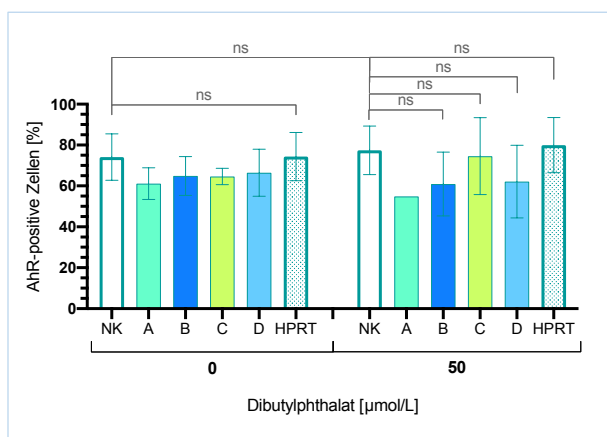


Abbildung 42. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz AhR-positiver Zellen in mit sgRNA A bis D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geditierten Populationen von THP-1 nach Behandlung mit 50 µmol/l DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen (NK). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei bis drei Messungen.

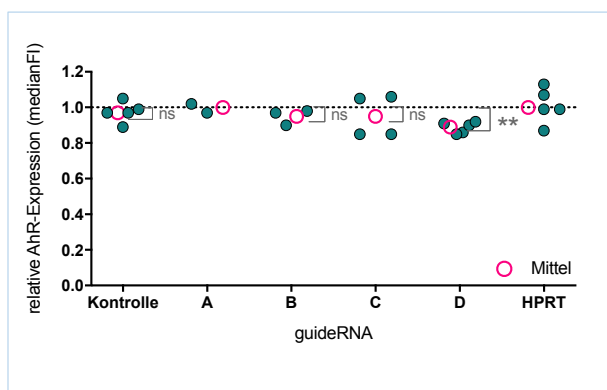


Abbildung 43. Relative mediane AhR-Expression in mit sgRNA A bis D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geditierten Populationen von THP-1 nach Behandlung mit 50 µmol/l DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen. Gezeigt sind Einzel- und Mittelwerte (Mittel) und aus zwei bis drei Messungen.

III.4.5.2 Selektionsprotokoll 2: Behandlung mit Dibutylphthalat und anschließende magnetische Depletion apoptotischer Zellen

Mit der reinen DBP-Behandlung konnten die durchflusszytometrisch bestimmten Prozentsätze AhR-positiver Zellen in editierten Populationen zwar bezogen auf die mitgeführten Kontrollen reduziert werden, zwischen unbehandelten und behandelten Populationen war der Unterschied jedoch deutlich weniger ausgeprägt (vier bis fünf Prozent). Es wurde daher eine Möglichkeit für die Depletion (früh-)apoptotischer AhR-positiver Zellen in den DBP-behandelten Populationen gesucht und mit den magnetischen Annexin V-Beads der Firma Miltenyi und dem zugehörigen Selektionssystem gefunden.

Da sich mit *guideRNA* D editierte THP-1 (CCT D) bis hierhin als am suszeptibelsten für die Behandlung mit DBP erwiesen hatten (Absenkung sowohl des prozentualen Anteils AhR-

Ergebnisse

positiver Zellen in dieser Population als auch statistisch signifikante Absenkung der relativen medianen AhR-Expression in diesen Zellen) und diese auch im unter II.9.2 beschriebenen Vorversuch zur Kokultur mit HaCaT die höheren Expressionen der Reifungsmarker gezeigt hatten, wurden diese Zellen für die weiteren Arbeiten am Testsystem verwendet und auch nur für diese das erweiterte Selektionsprotokoll eingesetzt.

So gelang es, über mehrere Passagen mit zwischengeschalteten Depletionsschritten (siehe II.7.4) den Prozentsatz AhR-positiver Zellen in der Population geneditierter THP-1 bezogen auf unbehandelte Kontrollen deutlich und statistisch signifikant zu senken (**Abbildung 44**).

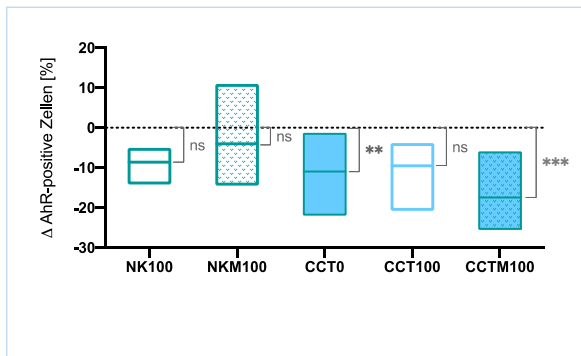


Abbildung 44. Differenz im Prozentsatz AhR-positiver Zellen nach Behandlung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ DBP in Populationen nicht editierter Kontrollen (NK100), geneditierter THP-1 (CCT100) und nach magnetischer Depletion apoptotischer Zellen (NKM100 bzw. CCTM100) und zum Vergleich in nicht behandelten, geneditierten Zellen (CCT0). Gezeigt sind Spannbreiten und Mittelwerte aus drei bis sechs Messungen.

Gleichzeitig sank die relative mediane AhR-Expression in den behandelten und der magnetischen Depletion apoptotischer Zellen unterzogenen Populationen statistisch signifikant ab; in Zellen, die während der magnetischen Depletion apoptotischer Zellen in der MACS-Säule verblieben waren, stieg währenddessen die relative mediane AhR-Expression bezogen auf unbehandelte, nicht geneditierte Kontrollen deutlich an, statistisch signifikant war dies jedoch nur für geneditierte Populationen (CCTS in **Abbildung 45**).

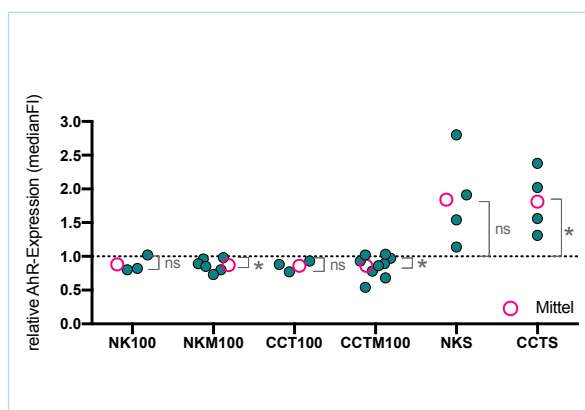


Abbildung 45. Relative mediane AhR-Expression in geneditierten Populationen (CCT100) von THP-1 und in nicht-editierten Kontrollen (NK100) nach Behandlung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ DBP und nach magnetischer Depletion apoptotischer Zellen (NKM100 bzw. CCTM100) sowie in Zellen, die in der MACS-Säule zurückblieben (NKS bzw. CCTS) bezogen auf uneditierte, unbehandelte Kontrollen. Gezeigt sind Einzel- und Mittelwerte (Mittel) und aus drei bis sechs Messungen.

So verblieben in Proben geneditierter und dem Selektionsprotokoll unterzogener Zellen im Median 33,2 % AhR-positive Zellen im Vergleich zu 42,4 % in ebenso behandelten, nicht geneditierten Kontrollen bzw. 57,5 % in unbehandelten THP-1 (**Abbildung 46, Tabelle 17**).

Tabelle 17. Mediane Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von THP-1 und CCT mit und ohne Behandlung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ DBP und anschließender magnetischer Depletion (MACS) apoptotischer Zellen.

	AhR-positive Zellen in Prozent			
	THP-1	THP-1 + DBP + MACS	CCT	CCT + DBP + MACS
Minimum	32,08	21,07	20,03	18,27
25% Perzentil	47,69	26,03	22,02	20,43
Median	57,46	42,37	45,70	33,22
75% Perzentil	68,98	67,87	65,27	57,10
Maximum	83,34	75,88	82,06	61,86

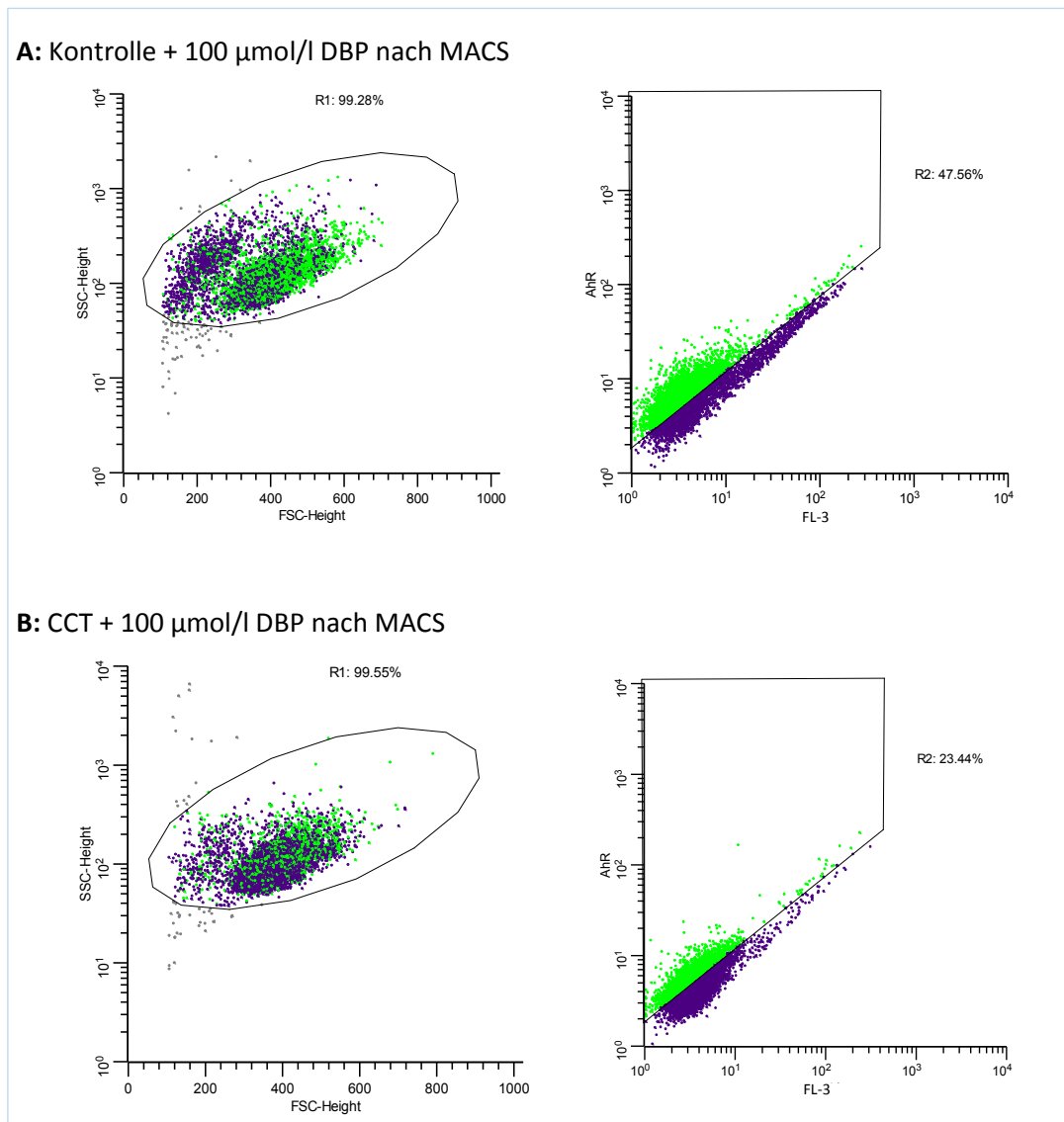


Abbildung 46. Grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse eines repräsentativen Experiments zum Selektionsprotokoll für AhR-negative Zellen mittels 100 $\mu\text{mol/l}$ DBP und magnetischer Depletion AhR-positiver, apoptotischer Zellen (MACS) im Vergleich von nicht geneditierten Kontrollzellen (A) mit einer AhR-Knockout-Population (B). SSC: *side scatter*, FSC: *forward scatter*, FL-3: Fluoreszenzkanal 3, in dem nur die Eigenfluoreszenz der Zellen zu sehen ist, AhR: anti-AhR-PE (FL-2).

Der Anteil von AhR-positiven Zellen in Populationen von THP-1 konnte demnach mittels CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockout gefolgt von der Selektion mit DPB und magnetischer Depletion apoptotischer Zellen um im Mittel 20,3 % (statistisch signifikant, $p = 0,008$) gesenkt werden. Derart behandelte Zellen wurden im Weiteren für den Einsatz in den Kulturen mit HaCaT und Jurkat eingesetzt.

III.5 Blockade von PD-L1 auf THP-1 und CCT

Nach der methodischen Etablierung und Optimierung des AhR-Knockouts und der Anreicherung AhR-negativer Zellen über die Selektion mit DBP und die magnetische Depletion apoptotischer Zellen wurde als nächstes die Blockade von PD-L1 auf diesen Zellen mit einem monoklonalen Antikörper untersucht.

Für die Blockade des PD-L1 auf THP-1 und geneditierten THP-1 (CCT), die in die Kokultur mit HaCaT (Kokultur B) eingesetzt werden sollten, wurde der Anti-PD-L1-Antikörper von Thermo Fisher mit 1 µg/ml verwendet. Bei diesen Zelltypen wird PD-L1 auf einem geringeren Anteil der Population exprimiert als bei differenzierten MUTZ-LC (im Mittel 12 bis 20 % auf THP-1/CCT im Vergleich zu 50 bis 60 % auf MUTZ-LC nach fünf bzw. sieben Tagen Differenzierung). In Populationen von THP-1 wurde nach der Inkubationszeit im Mittel nur noch auf 4 % Prozent der Zellen PD-L1 nachgewiesen (**Abbildung 47 A**). Gleichzeitig sank die Expression von PD-L1 auf den verbliebenen PD-L1-positiven Zellen mit und ohne Blockade im Mittel leicht ab, wie die durchflusszytometrische Messung der mittleren Fluoreszenzintensität zeigte.

In genetisch modifizierten AhR-defizienten CCT-Populationen wurden die Prozentzahlen PD-L1-positiver Zellen durch die Antikörperblockade etwas weniger, aber ebenfalls statistisch signifikant, auf im Mittel 5,1 % abgesenkt (**Abbildung 47 B**). Auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), also die Expression auf den verbliebenen PD-L1-positiven Zellen, sank leicht ab, dies war jedoch nicht statistisch signifikant.

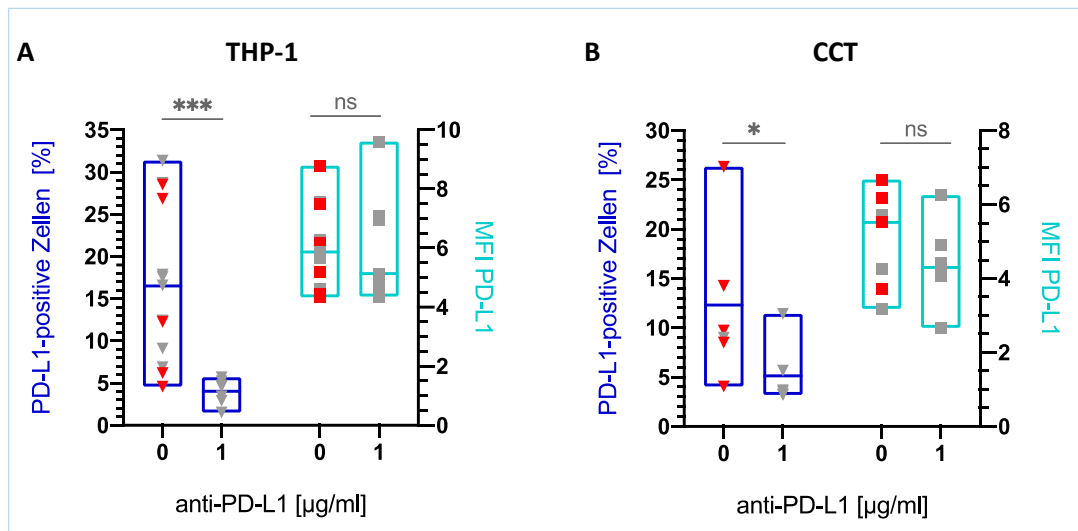


Abbildung 47. Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen (dunkelblaue Balken, linke y-Achsen) in THP-1- (A) und CCT- (B) Populationen, die in Kokultur mit HaCaT eingesetzt wurden, nach Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-PD-L1 (Thermo Fisher) und MFI PD-L1-positiver Zellen in diesen Populationen (hellblaue Balken, rechte y-Achsen). Gezeigt sind Einzelwerte aus drei bis vier unabhängigen Versuchen (graue Symbole) sowie Spannweiten und Mediane. Rote Symbole zeigen Messwerte von mitgeführten Isotyp-Kontrollen; einseitige P-Werte für % PD-L1-positive Zellen.

Der Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen ließ sich demnach unter Verwendung des Antikörpers effektiv senken. In Populationen AhR-defizienter THP-1 lagen die Prozentsätze und auch die Expression des Markers auf positiven Zellen etwas unter denen nicht editierter Zellen, wurden aber im Vergleich weniger deutlich gesenkt. Dabei gilt zu bedenken, dass auf den Knockout-Zellen die Blockade methodisch bedingt nach der Selektion mit DBP erfolgte und die PD-L1-Expression nach der Kokultur mit HaCaT auf ansonsten unbehandelten Zellen gemessen wurde.

III.6 Kokultur B: AhR-Knockout-Zellen (CCT) mit und ohne PD-L1-Blockade und HaCaT

III.6.1 Vorversuche

Da sich der AhR-Knockout und die anschließende Selektion mit DBP in THP-1 als effizienter als in MUTZ-3 erwiesen hatten, wurde im Folgenden mit THP-1 weitergearbeitet

und diese in das Kokulturmodell mit HaCaT eingeführt. In den unter II.9.2 beschriebenen Vorversuchen zur Kokultur von HaCaT mit verschiedenen AhR-defizienten THP-1-Populationen erwies sich die Population CCT D als diejenige, die konsistent stärker auf die Behandlung mit Allergenen reagierte, weshalb diese für die weiteren Arbeiten ausgewählt wurde.

Des Weiteren wurden Versuche zur Ermittlung geeigneter Konzentrationen der eingesetzten Testsubstanzen unternommen, da THP-1 dazu neigen, auf zytotoxische Substanz-Konzentrationen mit der Hochregulation der Reifungsmarker zu reagieren (sog. *apoptosis induced activation*), so dass etwa SLS ein falsch-positives Signal liefern kann. Dazu wurden THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade in Kokultur mit HaCaT mit steigenden Konzentrationen der drei ausgewählten Testsubstanzen, dem extremen Allergen DNCB, dem moderaten Allergen MBT und dem Irritant SLS, behandelt und die Viabilität durchflusszytometrisch bestimmt (**Abbildung 48**).

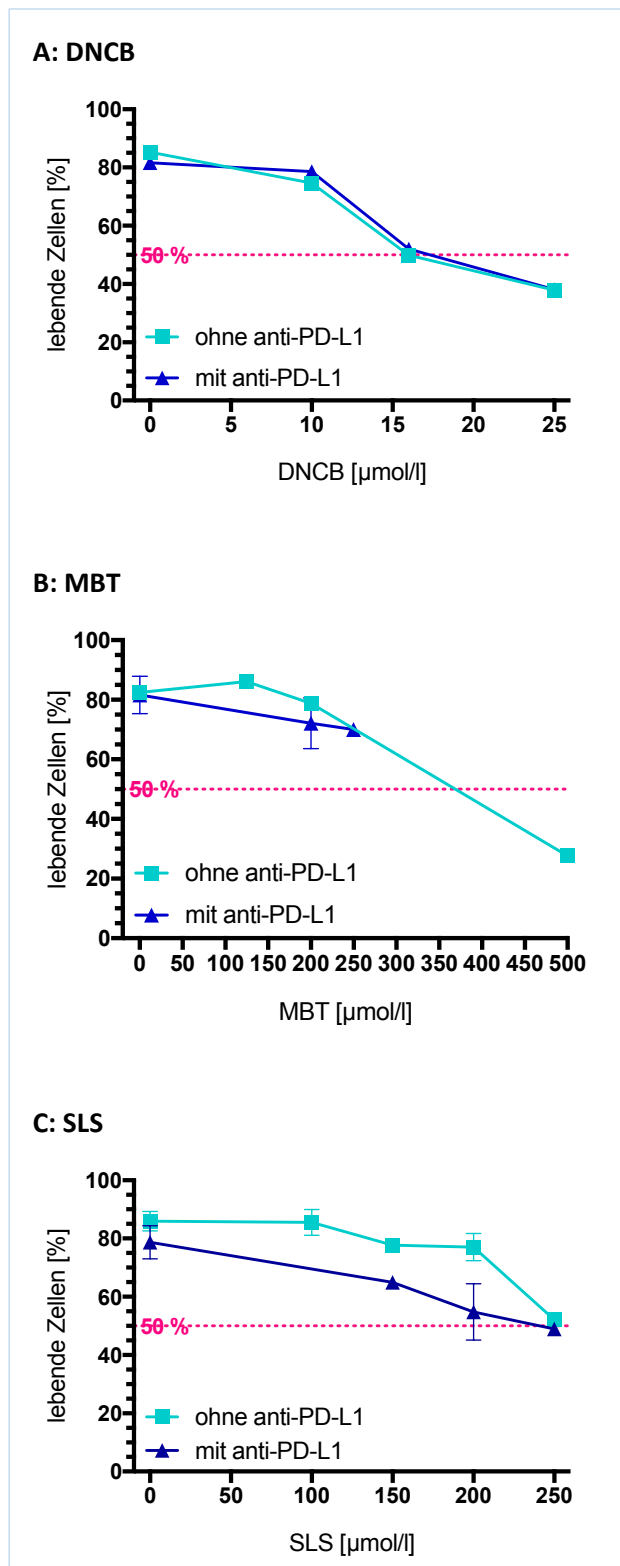


Abbildung 48. Durchflusszytometrisch bestimmte Viabilität von THP-1 mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) Blockade des PD-L1 nach zweitägiger Inkubation in Kokultur mit HaCaT mit steigenden Konzentrationen des extremen Allergens DNCB (A), des moderaten Allergens MBT (B) und des Irritanz SLS (C). Für den weiteren Einsatz in Kokultur B wurden Substanzkonzentrationen ausgewählt, die nur leicht zytotoxisch waren. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem bis drei Experimenten.

Parallel wurden die Expressionen des Aktivierungsmarkers CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 auf THP-1 in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit den Testsubstanzen gemessen und Konzentrationen ermittelt, die einen Anstieg der Expressionen verursachten. Auf diese Weise wurden folgende aktivierende und gleichzeitig nur minimal zytotoxische Konzentrationen bestimmt, die in Kokultur mit HaCaT eingesetzt wurden, um THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade und mit und ohne AhR-Knockout für die folgende Kokultur mit Jurkat-T-Zellen zu aktivieren: 10 µmol/l DNCB, 200 µmol/l MBT und 150 µmol/l SLS.

III.6.2 Regulation von Reifungsmarkern auf THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich die Blockade von PD-L1 und der AhR-Knockout auf die Stimulierbarkeit von THP-1 in Kokultur mit HaCaT durch Behandlung mit den ausgewählten Testsubstanzenkonzentrationen auswirkte.

Die vier Zelltypen – THP-1, PD-L1-blockierte THP-1 (THP-1+), AhR-k.o. THP-1 (CCT) und PD-L1-blockierte AhR-k.o. THP-1 (CCT+) – zeigten je nach Behandlung in der Kokultur mit HaCaT messbare Unterschiede in der Regulation des Reifungsmarker CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54.

Wie bereits für PD-L1-blockierte MUTZ-LC beobachtet, wurde auf AhR-k.o.-THP-1 mit (CCT+) und ohne (CCT) PD-L1-Blockade bereits ohne Behandlung mit Allergenen eine gegenüber unblockierten und nicht genmodifizierten THP-1 eine im Mittel 1,6-fach erhöhte Expression von CD86 und eine 1,3-fach erhöhte Expression von CD54 gemessen (**Abbildung 49**). Die Erhöhung war nicht statistisch signifikant. Die PD-L1-Blockade allein führte auf THP-1 – anders als auf MUTZ-LC – zu keiner nennenswerten Erhöhung der Markerexpression.

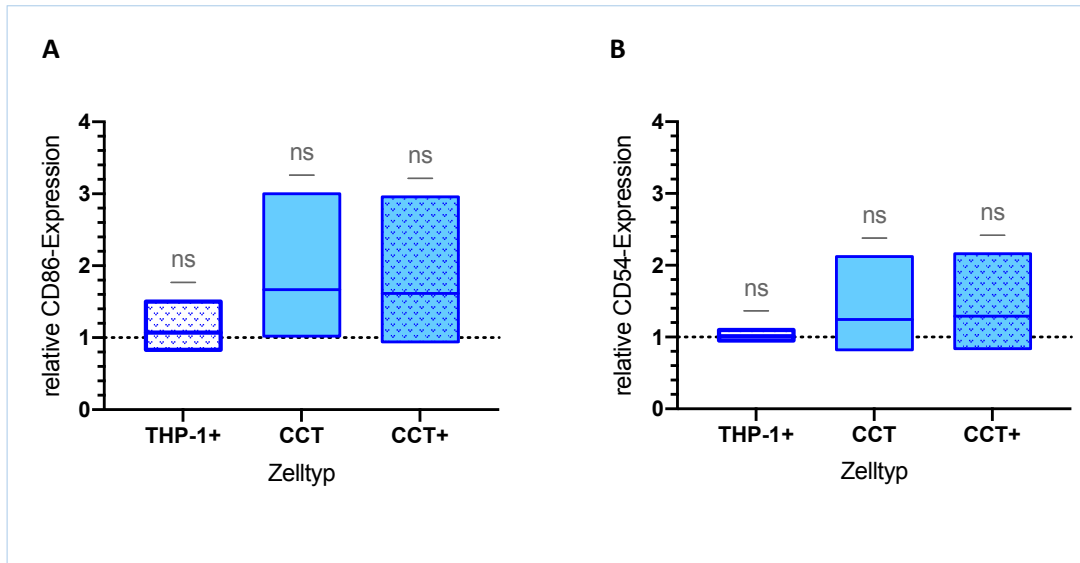


Abbildung 49. Durchflusszytometrisch bestimmte relative Expression der Marker CD86 (A) und CD54 (B) auf PD-L1-blockierten (THP+) und/oder AhR-defizienten THP-1 (CCT+/ CCT) bezogen auf THP-1 ohne PD-L1-Blockade. Gezeigt sind Mittelwerte und Spannweiten aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach Stimulation mit Allergenen reagierten alle vier Zelltypen mit der Hochregulation von CD86 und CD54 bezogen auf die unbehandelte, nicht geneditierte, nicht blockierte THP-1-Kontrolle (**Abbildung 50**). Dabei unterschieden sich die Gruppen untereinander nicht statistisch signifikant, wengleich die AhR-defizienten Populationen mit einer stärkeren mittleren Hochregulation von CD54 auf die Stimulation mit DNCB reagierten. Die Hochregulation von CD54 nach Behandlung mit 10 $\mu\text{mol/l}$ DNCB auf nicht blockierten, uneditierten THP-1 war nur gering, aber statistisch signifikant. Die geneditierten Populationen reagierten auf die Behandlung mit dem Irritanz SLS interessanterweise mit einer statistisch signifikanten Absenkung der CD54-Expression verglichen mit den nicht modifizierten, unbehandelten Kontrollen. Besonders ausgeprägt war diese Herabregulation der CD54-Expression auf AhR-Knockout-Populationen mit PD-L1-Blockade (CCT+).

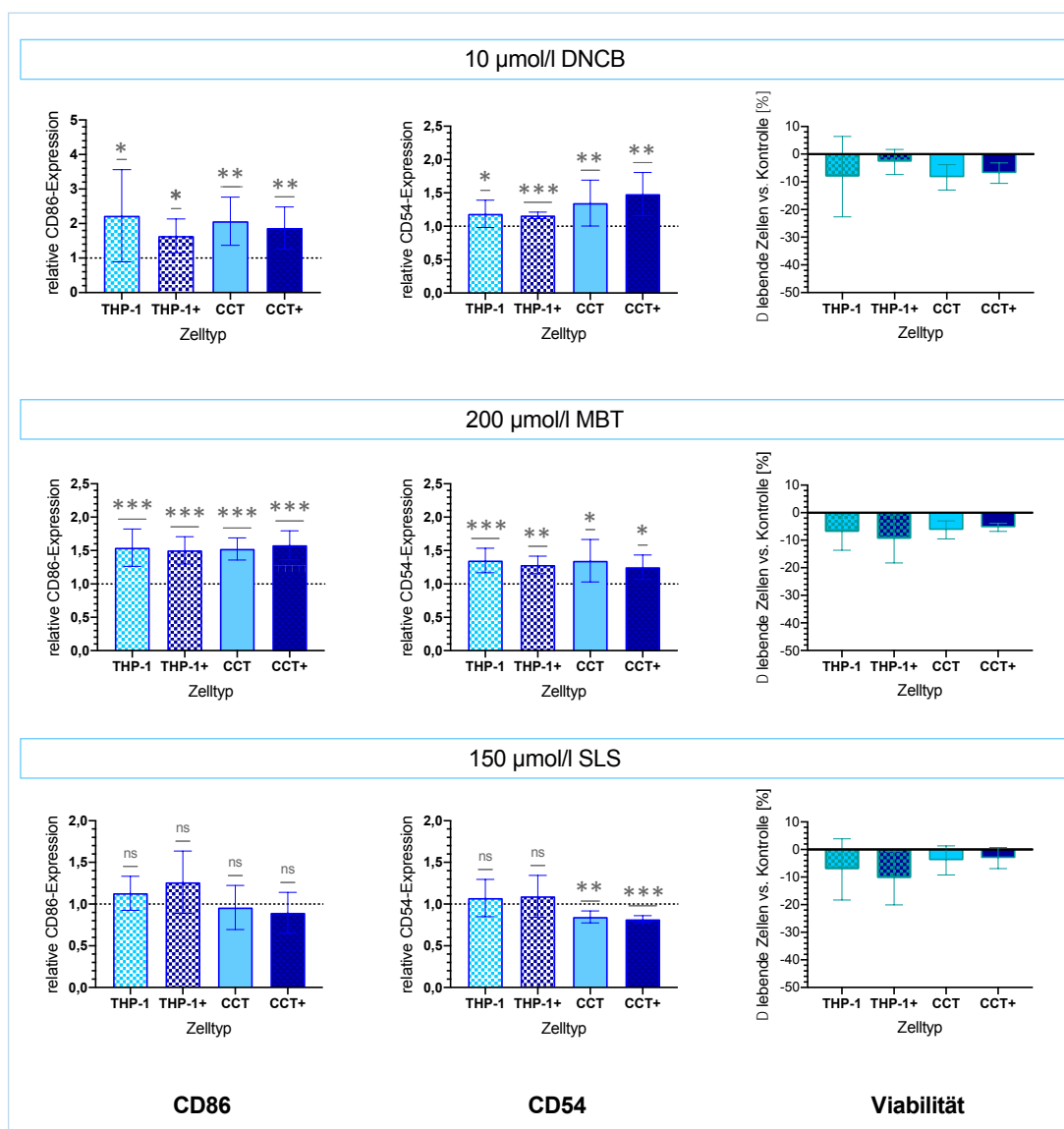


Abbildung 50. Regulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 auf THP-1, PD-L1-blockierten THP-1 (THP+), geneditierten Zellen (CCT) und geneditierten und PD-L1-blockierten Zellen (CCT+) bezogen auf unbehandelte THP-1-Kontrollen unter Berücksichtigung des Blockade- und/oder Knockout-Effekts (Nullkontrolleneffekt) und die Reduktion der Viabilität der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen desselben Typs nach Behandlung mit den Testsubstanzen DNCB, MBT und SLS. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

Insgesamt zeigte sich, dass Knockout-Populationen im Vergleich mit nicht genetisch modifizierten Zellen mit einer vergleichbaren Regulation von CD86, aber einer stärkeren Expressionserhöhung von CD54 auf das extreme Allergen DNCB reagierten. Nach

Behandlung mit SLS konnte eine Herunterregulierung der Marker gemessen werden, was für eine Diskriminierung zwischen Allergenen und Irritantien von Vorteil sein kann. Die Behandlung mit dem moderaten Allergen MBT führte in allen Zelltypen zu ähnlich ausgeprägten Reaktionen, die Gruppen waren nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

III.6.3 AhR-Expression in THP-1 und CCT vor und nach Kokultur mit HaCaT

Eine interessante Beobachtung ergab sich bezüglich der zytosolischen Expression des AhR in THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT. Diese wurde durchflusszytometrisch vor und nach der Kokultur in ansonsten unbehandelten Zellen bestimmt, um sicherzustellen, dass tatsächlich unterschiedliche Populationen in der Kultur verwendet wurden. Dabei fiel auf, dass nach der Kokultur sowohl die Prozentsätze AhR-positiver Zellen als auch die mediane FI positiver Zellen deutlich abgesunken war (**Abbildung 51**). So waren vor der Kokultur im Mittel 67,4 % ($\pm 17,3$ %) der THP-1 AhR-positiv mit einer medianen FI von im Mittel 6,9 ($\pm 1,1$), nach der Kokultur waren im Mittel noch 30 % ($\pm 12,1$ %) der THP-1 AhR-positiv (medianFI 5,2 \pm 0,6) und nur noch 23 % ($\pm 12,4$ %) der PD-L1-blockierten THP-1 (medianFI 5,3 \pm 1,39). Insgesamt niedrigere Werte wurden für CCT gemessen: An Tag 0 waren im Mittel 45 % ($\pm 15,3$ %) AhR-positiv mit einer medianen FI von 5,9 ($\pm 0,9$), nach der Kokultur waren es im Mittel noch 28 % ($\pm 13,9$ %) in der unblockierten Population (medianFI 5,0 \pm 0,9) und 19 % (± 17 %) in der Population mit zusätzlicher PD-L1-Blockade (medianFI 4,9 \pm 0,5).

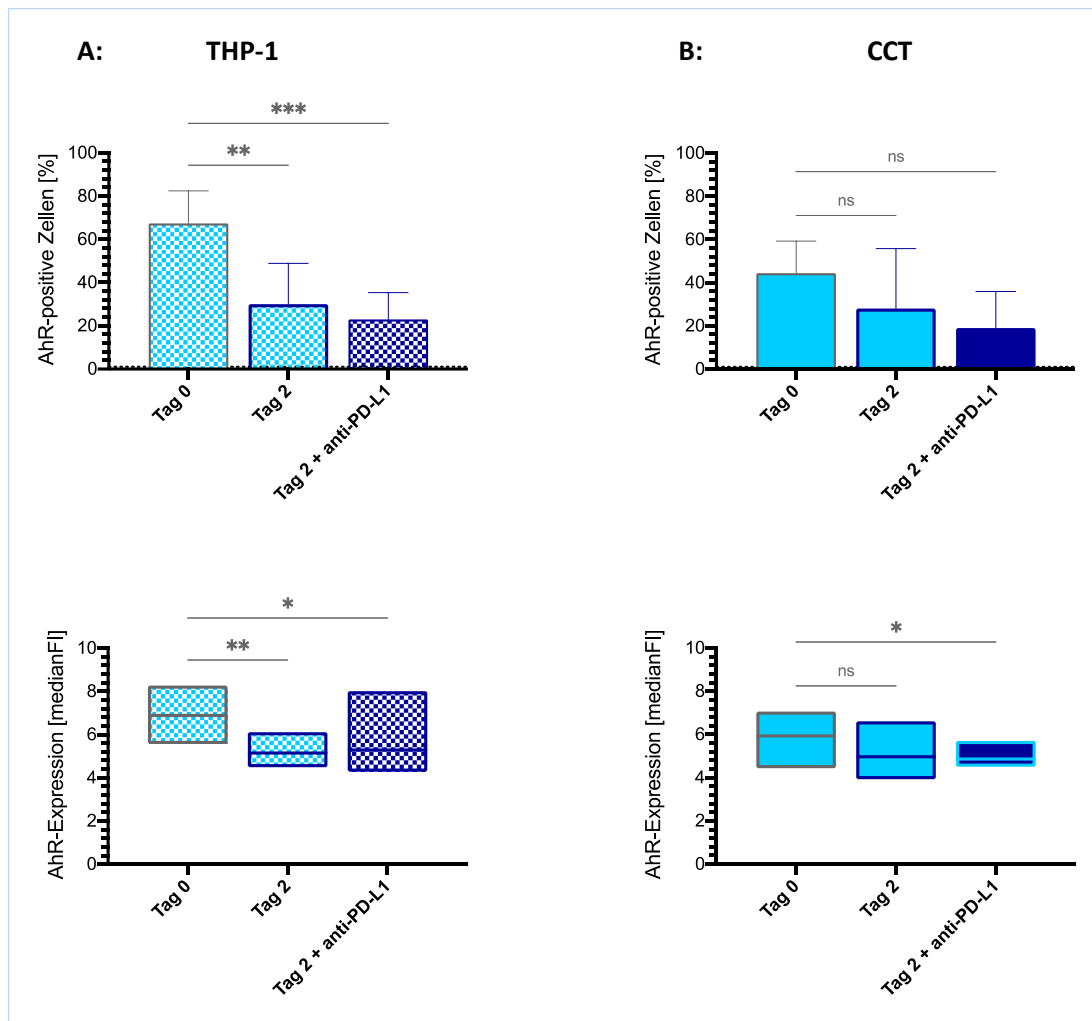


Abbildung 51. Oben: Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von THP-1 (A) und CCT (B) vor (Tag 0) und nach (Tag 2) Kokultur mit HaCaT. **Unten:** AhR-Expression als mediane FI auf AhR-positiven Zellen in Populationen von THP-1 (A) und CCT (B) vor (Tag 0) und nach (Tag 2) Kokultur mit HaCaT. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für Prozentsätze und Mittelwerte und Spannweiten für medianFI-Werte aus fünf unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits durch die Kokultur mit HaCaT in THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade die durch die intrazelluläre durchflusszytometrische Messung erfassbare zytosolische AhR-Expression reguliert wird.

III.6.4 ELISA: IL-8 in Überständen der Kokultur von THP-1/CCT mit HaCaT

Das proinflammatorische Zytokin IL-8 wurde in der Arbeitsgruppe bereits in den Überständen anderer Kokulturen aus monozytären/dendritischen Zellen und

Ergebnisse

Hautepithelzellen in hohen Mengen nachgewiesen (nicht publiziert) und im Zuge der vorliegenden Arbeit auch in den Überständen der Jurkat-Kokultur (Kokultur C, siehe III.7.3) gefunden. Um einen übermäßigen Eintrag des Zytokins aus Kokultur B (THP-1/CCT und HaCaT) in die Jurkat-Kultur auszuschließen, wurden Überstände aus Kokultur B daraufhin mittels ELISA überprüft. Außerdem lag die Vermutung nahe, dass sich die Sekretion von IL-8 als Ausleseparameter für die Aktivierung von Keratinozyten (KE1) eignen könnte, da dieses Zytokin insbesondere auch von Epithelzellen produziert wird. So konnte IL-8 in allen Überständen nachgewiesen werden (**Abbildung 52**).

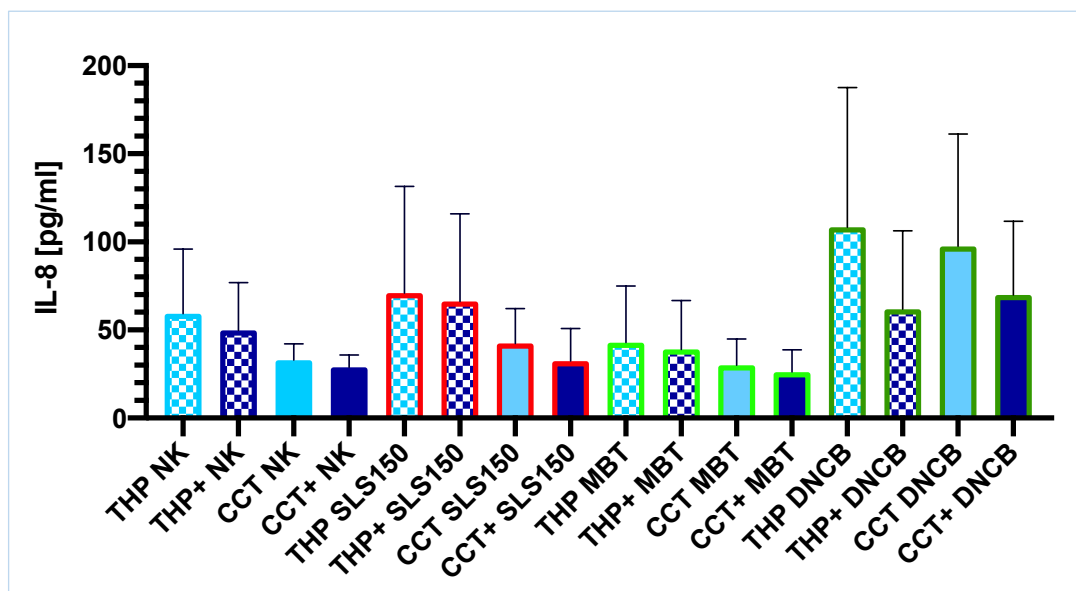


Abbildung 52. Mittels ELISA bestimmte Konzentrationen von IL-8 in Überständen der Kokultur mit HaCaT nach Zelltyp und Behandlung. THP: THP-1 (hellblau gemustert), THP+: THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau gemustert), CCT: AhR-k.o. THP-1 (hellblau), CCT+: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau), NK: Nullkontrolle, SLS150: 150 $\mu\text{mol/l}$ SLS (rote Rahmen), MBT: 200 $\mu\text{mol/l}$ MBT (hellgrüne Rahmen), DNCB: 10 $\mu\text{mol/l}$ DNCB (dunkelgrüne Rahmen). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die höchsten Konzentrationen wurden in den Proben gemessen, die mit SLS oder DNCB behandelt worden waren und explizit in den Proben THP-1 mit 10 $\mu\text{mol/l}$ DNCB und CCT mit 10 $\mu\text{mol/l}$ DNCB. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten ergaben sich für den Vergleich von THP-Nullkontrollen (THP NK) mit den Kontrollen der Knockout-Populationen mit PD-L1 Blockade (CCT+ NK). Der Vergleich zwischen den

beiden Knockout-Populationen blieb statistisch nicht signifikant.

Die geringsten IL-8-Konzentrationen wurden jeweils in den Ansätzen mit PD-L1-blockierten AhR-k.o.-Zellen gemessen, die höchsten jeweils in Kokulturen mit nicht PD-L1-blockierten und nicht AhR-defizienten THP-1. Im Vergleich mit der entsprechenden, unbehandelten Kontrolle zeigte sich für die Kokultur mit AhR-defizienten und/oder PD-L1-blockierten Zellen im Mittel eine leichte Erhöhung der IL-8-Konzentration, wenn die Zellen mit SLS behandelt worden waren, eine leichte Absenkung der mit MBT-Behandlung und eine Verdoppelung der Konzentration mit DNCB-Behandlung. Damit konnte auch für das proinflammatorische Zytokin IL-8 in der Kokultur von HaCaT mit monozytären Zellen eine differenzielle Regulation in Abhängigkeit von der Testsubstanzbehandlung und der Expression immunsupprimierender Rezeptoren nachgewiesen werden.

III.7 Kokultur C: THP-1/CCT und Jurkat

III.7.1 Proliferation von Jurkat nach Kokultur mit THP-1 und CCT

Die in der Kokultur mit HaCaT mittels Testsubstanz-Zugabe aktivierten THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade wurden im nächsten Schritt, in Anlehnung an KE3 des AOP für Sensibilisierung durch Hautkontakt, mit Zellen der T-Zelllinie Jurkat kokultiviert. So sollte geprüft werden, ob Allergen-stimulierte THP-1 eine messbare T-Zell-Aktivierung induzieren können und welchen Effekt dabei die Blockade des PD-L1 und der Knockout des AhR haben.

Die Proliferationsaktivität wurde durchflusszytometrisch an CD3-positiven Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Mitose-anzeigende Protein Ki-67 ermittelt. Dabei fungierte CD3 als Korezeptor des T-Zell-Rezeptors als Unterscheidungsmerkmal zwischen Monozyten (THP-1/ CCT) und T-Zellen (Jurkat). Der Prozentsatz von Zellen, die Ki-67 stark exprimierten (Ki-67^{high}) wurde als Ausleseparameter für die Proliferation der CD3-positiven Zellen herangezogen. Die Kokultur mit THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade sowie CCT mit und ohne PD-L1-Blockade wirkte sich je nach Zelltyp bereits ohne Behandlung der monozytären Zellen auf die Proliferation von Jurkat-T-Zellen aus (**Abbildung 53**). So wurde eine statistisch signifikante Absenkung des Prozentsatzes stark proliferierender Jurkat in Kokultur bezogen auf Jurkat in Solokultur gemessen, wenn auf

Ergebnisse

kokultivierten THP-1 (ohne Testsubstanzbehandlung) der PD-L1 blockiert und/oder der AhR ausgeknockt worden war. Die Behandlung von Jurkat mit Anti-CD3/CD28-Beads induzierte eine starke Proliferation in Solokultur.

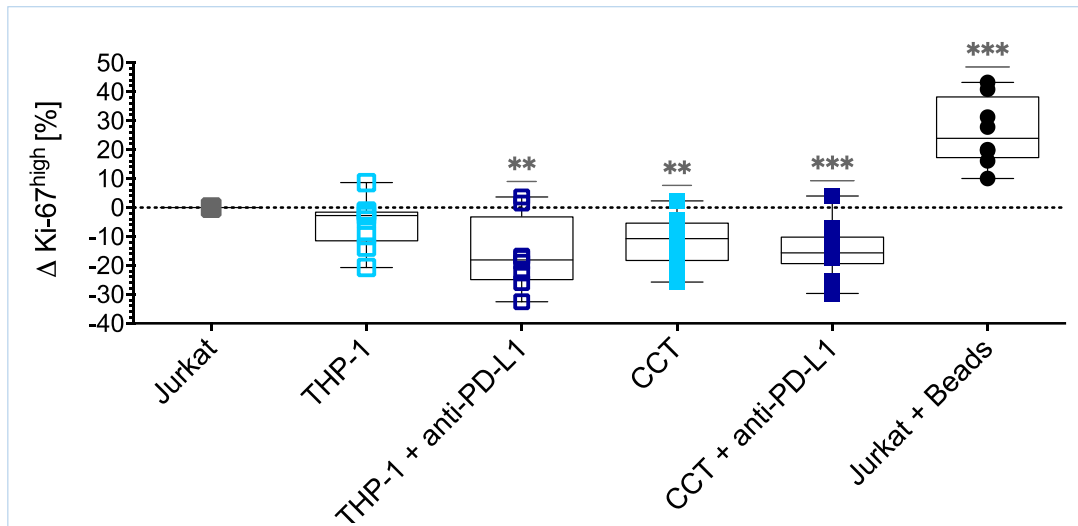


Abbildung 53. Veränderung des prozentualen Anteils stark proliferierender CD3-positiver Zellen nach Kokultur mit THP-1 (hellblau umrandete Quadrate), THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau umrandete Quadrate), CCT (hellblaue Quadrate) oder CCT mit PD-L1-Blockade (dunkelblaue Quadrate) aus der Kokultur mit HaCaT bezogen auf Jurkat in Solokultur (Jurkat). Als Positivkontrolle dienten Jurkat in Solokultur, die mit Anti-CD3/CD28-Beads behandelt worden waren (Jurkat + Beads). Gezeigt sind Einzelwerte, Mediane und Spannweiten aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten. Nicht signifikante Veränderungen sind nicht markiert.

Um den Effekt der Behandlung der monozytären Zellen mit Testsubstanzen auf die Proliferation von Jurkat in Kokultur zu ermitteln, wurde die Veränderung der Prozentsätze stark proliferierender Jurkat in Kokulturen mit behandelten THP-1 bzw. CCT mit und ohne PD-L1-Blockade zur entsprechenden Nullkontrolle (gleicher Zelltyp, aber ohne Testsubstanz-Behandlung) bestimmt (**Abbildung 54**). So wurden die Prozentsätze stark proliferierender Jurkat in Kokultur mit behandelten THP-1 statistisch signifikant gesenkt und zwar unabhängig von der Art der Testsubstanz (**Abbildung 54 THP-1**). Wurde auf THP-1 der PD-L1 mittels Antikörper blockiert, wurde die Proliferation von kokultivierten Jurkat im Vergleich zu Kokulturen mit nicht blockierten THP-1 angeregt, in Kokulturen nach SLS-Behandlung statistisch signifikant über den Wert der mitgeführten Kontrolle (**Abbildung 54**

THP-1 + anti-PD-L1). In Kokulturen mit AhR-Knockout-Populationen (CCT) wurde der Prozentsatz stark proliferierender Jurkat nach Allergenbehandlung von CCT im Vergleich zu Kokulturen mit THP-1 ebenfalls erhöht, nach Behandlung der CCT mit SLS jedoch nicht, so dass in diesen Kokulturen der Prozentsatz stark proliferierender Jurkat statistisch signifikant geringer blieb als in Kokulturen mit der unbehandelten Kontrolle (**Abbildung 54 CCT**). Wurden nun THP-1 sowohl mittels PD-L1-Blockade als auch AhR-Knockout modifiziert, wurde durch die Kokultur mit solchen Zellen nach Behandlung mit Allergenen der Prozentsatz stark proliferierender Jurkat noch weiter erhöht, für MBT-behandelte Proben statistisch signifikant über den Wert der mitgeführten Kontrolle. Die Effekte von SLS-Behandlung und PD-L1-Blockade bzw. AhR-Knockout hoben sich auf, so dass in Kokulturen mit PD-L1-blockierten CCT der Prozentsatz stark proliferierender Jurkat im Vergleich zur Kokultur mit der unbehandelten Kontrolle gleich blieb (**Abbildung 54 CCT + anti-PD-L1**).

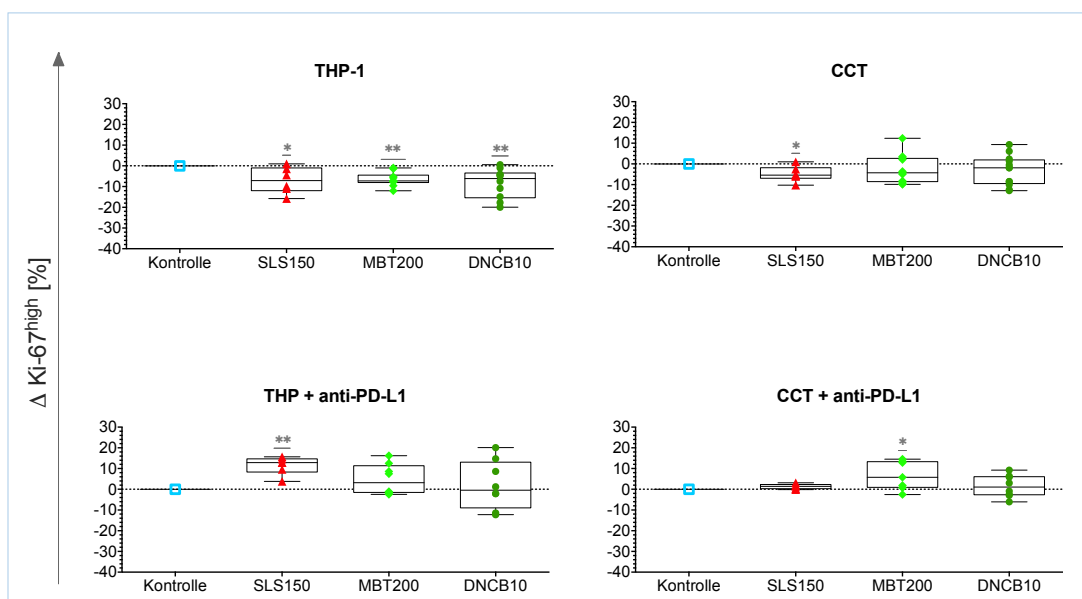


Abbildung 54. Veränderung des prozentualen Anteils stark proliferierender CD3-positiver Zellen nach Kokultur mit THP-1, THP-1 mit PD-L1-Blockade, CCT oder CCT mit PD-L1-Blockade aus der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit 150 μ mol/l SLS (SLS150, rote Dreiecke), 200 μ mol/l MBT (MBT200, hellgrüne Rauten) oder 10 μ mol/l DNCB (DNCB10, dunkelgrüne Kreise) bezogen auf Kulturen mit nicht Testsubstanz-behandelten Zellen (Kontrolle). Gezeigt sind Einzelwerte, Mediane und Spannweiten aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten. Nicht-signifikante Veränderungen sind nicht markiert. CCT: AhR-k.o.-Population

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der monozytären Zellen in der vorgeschalteten Kokultur mit HaCaT einen differenziellen Einfluss auf die Proliferation von kokultivierten Jurkat-T-Zellen hat. Die Blockade des immunsupprimierenden Rezeptors PD-L1 auf monozytären Zellen und der AhR-Knockout in diesen Zellen steigerten die Fähigkeit dieser Zellen, nach Behandlung mit Allergenen die Proliferation kokultivierter Jurkat anzuregen. Während jedoch die alleinige Blockade des PD-L1 auf THP-1 und die Behandlung dieser mit SLS in der Kokultur mit HaCaT zu einer starken Anregung der Proliferation kokultivierter Jurkat führte, war dies in Kokulturen mit AhR-defizienten, jedoch nicht PD-L1-blockierten Populationen nicht der Fall. Auf diese Weise ermöglichte die additive Wirkung von PD-L1-Blockade und AhR-Knockout eine Unterscheidung zwischen Allergenen und dem Irritant im Hinblick auf die durch entsprechend behandelte monozytäre Zellen induzierte Proliferation von Jurkat-T-Zellen.

III.7.2 CD3-Expression auf Jurkat nach Kokultur mit THP-1 und CCT

Zusätzlich zur Proliferation von Jurkat wurde die Veränderung der Expression des TCR-Korezeptors CD3 auf diesen Zellen nach Kokultur mit Testsubstanz-stimulierten monozytären Zellen aus der Kokultur mit HaCaT untersucht.

Bezogen auf die Jurkat-Solokultur führte sowohl die Behandlung von Jurkat mit Anti-CD3/CD28-Beads als auch die Kokultur mit allen vier monozytären Zelltypen bereits ohne vorherige Testsubstanz-Behandlung zu einer deutlichen, statistisch signifikanten Absenkung der durchflusszytometrisch bestimmten CD3-Expression auf stark proliferierenden Jurkat (**Abbildung 55**). Die Absenkung war für Kokulturen mit AhR-defizienten Populationen stärker ausgeprägt als für Jurkat mit Beads oder Jurkat in Kokultur mit PD-L1-blockierten und unblockierten THP-1.

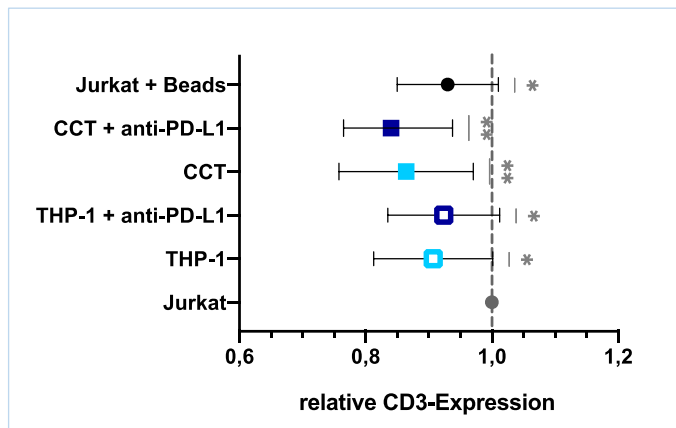


Abbildung 55. Relative CD3-Expression auf stark proliferierenden Jurkat nach Inkubation mit Beads (Jurkat + Beads) oder THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade aus der Kokultur mit HaCaT ohne Testsubstanz-Behandlung bezogen auf Jurkat in Solokultur.

Bezogen auf die Kokulturen mit der unbehandelten Kontrolle veränderte sich die CD3-Expression in THP-1/Jurkat-Kokulturen durch vorherige Testsubstanz-Behandlung der THP-1 in Kokultur mit HaCaT nicht (**Abbildung 56 THP**). In Kokulturen mit geneditierten Zellen stieg die relative CD3-Expression bezogen auf unbehandelte Kontroll-Kokulturen auf stark proliferierenden Jurkat leicht, aber statistisch signifikant an, wenn CCT vorher in Kokultur mit HaCaT mit DNCB behandelt worden waren (**Abbildung 56 CCT**). Wurde zusätzlich der PD-L1 auf CCT blockiert, wurde die CD3-Expression im Vergleich zu Kokulturen mit unbehandelten Kontrollen in den Kokulturen mit DNCB-stimulierten CCT noch stärker induziert und auch Kokulturen mit MBT-stimulierten CCT leicht angeregt (**Abbildung 56 CCT + anti-PD-L1**). Erfolgte jedoch lediglich die PD-L1-Blockade auf THP-1, verringerte sich die relative Expression von CD3 auf stark proliferierenden Jurkat in Kokultur mit Allergen-stimulierten THP-1 statistisch signifikant (**Abbildung 56 THP-1 + anti-PD-L1**). In keiner der Kokulturen, die Zellen enthielten, die in Kokultur mit HaCaT mit dem Irritanz SLS behandelt worden waren, zeigte sich in Bezug auf die jeweilige unbehandelte Kontroll-Kokultur eine Veränderung der CD3-Expression auf stark proliferierenden Jurkat.

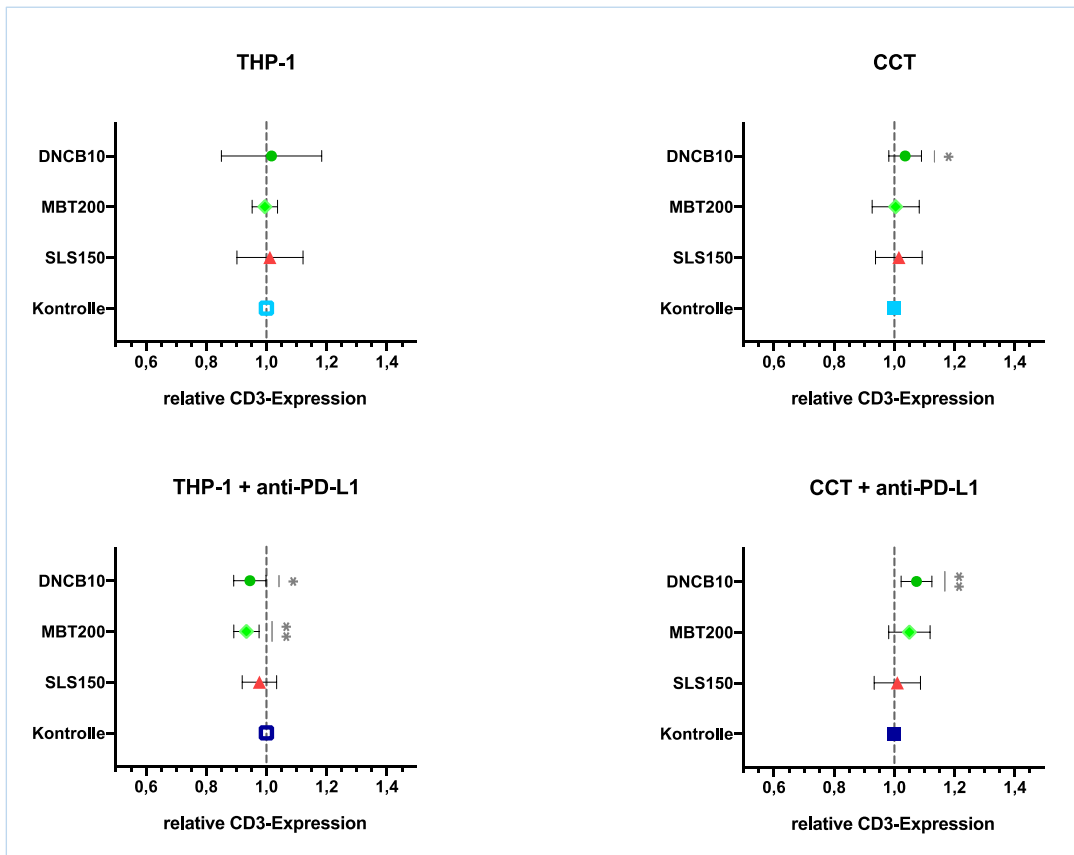


Abbildung 56. Relative CD3-Expression auf Jurkat aus Kokultur C nach Inkubation mit THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade und Testsubstanz-Behandlung mit 150 $\mu\text{mol/l}$ SLS (SLS150), 200 $\mu\text{mol/l}$ MBT (MBT200) oder 10 $\mu\text{mol/l}$ DNCB (DNCB10) bezogen auf Kokulturen mit der entsprechenden unbehandelten Kontrolle (Kontrolle). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten. Nicht-signifikante Werte sind nicht markiert.

Auch für die Expression des TCR-Korezeptors CD3 auf stark proliferierenden Jurkat konnte in Kokulturen mit AhR-defizienten und/oder PD-L1-blockierten Zellen ein Effekt gemessen werden, wenn die Monozyten zuvor in Kokultur mit HaCaT mit Allergenen behandelt worden waren. Dabei verursachten PD-L1-Blockade und AhR-Knockout gegenläufige Effekte.

III.7.3 ELISA: Zytokine, die nicht im Medium von Kokultur C nachgewiesen werden konnten

Als weiterer Ausleseparameter für die Aktivierung von Zellen im Kokultursystem wurde die Sekretion von Zytokinen ins Medium herangezogen. Dazu wurden die Überstände der

Jurkat-Kokultur mit monozytären Zellen auf typische T-Zell-Zytokine mittels ELISA untersucht.

In den Überständen ließen sich mittels klassischem Sandwich-ELISA weder IL-17A noch IL-2 nachweisen. Diese Ergebnisse wurden durch das T-Zell-Zytokin-Kit mit 21 T-Zell-assoziierten Zytokinen im Multiplex-Assay bestätigt.

Mittels des 21-Zytokin-Kits im Multiplex-Assay wurden geringste Mengen GM-CSF und ITAC (*interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*) in den Kokulturen nachgewiesen, die Konzentrationen lagen jedoch weit unterhalb der kleinsten Standardkonzentration und wurden deshalb aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen.

Außerdem wurden folgende weitere Zytokine aus dem Panel nicht nachgewiesen: Fraktalkin, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-21, IL-23 und MIP-1 α .

III.7.4 Multiplex-Assay: Zytokinsekretion ins Medium von Kokultur C

Die Überstände der Kokultur von Jurkat mit Testsubstanz-stimulierten monozytären Zellen aus der HaCaT-Kokultur wurden mit dem Multiplex-Assay auf 21 verschiedene T-Zell-assoziierte Zytokine untersucht. Dabei wurden MIP-3 α , MIP-1 β , TNF- α und IL-8 nachgewiesen und quantifiziert.

In einem ersten Versuch wurde die Zytokinsekretion ins Medium der Kokultur aus Jurkat und monozytären Zellen nach Kokultur mit HaCaT und Testsubstanz-Behandlung an Tag 3 (durch Abnahme eines Medium-Aliquots) und Tag 5 der Kultur gemessen, um den idealen Zeitpunkt für die Messung zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass bis auf MIP-1 β alle nachweisbaren Zytokine an Tag 5 in höheren oder vergleichbar hohen Konzentrationen vorhanden waren (**Abbildung 57**). Deshalb erfolgte die weitere Messung der Zytokine nach Tag 5 der Kokultur.

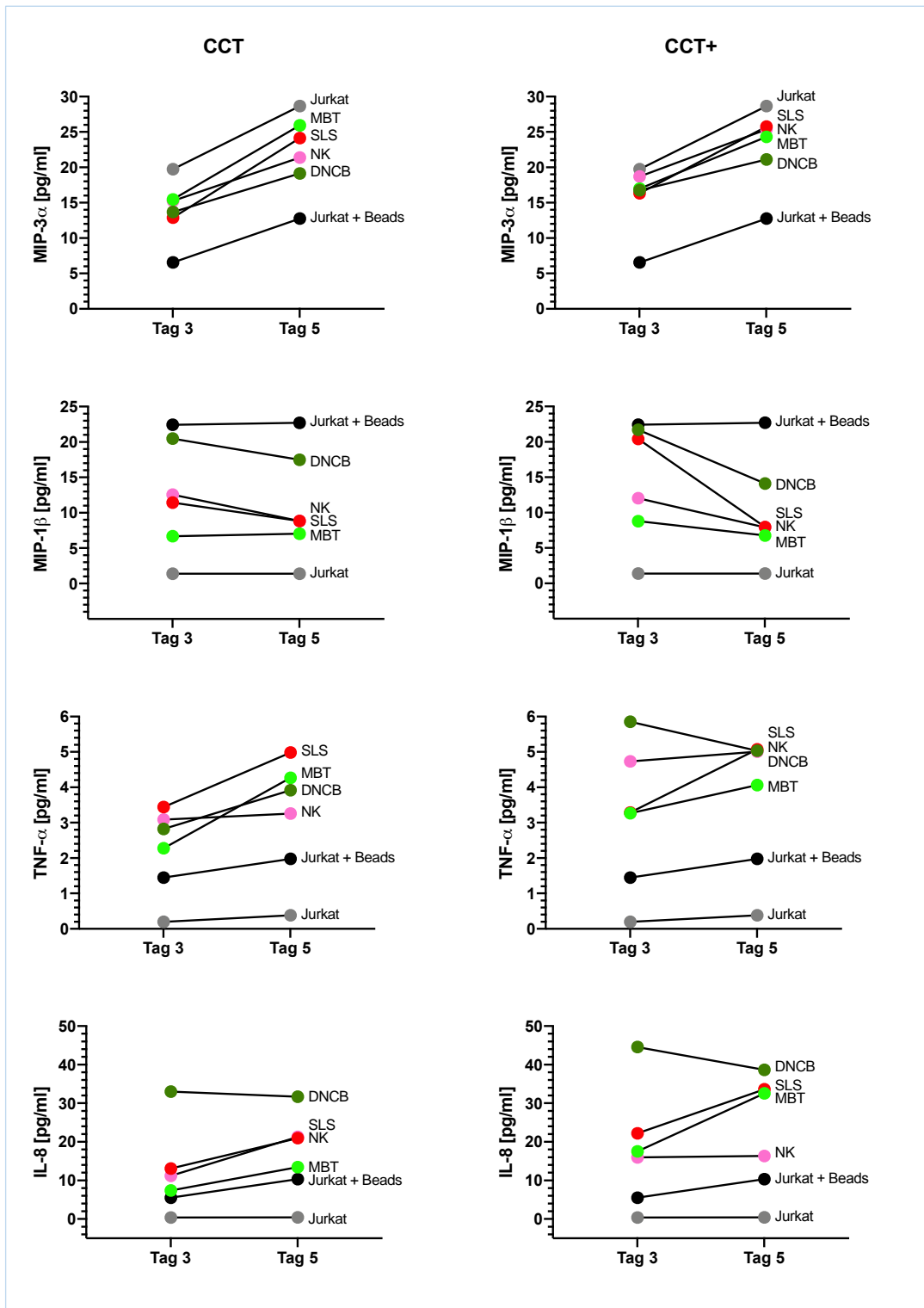


Abbildung 57. Zytokinkonzentrationen im Medium der Kokultur aus Jurkat und unterschiedlich behandelten CCT bzw. CCT mit PD-L1-Blockade (CCT+) an Tag 3 und Tag 5 der Kultur sowie von Jurkat allein und Jurkat mit CD3/CD28-Microbeads (Jurkat + Beads) als Mittelwerte einer Doppelbestimmung aus einem Experiment.

Jurkat in Solokultur produzierten über die Kulturzeit von fünf Tagen nur minimale Mengen (im Bereich der niedrigsten eingesetzten Standardkonzentration) IL-8, TNF- α und MIP-1 β . Deutlich verstärkt wurde die Produktion dieser Zytokine, wenn Jurkat mit Anti-CD3/anti-CD28-Beads behandelt wurden. Umgekehrt verhielt es sich für die Sekretion von MIP-3 α : Diese wurde durch die Behandlung von Jurkat mit Beads im Vergleich zur Jurkat-Solokultur signifikant reduziert (**Abbildung 58 A**). In Kokulturen mit nicht Testsubstanz-behandelten monozytären Zellen (Nullkontrollen in der HaCaT-Kokultur) erhöhte sich die relative MIP-3 α -Konzentration bezogen auf Konzentrationen in der Jurkat-Solokultur, wenn auf THP-1 PD-L1 blockiert war. Ebenfalls erhöht wurde die relative Konzentration bezogen auf Jurkat-Solokulturen für MIP-1 β , TNF- α und IL-8 in Kokulturen mit unbehandelten Kontrollen aus der Kokultur mit HaCaT (**Abbildung 58 B bis D**). Für TNF- α und IL-8 war diese Erhöhung in allen Ansätzen ähnlich stark wie in Kulturen Bead-stimulierter Jurkat, wobei die relativen TNF- α -Konzentrationen bezogen auf Jurkat in Solokultur in den Ansätzen mit PD-L1-Blockade und/ oder AhR-Knockout im Mittel sogar über den mittleren relativen Wert der Bead-stimulierten Jurkat-Kulturen stiegen.

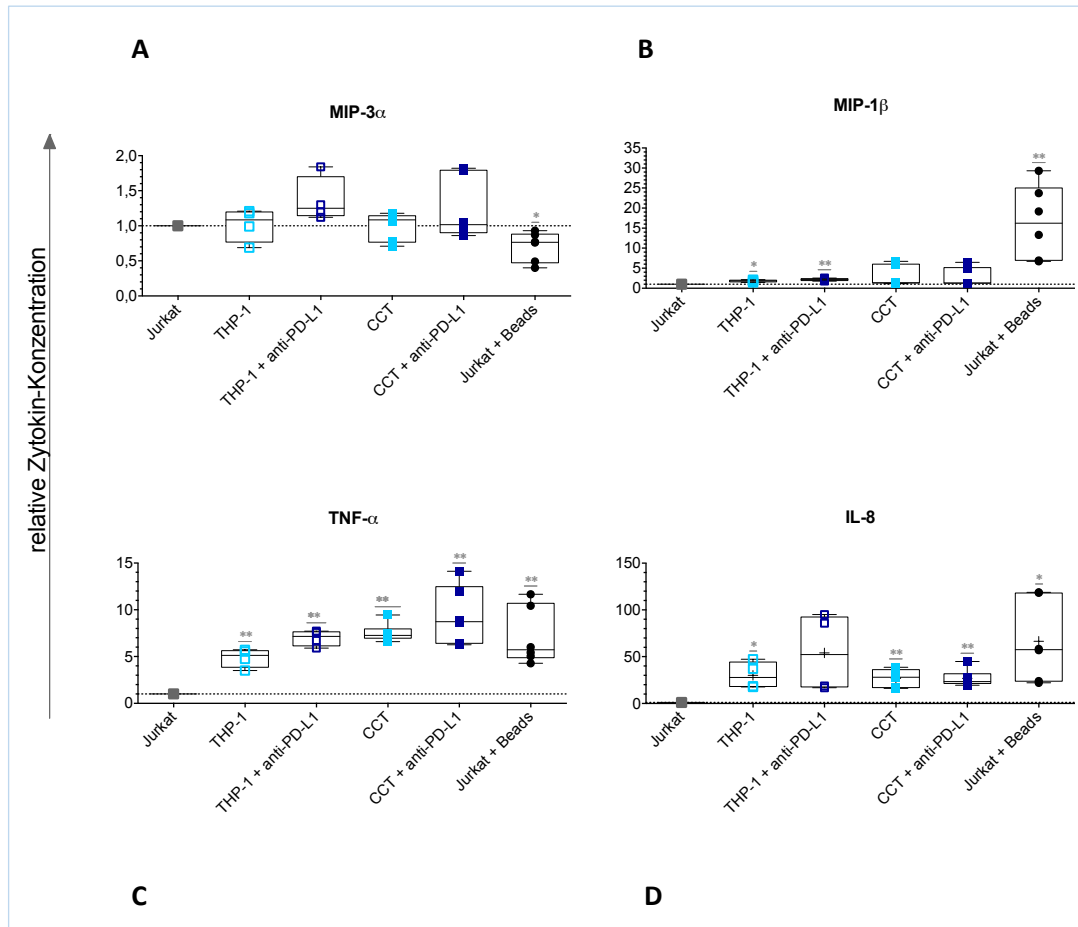


Abbildung 58. Relative Konzentrationen der Zytokine MIP-3 α (A), MIP-1 β (B), TNF- α (C) und IL-8 (D) in Kokulturen aus Jurkat und THP-1, THP-1 mit PD-L1-Blockade, (AhR-defizienten) CCT und CCT mit PD-L1-Blockade nach fünf Tagen ohne Allergenbehandlung bezogen auf Jurkat in Solokultur. Als Positivkontrolle dienten Jurkat, die mit Anti-CD3/CD28-Beads inkubiert worden waren (Jurkat + Beads). Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannweiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus zwei bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert; die statistische Auswertung erfolgte abweichend von Il.10 auch für Werte aus zwei Messungen.

Zur Verdeutlichung der Effekte, die durch die Behandlung der monozytären Zellen mit Testsubstanzen induziert wurden, wurden die Konzentrationswerte der gemessenen Zytokine in der Kokultur mit Jurkat auf die jeweils mitgeführten Kontroll-Kokulturen mit monozytären Zellen ohne Testsubstanz-Behandlung bezogen.

MIP-3 α : In Jurkat Kokulturen mit THP-1 führte die Testsubstanz-Behandlung zu einer Erhöhung der relativen MIP-3 α -Konzentration bezogen auf die Konzentrationen in Kokulturen mit unbehandelten Kontrollen, unabhängig von der Art der Testsubstanz

(Abbildung 59). In Kokulturen mit PD-L1-blockierten Zellen sank hingegen die relative MIP-3 α -Konzentration, wenn die monozytären Zellen zuvor mit Allergenen behandelt worden waren. In Kokulturen mit AhR-defizienten Zellen ohne PD-L1-Blockade war die MIP-3 α -Konzentrationen verglichen mit Kokulturen mit der unbehandelten Kontrolle nach Allergen-Behandlung erhöht; für MBT-behandelte Kulturen war dies statistisch signifikant. In Kokulturen mit AhR-defizienten Zellen, die mit dem Irritanz SLS behandelt worden waren, konnte keine Veränderung der relativen MIP-3 α -Konzentration nachgewiesen werden. Die Effekte der PD-L1-Blockade und des AhR-Knockouts glichen sich in der Kombination beider Modifikationen aus.

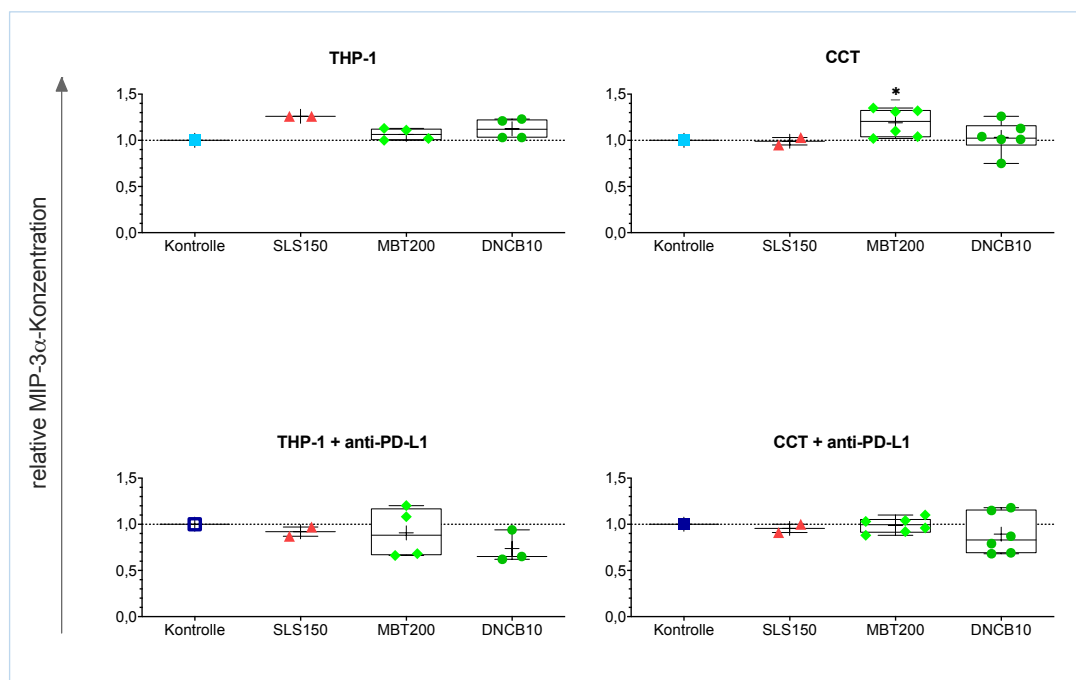


Abbildung 59. Relative MIP-3 α -Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Tests substanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 $\mu\text{mol/l}$, MBT200: MBT200 $\mu\text{mol/l}$, DNCB10: DNCB 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannbreiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus einer bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.

MIP-1 β : Bezogen auf die jeweils mitgeführten Kontroll-Kokulturen ohne vorherige Testsubstanzbehandlung wurde die Sekretion von MIP-1 β in Kulturen ohne PD-L1-Blockade gehemmt, wenn die monozytären Zellen zuvor mit MBT behandelt worden waren (**Abbildung 60**). Für CCT-Kokulturen war die Absenkung der relativen MIP-1 β -Konzentration in Kokulturen mit MBT-stimulierten Zellen statistisch signifikant. Die vorherige Behandlung von THP-1 ohne PD-L1-Blockade oder CCT mit oder ohne Blockade mit 10 $\mu\text{mol/l}$ DNCB führte im Mittel zu einer Induktion der MIP-1 β -Produktion, die Streuung der Einzelwerte war jedoch in den Kokulturen mit unblockierten Zellen groß. Deutlich geringer war die Streuung in Kulturen mit zusätzlich PD-L1-blockierten Zellen. In Kokulturen mit PD-L1-blockierten und DNCB-behandelten THP-1 wurde die Sekretion von MIP-1 β gehemmt. Die vorherige Behandlung der monozytären Zellen mit 150 $\mu\text{mol/l}$ SLS führte in den Kulturen mit nicht blockierten Zellen zu einer leichten Erhöhung der MIP-1 β -Konzentration, in Kokulturen mit PD-L1-blockierten Zellen verschwand dieser Effekt.

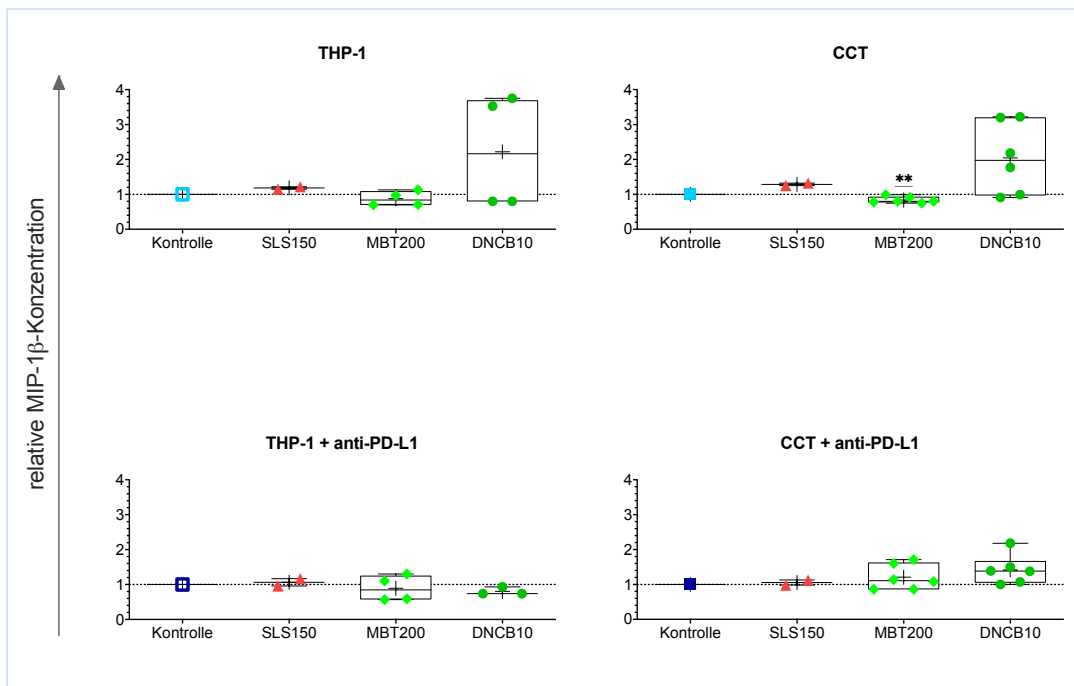


Abbildung 60. MIP-1 β -Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Testsustanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 $\mu\text{mol/l}$, MBT200: MBT200 $\mu\text{mol/l}$, DNCB10: DNCB 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannweiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus einer bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.

TNF- α : Bezogen auf die Kokulturen mit unbehandelten Kontrollen führte die PD-L1-Blockade auf mit Jurkat kokultivierten THP-1 zu einer deutlichen Absenkung der TNF- α -Produktion, wenn die Monozyten vorher in Kokultur mit HaCaT mit Allergenen behandelt worden waren (**Abbildung 61**). Die Behandlung mit SLS führte zu einer Induktion der Produktion des Zytokins. In den Kokulturen mit AhR-defizienten Zellen hingegen führte die vorangegangene Allergen-Behandlung zu keiner Änderung der TNF- α -Sekretion. Die Behandlung der AhR-defizienten monozytären Zellen mit SLS führte in Kokultur mit Jurkat jedoch zu einer leichten Erhöhung der TNF- α -Konzentration.

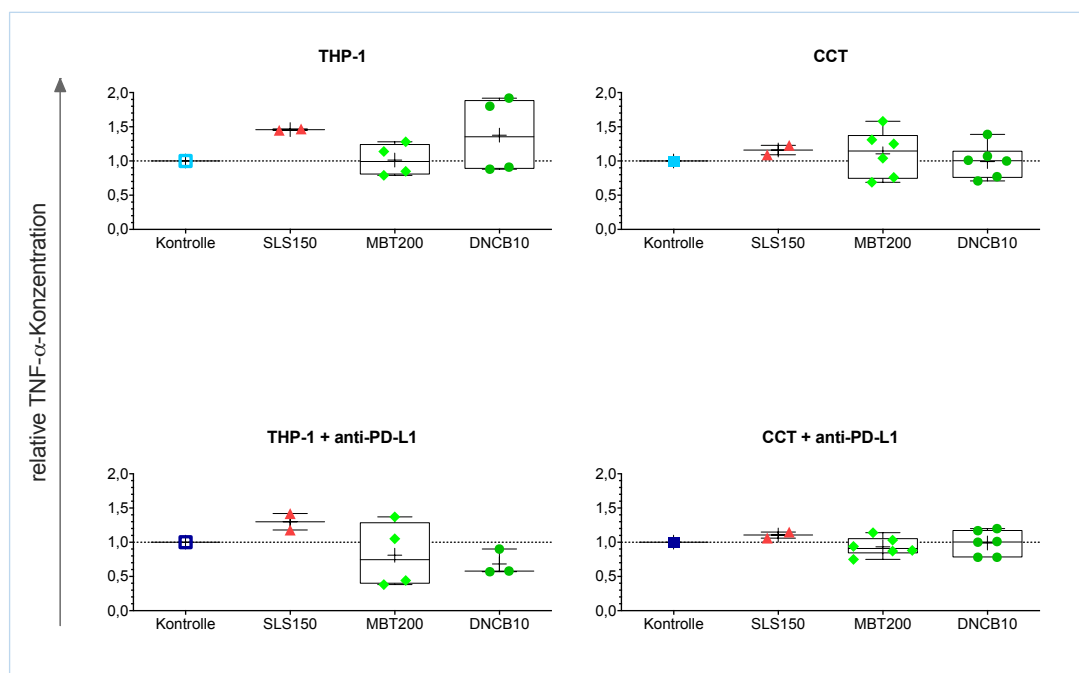


Abbildung 61. Relative TNF- α -Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Testsubstanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 $\mu\text{mol/l}$, MBT200: MBT200 $\mu\text{mol/l}$, DNCB10: DNCB 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enhaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannbreiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus einer bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.

IL-8: Die vorangegangene Behandlung von THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade mit Testsubstanzen veränderte bezogen auf die unbehandelte Kontroll-Kokultur in den Kokulturen mit Jurkat die IL-8-Konzentration im Mittel nicht oder nur minimal, wobei die PD-L1-Blockade zu einer leichten Hemmung der IL-8-Sekretion in diesen Kulturen beitrug (**Abbildung 62**). Im Gegensatz dazu induzierte die vorangegangene Behandlung von AhR-Knockout-Populationen mit DNCB oder SLS in den entsprechenden Kokulturen mit Jurkat die IL-8-Produktion (für DNCB statistisch signifikant). Die PD-L1-Blockade auf CCT verstärkte diesen Effekt für Allergen-behandelte Kokulturen deutlich, so dass nun auch in MBT-behandelten eine statistisch signifikante Erhöhung der IL-8-Konzentration Kokulturen bezogen auf die unbehandelte Kontroll-Kokultur gemessen wurde.

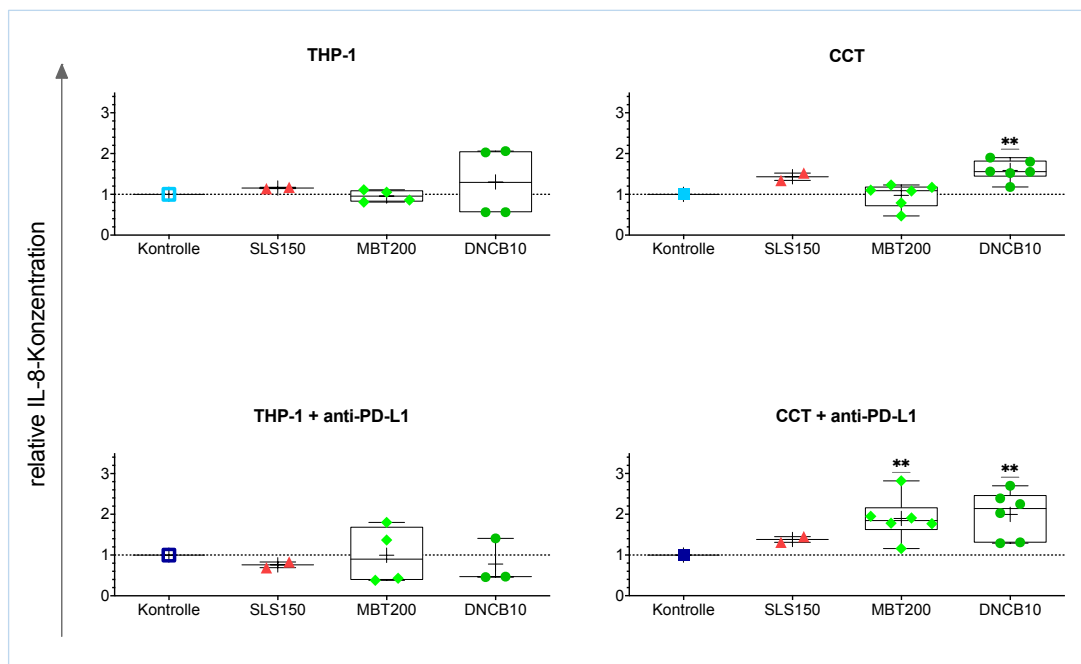


Abbildung 62. Relative IL-8-Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Testschubstanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 $\mu\text{mol/l}$, MBT200: MBT200 $\mu\text{mol/l}$, DNCB10: DNCB 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannweiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus zwei bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.

Das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten- und IL-8-enthaltenden Mediums aus der Kokultur mit HaCaT bewegte sich im Mittel zwischen zwei und fünf Prozent des Jurkat-Kokulturvolumens. Die so bereits in die Kokultur mit Jurkat übertragenen Mengen von IL-8 bewegten sich im Rahmen von im Mittel 0,4 bis 1,6 % der in der Jurkat-Kokultur gemessenen Konzentrationen (**Abbildung 70** im Anhang), so dass nicht von einem Eintrag aus der vorgeschalteten HaCaT-Kokultur auszugehen ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Produktion von MIP-1 β , TNF- α und IL-8 durch die Kokultur mit unbehandelten monozytären Zellen aus der Kokultur mit HaCaT jeweils induziert wurde. Für MIP-3 α war dies nur in Kokulturen mit PD-L1-blockierten THP-1 der Fall. Bezogen auf die jeweiligen nicht Testsubstanz-behandelten Kontroll-Kokulturen wurde die Zytokin-Produktion in den Kokulturen substanzspezifisch reguliert. Außerdem wurden die Effekte durch PD-L1-Blockade und AhR-Knockout der monozytären Zellen moduliert. Die PD-L1-Blockade führte in THP-1-Kokulturen mit vorangegangener Allergenbehandlung durchgängig zu einer Hemmung der Zytokinsekretion verglichen mit Kokulturen ohne vorherige Testsubstanzbehandlung. Der AhR-Knockout allein und in Kombination mit der PD-L1-Blockade hingegen führte in Kokulturen mit Allergen-behandelten CCT tendenziell zu einer Erhöhung der Konzentration im Medium nachgewiesener Zytokine.

III.7.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Jurkat-Kokultur

Im Hinblick auf die Regulation der Aktivierung von Jurkat-T-Zellen in Kokultur mit monozytären Zellen, die zuvor in Kokultur mit HaCaT-Keratinocyten über zwei Tage mit Testsubstanzen stimuliert worden waren, ergab sich ein Substanz- und Zelltyp-spezifisches Muster.

Dabei hatten PD-L1-Blockade und AhR-Knockout der monozytären Zellen einen gegenläufigen Effekt auf die Proliferation von kokultivierten Jurkat, wenn zuvor eine Behandlung mit dem Irritanz SLS erfolgte, jedoch einen additiven Effekt, wenn die monozytären Zellen in der Kokultur mit HaCaT mit Allergenen behandelt worden waren. Gegenläufig wirkten sich PD-L1-Blockade und AhR-Knockout Allergen-stimulierter monozytärer Zellen auch auf die CD3-Expression auf stark proliferierenden kokultivierten

Jurkat aus: Während der AhR-Knockout in monozytären Populationen nach Allergen-Behandlung die Expression von CD3 auf kokultivierten Jurkat induzierte, wurde die CD3-Expression auf proliferierenden Jurkat in Kokultur mit PD-L1-blockierten THP-1 gehemmt. In Kokulturen mit PD-L1-blockierten und AhR-defizienten Zellen ergab sich für die Induktion der CD3-Expression auf Jurkat sogar ein überadditiver Effekt.

Auch die Ausschüttung von Zytokinen ins Medium der Kokulturen von Jurkat und unterschiedlich behandelten monozytären Zellen wurde differenziell reguliert, je nachdem, ob in den Monozyten ein AhR-Knockout oder die Blockade des PD-L1 oder beides erfolgte, und mit welcher Testsubstanz die Zellen in der vorangegangenen Kokultur mit HaCaT stimuliert worden waren. Insbesondere die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-8 wurde in Kokulturen Allergen-stimulierter AhR-defizienter und PD-L1-blockierter Zellen mit Jurkat signifikant erhöht.

Insgesamt konnte in diesem Kokultur-System eine substanz-spezifische Stimulierbarkeit von Jurkat-T-Zellen durch aktivierte modifizierte monozytäre Zellen nachgewiesen werden.

III.8 Gesamtergebnis der Arbeit: *Cell Line Co-culture based Sensitisation Assay (CLCSA)*

Zielstellung der Arbeit war es, zum einen die Stimulierbarkeit von T-Zellen *in vitro* durch die Inaktivierung immunsupprimierender Moleküle in dendritischen bzw. monozytären Zellen technisch messbar zu verbessern und zum anderen auf dieser Grundlage ein Testsystem aus Zelllinien zu entwickeln, das als alleinstehende Methode alle Schlüsselereignisse des AOP für die Sensibilisierung durch Hautkontakt abdeckt.

Auf Grundlage des in der Arbeitsgruppe entwickelten *loose-fit co-culture based sensitization assay with lymphocyte endpoint (LCSA-ly)* [83] wurden primäre Zellen des Originalprotokolls erfolgreich durch Zelllinien ersetzt. So konnte ein zweistufiges Testsystem entwickelt werden, das zu jedem Schlüsselereignis im AOP messbare Parameter bietet. In Anlehnung an seinen Ursprung wurde das neue System *cell line co-culture based sensitisation assay (CLCSA)* getauft. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Stufen des Systems im Folgenden noch einmal zusammengefasst werden.

- **Vorbereitung der Zellen**

Für den Einsatz in der ersten Stufe des neuen Testsystems wurden Populationen der monozytären Linie THP-1 mittels CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockout des Arylhydrocarbon-Rezeptors genetisch so modifiziert, dass eine AhR-defiziente Population entstand (CCT). Diese Zellen wurden mit dem neu entwickelten Selektionsprotokoll für AhR-defiziente Zellen behandelt, um möglichst hohe Prozentsätze der genmodifizierten Zellen zu erhalten. Im Verlauf der Arbeit hatten sich THP-1 im Vergleich zu MUTZ-3 als suszeptibler sowohl für den Knockout des AhR als auch für das folgende Selektionsprotokoll erwiesen, weshalb THP-1 und nicht MUTZ-3 im weiterentwickelten Testsystem zum Einsatz kamen.

- **Stufe 1: Kokultur aus HaCaT und monozytären Zellen**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedlich modifizierte THP-1 in Kokultur mit HaCaT in der Lage sind, differenziell auf die Behandlung mit Allergenen oder Irritantien zu reagieren. Die Kokultur mit HaCaT bot dabei zum einen eine Stabilisierung der Kulturbedingungen, da THP-1 in Solokultur empfindlicher auf zytotoxische Konzentrationen von Testsubstanzen reagierte (**Abbildung 63**), und zum anderen ergab sich die Möglichkeit, mit der Bestimmung von IL-8 (wie in dieser Arbeit gezeigt) oder anderen Zytokinen die Aktivierung von HaCaT-Keratinocyten als Schlüsselereignis 1 des AOP zu erfassen.

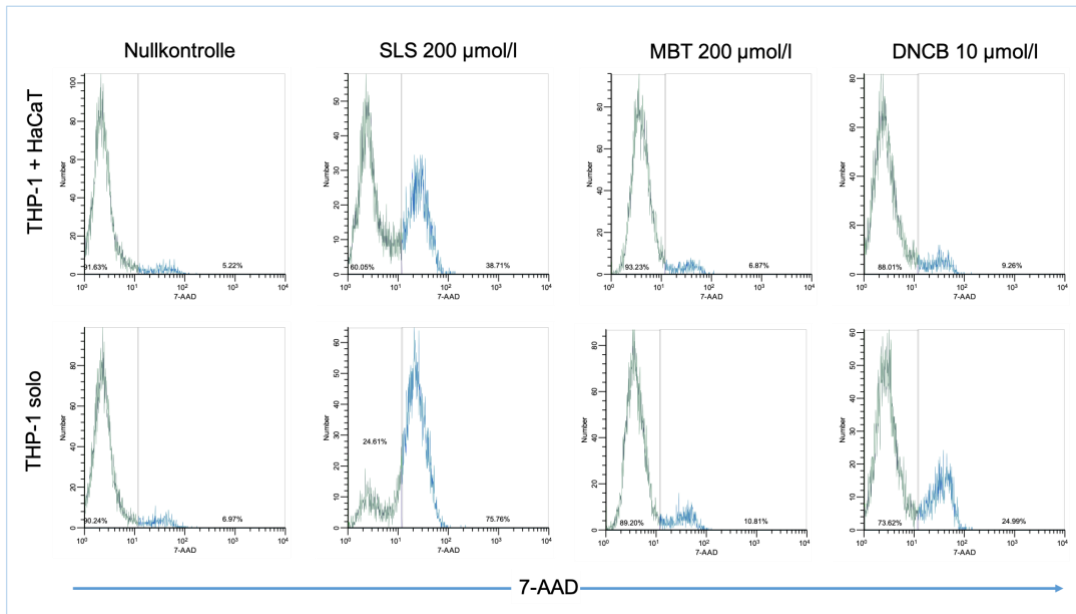


Abbildung 63. Histogramme einer durchflusszytometrischen Viabilitätsbestimmung von THP-1 in Kokultur mit HaCaT (oben) und in Solokultur (unten) ohne Behandlung (Nullkontrolle) und nach Behandlung mit verschiedenen Testsubstanzen in moderat (SLS), nicht (MBT) oder leicht (DNCB) zytotoxischen Konzentrationen. In Solokultur reagieren THP-1 mit deutlich verstärktem Viabilitätsverlust.

Der Ablauf der ersten Stufe des CLCSA, der Kokultur von HaCaT mit THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade und AhR-defizienten Populationen mit und ohne PD-L1-Blockade, ist schematisch in **Abbildung 64** dargestellt.

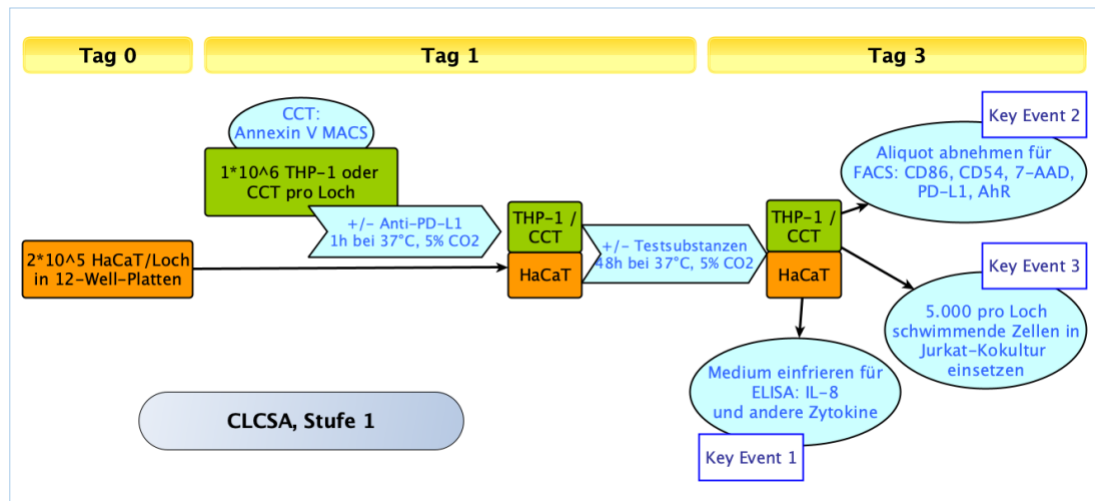


Abbildung 64. Schematische Darstellung der sequenziellen experimentellen Entwicklung des Protokolls für die erste Stufe des CLCSA. Es wurden zunächst HaCaT-Keratinocyten in 12-Well-Platten ausgesät. Nach Erreichen der Adhärenz wurden THP-1 oder AhR-Knockout Populationen (CCT) nach dem Selektionsprotokoll mit magnetischer Depletion apoptotischer Zellen (Annexin V MACS) und mit oder ohne Präinkubation mit anti-PD-L1 zu den HaCaT gegeben und die Kokultur mit Testsubstanzen über 48 Stunden inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden Aktivierungsmarker auf monozytären Zellen durchflusszytometrisch gemessen, Überstände der Kultur für Zytokinbestimmungen abgenommen und die zweite Stufe des CLCSA eingeleitet.

In der ersten Stufe des CLCSA konnte neben *Key Event 1* (Bestimmung der IL-8-Konzentration in Überständen der Kultur) über die Messung der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 auf monozytären Zellen auch *Key Event 2* erfasst werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expressionen von CD86 und CD54 nach Stimulation monozytärer genmodifizierter Zellen mit Allergenen ebenso hochreguliert wird, wie für THP-1 bereits bekannt, nach Behandlung mit dem Irritanz SLS die Expression von CD54 jedoch gesenkt wird, womit die Unterscheidung zwischen Allergenen und Irritantien verbessert wurde.

▪ Stufe 2: Kokultur monozytärer Zellen mit Jurkat-T-Zellen

In Stufe 2 des CLCSA wurden nun in Kokultur mit HaCaT Testsubstanz-stimulierte verschieden modifizierte THP-1 mit Jurkat in Kokultur gebracht und am Ende der Inkubationszeit die Aktivierung der T-Zellen über die Proliferationsbestimmung, die

Ergebnisse

Expression des T-Zellrezeptor-Korezeptors CD3 und die Sekretion T-Zell-assoziiierter Zytokine gemessen (**Abbildung 65**).

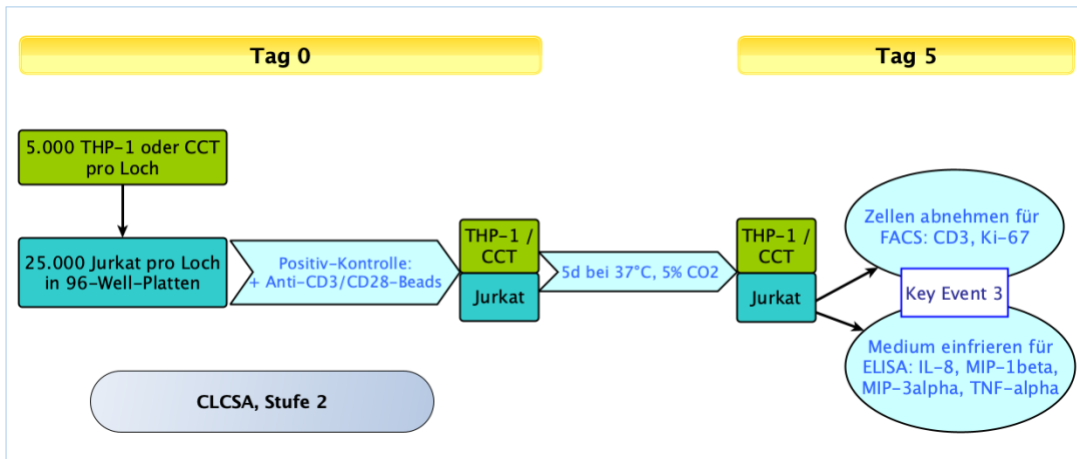


Abbildung 65. Schematische Darstellung der experimentellen Entwicklung des Protokolls für die zweite Stufe des CLCSA. Tests substanz-aktivierte THP-1 oder geneditierte THP-1 (CCT) mit und ohne PD-L1-Blockade aus Stufe 1 des Protokolls wurden mit Jurkat-T-Zellen kokultiviert und die Aktivierung der T-Zellen als Schlüsselereignis 3 des AOP nach fünf Tagen Inkubation über die durchflusszytometrische Messung der Expression von CD3 und Ki-67 sowie mittels Zytokinbestimmung im Medium der Kultur nachgewiesen.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass wiederum geneditierte und/ oder PD-L1-blockierte THP-1 im Gegensatz zu nicht modifizierten Zellen in der Lage sind, Jurkat-T-Zellen zu aktivieren. So regten geneditierte, PD-L1-blockierte THP-1 Jurkat zur erhöhten Proliferation an, wenn sie mit dem Allergen MBT stimuliert worden waren, während andere Populationen von THP-1 dazu nicht in der Lage waren. Das Ergebnis einer Beispiel-Messung der Ki-67-Expression in Jurkat nach Kokultur mit geneditierten, PD-L1-blockierten THP-1 ist in **Abbildung 66** gezeigt.

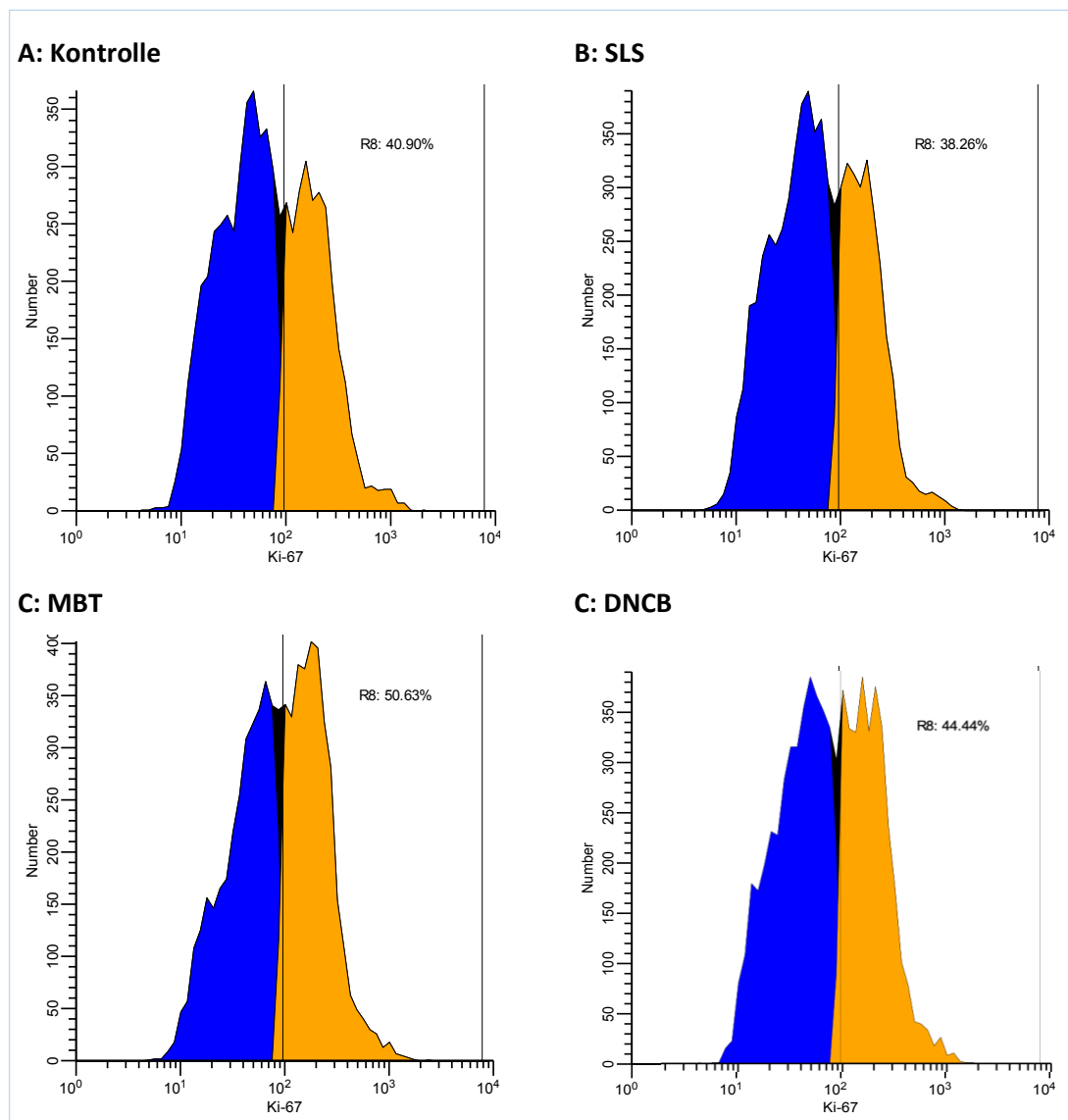


Abbildung 66. Histogramme als Ergebnis einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung der Ki-67-Expression in CD3-positiven Zellen (Jurkat) mit Markierung des Anteils stark proliferierender Zellen (orange) nach Kokultur mit unbehandelten (A), SLS-behandelten (B), MBT-behandelten (C) und DNCB-behandelten (D) PD-L1-blockierten und AhR-defizienten THP-1.

Die Expression von CD3 auf Jurkat wurde durch PD-L1-blockierte und/oder geneditierte und SLS-behandelte THP-1 nicht verändert. Allergen-behandelte PD-L1-blockierte THP-1 hemmten im Vergleich zu unbehandelten Zellen die CD3-Expression auf Jurkat jedoch, während Allergen-behandelte CCT mit PD-L1-Blockade die CD3-Expression anregten.

Ergebnisse

Die Zytokinsekretionen in den Kokulturen mit modifizierten und SLS-behandelten THP-1 wurden für MIP-3 α , MIP-1 β und IL-8 nicht oder nur minimal verändert, während in Kokulturen mit Allergen-stimulierten, PD-L1-blockierten THP-1 die Sekretion dieser Zytokine gehemmt und in Kokulturen mit Allergen-stimulierten, PD-L1-blockierten CCT induziert wurde. Die TNF- α -Produktion wurde vor allem in Kokulturen mit PD-L1-blockierten THP-1 Testsubstanz-abhängig moduliert: Die Behandlung mit SLS verursachte gegenüber Kokulturen mit unbehandelten PD-L1-blockierten THP-1 eine Induktion der Sekretion, Allergen-Behandlung jedoch eine Hemmung.

- **Auswertung der Ergebnisse**

Betrachtet man die Veränderungen der jeweiligen Endpunkte gegenüber Kokulturen mit unbehandelten Kontrollzellen, ergibt sich insbesondere für die T-Zell-Endpunkte eine deutliche Verbesserung der Identifikation von Allergenen gegenüber Kokulturen mit unmodifizierten THP-1, wenn THP-1 mittels PD-L1-Blockade oder AhR-Knockout und PD-L1-Blockade modifiziert wurden. Zum Vergleich der Ergebnisse mit den entsprechenden Modifikationen wurde eine *Heatmap* angelegt (II.9.5), in die Veränderungen der gemessenen Parameter mit Hilfe eines Farbcodes eingetragen wurden (rot für Reduktion, grün für Erhöhung, gelb für keine Veränderung). Der optische Vergleich der THP-1-Modifikationen ist in **Abbildung 67** gezeigt.

Zelltyp	THP			THP + anti-PD-L1			CCT + anti-PD-L1			CCT		
	SLS	MBT	DNCB	SLS	MBT	DNCB	SLS	MBT	DNCB	SLS	MBT	DNCB
CD86	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
CD54	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
IL-8 KoKuB	Green	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Green	Red	Yellow	Green	Yellow	Green
Ki-67high	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Yellow
CD3	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow	Green	Green	Yellow	Yellow	Green
MIP-1beta	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Green
IL-8 KoKuC	Green	Yellow	Green	Red	Yellow	Red	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
TNFalpha	Green	Yellow	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Yellow	Green	Green	Yellow
MIP-3alpha	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green	Yellow

--	-	0	+	++
Red	Red	Yellow	Green	Green

Abbildung 67. *Heatmap* der Ergebnisse des CLCSA mit unterschiedlich modifizierten monozytären Zellen. CCT: AhR-Knockout. Zu erkennen ist die Verstärkung der messbaren T-Zell-Antwort mit PD-L1-blockierten THP-1 (Verschiebung des Farbmusters in Richtung Rot mit steigender allergener Potenz der Testsubstanz) und AhR-Knockout-THP-1 mit PD-L1-Blockade (Verschiebung Richtung Grün mit steigender allergener Potenz der Testsubstanz). [--/++]: Veränderung statistisch signifikant oder größer als 20 %, [-/+]: 20 % > Veränderung \geq 5 % oder nicht statistisch signifikant, 0: Veränderung kleiner als 5 %; KoKu: Kokultur, B mit HaCaT (Stufe 1), C mit Jurkat (Stufe 2)

Eine deutliche Verbesserung der Auslesbarkeit der T-Zell-Antwort ergab sich in den Kokulturen mit PD-L1-blockierten THP-1 und AhR-defizienten und zusätzlich PD-L1-blockierten THP-1 (CCT + anti-PD-L1). In der *Heatmap* ist eine deutliche Verschiebung des Farbmusters mit steigender allergener Potenz der Testsubstanz erkennbar, wobei sich mit ausschließlicher Blockade das Farbmuster nach Rot verschiebt und mit Blockade und Knockout in Richtung Grün, so dass auch eine Potenzabschätzung möglich wird.

Das Gesamtergebnis der Arbeit ist ein Testsystem, das die Allergen-vermittelte Aktivierung von Keratinozyten, monozytären Zellen als Surrogat für dendritische Zellen und T-Zellen *in vitro* auf Basis von Zelllinien quantitativ messbar macht und damit alle Schlüsselereignisse des AOP für Sensibilisierung durch Hautkontakt abdeckt.

IV DISKUSSION

IV.1 MUTZ-3 und MUTZ-LC als Modell für dendritische Zellen

IV.1.1 Differenzierung von MUTZ-3 führt zur Expression DC-typischer Oberflächenmarker

Ein Ziel der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation war, den Prozess der Sensibilisierung *in vivo* vollständig *in vitro* nachzubilden, da aktuell verfügbare OECD-validierte Methoden jeweils nur ein Schlüsselereignis abbilden. Dazu sollten dendritische Zellen im aufzubauenden Testsystem eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde die Zelllinie MUTZ-3 ausgewählt, deren Differenzierbarkeit zu Langerhans-ähnlichen und dendritischen Zellen in der Literatur beschrieben ist [89,138,144].

Der myelomonozytäre Charakter undifferenzierter MUTZ-3 blieb unter den gewählten Kulturbedingungen erhalten. Die Zellen waren Langerin-negativ und nur etwa 10 % der Population exprimierten PD-L1. Rund 20 % Population waren CD14-positiv, weniger als 20 % der Zellen exprimierten CD1a und CD1c; stark exprimiert wurden hingegen HLA-DR (MHC II) und CD54. Etwa die Hälfte der Zellen trug CD86. Im verkürzten Differenzierungsprotokoll entwickelten die Zellen einen Langerhans-Zell-ähnlichen Phänotyp. So neoexprimierten die Zellen Langerin und verloren CD14. Während die Prozentzahlen CD86-, CD54- und HLA-DR-positiver Zellen etwa gleich blieben, wurde die Expression von CD86 und CD54 auf Einzelzellniveau jedoch verstärkt, wie es für differenzierte Zellen gemäß Literatur zu erwarten war [144,145]. Die Zellen exprimierten nun auch zu einem deutlich höheren Prozentsatz (60 bis 70 %) CD1a und CD1c und regulierten die Expression dieser Marker verglichen mit undifferenzierten Zellen um das Fünf- bis Zehnfache nach oben. Zusätzlich wurde die Expression von PD-L1 hochreguliert, was auf eine Aktivierung der Zellen durch die eingesetzten Zytokine schließen lässt. Zusammengefasst deutet das Expressionsmuster der Oberflächenmarker damit auf einen Zelltyp hin, der sowohl Charakteristika von Langerin⁺ cDC2 (CD1c, Langerin) als auch von Langerhans-Zellen aufweist (Langerin, CD1a, PD-L1 [Expression gezeigt in: 41]).

Sowohl MUTZ-3 als auch MUTZ-LC exprimierten in beinahe 100 % der Zellen den AhR, die Differenzierung erhöhte allerdings die Expressionslevel auf Einzelzellebene (III.1). Auch das spricht dafür, dass die differenzierten Zellen in einem bereits voraktivierten Zustand vorlagen.

IV.1.2 Allergene induzieren Expressionserhöhung von CD86 auf MUTZ-LC in Kokultur mit HaCaT-Keratinocyten

Über fünf Tage zu MUTZ-LC differenzierte MUTZ-3 wurden in einer Kokultur mit HaCaT-Keratinocyten über zwei Tage mit Testsubstanzen behandelt und durchflusszytometrisch auf die Expression des Reifungsmarkers CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 hin untersucht. Unabhängig vom Subtyp (Langerhans-Zelle oder dermale cDC) sollte die Behandlung der Zellen mit Allergenen zu einer Induktion der Oberflächenmarker CD86 und CD54 führen, so dass zum einen die Adhäsion an naive T-Zellen über CD54 und zum anderen deren Kostimulation über CD86 gewährleistet ist. Zwar induzierte die Behandlung der differenzierten MUTZ-3 mit dem extremen Allergen DNCB und dem moderaten Allergen MBT einen konzentrationsabhängigen Anstieg der CD86-Expression bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, jedoch sank gleichzeitig auf diesen Zellen die CD54-Expression (II.9.1). Dies erscheint bezüglich einer nachfolgenden T-Zell-Aktivierung erst einmal nicht plausibel, da die Bindung über CD54 den ersten und stärkeren Kontakt zwischen den beiden Zelltypen darstellt, noch bevor die Bindung über MHC II und TCR stattfindet [37]. Allerdings wurde bereits nach der Differenzierungskultur CD54 auf den Zellen extrem stark exprimiert, so dass möglicherweise in diesem experimentellen Setting die Regulation des Markers nicht mehr messbar war. Die Absenkung der Expression könnte ein Effekt der einsetzenden Zytotoxizität der Substanzen bei höheren Konzentrationen gewesen sein, wie es auch für das Irritanz SLS bei hohen, zytotoxischen Konzentrationen zu beobachten war. Mögliche Abhilfe könnte der Einsatz noch kürzer differenzierter Zellen, etwa nach nur drei oder, ähnlich wie im LCSA, nach zwei Tagen mit Zytokinen, schaffen. Andererseits ist aufgrund der starken Grundexpression für den Einsatz in einem T-Zell-Aktivierungsassay möglicherweise auch keine weitere Regulation von CD54 notwendig, so dass stattdessen andere Aktivierungsmarker herangezogen werden könnten. Mit längeren Differenzierungsprotokollen über sieben und zehn Tage konnten z.B. auch das kostimulatorische Molekül CD80 [144] und das Adhäsionsmolekül CD34 [89] auf MUTZ-LC nachgewiesen werden, die zur Erweiterung der Ausleseparameter geeignet erscheinen.

Das starke Allergen TNBS konnte allerdings bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 1.000 $\mu\text{mol/l}$ gar keine Expressionsveränderung von CD86 und CD54 hervorrufen. Mit der Substanz wurde bis zur höchsten Konzentration außerdem keinerlei Zytotoxizität induziert, was die These stützt, dass für die Absenkung der CD54-Expression mit den anderen Testsubstanzen deren irritative Wirkung verantwortlich war. Warum jedoch auch die Expression von CD86 nicht durch Behandlung mit TNBS verändert werden konnte, bleibt unklar. In einem Versuch der vorliegenden Arbeit konnte auch auf undifferenzierten MUTZ-3 nach Inkubation mit TNBS bis 500 $\mu\text{mol/l}$ keine Expressionsveränderung von CD86 gemessen werden, so dass der Schluss naheliegt, dass dieser Zelltyp an sich unempfindlich gegenüber der Regulation der CD86-Expression durch TNBS ist, denn andere, aus monozytären Vorläufern differenzierte DC regulieren auf TNBS-Stimulus hin CD86 hoch. Dies wurde bereits mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ TNBS sowohl für „klassische“ DC-rc im LCSA mit primären Keratinozyten gezeigt [79] als auch für CD1a⁺/CD1c⁺ DC-rc [82], deren Markerprofil dem von MUTZ-LC ähnelt. Auch auf Monozyten des peripheren Blutes, die mit GM-CSF und IL-4 über sechs Tage zu moDC differenziert worden waren, wurde CD86 nach TNBS-Behandlung hochreguliert, allerdings mit nur einer, sehr hohen, Substanzkonzentration (5.000 $\mu\text{mol/l}$; niedrigere Konzentrationen wurden nicht getestet) [146]. Es wurde auch gezeigt, dass aus MUTZ-3 differenzierte dendritische Zellen nach Aktivierung durch TLR-Liganden CD86 ähnlich hochregulierten wie klassische primäre moDC. So erhöhte sich nach dem Stimulus mit dem TLR2-Liganden Zymosan oder dem TLR4-Liganden LPS die CD86-Expression auf beiden Zelltypen zweifach bezogen auf unbehandelte Kontrollen. Auf den TLR3-Liganden Poly-Inosinsäure:Poly-Cytidinsäure [Poly(I:C), ein RNA-Analogon] reagierten MUTZ-DC hingegen gar nicht, während moDC auch darauf mit Verdoppelung der CD86-Expression reagierten [147]. Die Funktionalität und die Sensitivität für phänotypische Veränderungen scheint also grundsätzlich auch für MUTZ-3 und aus ihnen differenzierte Zellen gegeben, ist aber offenbar substanzabhängig.

Eine Erklärung für die Unempfindlichkeit von MUTZ-LC gegenüber dem Stimulus durch TNBS in dieser Arbeit bietet daher der Ansatz, dass bei der Aktivierung von dendritischen Zellen mit TNBS möglicherweise ein anderer Mechanismus relevant sein ist als etwa mit DNCB. Als Vergleichsbasis bietet sich die Fremdstoff-induzierte Colitis als Modell einer entzündlichen Autoimmunerkrankung an, da sowohl TNBS als auch DNCB verwendet werden können, um eine *Colitis ulcerosa* in Versuchstieren hervorzurufen und die entsprechenden Immunantworten gut untersucht sind. Schon die Schwere der

immunologischen (v.a. entzündlichen Reaktion) auf die intrarektale Applikation der beiden Substanzen unterscheidet sich deutlich: Während DNCB eine akute Reaktion auslöst, die etwa zwei Wochen anhält, führt die Applikation von TNBS zu einer deutlich verlängerten Entzündungsreaktion, die selbst mit niedrigen Dosierungen über acht Wochen erhalten bleibt [148]. Beide Substanzen induzieren die Myeloperoxidase (MPO), ein Enzym, das vor allem von Granulozyten, aber auch Monozyten und Gewebemakrophagen, exprimiert wird und an Entzündungsreaktionen beteiligt ist, indem es z.B. die Bildung von zytotoxischem Hypochlorit katalysiert. Im direkten Vergleich induziert TNBS im Rattenmodell MPO etwa dreimal stärker als DNCB [149]. Erhebliche Unterschiede finden sich auch im Zytokinprofil der akuten Phase der induzierten Entzündung. So induziert DNCB IL-1 β und TGF- β [150], die für die Polarisierung von naiven T-Zellen zu Th17 und Th22 benötigt werden, während TNBS zunächst die Produktion von IL-12 und IFN- γ anregt [151], die naive T-Zellen in Th1-Richtung polarisieren. Das zeigt, dass die beiden Substanzen distinkte immunologische Reaktionen einer Entzündung hervorrufen, so dass der Schluss naheliegt, dass dies auch bei der Sensibilisierung als Entzündungsreaktion nach Hautkontakt der Fall ist und in diesem Zusammenhang die immunstimulatorische Potenz verkehrt ist – DNCB ist ein nachgewiesenermaßen ein stärkeres Allergen als TNBS.

IV.1.3 Die Blockade des inhibitorischen Liganden PD-L1 auf MUTZ-LC erhöht die Expression von CD86 und CD54 – Ist PD-L1 zur Signaltransduktion befähigt?

Für die geplante Kokultur von Testsubstanz-stimulierten MUTZ-LC mit Jurkat T-Zellen sollte in einem Ansatz dieser Arbeit die Inhibition der T-Zellaktivierung über die Interaktion von PD-L1 auf dendritischen Zellen mit PD-1 auf T-Zellen verhindert werden. Dazu wurden MUTZ-LC mit einem PD-L1-blockierenden monoklonalen Antikörper inkubiert, der den in der Durchflusszytometrie messbaren Prozentsatz PD-L1-exprimierender Zellen in der Population drastisch senken konnte (III.2). Interessanterweise bewirkte die Blockade des PD-L1 auch eine Veränderung der Expression der beiden Marker CD86 und CD54. Diese wurde bereits ohne Stimulus durch Kontaktallergene auf blockierten Zellen statistisch signifikant um 10 % (CD54) bis 20 % (CD86) gegenüber der unblockierten Kontrolle erhöht (III.3.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PD-L1 in der Tat in MUTZ-LC zur Signaltransduktion befähigt ist. Ähnliche Ergebnisse berichtet eine niederländische Arbeitsgruppe, die den Effekt der PD-L1-Blockade auf die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen im

Mausmodell untersuchte. Auf dendritischen Zellen, die aus murinen Knochenmarkvorläufern differenziert worden waren, wurde die Expression von CD80 und CD86 durch die Blockade des PD-L1 mit löslichem PD-1 allerdings gehemmt [152]. Diese Diskrepanz lässt sich durch Speziesunterschiede, die unterschiedlichen Subtypen dendritischer Zellen, die in den vorgestellten Experimenten untersucht wurden, unterschiedliche PD-L1-Antikörper und Kulturbedingungen erklären. Grundsätzlich kann jedoch festgehalten werden, dass PD-L1 sowohl in MUTZ-LC als auch in murinen dendritischen Zellen aus Knochenmarkvorläufern die Expression kostimulatorischer Moleküle regulieren kann.

Die erhöhte Expression blieb auch nach Stimulation mit Kontaktallergenen erhalten. Die Stärke der Erhöhung der Expression von CD86 mit steigenden Konzentrationen von DNCB oder MBT gegenüber der ebenfalls PD-L1-blockierten unbehandelten Kontrolle blieb verglichen mit den Kurvenverläufen nicht blockierter Zellen etwa gleich. Den halbmaximalen Anstieg der CD86-Expression (die Konzentration, bei der 50 % des maximal messbaren Effekts auftrat - $EC_{50_{sens}}$) erreichten die blockierten Zellen jedoch bei jeweils geringeren Konzentrationen von DNCB und MBT als die nicht blockierten Zellen. Die berechneten $EC_{50_{sens}}$ -Werte für DNCB waren 11 $\mu\text{mol/l}$ für unblockierte MUTZ-LC und 8,5 $\mu\text{mol/l}$ für blockierte sowie für MBT 389,2 $\mu\text{mol/l}$ für unblockierte und 383,7 $\mu\text{mol/l}$ für blockierte Zellen. Die Sensitivität des Systems gegenüber Kontaktallergenen wurde durch die PD-L1-Blockade also erhöht.

IV.1.4 MUTZ-LC regulieren nach Behandlung mit starken Allergenen die Expression von PD-L1

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die beiden starken Allergene DNCB und TNBS sich auch in ihrer Fähigkeit, die Expression von PD-L1 auf MUTZ-LC zu regulieren, unterscheiden. So induzierte in der Kokultur mit HaCaT die Behandlung mit DNCB konzentrationsabhängig die Expression von PD-L1 auf MUTZ-LC und zwar auch und stärker, wenn in der Population zuvor die Blockade des Rezeptors mit einem monoklonalen Antikörper vorgenommen wurde (III.3.2). Das erscheint insofern biologisch plausibel, als dass eine starke Aktivierung der dendritischen Zellen bei der Sensibilisierung auch regulatorische Mechanismen in Gang setzen muss, um ein Überschießen der Immunantwort zu verhindern. Da vor allem in den PD-L1-blockierten Kulturen, die mit

hohen DNCB-Konzentrationen behandelt worden waren, gleichzeitig der Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen anstieg, aber die mittlere Expression bezogen auf ebenfalls blockierte, aber unbehandelte Kontrollen sank, liegt der Schluss nahe, dass die Induktion durch DNCB die Blockade des PD-L1 mittels Antikörper nicht überwinden kann und die Expression von PD-L1 auf Zellen induziert wird, die den Marker zuvor nicht exprimierten.

Die Behandlung der Kokulturen mit TNBS zeigte einen anderen Mechanismus der Regulation von PD-L1 für dieses starke Allergen auf. In unblockierten Populationen, die mit hohen TNBS-Konzentrationen behandelt worden waren, sank der Prozentsatz PD-L1-positiver Zellen gleichzeitig mit der mittleren Expression des Markers. Es ist denkbar, dass TNBS zwar keine Expressionserhöhung der (auf MUTZ-LC ohnehin recht stark exprimierten) Marker CD86 und CD54 induziert, dafür aber den regulatorischen, immunsuppressiven Mechanismus über PD-L1 in den Zellen hemmt. Durch die Blockade des PD-L1 wird diese Wirkung von TNBS verstärkt, so dass die Effekte bereits bei niedrigeren Konzentrationen messbar werden, während die Reaktion von PD-L1-blockierten MUTZ-LC auf hohe Konzentrationen TNBS sich der auf die DNCB-Behandlung angleicht (erhöhte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen bei gleichzeitiger Absenkung der mittleren Expression). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich eine Möglichkeit, TNBS als Allergen auch mit MUTZ-LC zu detektieren. Weitere Untersuchungen, die auch die Regulation von PD-L1 nach Behandlung von MUTZ-LC mit weiteren allergenen und nicht allergenen Substanzen zum Gegenstand haben, könnten die hier gezeigten Ergebnisse stützen.

IV.1.5 MUTZ-LC eignen sich als Alternative für primäre moDC in der Grundlagenforschung

Die komplexen Kulturbedingungen für MUTZ-3, die hochsupplementiertes Kulturmedium sowie zusätzlich konditioniertes Medium der Blasenkarzinom-Zelllinie 5637 benötigen und sehr empfindlich gegenüber serumfreien oder weniger stark supplementierten Bedingungen reagieren, stellten im Verlauf der Arbeit eine experimentell-methodisch nicht lösbare Herausforderung dar. Zum einen erschwerte die Empfindlichkeit von MUTZ-3 den AhR-Knockout in serumfreiem Medium (siehe IV.2) und zum anderen ließ sich in der Kokultur kein Effekt auf Jurkat nachweisen (Ergebnisse nicht gezeigt), was möglicherweise auf das Absterben von MUTZ-LC in Standardmedium zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der Differenzierungsversuche zeigen jedoch, dass sich MUTZ-3 gut als Alternative für primäre Monozyten des peripheren Blutes eignen, da sie sich ebenso differenzieren lassen und spezifisch auf verschiedene Stimuli reagieren. Als Zelllinie sind sie jederzeit verfügbar, zeigen keine Spendervarianz und benötigen keine Isolation aus Blutspenden. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass MUTZ-3 je nach Länge der Differenzierungskultur Oberflächenmarker sowohl dermalen cDC als auch von Langerhans-Zellen in unterschiedlicher Stärke und Anzahl exprimieren und so über die Länge der Inkubationszeit der sich herausbildende Phänotyp der Zellen reguliert werden kann. Die Ergebnisse der Experimente mit Blockade von PD-L1 zeigen darüber hinaus, dass die Signaltransduktion über PD-L1 in MUTZ-LC nachweisbar ist und diese Zellen zudem die Expression von PD-L1 Testschutz- und Konzentrations-abhängig regulieren. Damit ergeben sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der Grundlagenforschung, etwa bei der Aufklärung des noch wenig untersuchten *reverse signalling* über PD-L1 außerhalb der Krebsforschung oder bei Untersuchungen, die auf substanzabhängige mechanistische Unterschiede bei der Aktivierung von dendritischen und Langerhans-Zellen abzielen.

IV.2 Der AhR-Knockout mittels CRISPR/Cas9 und die Entwicklung eines Selektionsprotokolls für AhR-defiziente Zellen

Neben der Antikörper-vermittelten Blockade des PD-L1 sollte für diese Arbeit als weiterer Rezeptor, für den Hinweise auf eine immunsuppressive Rolle vorliegen, der AhR in dendritischen bzw. monozytären Zellen molekularbiologisch ausgeschaltet werden. Danach sollte untersucht werden, ob und welche Effekte sich durch AhR-Knockout und/oder PD-L1-Blockade in Allergen-stimulierten monozytären/dendritischen Zellen auf die Stimulierbarkeit kokultivierter T-Zellen ergeben.

Der AhR-Knockout wurde zunächst mit MUTZ-3-Zellen versucht und erwies sich als weniger effizient als erhofft. Gleichwohl der mit molekularbiologischen Methoden bestimmte Prozentsatz der mittels Cas9-Enzym gespaltenen DNA in Ansätzen mit verschiedenen *guideRNAs* (die sich in Ziel-DNA- und PAM-Sequenz unterschieden) rund 20 % betrug und in einigen Ansätzen auch der Knockout des als Positivkontrolle dienenden HPRT1-Gens nachgewiesen werden konnte (III.4.3), hatte sich der AhR-Knockout nach einigen Passagen nur in einem geringen Prozentsatz (unter 10 % verglichen mit Kontrollpopulationen, durchflusszytometrisch bestimmt) der Zellen manifestiert (III.4.1). Aufgrund

dieser Ergebnisse wurden Experimente zum AhR-Knockout in einer zweiten monozytären Zelllinie (THP-1) als möglicher Alternative zu MUTZ-3 unternommen.

In THP-1 konnte nach dem AhR-Knockout molekularbiologisch im Mittel rund 30 % gespaltene DNA nachgewiesen werden (III.4.4). Durchflusszytometrisch bestimmt ergab sich nach einigen Passagen eine Reduktion des Prozentsatzes AhR-positiver Zellen von im Mittel bis zu 15 %. Während in geneditierten MUTZ-3 jedoch gleichzeitig eine statistisch signifikante Verringerung der AhR-Expression in noch positiven Zellen in Populationen gemessen werden konnte, war dies für ebenso editierte THP-1 nicht der Fall (III.4.2). Dies legt die Vermutung nahe, dass es in MUTZ-3 vermehrt zum heterozygoten Knockout des AhR-Gens kam, was die im Vergleich mit THP-1 geringere Reduktion der Prozentsätze AhR-positiver Zellen zum Teil erklären könnte. Eine weitere Erklärung für die verminderte Effizienz des Knockouts in MUTZ-3 ist ihr erhöhter Anspruch an das Kulturmedium, so dass MUTZ-3 im serumfreien Mangelmedium, das im Knockout-Protokoll verwendet wird, möglicherweise in den Zellzyklusarrest treten, womit die Erreichbarkeit des Zielgens vermindert wird. Für diese Hypothese spricht, dass MUTZ-3 in der durchflusszytometrischen Bestimmung der Viabilität direkt nach dem Knockout keine erhöhten Prozentsätze abgestorbener Zellen zeigten.

Zwar hatte sich der CRISPR/Cas9-vermittelte Knockout des AhR in THP-1 als effizienter erwiesen, in den Knockout-Populationen exprimierten jedoch immer noch etwa zwei Drittel der Zellen den Rezeptor. Außerdem schienen AhR-positive Zellen gegenüber Knockout-Zellen einen Wachstumsvorteil aufzuweisen und sich in der Kultur stärker zu vermehren. Gestützt wird diese Beobachtung durch Untersuchungen zu physiologischen Funktionen des AhR, die gezeigt haben, dass dieser eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. So wurde etwa durch den siRNA-vermittelten Knockdown des AhR in HaCaT die Proliferation der Zellen signifikant eingeschränkt [122]. Der AhR-Antagonist Luteolin [153] induzierte in Brustkrebszellen Apoptose, inhibierte deren Viabilität und führte zum Zellzyklusarrest [154]. In einer Mischpopulation aus AhR-positiven und AhR-Knockout-Zellen würden also unweigerlich die nicht modifizierten Zellen stärker proliferieren und damit der Anteil AhR-negativer Zellen über die Passagen entsprechend abnehmen. Daher wurde die Entwicklung eines Selektionsprotokolls für AhR-defiziente Zellen notwendig.

Eine polnische Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass die Inkubation von primären murinen kortikalen Neuronen mit Dibutylphthalat (DBP) die Aktivität von Caspase-3, die als

Biomarker für apoptotische Zellen verwendet wird, AhR-vermittelt, konzentrations- und zeitabhängig induziert [155]. Auf dieser Grundlage wurden in der vorliegenden Arbeit Versuchsreihen geführt, um zu prüfen, ob diese Eigenschaft von DBP auch für die Selektion von monozytären AhR-Knockout-Zellen anwendbar ist. Als entscheidend für eine hohe Ausbeute AhR-negativer Zellen stellte sich dabei heraus, die frühapoptotischen Zellen aus der Kultur zu entfernen. Dazu wurde an die dreitägige Inkubation mit DBP die magnetische Depletion dieser Zellen über die Bindung von magnetischen Annexin V-Beads an Phosphatidylserin, einen Apoptosemarker, angeschlossen. Auf diese Weise gelang schließlich die Reduktion des Anteils AhR-positiver Zellen in den Kulturen auf im Mittel rund 40 % (Median: 33 %) und damit die deutliche Anreicherung von AhR-negativen Zellen. Dabei sank in den Knockout-Populationen die AhR-Expression bezogen auf unbehandelte, nicht geneditierte THP-1 statistisch signifikant, so dass anzunehmen ist, dass auch in THP-1 (wie in MUTZ-3) in einigen wenigen Zellen der AhR heterozygot ausgeknockt war und dies nach der Selektion messbar wurde (III.4.5.2).

Eine weitere Reduktion der Prozentsätze AhR-positiver Zellen in den Knockout-Populationen ließ sich jedoch auch mit höheren Konzentrationen von DBP nicht erreichen, was vermutlich zum einen an der eingeschränkten Löslichkeit des Phthalats im Kulturmedium lag und zum anderen daran, dass THP-1 im Allgemeinen nur niedrige Level des AhR exprimieren [117] und der apoptotische Effekt von DBP offenbar eine höhere Expression des Rezeptors voraussetzt. Diese Annahme wird durch die Untersuchung der Zellen, die bei der magnetischen Depletion in der Säule zurückgehalten wurden, gestützt. Diese zeigten eine fast zweifach höhere Expression des AhR im Vergleich zur Knockout-Population, was auf eine Abhängigkeit des DBP-Effekts von der Höhe der AhR-Expression hindeutet.

Eine reine AhR-Knockout-Population ließe sich mit komplexeren gentechnischen Techniken herstellen. Dazu wäre es notwendig, zunächst eine Reporterfunktion in AhR-positiven Zellen einzuführen, also etwa die Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) unter der Kontrolle des AhR-Promotors und danach den Knockout wie beschrieben durchzuführen. So ergäbe sich die Möglichkeit, über die Inkubation mit einem AhR-Agonisten (etwa Genistein in subtoxischer Konzentration), AhR-positiven Zellen zur Produktion von GFP anzuregen, wodurch sie sich durchflusszytometrisch unter sterilen Bedingungen in einem entsprechend ausgerüsteten Gerät (*cell sorter*) von AhR-negativen Zellen trennen ließen. Dabei wäre jedoch zu prüfen, ob eine solche reine Knockout-

Population im Hinblick auf die oben beschriebene Funktion des AhR im Zellzyklus überhaupt überlebensfähig wäre.

IV.3 AhR-Knockout und Blockade des PD-L1 regulieren Immunorezeptoren von THP-1 in Kokultur mit HaCaT

Nachdem die Entscheidung für THP-1 als Surrogat für dendritische Zellen im zu entwickelnden Testsystem gefallen und der AhR-Knockout in diesen Zellen gelungen war, sollte im weiteren Verlauf auch auf Knockout-Populationen der PD-L1 mittels Antikörper blockiert werden und die blockierten und/oder AhR-defizienten Zellen vergleichend mit unmodifizierten THP-1 ins Testsystem eingebracht werden. Dabei erwies es sich im Hinblick auf die gewünschte möglichst vollständige Blockade des immunsupprimierenden Rezeptors als vorteilhaft, dass im Gegensatz zu ausdifferenzierten MUTZ-LC THP-1 zu einem deutlich geringeren Prozentsatz und weniger stark PD-L1 exprimieren, so dass die Blockade auch mit dem weniger effizienten Antikörper (von Thermo Fisher) eine in der durchflusszytometrischen Messung zu 95 % PD-L1-negative Population hervorbrachte (III.5).

Anders als für MUTZ-LC wurde für THP-1 nach PD-L1-Blockade in Kokultur mit HaCaT-Keratinocyten ohne Testsubstanzbehandlung jedoch keine verstärkte Expression des kostimulatorischen Markers CD86 oder des Adhäsionsmoleküls CD54 gemessen, was möglicherweise mit der niedrigen Expression des PD-L1 zusammenhängt, die für eine effektive Signaltransduktion nach Bindung des Antikörpers eventuell nicht ausreicht.

Der AhR-Knockout in THP-1 führte indes in der HaCaT-Kokultur zur Expressionserhöhung der beiden Marker und zwar gleichermaßen in PD-L1-blockierten wie unblockierten geneditierten Zellen, was zeigt, dass der AhR offenbar an der Regulation dieser Oberflächenmoleküle auf nicht Testsubstanz-stimulierten THP-1 beteiligt ist, PD-L1 jedoch nicht (III.6.2). Diese Ergebnisse liefern außerdem einen Hinweis darauf, dass der AhR in monozytären Zellen seine immunsuppressive Funktion im Zusammenhang mit Sensibilisierungsprozessen auch über die negative Regulation der Expression beteiligter Oberflächenmarker ausübt. Gestützt wird diese Hypothese von Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigen konnte, dass primäre humane moDC auf AhR-Aktivierung durch die Agonisten 6-Formylindolo(3,2-b)carbazol (FICZ) und 2-(1'H-indol-3'-carbonyl)-thiazol-

4-carboxylsäure-Methylester (ITE) mit der statistisch signifikanten Herabregulation von CD86 reagieren [156].

Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis bezüglich der AhR-Expression in THP-1 mit und ohne vorherigen Knockout ergab sich in der Kokultur mit HaCaT in ansonsten unbehandelten Zellen. Der durchflusszytometrisch bestimmte prozentuale Anteil AhR-positiver Zellen und die durchflusszytometrisch messbare zytosolische AhR-Expression sanken über die zwei Tage Inkubationszeit beträchtlich ab – für die Populationen ohne AhR-Knockout in beiden Fällen statistisch signifikant (III.6.3). Die Absenkung der zytosolischen AhR-Expression deutet auf eine Bindung des Rezeptors und mögliche Translokation in den Zellkern hin. Es wäre in lysierten Zellen mittels Proteinbestimmung im *Western Blot* zu prüfen, ob es zu einem Abbau des AhR in diesen Zellen kommt oder die AhR-Expression aus anderen Gründen (durch Bindung und Inhibition oder wie vorgeschlagen durch Aktivierung mit Translokation in den Kern) nicht durchflusszytometrisch erfassbar war. Eine Aktivierung des AhR könnte zusätzlich mit der Bestimmung von AhR-assoziierten Enzymen der CYP-Familie auf mRNA- oder Proteinebene nachgewiesen werden. Grundsätzlich ist eine Bindung des AhR durch endogene Liganden denkbar. So gehören etwa die Tryptophan-Metabolite im Kynurenin-Stoffwechselweg zu den endogenen AhR-Liganden [157]. Es konnte gezeigt werden, dass der Kynurenin-Stoffwechselweg in humanen Keratinozyten aktiv und an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. Durch Aktivierung mit IFN- γ wurde der Katabolismus von Tryptophan zu Kynurenin in KC signifikant angeregt [158]. Die Erstellung eines Zytokinprofils der THP-1/HaCaT-Kokultur könnte zeigen, ob der Stimulus durch die Koinkubation ausreicht, um messbare Mengen IFN- γ zu generieren. In dieser Arbeit wurden jedenfalls durchaus hohe Konzentrationen eines anderen proinflammatorischen Zytokins, IL-8, in Überständen der ansonsten unbehandelten Kokultur gemessen. Auch Ergebnisse aus Trier zu HaCaT/THP-1-Kokulturen lassen darauf schließen, dass die beiden Zelltypen in der Kokultur in wechselseitigem Kontakt stehen. So wurde auf THP-1 sowohl in Kokultur ohne weitere Stimulation als auch bei der Inkubation von THP-1 in HaCaT-konditioniertem Medium eine Regulation der Oberflächenmarker CD86, CD40 und CD54 gezeigt [159].

Interessanterweise war die Absenkung des prozentualen Anteils AhR-positiver Zellen in PD-L1-blockierten Populationen nach zwei Tagen Inkubation in der Kokultur mit HaCaT noch deutlicher ausgeprägt als in nicht blockierten Zellen: in nicht geneditierten Populationen auf etwa drei Viertel des Anteils in unblockierten Populationen und in AhR-Knockout-

Populationen auf etwa zwei Drittel des Anteils in der Knockout-Population ohne PD-L1-Blockade. Gleichzeitig wurde bei der Messung der PD-L1-Blockade mittels Antikörper offenbar, dass in AhR-defizienten Populationen PD-L1 konsistent auf einem geringeren Anteil der Zellen (THP-1 im Mittel: 16,6 %, CCT im Mittel: 12,3 %) und weniger stark exprimiert wird (mittlere MFI auf THP-1 6, auf CCT 5). Diese Ergebnisse zeigen einen wechselseitigen Einfluss auf die jeweilige Expression der Rezeptoren und decken sich mit Ergebnissen einer chinesischen Arbeitsgruppe, die gezeigt hatte, dass die Behandlung von Mäusen mit dem AhR-Inhibitor α -Naphthoflavon zu einer statistisch signifikanten Reduktion der PD-L1-Expression im Lungenepithel führte. Die Behandlung von Lungenepithelzellen mit dem AhR-Agonisten Benzo(a)pyren (BaP), der Bestandteil des Zigarettenrauchs ist, führte dagegen zu einer Erhöhung der PD-L1-Expression. In AhR-Knockout-Mäusen vermochte die BaP-Behandlung die PD-L1-Expression nicht zu induzieren. Ebenso wiesen Lungenkarzinomzellen von rauchenden Personen im Vergleich zu Lungenkarzinomzellen nicht rauchender Personen eine erhöhte PD-L1/AhR-Koexpression auf [160]. Die Ergebnisse mit THP-1 weisen darauf hin, dass eine solche Koregulation auch in Monozyten auftritt. Weitere Untersuchungen, etwa auf mRNA-Ebene und mit AhR-Agonisten und -Antagonisten, könnten diese Ergebnisse weiter untermauern.

IV.4 Das weiterentwickelte Testsystem: *Cell Line Co-culture based Sensitisation Assay (CLCSA)*

IV.4.1 Stufe 1: HaCaT-Kokultur

Gemäß Zielstellung der Arbeit wurden monozytäre Zellen, deren immunsuppressive Rezeptoren blockiert und/oder gentechnisch ausgeschaltet worden waren, in der Kokultur mit HaCaT-Keratinocyten mit Testsubstanzen behandelt. So sollte um zum einen die Regulation des kostimulatorischen Markers CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 auf diesen Zellen nach (Allergen-)Stimulus untersucht und zum anderen in einem weiteren Schritt geprüft werden, ob und inwieweit die modifizierten Zellen die Aktivierung von Jurkat-T-Zellen *in vitro* vermitteln können.

Geneditierte und/oder PD-L1-blockierte Zellen reagierten in der Kokultur mit HaCaT auf den Stimulus mit dem moderaten Allergen MBT ähnlich mit der Hochregulation von CD86

und CD54 wie nicht modifizierte THP-1, zeigten jedoch eine erhöhte Expression von CD54 bezogen auf unbehandelte, nicht modifizierte Zellen, wenn sie mit dem extremen Allergen DNCB behandelt worden waren. Während sich die Expression von CD54 bezogen auf unbehandelte, nicht modifizierte THP-1 in behandelten THP-1 und THP-1 mit PD-L1-Blockade lediglich um 20 % verstärkte, erhöhte sich die Expression in geneditierten Populationen um 40 % und in geneditierten und PD-L1-blockierten um 50 %. Das zeigt, dass ein starker Stimulus zu einer messbar verstärkten Aktivierung geneditierter Zellen führt, die PD-L1-Blockade allein oder der weniger starke Stimulus durch MBT dafür jedoch nicht ausreichen.

Nach Behandlung mit dem Irritanz SLS wurde die Expression von CD54 auf geneditierten Populationen bezogen auf unbehandelte, unmodifizierte Kontrollen statistisch signifikant gehemmt, in zusätzlich zum AhR-Knockout PD-L1-blockierten Populationen wiederum etwas stärker als ohne PD-L1-Blockade (III.6.2). Mit dem Ausfall eines Adhäsionssignals in der immunologischen Synapse ergibt sich nach Stimulus mit einem Irritanz in den geneditierten Zellen eine verringerte Fähigkeit, T-Zellen zu binden und in Konsequenz zu aktivieren, was für die zweite Stufe des Testsystems und die Diskriminierung von Irritantien und Allergenen in diesem System von entscheidender Bedeutung ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass der CLCSA *Key Event 2* des AOP für Sensibilisierung durch Hautkontakt abbilden kann.

Als ein möglicher Ausleseparameter für das erste Schlüsselereignis (KE1) – die Aktivierung von Keratinozyten – wurde die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 ins Kokulturmedium untersucht. Auch hierfür zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Kokulturen mit verschiedenen modifizierten Zellen und unmodifizierten THP-1. Die höchsten IL-8-Konzentrationen wurden in den Kokulturen mit unmodifizierten THP-1 gemessen, die niedrigsten jeweils in den Kokulturen mit geneditierten, PD-L1-blockierten Populationen (III.6.4). Da IL-8 sowohl von Epithelzellen (wie Keratinozyten) als auch von Monozyten sezerniert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Expression dieses Zytokins in den AhR-defizienten und/oder PD-L1-blockierten Populationen gehemmt ist, wobei sich die beiden Modifikationen additiv hemmend auf die Sezernierung von IL-8 auswirken. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Gruppe am Institut Curie in Frankreich, die zeigen konnte, dass der AhR-Knockdown die Produktion von IL-8 in der myeloiden Zelllinie KBM7 nach Poly(I:C)-Stimulus vollkommen unterbindet; umgekehrt wurde die IL-8-Produktion in

primären aus Monozyten differenzierten Makrophagen durch die Aktivierung des AhR mit dem AhR-Agonisten FICZ angeregt [161].

Nach Behandlung mit dem extremen Allergen DNCB wurde der Effekt des AhR-Knockouts fast vollständig überwunden, so dass in den Kulturen mit Knockout-Zellen im Mittel eine ähnlich hohe Konzentration von IL-8 gemessen wurde wie in Kulturen mit nicht geneditierten Zellen. In Kokulturen mit PD-L1-blockierten Zellen (mit und ohne AhR-Knockout) waren die gemessenen IL-8-Konzentrationen deutlich niedriger, aber untereinander ebenfalls gleich hoch. Diese Ergebnisse dürften im Zusammenhang mit der Regulation der PD-L1-Expression durch DNCB-Stimulus stehen. Diese Hypothese wäre aber durch gezielte Messungen auf THP-1 noch zu prüfen.

Allgemein führte die Behandlung mit dem Irritanz SLS oder dem extremen Allergen DNCB zu einer erhöhten IL-8-Sezernierung gegenüber unbehandelten Kontrollen. Die Behandlung mit dem moderaten Allergen MBT-Behandlung hingegen hemmte die Sezernierung im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Kokulturen. In den DNCB-behandelten Kulturen wurde zudem ein verstärktes Ablösen der HaCaT von den Kulturplatten beobachtet, was auf selektive Zytotoxizität und Zelllyse (und mögliches Austreten von intrazellulärem IL-8) hindeutet. Diese Ergebnisse lassen sich insgesamt als Hinweise für eine Aktivierung von HaCaT (ähnlich wie etwa im OECD-validierten IL-8 Luc Assay) und das durch die irritative Wirkung der Testsubstanzen ausgelöste Auftreten von Gefahrsignalen in der Kokultur auffassen. Für das extreme Allergen DNCB haben Basketter und andere eine sowohl hohe allergene als auch irritative Potenz zeigen können. Das moderate Allergen MBT hingegen wies im LLNA eine 34-fach höhere Effekt-Konzentration (EC3 – Konzentration, die zur dreifach verstärkten Proliferation von Zellen des regionären Lymphknotens führt) und eine 100-fach höhere irritative Konzentration im GPMT auf [26]. Diese Ergebnisse belegen eine gegenüber DNCB deutlich geringere irritative Wirkung von MBT, was die unterschiedlichen Effekte der Testsubstanzen auf die IL-8-Konzentrationen in den Kokulturüberständen in dieser Arbeit erklären würde. Gleichzeitig wurde für SLS eine induktive Wirkung auf die Sezernierung von IL-8 sowohl in primären humanen Keratinozyten *in vitro* als auch in humaner Haut *in vivo* gezeigt [162,163]. Diese Ergebnisse werden hier für die Kokultur aus HaCaT und THP-1 bestätigt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des IL-8-ELISA im Zusammenspiel mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Bestimmung der CD86- und CD54-Expression auf THP-1-

Modifikationen in der ersten Stufe des CLCSA, dass das System die Situation *in vivo* offenbar korrekt abbildet. So reicht eine alleinige irritative Wirkung (wie über den Surrogatmarker IL-8 für SLS bestimmt) nicht aus, um nachfolgend das zweite Schlüsselereignis – die Aktivierung dendritischer Zellen – zu initiieren. Andersherum können Substanzen auch ohne eine ausgeprägte irritative Wirkung sensibilisierend sein, also dendritische Zellen (und nachfolgend T-Zellen) aktivieren, wie hier für MBT gezeigt und *in vivo* in Maus und Meerschweinchen belegt.

Auch das molekulare initiiierende Ereignis (MIE) wird – wenn auch nicht explizit gemessen – grundsätzlich im Testsystem erfasst, da in eigenen Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass dendritische Zellen in Kokultur mit HaCaT auch das Prohaptan *para*-Phenylendiamin (PPD) zuverlässig erkennen [82]. In anderen Arbeitsgruppen konnte zudem gezeigt werden, dass HaCaT auf PPD-Stimulus mit der Produktion von IL-18 reagieren [164] und THP-1 in Kokultur mit HaCaT auf die Behandlung mit den Prohaptanen Eugenol und 2-Methoxy-4-methylphenol mit einer stärkeren konzentrationsabhängigen Erhöhung der CD86-Expression als in Monokultur reagieren [159].

Auf diese Weise sind in Stufe 1 des CLCSA bereits die ersten drei Schritte im AOP:40 abgedeckt.

IV.4.2 Stufe 2: Jurkat-Kokultur

IV.4.2.1 Proliferation von Jurkat

Zur Adressierung des letzten Schritts im AOP „Sensibilisierung durch Hautkontakt“ wurde an die THP-1/HaCaT-Kokultur eine weitere Kokultur angeschlossen. So wurden die in der ersten Stufe aktivierten monozytären Zellen nun mit Jurkat-T-Zellen kokultiviert und als Endpunkte die Proliferation und CD3-Expression letzterer sowie die Sekretion von Zytokinen ins Medium der Kokultur gemessen.

Für den Endpunkt Proliferation wurde eine zunächst überraschende Beobachtung gemacht: Jurkat-Zellen in Kokultur mit (unterschiedlich modifizierten und unmodifizierten) THP-1 enthielten prozentual weniger stark proliferierende Zellen als Jurkat in Solokultur oder Jurkat, die mit Anti-CD3/CD28-Beads behandelt worden waren. Besonders stark verringert wurde der Prozentsatz in Kokulturen mit PD-L1-blockierten THP-1/ CCT (III.7.1).

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liefert die Expression von CD95L (auch: *Fas7-associated cell surface antigen* [Fas]-Ligand) auf THP-1 [165,166], der über den entsprechenden Rezeptor auf Jurkat in diesen Apoptose auslöst [165]. Inwiefern die Blockade von PD-L1 diesen Effekt verstärkt bzw. die Expression von CD95L induziert, müsste gesondert geprüft werden, wäre aber im Sinne einer Gegenregulation denkbar.

Zur Charakterisierung des Effekts der Testsubstanz-Behandlung der monozytären Zellen auf die nachfolgende Aktivierung von Jurkat-T-Zellen wurden die Prozentsätze stark proliferierender CD3-positiver Zellen in den Kokulturen im Vergleich zu Kokulturen mit unbehandelten monozytären Zellen derselben Modifikation (mit und ohne PD-L1-Blockade, mit und ohne AhR-Knockout) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die PD-L1-Blockade und der AhR-Knockout in THP-1 einen gegenläufigen Effekt (bezogen auf die jeweils gleich modifizierte, unbehandelte Kontroll-Kokultur) auf die Proliferation von Jurkat hatten, wenn die Monozyten zuvor mit dem Irritanz SLS oder dem moderaten Allergen MBT behandelt worden waren. Verglichen mit Kokulturen mit unmodifizierten THP-1 war der Prozentsatz stark proliferierender Jurkat in Kokulturen mit modifizierten THP-1 jedoch unabhängig von der eingesetzten Testsubstanz erhöht, so dass die Hypothese, dass das Blockieren oder Ausschalten suppressiver Rezeptoren im *in vitro* nachgebildeten Sensibilisierungsprozess zu einer Verstärkung der T-Zell-Reaktion führen könnte, als bestätigt erachtet werden kann.

Beide Modifikationen an THP-1 in Kombination führten dazu, dass SLS-behandelte monozytäre Zellen keine Veränderung des Prozentsatzes stark proliferierender Jurkat bezogen auf unbehandelte Kontroll-Kokulturen induzieren konnten, während MBT-behandelte CCT den Prozentsatz statistisch signifikant erhöhten. Auf diese Weise gelang die Diskriminierung zwischen Allergen und Irritanz. Die Behandlung von modifizierten THP-1 mit DNCB erbrachte jedoch in keinem Fall eine Veränderung des Prozentsatzes stark proliferierender Jurkat in Kokultur, was zunächst im Widerspruch mit den Ergebnissen mit MBT-Behandlung steht.

IV.4.2.2 CD3-Expression

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der CD3-Expression auf stark proliferierenden Jurkat in Kokultur ermöglichen eine differenziertere Betrachtung als die Ergebnisse zur Proliferation allein (III.7.2). So wurden in dieser Arbeit Hinweise gefunden, dass der AhR-Knockout in THP-1 zu einer verstärkten Bindung des T-Zell-Rezeptors auf

Jurkat in Kokultur führt, die Blockade von PD-L1 jedoch nicht. Das geht aus dem Vergleich der Expression des T-Zell-Rezeptor-Korezeptors CD3 auf Jurkat in Solokultur, Jurkat, die mit Anti-CD3/CD28-Beads inkubiert wurden, und Jurkat in Kokultur mit unterschiedlich modifizierten THP-1 hervor. Bezogen auf Jurkat in Solokultur erniedrigten Anti-CD3/CD28-Beads und kokultivierte THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade die messbare CD3-Expression auf Jurkat etwa gleich stark, AhR-Knockout-THP-1 mit und ohne PD-L1-Blockade führten jedoch zu einer noch stärkeren Reduktion der durchflusszytometrisch messbaren Expression des Korezeptors. Ein möglicher Mechanismus wäre die erhöhte Expression von MHC II auf THP-1 mit AhR-Knockout. In diesem Fall stünden mehr MHC II-Moleküle auf THP-1 für die Interaktion mit CD3 auf Jurkat zur Verfügung, so dass weniger „freie“ CD3-Antigene für die Bindung Fluorochrom-konjugierter Antikörper in der durchflusszytometrischen Messung vorhanden wären. Zum Einfluss des AhR auf die Expression von MHC II auf antigenpräsentierenden Zellen ist eine Reihe von Ergebnissen publiziert. In AhR-Knockout-Mäusen war die Expression von MHC II auf Lungen-DC erhöht und diese Zellen regten nach Ovalbumin-Stimulus die Proliferation von T-Zellen deutlich stärker an als Kontroll-Zellen von nicht genetisch veränderten Mäusen [167]. Auf murinen dendritischen Zellen, die aus Knochenmark-Vorläufern differenziert worden waren, fand sich nach Inkubation mit dem AhR-Antagonisten CH223191 eine erhöhte Expression von MHC I, aber eine unveränderte Expression von MHC II im Vergleich zu Kontrollzellen, die in RPMI kultiviert worden waren. Gleichzeitig führte jedoch die Kultivierung in Iscove's Medium, das natürlicherweise verglichen mit RPMI die drei- bis fünffache Menge an endogenen AhR-Liganden (aromatischen Aminosäuren) enthält, zu erhöhter Expression von MHC II und einer unveränderten Expression von MHC I [168]. Auf humanen moDC wurde nach Aktivierung des AhR mit FICZ und ITE wiederum HLA-DR (MHC II) herunterreguliert [156], was nahelegt, dass eine Inhibition des AhR den gegenteiligen Effekt (Hochregulation von MHC II) hätte; ein AhR-Antagonist wurde in dieser Studie jedoch nicht getestet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedenfalls auf eine stärkere TCR-Interaktion durch THP-1 mit AhR-Knockout hin.

Hinsichtlich des Einflusses der Testsubstanz-Behandlung von monozytären Zellen auf die Expression von CD3 auf Jurkat in Kokultur ergaben sich mit unmodifizierten THP-1 keine Veränderungen, diese waren also nicht in der Lage, Jurkat Testsubstanz-abhängig zu stimulieren. Im Gegensatz dazu ergaben sich mit PD-L1-blockierten THP-1 Hinweise auf eine verstärkte TCR-Interaktion nach Behandlung mit Allergenen (nicht jedoch mit dem Irritant),

wie durch statistisch signifikant verringerte CD3-Bindung des Färbeantikörpers in der Durchflusszytometrie gezeigt wurde. Für die Kokulturen mit den AhR-Knockout-Populationen ergab sich ein zunächst paradox erscheinendes Bild: In Kokulturen mit AhR-Knockout-Zellen (CCT) stieg nach Behandlung der THP-1 mit DNCB die CD3-Expression auf Jurkat im Vergleich zu Kokulturen mit unbehandelten Kontrollen (nicht jedoch bei SLS- oder MBT-Behandlung), in Kokulturen mit zusätzlich PD-L1-blockierten THP-1 verstärkte sich dieser Effekt sogar und war jetzt auch in Kokulturen mit MBT-behandelten monozytären Zellen messbar. Hierbei scheinen verschiedene, konkurrierende Mechanismen eine Rolle zu spielen. Zum einen erhöht der AhR-Knockout, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54, wodurch eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöhte Stimulation von T-Zellen möglich wird. Zusätzlich erhöht die Behandlung mit dem extremen Allergen DNCB die Expression dieser beiden Marker, so dass eine verstärkte Interaktion zwischen T-Zellen und diesen monozytären Zellen verglichen mit unbehandelten, geneditierten Zellen stattfindet. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ein weiteres kostimulatorisches Molekül – CD80 – mit PD-L1 *cis*-heterodimerisiert (also auf der Oberfläche derselben Zelle) und damit die PD-L1/PD-1-Interaktion unterbindet, also die Stimulation der T-Zelle aufrecht erhält, insbesondere wenn dendritische Zellen hohe Mengen CD80 exprimieren [169]. Da CD80 auf AhR-aktivierten moDC parallel mit CD86 herunterreguliert wird [156], liegt die Vermutung nahe, dass es auf AhR-Knockout-Zellen, ebenso wie der Schwesterrezeptor, hochreguliert wird, womit die PD-L1/CD80-Dimerisierung begünstigt wäre. Es ist daher anzunehmen, dass DNCB-stimulierte, AhR-Knockout-Zellen T-Zellen in Kokultur um ein Vielfaches stärker aktivieren können, wodurch aber auch verstärkt die supprimierenden Mechanismen greifen. So verstärken aktivierte T-Zellen die Expression von CTLA4, das mit CD28 – dem stimulatorischen Target von CD86 und CD80 – kolokalisiert, eine stärkere Affinität gegenüber CD86/CD80 aufweist als CD28 und regulatorisch wirkt [37], so dass zum Zeitpunkt der Messung (nach fünf Tagen Kokultur) in Kokulturen mit AhR-defizienten und überaktivierten monozytären Zellen die T-Zellen bereits in die „Abkühlphase“ eingetreten sein könnten. Ebenso und verstärkt würden zusätzlich PD-L1-blockierte AhR-defiziente Zellen in der Frühphase der Interaktion mit T-Zellen diese überaktivieren, da hier zusätzlich der regulatorische Signalweg über PD-L1/PD-1 unterbunden wird. Auf diese Weise könnte auch der schwächere Stimulus durch MBT ausreichen, um diese Überaktivierung zu erreichen. Im Verlauf würde dann aber, wie oben beschrieben, der regulatorische Mechanismus über CTLA4 überwiegen und wiederum dazu führen, dass zum Messzeitpunkt

die zunächst überaktivierten T-Zellen bereits in die supprimierte Phase eingetreten sind. Ein weiterer möglicherweise beteiligter Mechanismus könnte die Interaktion von CD80 mit PD-L1 auf T-Zellen sein. Es wurde gezeigt, dass auch aktivierte T-Zellen PD-L1 exprimieren und CD80 als Ligand fungieren kann, was zur Inhibition der T-Zell-Antwort führt [170,171]. Dieser Mechanismus könnte demnach in Kokulturen mit PD-L1-blockierten, AhR-defizienten Monozyten, in denen die CD80/PD-L1-*cis*-Dimerisierung und der damit verbundene stimulatorische Signalweg unterbunden ist, überwiegen. Um diese angenommene Interaktion von stimulierenden und supprimierenden Ereignissen aufzuklären, wären Messungen der CD80-Expression auf AhR-defizienten und/oder PD-L1-blockierten THP-1, Messungen der CD3-Expression auf Jurkat zu verschiedenen Zeitpunkten der Kokultur und weitere Experimente, etwa mit Blockade von CTLA4 und/oder TCR, notwendig.

IV.4.2.3 Zytokinsekretion ins Medium der Kokultur

Als zusätzlicher Ausleseparameter für die Aktivierung von Zellen in der Kokultur wurde die Zytokinsezernierung untersucht. Dabei wurden im Wesentlichen vier Zytokine in den Überständen gefunden: TNF- α , IL-8, MIP-3 α , MIP-1 β (III.7.4). Die Konzentrationen aller vier Zytokine waren in Kokulturen unbehandelter monozytärer Zellen mit Jurkat gegenüber Konzentrationen in Jurkat-Solokulturen erhöht, insbesondere dann, wenn die Blockade des PD-L1 erfolgt war.

- **TNF- α**

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α wird von Epithelzellen, Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen im Zusammenhang mit Sensibilisierungsprozessen produziert [18]. Außerdem wurde gezeigt, dass aktivierte Jurkat ebenfalls vermehrt TNF- α produzieren [98]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Kokulturen von Jurkat mit monozytären Zellen bereits ohne Testsubstanz-Behandlung die TNF- α -Konzentrationen gegenüber Jurkat-Solokulturen stark erhöht waren, im Mittel sogar über die Werte, die in Kulturen mit durch Anti-CD3/CD28-Beads aktivierten Jurkat gemessen wurden. Dabei waren die TNF- α -Konzentrationen in Kulturen mit PD-L1-blockierten und/oder AhR-defizienten monozytären Zellen besonders hoch. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die gezeigt haben, dass die PD-L1-Blockade auf Makrophagen und

moDC und der AhR-Knockout in Mäusen (im Zusammenhang mit experimenteller Autoimmunerkrankung oder der Exposition gegenüber Zigarettenrauch) zu einer erhöhten TNF- α -Produktion führt [172–175].

In Kokulturen mit Testsubstanz-behandelten monozytären Zellen verschiedener Modifikationen ergaben sich für die TNF- α -Konzentration im Vergleich zu Kokulturen mit unbehandelten monozytären Zellen nur kleine Veränderungen. Die Behandlung mit SLS führte durchgehend zu erhöhten TNF- α -Konzentrationen, was möglicherweise auf die irritative, proinflammatorische Wirkung von SLS zurückzuführen ist. In Kokulturen mit PD-L1-blockierten THP-1 führte die vorherige Behandlung der Monozyten mit Allergenen wiederum zu einer Absenkung der Zytokinkonzentration verglichen mit unbehandelten Kontroll-Kokulturen. Dieser Effekt könnte mit der Induktion der PD-L1-Expression durch Allergene (wie in dieser Arbeit mit MUTZ-LC gezeigt werden konnte) zusammenhängen, so dass in den Allergen-behandelten Zellen die TNF- α -Produktion im Vergleich weniger stark angeregt wird als in unbehandelten Zellen mit derselben Modifikation.

- **IL-8**

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin ist IL-8, das unter anderem von Epithelzellen, Monozyten und Lymphozyten nach Aktivierung etwa über TLRs oder TNF- α produziert wird [176]. Für dieses Zytokin wurde ebenfalls eine erhöhte Sekretion als Antwort auf die PD-L1-Blockade in moDC gezeigt [172], die in dieser Arbeit in Kokulturen mit unbehandelten PD-L1-blockierten THP-1 bestätigt werden konnte. Nach Allergenstimulus wurde die IL-8-Konzentration in Kokulturen mit PD-L1-blockierten THP-1 im Vergleich mit unbehandelten Kontroll-Kokulturen ebenfalls abgesenkt. Das ist im Hinblick auf die IL-8-induzierende Wirkung von TNF- α naheliegend, da in diesen Kokulturen auch die TNF- α -Konzentrationen niedriger waren als in Kontroll-Kokulturen ohne Testsubstanz-Behandlung. Stark verstärkt im Vergleich zur Kontroll-Kokultur wurde die IL-8-Sezernierung hingegen in Kokulturen mit AhR-defizienten und zusätzlich PD-L1-blockierten Zellen nach Allergen-Behandlung. Nach DNCB-Behandlung war das auch in Kokulturen mit AhR-Knockout-Zellen ohne PD-L1-Blockade der Fall. Dabei scheint der AhR-Knockout eine Rolle gespielt zu haben, da in Jurkat- (und HaCaT-) Kokulturen mit AhR-defizienten Zellen konsistent niedrigere IL-8-Konzentrationen gemessen wurden als in Kokulturen mit nicht modifizierten Zellen. Der supprimierende Einfluss eines AhR-Knockdowns oder der Behandlung mit dem AhR-

Antagonisten CH223191 auf die IL-8-Sekretion wurde etwa auch in humanen Sebozyten und der myeloiden Zelllinie KBM7 gezeigt [161,177]. Möglich wäre, dass in den AhR-Knockout-Zellen daher die Behandlung mit Allergenen eine bezogen auf die ebenso modifizierten unbehandelten Kontrollen stärkere Induktion der IL-8-Produktion verursacht und dieser Effekt in Kombination mit der PD-L1-Blockade zusätzlich verstärkt wird. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste allerdings gezeigt werden, dass in AhR-defizienten Zellen die Allergen-bedingte Erhöhung der PD-L1-Expression weniger stark (oder gar nicht) erfolgt als in nicht AhR-defizienten Zellen. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PD-L1 auf AhR-defizienten, nicht aktivierten Zellen bereits weniger stark exprimiert wird als auf unmodifizierten THP-1 (IV.3).

- **MIP-3 α**

Das Chemokin MIP-3 α (auch CCL20) ist im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen der oberen Atemwege [178], T-Zell-vermittelten Entzündungsprozessen [179] und bei der Rekrutierung und Migration von Langerhans-Zellen, die den entsprechenden Rezeptor (CCR6) tragen [180,181], beschrieben. Es wird von Epithel- und Endothelzellen produziert [181]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch Jurkat in Solokultur ohne Aktivierung im Vergleich zu den anderen drei nachgewiesenen Zytokinen deutlich erhöhte Mengen MIP-3 α produzieren; mit der Aktivierung über Anti-CD3/CD28-Beads wurde die Produktion des Zytokins gehemmt.

In Kokulturen mit nicht PD-L1-blockierten monozytären Zellen wurde die MIP-3 α -Produktion nach vorangegangenem Allergen-Stimulus im Vergleich zu unbehandelten oder SLS-behandelten Kontroll-Kokulturen angeregt. Im Gegensatz dazu führte die erhöhte Aktivierung von Jurkat in den Kokulturen mit Allergen-stimulierten PD-L1-blockierten Zellen wie die Aktivierung mit Anti-CD3/CD28-Beads zur Hemmung der Produktion des Zytokins, während die vorangegangene SLS-Behandlung der monozytären Zellen keinen Einfluss auf die Produktion des Zytokins hatte. Der Knockout des AhR und die PD-L1-Blockade in THP-1 zeigten in diesem Zusammenhang gegenläufige Effekte. In jedem Fall ließ die Bestimmung der MIP-3 α -Konzentration in den Überständen der Kokulturen mit modifizierten THP-1 die Unterscheidung von Allergenen und Irritanz zu.

- **MIP-1 β**

Die Produktion eines weiteren Chemokins – MIP-1 β (CCL4) – wurde bereits in Allergen-behandelten THP-1 und MUTZ-LC nachgewiesen, während die Behandlung mit Irritantien die Produktion nicht anregen konnte [182–184]. In dieser Arbeit produzierten Jurkat in Solokultur nur eben nachweisbare Mengen MIP-1 β (im Bereich der Detektionsgrenze). In Kulturen Bead-aktiverter Jurkat war die MIP-1 β -Konzentration im Vergleich um ein Vielfaches erhöht. Wie in den zitierten Arbeiten gezeigt, wurde auch in dieser Arbeit die MIP-1 β -Konzentration in Überständen der Jurkat-Kokultur nicht verändert, wenn PD-L1-blockierte monozytäre Zellen zuvor mit dem Irritant SLS behandelt worden waren. In Kokulturen mit AhR-Knockout Zellen hatte die Art des Allergens, mit dem die monozytären Zellen behandelt worden waren, Einfluss auf die Konzentration von MIP-1 β . So wurde die Konzentration im Vergleich zu Kokulturen mit unbehandelten Zellen mit MBT-Behandlung geringer, mit DNCB-Behandlung jedoch größer. Nach PD-L1-Blockade verschwand dieser Testsubstanz-abhängige Unterschied und in Kokulturen mit PD-L1-blockierten THP-1 wurde die Produktion von MIP-1 β nach Allergenbehandlung leicht gesenkt, in Kokulturen mit zusätzlich AhR-defizienten Zellen jedoch gesteigert. Insgesamt führte die PD-L1-Blockade also zu einer verbesserten Unterscheidbarkeit zwischen Allergen- und Irritant-Behandlung in Bezug auf die Produktion von MIP-1 β .

Sowohl für MIP-3 α als auch für MIP-1 β hatte die PD-L1-Blockade einen ähnlichen Effekt wie für TNF- α und IL-8, also eine Erhöhung der Sekretion im unstimulierten Zustand und eine im Verhältnis dazu verringerte Sekretion nach Allergen-Stimulus durch die (vermutlich) induzierte Expressions-Erhöhung von PD-L1.

IV.4.3 Auswertung der Ergebnisse aus dem CLCSA: PD-L1-Blockade und AhR-Knockout führen zu einer verbesserten Auslesbarkeit der T-Zell-Antwort auf Allergen-Stimulus

Die Auswertung aller gemessenen Parameter in einer *Heatmap* zeigte eine gegenüber nicht modifizierten THP-1 verbesserte Stimulierbarkeit von Jurkat-T-Zellen durch Allergen-aktivierte monozytäre Zellen, wenn in diesen der AhR-Knockout und/oder die Blockade des PD-L1 erfolgt war (III.8). Die *Heatmap* ließ zudem eine Potenzabschätzung zu, was im

regulatorischen Kontext eine wichtige Funktion darstellt. Beide Modifikationen zeigten im direkten Vergleich ähnlich gute Ergebnisse. Ein paralleler Einsatz beider Modifikationen im Testsystem erscheint dennoch sinnvoll, da dies falsch-positive oder falsch-negative Befunde verringern könnte, wenn ein Ansprechen beider Systeme als Voraussetzung für eine entsprechende Einstufung herangezogen würde.

IV.5 Fazit und Ausblicke

Mit der Etablierung einer Kokultur aus aktivierten monozytären Zellen und stimulierbaren T-Zellen kann die Zielstellung der Arbeit, ein Testsystem zu entwickeln, das unter Einsatz von Zelllinien alle Schritte der zellulären Kaskade des AOP „Sensibilisierung durch Hautkontakt“ abbildet, als erfüllt angesehen werden.

Für die weitere Evaluierung des Systems und die Einleitung einer behördlichen Validierung ist es allerdings notwendig, das System mit einer deutlich erweiterten Liste von bekannten Allergenen und Irritantien zu prüfen. Dabei wären vor allem Prä- und Prohaptene als Testsubstanzen interessant, um sicherzustellen, dass auch das molekulare initiierende Ereignis im System stattfindet. Auf Grundlage der Testung von Modellsubstanzen und der Erfassung der resultierenden zellulären Antworten müssten zudem Schwellen- bzw. Richtwerte für die Kategorisierung von Allergenen und Irritantien festgelegt werden, um das System prädiktiv nutzbar zu machen und die Kategorisierung von getesteten Substanzen nach GHS/CLP auf Grundlage der Ergebnisse aus dem System zu ermöglichen. Dabei wären die Nutzung eines Entscheidungsbaums, ähnlich wie bei integrierten Ansätzen mit mehreren Testsystemen denkbar. Wie in III.8 gezeigt ist auch die Erstellung einer *Heatmap*, in die die Veränderungen der einzelnen Endpunkte (Expression von CD86 und CD54, IL-8-Konzentration in Kokultur mit HaCaT, Prozentsatz stark proliferierender Zellen, CD3-Expression, ZytokinKonzentrationen in Kokultur mit Jurkat) gegenüber der unbehandelten Kontrolle in Form eines Farbcodes eingetragen werden, möglich.

Zudem sind methodische Modifikationen vorstellbar, die die Performance des Testsystems erhöhen können. Die Herstellung einer reinen AhR-Knockout-Population aus THP-1 könnte, sofern für diese eine ausreichende Viabilität erhalten bliebe, zur Verstärkung

Diskussion

der gemessenen Effekte beitragen. Interessant wäre auch, die PD-L1-Blockade erst nach der Stimulation mit Testsubstanzen, unmittelbar vor dem Einsatz der Monozyten in die Jurkat-Kokultur durchzuführen, um die Allergen-bedingte Erhöhung der Expression des PD-L1 zu tilgen. Diese Vorgehensweise wäre allerdings mit rein labortechnischen Hürden verbunden, da Tag 2 der HaCaT-Kokultur gleichzeitig Tag 0 der Jurkat-Kokultur ist und einige zeitintensive Arbeitsschritte beinhaltet, so dass ein weiterer Arbeitsschritt mit einstündiger Inkubationszeit für den Routine- und Screening-Einsatz wenig geeignet erscheint.

Weitere mögliche Modifikationen betreffen die eingesetzten Zelllinien. So ließen sich unmodifizierte HaCaT durch Luciferase-Reporter-HaCaT ersetzen, wie sie im IL-8 Luc eingesetzt werden, wodurch das Auslesen der KC-Aktivierung vereinfacht würde. Grundsätzlich wäre auch die Differenzierung von THP-1 zu moDC möglich. Dabei wäre zu prüfen, inwiefern sich die Differenzierbarkeit durch den AhR-Knockout verändert und ob die Differenzierung zur Aktivierbarkeit der Zellen durch Allergene beiträgt. Der Austausch von Jurkat durch die T-Zelllinie HH wäre ebenfalls möglich, wobei zu prüfen wäre, ob diese etwa CD4 stärker exprimiert als Jurkat (um sich als vorteilhaft gegenüber letzteren zu erweisen) und wie sich die fehlende IL-2R α -Expression in dieser Linie und die damit verbundene Unfähigkeit, IL-2 zu produzieren [185], auf ihre Stimulierbarkeit auswirkt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass es im Verlauf dieser Arbeit gelungen ist, den Grundstein für ein Zelllinien-basiertes Testsystem zu legen, das alle Schritte des AOP für Sensibilisierung durch Hautkontakt erfassen kann. Das System unterscheidet sich von bereits OECD-validierten Methoden insbesondere darin, dass es zusätzlich auch Ausleseparameter für das letzte, entscheidende, Schlüsselereignis im AOP – die Aktivierung von T-Zellen – bietet. Damit könnte dieses System nach Validierung als alleinstehendes Testsystem für die Risikobewertung zum Endpunkt Hautsensibilisierung in EU-Zulassungsverfahren für Chemikalien und Arzneimittel verwendet werden und die etablierten Tierversuche ersetzen.

V VERZEICHNISSE

V.1 Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ACD	<i>allergic contact dermatitis</i> – allergische Kontaktdermatitis
ADRA	<i>amino acid derivative reactivity assay</i>
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
ARE	<i>antioxidant response element</i> – Teil der Promoterregion von Genen antioxidativer Proteine
AOP	<i>adverse outcome pathway</i> – biologischer Pfad vom molekularen Initialereignis bis hin zu einem adversen Effekt
APC	<i>antigen-presenting cell</i> – antigenpräsentierende Zelle
BALB/c	<i>Bagg albino mice, substrain c</i> – Inzuchtstamm von Albinomäusen, deren erstes Elternpaar von Halsey J. Bagg im Memorial Hospital, New York, erworben wurde
C57BL/6	C57 black mouse substrain 6 – Inzuchtstamm von schwarzen Farbmäusen
CH223191	2-Methyl-N-[2-methyl-4-[(2-methylphenyl)diazenyl]phenyl]pyrazol-3-carboxamid – ein AhR-Antagonist
CCM	geneditierte, AhR-defiziente (CRISPR/Cas)-MUTZ-3
CCT	geneditierte, AhR-defiziente (CRISPR/Cas)-THP 1
CD	<i>cluster of differentiation</i> – spezifische Oberflächenproteine von Zellen
cDC	<i>conventional dendritic cell</i> – „konventionelle“ dendritische Zelle
CLCSA	<i>cell line coculture-based sensitisation assay</i>
CRISPR/Cas9	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9</i> – sich wiederholende kurze palindromische DNA-Abschnitte und Cas-Enzym
crRNA	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats ribonucleic acid</i> - RNA im CRISPR/Cas-Komplex
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein</i> , auch CD152 – immunmodulierender Rezeptor
C-Typ Lektin	Lektin, das zur Bindung Kalzium (Calcium) benötigt
DC	<i>dendritic cell</i> – dendritische Zelle
(D)MEM	<i>(Dulbecco's) modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

Verzeichnisse

DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
DNCB	2,4-Dinitrochlorbenzol
DNFB	D initro f luor b enzol – 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol
DPRA	<i>direct peptide reactivity assay</i>
ECHA	E uropäische C hemikalien- A gentur
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> – auf Antigen-Antikörper-Interaktion beruhende Nachweismethode für Proteine
EURL ECVAM	<i>European Union Reference Laboratories of the European Centre for Validation of Alternative Methods</i> – Referenzlabore der Europäischen Union für die Validierung von Alternativen zum Tierversuch
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> – Akronym für Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> – fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>forkhead box protein</i> P3, auch Scurfin – ein Transkriptionsfaktor
g	Fallbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$ in Mitteleuropa) im Zusammenhang mit Zentrifugationsgeschwindigkeiten, sonst: Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> – Wachstumsfaktor für Granulozyten und Makrophagen
GPMT	<i>guinea pig maximization test</i> – Sensibilisierungstest am Meerschweinchen
HaCaT	<i>human adult skin keratinocytes propagated under low Ca^{2+} conditions and elevated temperature</i> – humane Keratinozytenzelllinie, benannt nach den Erstkulturbedingungen; Erstbeschreibung in [10]
h-CLAT	<i>human cell line activation assay</i>
HLA-DR	H umanes L eukozytenantigen I sotyp DR – ein MHC-Protein (MHC-Klasse I durchnummeriert von A bis C, MHC-Klasse II mit D plus M bis R für den Genort)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPRT	H ypoxanthin- G uanin- P hosphoribosyltransferase
hTCPA	<i>human T cell priming assay</i>
IATA	<i>integrated approaches to testing and assessment</i> – toxikologische Stoffbewertung anhand der Ergebnisse mehrerer Methoden
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule</i> – Adhäsionsmolekül auf dendritischen Zellen für die Bindung an T-Zellen, auch CD54
IgG	I mmunoglobulin G
IL	I nterleukin – Zytokin, das die Kommunikation zwischen Leukozyten gewährleistet
ITAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i> – Interferon-induzierbares T-Zell α Chemokin, auch CXCL11 (<i>C-X-C motif chemokine ligand 11</i>), Zytokin, das die Chemotaxis in aktivierten T-Zellen induziert

ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> – CD3-ständige Strukturen, die bei der Aktivierung von T-Zellen von Tyrosin-Kinasen phosphoryliert werden
IU	<i>international unit</i> - Internationale Einheit (beruht auf der biologischen Aktivität einer Substanz)
KBM-7	Zelllinie aus der chronischen myeloischen Leukämie eines 39-jährigen Patienten mit beinahe haploidem Karyotyp; Erstbeschreibung in [186] (Herkunft der Abkürzung unklar)
KC	<i>keratinocyte</i> – Keratinozyt
(k)Da	(Kilo-) Dalton – Maßeinheit für molekulare Massen, benannt nach dem Chemiker John Dalton
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated protein</i> – ein Sensorprotein, das Kelch-Proteinen ähnelt, die ihren Namen wegen ihrer Proteinstruktur vom entsprechenden Trinkgefäß haben; ECH: <i>Erythroid-derived CNC Homology protein</i> – ein Protein aus dem Huhn, das ähnliche Funktionen hat wie Nrf2 (s.u.) und homologe Regionen mit dem CNC (<i>cap`n`collar</i>)-Gen aus <i>Drosophila melanogaster</i> aufweist, welches für die Morphogenese der Kopfregion bei der Embryogenese der Fliegen zuständig ist
Ki-67	Kiel-67 - (Antikörper gegen) Mitose-anzeigendes Protein
KoKu	Kokultur
l	Liter
LC	Langerhans- <i>cell</i> – Langerhans-Zelle
Lck	<i>lymphocyte-specific tyrosine kinase</i> – Tyrosinkinase, die in Lymphozyten exprimiert wird
LCSA	<i>loose-fit coculture-based sensitization assay</i>
LLNA	<i>murine local lymphnode assay</i> – Lymphknotentest an der Maus für die Bestimmung des sensibilisierenden Potentials von Xenobiotika
LPS	Lipopolysaccharid – ein Bestandteil der Bakterienzellmembran
Luc	Luciferase
M	molar, mol/l
MACS	<i>magnetic cell sorting</i> – magnetische Zellsortierung, Ende der 1980er Jahre von Stefan Miltenyi und Kollegen entwickelt [187] und heute von seiner Firma Miltenyi Biotech vertrieben
MBT	Mercaptobenzothiazol
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> – Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP-1β/-3α	<i>macrophage inflammatory protein 1beta/3alpha</i> , auch CCL4 (<i>chemotactic cytokine ligand 4</i>) bzw. CCL20
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

Verzeichnisse

moDC	monocyte-derived dendritic cell – aus Monozytenvorläufern <i>in vitro</i> oder <i>in vivo</i> generierte dendritische Zelle
MPO	Myeloperoxidase – ein Enzym neutrophiler Granulozyten, das an Entzündungsprozessen beteiligt ist
mRNA	messenger ribonucleic acid – Boten-RNA, enthält genetische Information für Proteinaufbau
MUTZ-3	akute myeloide Leukämie-Zelllinie, Erstbeschreibung in [1] (Herkunft des Akronyms unklar)
MW	Mittelwert
NF-AT	nuclear factor of activated T cells – Transkriptionsfaktor aktivierter T-Zellen
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – Transkriptionsfaktor, der ursprünglich in B-Zellen entdeckt wurde, aber in vielen Zelltypen exprimiert wird
NK	Nullkontrolle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2 – Transkriptionsfaktor
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development – Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PBMC	peripheral blood mononuclear cells – mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline – Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	programmed cell death-ligand1 – Ligand des PD-Rezeptors, der vom PDCDL1-Gen codiert wird
PE	Phycoerythrin
pmol	Pikomol
PPD	para-Phenylendiamin
QSAR	quantitative structure-activity relationship – quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung
ROS	reactive oxygen species – reaktive Sauerstoffverbindungen
ROUT	robust regression followed by outlier identification - Ausreißeridentifikationsmodell
RPMI-1640	Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde
RT	Raumtemperatur
sgRNA	single (auch: synthetic) guide ribonucleic acid – Ribonukleinsäure, die das Cas9-Protein an die zu schneidende Stelle des Gens leitet

siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> , auch <i>silencing</i> RNA – kleine eingreifende RNA, die an komplementäre RNA bindet und deren Funktion unterbindet (Interferenz)
SLS	<i>sodium lauryl sulfate</i> – Natriumlaurylsulfat
TCR	<i>T cell receptor</i> – T-Zell-Rezeptor
TE	TRIS + EDTA (Tris(hydroxymethyl)aminomethan + Ethylendiamintetraacetat)
TGF- β	<i>transforming growth factor</i> -beta – Wachstumsfaktor
THP-1	akute monozytäre Leukämie-Zelllinie; Erstbeschreibung in [11] (Herkunft der Abkürzung unklar)
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i> – Rezeptoren für die Erkennung von Antigenen auf dendritischen Zellen, die den Toll-Rezeptoren aus <i>Drosophila melanogaster</i> ähneln
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
tracrRNA	<i>trans-activating CRISPR ribonucleic acid</i> – transcodierte RNA im CRISPR/Cas-System
T-Zelle	immunkompetente Zelle, die im Thymus reift
U-937	Zelllinie aus einem generalisierten histiozytischen Lymphom, Erstbeschreibung in [188]
vgl.	vergleiche
ZAP70	<i>zeta-chain associated protein kinase</i> 70 kDa – Proteinkinase, die mit der ξ -Kette der CD3 Heterodimere assoziiert ist und deren Molekulargewicht 70 kDa beträgt

V.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Zelltypen. Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.	59
Tabelle 2. Verwendete Chemikalien und Medien mit Bezugsquelle und Erläuterungen.	60
Tabelle 3. Software, die zur Auswertung der erhobenen Daten verwendet wurde.	61
Tabelle 4. Für die Differenzierung von MUTZ-3 zu MUTZ-LC verwendete rekombinante humane Zytokine mit Herstellerangaben.	66
Tabelle 5. Für PD-L1-Blockade-Versuche eingesetzte Antikörper und Kontrolle mit Herstellerinformationen.	67
Tabelle 6. Für durchflusszytometrische Arbeiten verwendete Puffer, Chemikalien und Laborutensilien (Verbrauchsmittel), deren Hersteller und weitere Angaben.	68
Tabelle 7. Übersicht über durchflusszytometrisch bestimmte Oberflächenantigene mit den verwendeten gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen sowie deren Hersteller, die entsprechenden Isotyp-Kontrollen und das für eine Probe eingesetzte Volumen. Wirtsspezies aller rekombinanten Antikörper war die Maus.	70
Tabelle 8. Übersicht über durchflusszytometrisch bestimmte intrazelluläre Antigene mit den verwendeten gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen sowie deren Hersteller, die entsprechenden Isotyp-Kontrollen und das für eine Probe eingesetzte Volumen. Wirtsspezies: Maus (AhR) oder Ratte (Ki-67).	71
Tabelle 9. Für die Durchführung von molekularbiologischen Arbeiten verwendete Puffer, Chemikalien und Laborutensilien (Verbrauchsmittel), deren Hersteller und weitere Angaben.	78
Tabelle 10. Sequenzen der für den CRISPR/Ca9-vermittelten AhR-Knockout verwendeten <i>single guide</i> (sg)RNAs.	79
Tabelle 11. Puffer, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien, die für den <i>Cleavage Detection Assay</i> (Artikelnr. A24372) verwendet wurden. Die Reagenzien und Puffer waren zum Großteil im Assay-Kit des Herstellers (Thermo Fisher) enthalten, Primer und RNase-freies Wasser wurden ebenfalls von Thermo Fischer bezogen.	80
Tabelle 12. Für die Durchführung von ELISAs verwendete Puffer, Chemikalien und Laborutensilien (Verbrauchsmittel), deren Hersteller und weitere Angaben.	85
Tabelle 13. Konzentrationen und Lösungsmittel der in Kokultur A eingesetzten Testsubstanzen.	89
Tabelle 14. Sensibilisierungskategorien nach [80].	90

Tabelle 15. Konzentrationen und Lösungsmittel der in Kokultur B eingesetzten Testsubstanzen. Für Herstellerangabe und CAS Nummern siehe Tabelle 13	91
Tabelle 16. Legende zu Abbildung 36	121
Tabelle 17. Mediane Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von THP-1 und CCT mit und ohne Behandlung mit 100 µmol/l DBP und anschließender magnetischer Depletion (MACS) apoptotischer Zellen.	129
Tabelle 18. Verwendete Laborverbrauchsmittel (Plastikware) mit Hersteller und Artikelnummer. ..	vi
Tabelle 19. Verwendete Geräte mit Modell und Hersteller.	vii

V.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung des AOP für Hautsensibilisierung nach [5]. Ausgehend von der kovalenten Bindung eines Fremdstoffs an Hautproteine über die drei zellulären Schlüsselereignisse „Aktivierung von Keratinozyten“, „Aktivierung dendritischer Zellen“ und „Aktivierung von T-Zellen“ bis hin zum Endpunkt Hautsensibilisierung.	25
Abbildung 2. Vereinfachte schematische Darstellung der immunologischen Synapse zwischen aktivierter dendritischer Zelle und naiver T-Zelle mit kostimulatorischen Signalen. Für die Aktivierung von T-Zellen werden sowohl die Bindung des MHC-Antigen-Komplexes an einen entsprechenden T-Zell-Rezeptor (TCR)-CD3-Komplex (Signal 1) als auch die Bindung weiterer Oberflächenmarker und Adhäsionsmoleküle (Signal 2) und die beidseitige Stimulation durch Zytokine (Signal 3) benötigt (Kostimulation); LFA-1: <i>lymphocyte function associated antigen-1</i> , PD: <i>programmed cell death</i> , PD-L1: PD-Ligand, MHC: <i>major histocompatibility complex</i> , CD: <i>cluster of differentiation</i> . Modifiziert nach [36,37].	32
Abbildung 3. A: Primäre humane Keratinozyten (große, längliche Zellen als einschichtiger Zellrasen im Hintergrund) in Kokultur mit PBMC (runde Zellen im Vordergrund). B: HaCaT-Zellrasen in Monokultur. Eigene lichtmikroskopische Aufnahmen.	46
Abbildung 4. Zellen der Linie MUTZ-3 nach siebentägiger Differenzierung mit Zytokinen. Die Zellen verlieren ihre runde Form und bilden Dendriten aus. Eigene lichtmikroskopische Aufnahme.	47
Abbildung 5. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien MUTZ-3 (A) und THP-1 (B) mit etwa gleicher Vergrößerung (eigene Aufnahme).	48
Abbildung 6. <i>Gating</i> mittels WinList 7.0 für Antigene, die stark exprimiert wurden (A) sowie Antigene, die schwach exprimiert wurden (B) am Beispiel einer durchflusszytometrischen Messung der Expression von CD54 (A) und AhR (B) in MUTZ-3.	74
Abbildung 7. <i>Gating</i> -Strategie für die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung der Proliferation von Jurkat-Zellen. A: Ausschluss von Zelltrümmern. B: <i>Gating</i> auf CD3-positive Zellen C: Ausschluss CD3-negativer und schwach positiver Zellen. D: Darstellung CD3- und Ki-67-positiver Zellen als Dichteplot. E: Histogramm für die Verteilung Ki-67-positiver Zellen in	

einer Jurkat-Solokultur, der Anteil stark proliferierender Zellen ist orange eingefärbt. F: Histogramm für die Verteilung Ki-67-positiver Zellen in einer Jurkat-Kultur nach Stimulation mit Beads, der Anteil stark proliferierender Zellen ist orange eingefärbt. (Punkte in A-C sind für die Darstellung verstärkt.)	76
Abbildung 8. Anteil lebender Zellen in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis fünf unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen und Standardabweichungen.	97
Abbildung 9. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von Langerin (A) und HLA-DR (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen ± Standardabweichung.	98
Abbildung 10. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von CD1a (A) und CD1c (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen ± Standardabweichung.	99
Abbildung 11. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen ± Standardabweichung.	100
Abbildung 12. Veränderung des Anteils CD14-positiver Zellen und dessen Expression auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achse) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achse) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen ± Standardabweichung.	100
Abbildung 13. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von PD-L1 (A) und AhR (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen (linke y-Achsen) und die relative Expression des Markers bezogen auf Tag 0 der Kultur (rechte y-Achsen) als Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen ± Standardabweichung.	101
Abbildung 14. A: Auf die unblockierte Kontrolle (Nullkontrolle – NK) normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in MUTZ-LC-Kulturen nach sieben Tagen Differenzierung (% NK) sowie nach fünf Tagen Differenzierung für den Einsatz in Kokultur A (% NK Tag 5, heller Balken) nach Behandlung mit dem Biozol Anti-PD-L1-Antikörper. B: Auf die unblockierte Kontrolle normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen nach fünf Tagen Differenzierung und nach Blockade mit dem Thermo Fisher Antikörper. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus zwei bis vier durchflusszytometrischen Messungen (eine Messung für Thermo Fisher 0,5 µg/ml).	103

- Abbildung 15.** Durchflusszytometrisch bestimmte relative Expression der Marker CD86 und CD54 auf PD-L1-blockierten MUTZ-LC in Kokultur A bezogen auf nicht-blockierte MUTZ-LC. Gezeigt sind Mittelwerte und Spannbreiten aus fünf unabhängigen Experimenten.....104
- Abbildung 16.** Veränderung der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des extremen Allergens DNCB. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.105
- Abbildung 17.** Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von DNCB. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen mit Standardabweichungen.106
- Abbildung 18.** Veränderung der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des starken Allergens TNBS. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus zwei bis fünf unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.106
- Abbildung 19.** Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von TNBS. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.....107
- Abbildung 20.** Veränderung der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des moderaten Allergens MBT. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung.107
- Abbildung 21.** Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von MBT. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen mit Standardabweichungen.108
- Abbildung 22.** Veränderung der Expression von CD86 auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen der irritierenden Substanz SLS. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung. Rechts oben: Vergrößerter Ausschnitt der Grafik für Konzentrationen zwischen 0 und 50 $\mu\text{mol/l}$108

Abbildung 23. Veränderung der Expression von CD54 auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen der irritierenden Substanz SLS. Dargestellt ist die relative Expression des Markers bezogen auf die nicht PD-L1-blockierte unbehandelte Kontrolle (rot) als Mittelwerte aus drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung. 109

Abbildung 24. Anteil lebender MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von SLS. Dargestellt sind absolute Prozentzahlen als Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen \pm Standardabweichung. Rechts oben: Vergrößerter Ausschnitt der Grafik für Konzentrationen zwischen 0 und 50 $\mu\text{mol/l}$ 109

Abbildung 25. Oben: Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in MUTZ-LC-Populationen nach der Behandlung mit dem extremen Allergen DNCB in Kokultur mit HaCaT. **Unten:** Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) bezogene relative PD-L1-Expression auf MUTZ-LC nach der Behandlung mit DNCB in Kokultur mit HaCaT. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer bis drei Messungen ohne (A) und mit PD-L1-Blockade mit dem Biozol-Antikörper oder dem Thermo Fisher-Antikörper (B). 111

Abbildung 26. Oben: Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) normalisierte Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen in MUTZ-LC-Populationen nach der Behandlung mit dem starken Allergen TNBS in Kokultur mit HaCaT. **Unten:** Auf die jeweilige Nullkontrolle (**A:** ohne PD-L1-Blockade; **B:** mit PD-L1-Blockade) bezogene relative PD-L1-Expression auf MUTZ-LC nach der Behandlung mit TNBS in Kokultur mit HaCaT. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer bis drei Messungen ohne (A) und mit PD-L1-Blockade mit dem Biozol-Antikörper (B). 113

Abbildung 27. Schematische Darstellung der verschiedenen Ansätze, die zum Knockout des AhR in MUTZ-3 (CCM – CRISPR/Cas-editierte MUTZ-3) verfolgt wurden, mit Angabe der jeweils erfolgten Veränderung. In Ansatz II wurde nur die HPRT-Kontrolle verwendet, Ansatz III erbrachte keine Verbesserung der Methode (nicht gezeigt)..... 114

Abbildung 28. Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von MUTZ-3, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Werte aus einer bis drei Messungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung für uneditierte Zellen (Kontrolle), nach Einsatz der *single guide* RNAs (sgRNA) A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT) für die Versuche I-VII (CCM I bis VII). Zur Verdeutlichung des Gesamtergebnisses wurden die Werte über alle Ansätze gemittelt und sind als rosa Balken dargestellt (Mittel). Gestrichelte Linie (MW Kontrolle): Mittelwert aller Kontrollansätze ohne Knockout, CCM: CRISPR/Cas-editierte MUTZ-3..... 115

Abbildung 29. Durchflusszytometrisch bestimmte relative AhR-Expression bezogen auf unbehandelte Kontrollen in Populationen von MUTZ-3, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Einzelwerte aus mehreren Messungen nach Einsatz der sgRNAs A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT) für die Versuche

- I-VII (CCM I bis VII). Zur Verdeutlichung des Gesamtergebnisses wurden die Werte über alle Ansätze gemittelt und sind als rote Punkte dargestellt (Mittel).116
- Abbildung 30.** Prozentualer Anteil lebender Zellen nach AhR-Knockout in MUTZ-3 mit *guide*RNAs A bis D oder HPRT-Knockout. Gezeigt sind Einzelwerte aus den Ansätzen I bis VII (CCM I-VII) und der Mittelwert über alle Ansätze (rosa). Gestrichelte rosa Linie (MW Kontrolle): Mittelwert des Prozentsatzes lebender Kontrollzellen. ns: nicht signifikant.116
- Abbildung 31.** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von THP-1, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Werte aus drei bis fünf Messungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung für uneditierte Zellen (Kontrolle), nach Einsatz der sgRNAs A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT). gestrichelte rosa Linie (MW Kontrolle): Mittelwert aller Kontrollansätze ohne Knockout.117
- Abbildung 32.** Durchflusszytometrisch bestimmte relative AhR-Expression bezogen auf unbehandelte Kontrollen in Populationen von THP-1, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden. Gezeigt sind Einzelwerte aus mehreren Messungen nach Einsatz der sgRNAs A bis D (A, B, C, D) sowie der HPRT-Kontrolle (HPRT) sowie Mittelwerte als rote Kreise (Mittel).118
- Abbildung 33.** Prozentualer Anteil lebender Zellen nach AhR-Knockout in THP-1 mit *guide*RNAs A bis D oder HPRT-Knockout. Gezeigt sind Einzelwerte aus zwei bis drei Messungen und der Mittelwert (rosa). Gestrichelte rosa Linie (MW Kontrolle): Mittelwert des Prozentsatzes lebender Kontrollzellen.118
- Abbildung 34.** Prozentsatz lebender MUTZ-3 in HPRT-Knockout-Kontrollen nach der Behandlung mit 10 μ g/ml 6-TG über fünf Tage im Vergleich zu nicht editierten Kontrollen aus den Ansätzen I bis VII. Dargestellt sind Mittelwerte aus einer bis zwei Messungen für HPRT-k.o.-Zellen und Spannbreiten mit Mittelwert über alle Kontrollwerte.119
- Abbildung 35.** Prozentsatz lebender THP-1 in HPRT-Knockout-Kontrollen (violett) nach der Behandlung mit 10 μ g/ml 6-TG über fünf Tage im Vergleich zu nicht editierten Kontrollen (blau) aus den Ansätzen I und II. Dargestellt sind Spannbreiten und Mittelwerte über beide Ansätze mit je drei Messungen.120
- Abbildung 36.** Verifikation der PCR-Produkte aus dem *Genomic Cleavage Detection Kit* mittels Gelelektrophorese. Gel **A**: geditierte THP-1, Gel **B**: geditierte MUTZ-3, erste PCR, Gel **C**: geditierte MUTZ-3, zweite PCR; Legende siehe **Tabelle 16**.121
- Abbildung 37.** Gelelektrophorese des Enzymverdaus gespaltenen DNA in Proben von MUTZ-3 (CCM) und THP-1 (CCT) nach CRISPR/Cas9-vermittelter Geneditierung. Rot umrandet: zur Ermittlung der Editierungseffizienz ausgewertete Banden. Grün umrandet: Artefaktbande, die in allen Proben zu sehen war, die in der PCR mit dem HPRT-Primerpaar inkubiert wurden.122
- Abbildung 38.** Profile ausgewerteter Spuren aus der Gelelektrophorese nach Enzymverdau zur Ermittlung der Editierungseffizienz im CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout des AhR als Überlagerung des Originalprofils mit den Durchschnittswerten für die optische Dichte der Banden. A: PCR-Kontrolle, B: CCT A, C: CCM A. Prozentzahlen geben die Höhe der Peaks im

Verhältnis zum Mutterpeak an, graue Zonen kennzeichnen manuell ausgeschlossene Peaks (Verunreinigungen und Fotoartefakte)..... 123

Abbildung 39. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz AhR-positiver Zellen in mit sgRNA B (AhR B) und sgRNA D (AhR D) geneditierten Populationen von MUTZ-3 aus Ansatz V nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen DBP. Gezeigt sind Mittelwerte und Spannweiten aus einer bis zwei Messungen..... 124

Abbildung 40. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz AhR-positiver Zellen in mit sgRNA B (AhRB) und sgRNA D (AhR D) geneditierten Populationen sowie in nicht-editierten Zellen (Kontrolle) und HPRT-Kontrollen (HPRT) von MUTZ-3 aus Ansatz VII nach Behandlung mit 50 µmol/l DBP. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei bis drei Messungen. 125

Abbildung 41. Relative mediane AhR-Expression in mit sgRNA B und D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geneditierten Populationen von MUTZ-3 aus den Ansätzen V und VII nach Behandlung mit 50 µmol/l DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen. Gezeigt Einzelwerte aus zwei bis drei Messungen. 126

Abbildung 42. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz AhR-positiver Zellen in mit sgRNA A bis D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geneditierten Populationen von THP-1 nach Behandlung mit 50 µmol/l DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen (NK). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei bis drei Messungen. 127

Abbildung 43. Relative mediane AhR-Expression in mit sgRNA A bis D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geneditierten Populationen von THP-1 nach Behandlung mit 50 µmol/l DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen. Gezeigt sind Einzel- und Mittelwerte (Mittel) und aus zwei bis drei Messungen. 127

Abbildung 44. Differenz im Prozentsatz AhR-positiver Zellen nach Behandlung mit 100 µmol/l DBP in Populationen nicht editierter Kontrollen (NK100), geneditierter THP-1 (CCT100) und nach magnetischer Depletion apoptotischer Zellen (NKM100 bzw. CCTM100) und zum Vergleich in nicht behandelten, geneditierten Zellen (CCT0). Gezeigt sind Spannweiten und Mittelwerte aus drei bis sechs Messungen. 128

Abbildung 45. Relative mediane AhR-Expression in geneditierten Populationen (CCT100) von THP-1 und in nicht-editierten Kontrollen (NK100) nach Behandlung mit 100 µmol/l DBP und nach magnetischer Depletion apoptotischer Zellen (NKM100 bzw. CCTM100) sowie in Zellen, die in der MACS-Säule zurückblieben (NKS bzw. CCTS) bezogen auf uneditierte, unbehandelte Kontrollen. Gezeigt sind Einzel- und Mittelwerte (Mittel) und aus drei bis sechs Messungen. 129

Abbildung 46. Grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse eines repräsentativen Experiments zum Selektionsprotokoll für AhR-negative Zellen mittels 100 µmol/l DBP und magnetischer Depletion AhR-positiver, apoptotischer Zellen (MACS) im Vergleich von nicht geneditierten Kontrollzellen (A) mit einer AhR-Knockout-Population (B). SSC: *side scatter*, FSC: *forward scatter*, FL-3: Fluoreszenzkanal 3, in dem nur die Eigenfluoreszenz der Zellen zu sehen ist, AhR: anti-AhR-PE (FL-2)..... 130

- Abbildung 47.** Prozentsätze PD-L1-positiver Zellen (dunkelblaue Balken, linke y-Achsen) in THP-1- (A) und CCT- (B) Populationen, die in Kokultur mit HaCaT eingesetzt wurden, nach Behandlung mit 1 µg/ml anti-PD-L1 (Thermo Fisher) und MFI PD-L1-positiver Zellen in diesen Populationen (hellblaue Balken, rechte y-Achsen). Gezeigt sind Einzelwerte aus drei bis vier unabhängigen Versuchen (graue Symbole) sowie Spannbreiten und Mediane. Rote Symbole zeigen Messwerte von mitgeführten Isotyp-Kontrollen; einseitige P-Werte für % PD-L1-positive Zellen.....132
- Abbildung 48.** Durchflusszytometrisch bestimmte Viabilität von THP-1 mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) Blockade des PD-L1 nach zweitägiger Inkubation in Kokultur mit HaCaT mit steigenden Konzentrationen des extremen Allergens DNCB (A), des moderaten Allergens MBT (B) und des Irritanz SLS (C). Für den weiteren Einsatz in Kokultur B wurden Substanzkonzentrationen ausgewählt, die nur leicht zytotoxisch waren. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem bis drei Experimenten.134
- Abbildung 49.** Durchflusszytometrisch bestimmte relative Expression der Marker CD86 (A) und CD54 (B) auf PD-L1-blockierten (THP+) und/oder AhR-defizienten THP-1 (CCT+/ CCT) bezogen auf THP-1 ohne PD-L1-Blockade. Gezeigt sind Mittelwerte und Spannbreiten aus drei unabhängigen Experimenten.....136
- Abbildung 50.** Regulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 und des Adhäsionsmoleküls CD54 auf THP-1, PD-L1-blockierten THP-1 (THP+), geneditierten Zellen (CCT) und geneditierten und PD-L1-blockierten Zellen (CCT+) bezogen auf unbehandelte THP-1-Kontrollen unter Berücksichtigung des Blockade- und/oder Knockout-Effekts (Nullkontrolleneffekt) und die Reduktion der Viabilität der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen desselben Typs nach Behandlung mit den Testsubstanzen DNCB, MBT und SLS. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.137
- Abbildung 51. Oben:** Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von THP-1 (A) und CCT (B) vor (Tag 0) und nach (Tag 2) Kokultur mit HaCaT. **Unten:** AhR-Expression als mediane FI auf AhR-positiven Zellen in Populationen von THP-1 (A) und CCT (B) vor (Tag 0) und nach (Tag 2) Kokultur mit HaCaT. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für Prozentsätze und Mittelwerte und Spannbreiten für medianFI-Werte aus fünf unabhängigen Experimenten.139
- Abbildung 52.** Mittels ELISA bestimmte Konzentrationen von IL-8 in Überständen der Kokultur mit HaCaT nach Zelltyp und Behandlung. THP: THP-1 (hellblau gemustert), THP+: THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau gemustert), CCT: AhR-k.o. THP-1 (hellblau), CCT+: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau), NK: Nullkontrolle, SLS150: 150 µmol/l SLS (rote Rahmen), MBT: 200 µmol/l MBT (hellgrüne Rahmen), DNCB: 10 µmol/l DNCB (dunkelgrüne Rahmen). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.140
- Abbildung 53.** Veränderung des prozentualen Anteils stark proliferierender CD3-positiver Zellen nach Kokultur mit THP-1 (hellblau umrandete Quadrate), THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau umrandete Quadrate), CCT (hellblaue Quadrate) oder CCT mit PD-L1-Blockade (dunkelblaue Quadrate) aus der Kokultur mit HaCaT bezogen auf Jurkat in Solokultur (Jurkat). Als Positivkontrolle dienten Jurkat in Solokultur, die mit Anti-CD3/CD28-Beads behandelt worden waren (Jurkat + Beads). Gezeigt sind Einzelwerte, Mediane und Spannbreiten aus drei

bis sechs unabhängigen Experimenten. Nicht signifikante Veränderungen sind nicht markiert.
 142

Abbildung 54. Veränderung des prozentualen Anteils stark proliferierender CD3-positiver Zellen nach Kokultur mit THP-1, THP-1 mit PD-L1-Blockade, CCT oder CCT mit PD-L1-Blockade aus der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit 150 µmol/l SLS (SLS150, rote Dreiecke), 200 µmol/l MBT (MBT200, hellgrüne Rauten) oder 10 µmol/l DNCB (DNCB10, dunkelgrüne Kreise) bezogen auf Kulturen mit nicht Testsubstanz-behandelten Zellen (Kontrolle). Gezeigt sind Einzelwerte, Mediane und Spannbreiten aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten. Nicht-signifikante Veränderungen sind nicht markiert. CCT: AhR-k.o.-Population 143

Abbildung 55. Relative CD3-Expression auf stark proliferierenden Jurkat nach Inkubation mit Beads (Jurkat + Beads) oder THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade aus der Kokultur mit HaCaT ohne Testsubstanz-Behandlung bezogen auf Jurkat in Solokultur 145

Abbildung 56. Relative CD3-Expression auf Jurkat aus Kokultur C nach Inkubation mit THP-1 und CCT mit und ohne PD-L1-Blockade und Testsubstanz-Behandlung mit 150 µmol/l SLS (SLS150), 200 µmol/l MBT (MBT200) oder 10 µmol/l DNCB (DNCB10) bezogen auf Kokulturen mit der entsprechenden unbehandelten Kontrolle (Kontrolle). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten. Nicht-signifikante Werte sind nicht markiert. 146

Abbildung 57. Zytokinkonzentrationen im Medium der Kokultur aus Jurkat und unterschiedlich behandelten CCT bzw. CCT mit PD-L1-Blockade (CCT+) an Tag 3 und Tag 5 der Kultur sowie von Jurkat allein und Jurkat mit CD3/CD28-Microbeads (Jurkat + Beads) als Mittelwerte einer Doppelbestimmung aus einem Experiment 148

Abbildung 58. Relative Konzentrationen der Zytokine MIP-3α (A), MIP-1β (B), TNF-α (C) und IL-8 (D) in Kokulturen aus Jurkat und THP-1, THP-1 mit PD-L1-Blockade, (AhR-defizienten) CCT und CCT mit PD-L1-Blockade nach fünf Tagen ohne Allergenbehandlung bezogen auf Jurkat in Solokultur. Als Positivkontrolle dienten Jurkat, die mit Anti-CD3/CD28-Beads inkubiert worden waren (Jurkat + Beads). Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannbreiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus zwei bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert; die statistische Auswertung erfolgte abweichend von II.10 auch für Werte aus zwei Messungen. 150

Abbildung 59. Relative MIP-3α-Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Testsubstanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 µmol/l, MBT200: MBT200 µmol/l, DNCB10: DNCB 10 µmol/l in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannbreiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus einer bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.
 151

- Abbildung 60.** MIP-1 β -Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Testsubstanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 $\mu\text{mol/l}$, MBT200: MBT200 $\mu\text{mol/l}$, DNCB10: DNCB 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannbreiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus einer bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.152
- Abbildung 61.** Relative TNF- α -Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Testsubstanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 $\mu\text{mol/l}$, MBT200: MBT200 $\mu\text{mol/l}$, DNCB10: DNCB 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannbreiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus einer bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.153
- Abbildung 62.** Relative IL-8-Konzentrationen in Ansätzen der Kokultur aus Jurkat und Testsubstanz-stimulierten monozytären Zellen bezogen auf die Konzentration in Kokulturen mit den entsprechenden unbehandelten Kontrollen (Kontrolle). CCT: AhR-k.o. THP-1, CCT + anti-PD-L1: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade, SLS150: SLS 150 $\mu\text{mol/l}$, MBT200: MBT200 $\mu\text{mol/l}$, DNCB10: DNCB 10 $\mu\text{mol/l}$ in Kokultur mit HaCaT. Die angegebenen relativen Werte wurden für das in die Kokultur mit Jurkat eingesetzte Volumen des Monozyten-enthaltenen Mediums korrigiert. Gezeigt sind Einzelwerte mit Spannbreiten, Medianen und Mittelwerten (+) aus zwei bis drei Messungen. Nicht signifikante Werte sind nicht markiert.154
- Abbildung 63.** Histogramme einer durchflusszytometrischen Viabilitätsbestimmung von THP-1 in Kokultur mit HaCaT (oben) und in Solokultur (unten) ohne Behandlung (Nullkontrolle) und nach Behandlung mit verschiedenen Testsubstanzen in moderat (SLS), nicht (MBT) oder leicht (DNCB) zytotoxischen Konzentrationen. In Solokultur reagieren THP-1 mit deutlich verstärktem Viabilitätsverlust.....158
- Abbildung 64.** Schematische Darstellung der sequenziellen experimentellen Entwicklung des Protokolls für die erste Stufe des CLCSA. Es wurden zunächst HaCaT-Keratinocyten in 12-Well-Platten ausgesät. Nach Erreichen der Adhärenz wurden THP-1 oder AhR-Knockout Populationen (CCT) nach dem Selektionsprotokoll mit magnetischer Depletion apoptotischer Zellen (Annexin V MACS) und mit oder ohne Präinkubation mit anti-PD-L1 zu den HaCaT gegeben und die Kokultur mit Testsubstanzen über 48 Stunden inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden Aktivierungsmarker auf monozytären Zellen durchflusszytometrisch gemessen, Überstände der Kultur für Zytokinbestimmungen abgenommen und die zweite Stufe des CLCSA eingeleitet.159
- Abbildung 65.** Schematische Darstellung der experimentellen Entwicklung des Protokolls für die zweite Stufe des CLCSA. Testsubstanz-aktivierte THP-1 oder geneditierte THP-1 (CCT) mit und

ohne PD-L1-Blockade aus Stufe 1 des Protokolls wurden mit Jurkat-T-Zellen kokultiviert und die Aktivierung der T-Zellen als Schlüsselereignis 3 des AOP nach fünf Tagen Inkubation über die durchflusszytometrische Messung der Expression von CD3 und Ki-67 sowie mittels Zytokinbestimmung im Medium der Kultur nachgewiesen..... 160

Abbildung 66. Histogramme als Ergebnis einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung der Ki-67-Expression in CD3-positiven Zellen (Jurkat) mit Markierung des Anteils stark proliferierender Zellen (orange) nach Kokultur mit unbehandelten (A), SLS-behandelten (B), MBT-behandelten (C) und DNCB-behandelten (D) PD-L1-blockierten und AhR-defizienten THP-1. 161

Abbildung 67. *Heatmap* der Ergebnisse des CLCSA mit unterschiedlich modifizierten monozytären Zellen. CCT: AhR-Knockout. Zu erkennen ist die Verstärkung der messbaren T-Zell-Antwort mit PD-L1-blockierten THP-1 (Verschiebung des Farbmusters in Richtung Rot mit steigender allergener Potenz der Testsubstanz) und AhR-Knockout-THP-1 mit PD-L1-Blockade (Verschiebung Richtung Grün mit steigender allergener Potenz der Testsubstanz). [--/++]: Veränderung statistisch signifikant oder größer als 20 %, [-/+]: 20 % > Veränderung ≥ 5 % oder nicht statistisch signifikant, 0: Veränderung kleiner als 5 %; KoKu: Kokultur, B mit HaCaT (Stufe 1), C mit Jurkat (Stufe 2) 162

Abbildung 68. Profile ausgewerteter Spuren aus der Gelelektrophorese nach Enzymverdau zu Ermittlung der Editierungseffizienz im CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout des AhR als Überlagerung des Originalprofils mit den Durchschnittswerten für die optische Dichte der Banden. Prozentzahlen geben die Höhe der Peaks im Verhältnis zum Mutterpeak an, graue Zonen kennzeichnen manuell ausgeschlossene Peaks (Verunreinigungen und Fotoartefakte). Legende siehe Tabelle; CCM: geneditierte MUTZ-3, CCT: geneditierte THP-1, Kntr: Kontrolle, Leiter: Größenstandard, NK: Nullkontrolle, Pr.: Primer. iii

Abbildung 69. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz viabler Zellen in mit sgRNA A bis D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geneditierten Populationen von MUTZ-3, Ansatz V (A) und THP-1 (B) nach Behandlung mit bis zu 50 µmol/l DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen (Kontrolle, NK). Gezeigt sind Einzelwerte aus zwei Messungen. iv

Abbildung 70. Mittels ELISA bestimmte Prozentsätze von IL-8 aus der Kokultur mit HaCaT (Kokultur B) in Überständen der Kokultur mit Jurkat (Kokultur C) nach Zelltyp und Behandlung. THP: THP-1 (hellblau gemustert), THP+: THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau gemustert), CCT: AhR-k.o. THP-1 (hellblau), CCT+: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau), NK: Nullkontrolle, SLS150: 150 µmol/l SLS (rote Rahmen), MBT: 200 µmol/l MBT (hellgrüne Rahmen), DNCB: 10 µmol/l DNCB (dunkelgrüne Rahmen). Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. v

LITERATURVERZEICHNIS

[1] Russell WMS. The Development of the Three Rs Concept. *Altern Lab Anim* 1995; 23: 298–304. doi:10.1177/026119299502300306

[2] van Vliet E. State-of-the-art and new options to assess T cell activation by skin sensitizers: Cosmetics Europe Workshop. *ALTEX* 2018; 179–192. doi:10.14573/altex.1709011

[3] OECD. Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways. 2. Aufl. Paris: OECD; 2017

[4] Kleinstreuer NC, Hoffmann S, Alépée N, et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches. *Crit Rev Toxicol* 2018; 48: 359–374. doi:10.1080/10408444.2018.1429386

[5] OECD. AOP:40 Covalent Protein Binding Leading to Skin Sensitisation. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2012. Im Internet: <https://aopwiki.org/aops/40>

[6] Fitzpatrick JM, Roberts DW, Patlewicz G. What determines skin sensitization potency: Myths, maybes and realities. The 500 molecular weight cut-off: An updated analysis: Is there a MW threshold of 500 for skin sensitization? *J Appl Toxicol* 2017; 37: 105–116. doi:10.1002/jat.3348

[7] Fitzpatrick JM, Roberts DW, Patlewicz G. Is skin penetration a determining factor in skin sensitization potential and potency? Refuting the notion of a LogKow threshold for skin sensitization: Is there a LogKow threshold for skin sensitization? *J Appl Toxicol* 2017; 37: 117–127. doi:10.1002/jat.3354

[8] Esser PR, Martin SF. Pathomechanisms of Contact Sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017; 17: 83. doi:10.1007/s11882-017-0752-8

[9] Yang G, Seok JK, Kang HC, et al. Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2020; 21. doi:10.3390/ijms21082867

[10] Chipinda I, Hettick JM, Siegel PD. Haptenation: Chemical Reactivity and Protein Binding. *J Allergy* 2011; 2011: 1–11. doi:10.1155/2011/839682

[11] Gober MD, Gaspari AA. Allergic Contact Dermatitis. In: Nickoloff BJ, Nestle FO, Hrsg. *Dermatologic Immunity*. Basel: Krager; 2008: 1–26

[12] Brites GS, Ferreira I, Sebastião AI, et al. Allergic contact dermatitis: From pathophysiology to development of new preventive strategies. *Pharmacol Res* 2020; 105282. doi:10.1016/j.phrs.2020.105282

[13] Karlberg A-T, Börje A, Duus Johansen J, et al. Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis* 2013; 69: 323–334. doi:10.1111/cod.12127

[14] Aeby P, Sieber T, Beck H, et al. Skin Sensitization to p-Phenylenediamine: The Diverging Roles of Oxidation and N-Acetylation for Dendritic Cell Activation and the Immune Response. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 99–109. doi:10.1038/jid.2008.209

[15] Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 565–580. doi:10.1038/nrm3175

[16] Brites GS, Ferreira I, Sebastião AI, et al. Allergic contact dermatitis: From pathophysiology to development of new preventive strategies. *Pharmacol Res* 2020; 105282. doi:10.1016/j.phrs.2020.105282

[17] Emter R, Ellis G, Natsch A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 245: 281–290. doi:10.1016/j.taap.2010.03.009

[18] Ahmad S, Azid NA, Boer JC, et al. The Key Role of TNF-TNFR2 Interactions in the Modulation of Allergic Inflammation: A Review. *Front Immunol* 2018; 9: 2572. doi:10.3389/fimmu.2018.02572

[19] Esser PR, Wölfle U, Dürr C, et al. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PloS One* 2012; 7: e41340. doi:10.1371/journal.pone.0041340

[20] Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, et al. Activation of the IL-1 β -Processing Inflammasome Is Involved in Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1956–1963. doi:10.1038/sj.jid.5700819

[21] Sebastião AI, Ferreira I, Brites G, et al. NLRP3 Inflammasome and Allergic Contact Dermatitis: A Connection to Demystify. *Pharmaceutics* 2020; 12.

doi:10.3390/pharmaceutics12090867

[22] McFadden JP, Basketter DA. Contact allergy, irritancy and „danger“. *Contact Dermatitis* 2000; 42: 123–127

[23] Bonneville M, Chavagnac C, Vocanson M, et al. Skin Contact Irritation Conditions the Development and Severity of Allergic Contact Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1430–1435. doi:10.1038/sj.jid.5700726

[24] Martin SF. Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology: Contact dermatitis - an update. *Exp Dermatol* 2012; 21: 382–389. doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01471.x

[25] Lass C, Merfort I, Martin SF. In vitro and in vivo analysis of pro- and anti-inflammatory effects of weak and strong contact allergens: Inflammatory potential of contact allergens. *Exp Dermatol* 2010; 19: 1007–1013. doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01136.x

[26] Basketter DA, Kan-King-Yu D, Dierkes P, et al. Does Irritation Potency Contribute to the Skin Sensitization Potency of Contact Allergens? *Cutan Ocul Toxicol* 2007; 26: 279–286. doi:10.1080/15569520701555359

[27] Vocanson M, Hennino A, Rozières A, et al. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis: Pathophysiology of contact dermatitis. *Allergy* 2009; 64: 1699–1714. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x

[28] Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, et al. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* 2009; 60: 2–20. doi:10.1111/j.1600-0536.2008.01443.x

[29] Deckers J, Hammad H, Hoste E. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Front Immunol* 2018; 9: 93. doi:10.3389/fimmu.2018.00093

[30] Brüggen M-C, Epstein MM, Stingl G. Antigenpräsentierende Zellen der Haut. In: Biedermann T, Heppt W, Renz H, Röcken M, Hrsg. *Allergologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016: 55–58, 60–61. doi:10.1007/978-3-642-37203-2

[31] Boltjes A, van Wijk F. Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Front Immunol* 2014; 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00131

[32] Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 2018; 154: 3–20. doi:10.1111/imm.12888

[33] Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans

cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 935–947. doi:10.1038/nri2455

[34] Clausen BE, Stoitzner P. Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses. *Front Immunol* 2015; 6: 534. doi:10.3389/fimmu.2015.00534

[35] Noordegraaf M, Flacher V, Stoitzner P, et al. Functional Redundancy of Langerhans Cells and Langerin+ Dermal Dendritic Cells in Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 2752–2759. doi:10.1038/jid.2010.223

[36] Antigen Presentation. In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK, Hrsg. *Immunology*. Edinburgh ; New York: Mosby; 2001: 105–118

[37] Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, et al. T-Zell-System. In: Holländer GA, Barthlott T, Hrsg. *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2006: 82–133

[38] Frohwein TA, Sonnenburg A, Zuberbier T, et al. Unsaturated compounds induce up-regulation of CD86 on dendritic cells in the in vitro sensitization assay LCSA. *Arch Toxicol* 2016; 90: 927–936. doi:10.1007/s00204-015-1527-4

[39] Kreiling R, Hollnagel HM, Hareng L, et al. Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1896–1904. doi:10.1016/j.fct.2008.01.019

[40] Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 151–161. doi:10.1038/nri746

[41] Hitzler M, Majdic O, Heine G, et al. 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: e46776. doi:10.1371/journal.pone.0046776

[42] Geier J, Dickel H. Kontaktallergie - die unterschätzte Volkskrankheit. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb* 2020; 71: 163–165. doi:10.1007/s00105-019-04536-8

[43] Geier J, Uter W, Lessmann H, et al. Aktuelle Kontaktallergene. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb* 2011; 62: 751–756. doi:10.1007/s00105-011-2180-3

[44] Bauer A, Geier J, Mahler V, et al. Kontaktallergien bei Erwerbstätigen in Deutschland. *Ergebnisse des IVDK-Netzwerkes 2003-2013*. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb* 2015; 66: 652–664. doi:10.1007/s00105-015-3660-7

- [45] Gerberick GF. Development of a Peptide Reactivity Assay for Screening Contact Allergens. *Toxicol Sci* 2004; 81: 332–343. doi:10.1093/toxsci/kfh213
- [46] Fujita M, Yamamoto Y, Tahara H, et al. Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2014; 70: 94–105. doi:10.1016/j.vascn.2014.06.001
- [47] Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, et al. Cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay: Oxidation factor analysis of cysteine-derivative reagent (NAC) in ADRA. *J Appl Toxicol* 2019; 39: 191–208. doi:10.1002/jat.3707
- [48] OECD. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). OECD; 2020. doi:10.1787/9789264229709-en
- [49] Urbisch D, Mehling A, Guth K, et al. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015; 71: 337–351. doi:10.1016/j.yrtph.2014.12.008
- [50] Bauch C, Kolle SN, Fabian E, et al. Intralaboratory validation of four in vitro assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 1162–1168. doi:10.1016/j.tiv.2011.05.030
- [51] OECD. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing the AOP Key Event on Keratinocyte Activation. OECD; 2018. Im Internet: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264229822-en.pdf?expires=1597407015&id=id&accname=guest&checksum=9CE5FAC344404DD5970B92AB0D01FD6B>; Stand: 14.08.2020
- [52] Mehling A, Eriksson T, Eltze T, et al. Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1273–1295. doi:10.1007/s00204-012-0867-6
- [53] Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, et al. Putting the parts together: Combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 63: 489–504. doi:10.1016/j.yrtph.2012.05.013
- [54] Roggen EL. In Vitro Approaches for Detection of Chemical Sensitization. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014; 115: 32–40. doi:10.1111/bcpt.12202
- [55] OECD. Test No. 442E: In Vitro Assays Addressing the Key Event on Activation of

Dendritic Cells on the AOP for Skin Sensitisation. OECD; 2018. Im Internet: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264359-en.pdf?expires=1597407333&id=id&accname=guest&checksum=56CA63AF4B1B3812701D701F292FB37F>; Stand: 14.08.2020

[56] Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, et al. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro* 2006; 7

[57] Europäische Kommission. TSAR. Track Syst Altern Methods Regul Accept TSAR 2021. Im Internet: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/>

[58] Roberts DW, Patlewicz G. Non-animal assessment of skin sensitization hazard: Is an integrated testing strategy needed, and if so what should be integrated?: Non-animal ITS for skin sensitisation. *J Appl Toxicol* 2018; 38: 41–50. doi:10.1002/jat.3479

[59] Hoffmann S, Kleinstreuer N, Alépée N, et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol* 2018; 48: 344–358. doi:10.1080/10408444.2018.1429385

[60] Takahashi T, Kimura Y, Saito R, et al. An In Vitro Test to Screen Skin Sensitizers Using a Stable THP-1–Derived IL-8 Reporter Cell Line, THP-G8. *Toxicol Sci* 2011; 124: 359–369. doi:10.1093/toxsci/kfr237

[61] Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, et al. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 2015; 29: 1816–1830. doi:10.1016/j.tiv.2015.07.006

[62] Kimura Y, Watanabe M, Suzuki N, et al. The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA). *J Toxicol Sci* 2018; 43: 741–749. doi:10.2131/jts.43.741

[63] Europäische Union. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. 2009

[64] Faulkner L, Martinsson K, Santoyo-Castelazo A, et al. The Development of In Vitro Culture Methods to Characterize Primary T-Cell Responses to Drugs. *Toxicol Sci* 2012; 127: 150–158. doi:10.1093/toxsci/kfs080

[65] Bock S, Murgueitio MS, Wolber G, et al. Acute myeloid leukaemia-derived Langerhans-like cells enhance Th1 polarization upon TLR2 engagement. *Pharmacol Res*

2016; 105: 44–53. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.016

[66] ProImmune. ProScern® CFSE DC-T Cell Assays. 2020. Im Internet: <https://www.proimmune.com/proscern-dc-t-cell-proliferation-assays/>

[67] Richter A, Schmucker SS, Esser PR, et al. Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC--IFN- γ and TNF- α readout. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 2013; 27: 1180–1185. doi:10.1016/j.tiv.2012.08.007

[68] Vocanson M, Mutez V, Esser PR, et al. Contact hypersensitivity: T-cell based assay. *Curr Opin Toxicol* 2017; 5: 39–45

[69] Ahmed SS, Wang XN, Fielding M, et al. An *in vitro* human skin test for assessing sensitization potential: An *in vitro* human skin test for assessing sensitization potential. *J Appl Toxicol* 2016; 36: 669–684. doi:10.1002/jat.3197

[70] Ahmed SS, Whritenour J, Ahmed MM, et al. Evaluation of a human *in vitro* skin test for predicting drug hypersensitivity reactions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 369: 39–48. doi:10.1016/j.taap.2019.02.005

[71] Clouet E, Bechara R, Raffalli C, et al. The THP-1 cell toolbox: a new concept integrating the key events of skin sensitization. *Arch Toxicol* 2019; 93: 941–951. doi:10.1007/s00204-019-02416-7

[72] Hou F, Xing C, Li B, et al. Performance of a novel *in vitro* assay for skin sensitization based on activation of T lymphocytes. *ALTEX* 2020; 37: 451–468. doi:10.14573/altex.2001312

[73] Cottrez F, Boitel E, Auriault C, et al. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol In Vitro* 2015; 29: 787–802. doi:10.1016/j.tiv.2015.02.012

[74] Johansson H, Gradin R, Johansson A, et al. Validation of the GARD™skin Assay for Assessment of Chemical Skin Sensitizers: Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. *Toxicol Sci* 2019; 170: 374–381. doi:10.1093/toxsci/kfz108

[75] Rovida C. Advanced tests for skin and respiratory sensitization assessment. *ALTEX* 2013; 30: 231–252. doi:10.14573/altex.2013.2.231

[76] Grundström G, Borrebaeck C. Skin Sensitization Testing—What’s Next? *Int J Mol*

Sci 2019; 20: 666. doi:10.3390/ijms20030666

[77] Gradin R, Johansson A, Forreryd A, et al. The GARDpotency Assay for Potency-Associated Subclassification of Chemical Skin Sensitizers—Rationale, Method Development, and Ring Trial Results of Predictive Performance and Reproducibility. *Toxicol Sci* 2020; 176: 423–432. doi:10.1093/toxsci/kfaa068

[78] Wanner R, Schreiner M. An in vitro assay to screen for the sensitizing potential of xenobiotics. *ALTEX* 2008; 25: 115–120. doi:10.14573/altex.2008.2.115

[79] Schreiner M, Peiser M, Briechle D, et al. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens. *Toxicology* 2008; 249: 146–152. doi:10.1016/j.tox.2008.04.020

[80] Wanner R, Sonnenburg A, Quatchadze M, et al. Classification of sensitizing and irritative potential in a combined in-vitro assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 245: 211–218. doi:10.1016/j.taap.2010.02.019

[81] Sonnenburg A, Ahuja V, Schreiner M, et al. Assessment of the sensitizing potential of textile disperse dyes and some of their metabolites by the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA). *Arch Toxicol* 2012; 86: 733–740. doi:10.1007/s00204-012-0811-9

[82] Frombach J, Sonnenburg A, Krapohl B-D, et al. A novel method to generate monocyte-derived dendritic cells during coculture with HaCaT facilitates detection of weak contact allergens in cosmetics. *Arch Toxicol* 2017; 91: 339–350. doi:10.1007/s00204-016-1722-y

[83] Frombach J, Sonnenburg A, Krapohl B-D, et al. Lymphocyte surface markers and cytokines are suitable for detection and potency assessment of skin-sensitizing chemicals in an in vitro model of allergic contact dermatitis: the LCSA-ly. *Arch Toxicol* 2018; 92: 1495–1505. doi:10.1007/s00204-018-2164-5

[84] Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106: 761–771

[85] Owsianowski M, Busch FW, Bonnekoh B, et al. Long-term cultured adult human keratinocytes secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not interleukin-3 after cytokine exposure in vitro. *Skin Pharmacol Off J Skin Pharmacol Soc* 1991; 4: 158–164. doi:10.1159/000210943

- [86] Winiski AP, Foster CA. ICAM-1 expression in a spontaneously transformed human keratinocyte cell line: characterization by a simple cell-ELISA assay. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 48–52. doi:10.1111/1523-1747.ep12611715
- [87] Hu Z, Ma W, Zaborski M, et al. Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia* 1996; 10: 1025–1040
- [88] Ning J, Morgan D, Pamphilon D. A Rapid Culture Technique Produces Functional Dendritic-Like Cells from Human Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 1–9. doi:10.1155/2011/172965
- [89] Gibbs S, Spiekstra S, Corsini E, et al. Dendritic cell migration assay: A potential prediction model for identification of contact allergens. *Toxicol In Vitro* 2013; 27: 1170–1179. doi:10.1016/j.tiv.2012.05.016
- [90] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26: 171–176. doi:10.1002/ijc.2910260208
- [91] Cao Y, Ma P, Liu W, et al. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012; 34: 196–204. doi:10.3109/08923973.2011.591800
- [92] Krakauer T, Oppenheim JJ. Interleukin 1 production by a human acute monocytic leukemia cell line. *Cell Immunol* 1983; 80: 223–229. doi:10.1016/0008-8749(83)90111-9
- [93] Kitchens RL, Ulevitch RJ, Munford RS. Lipopolysaccharide (LPS) partial structures inhibit responses to LPS in a human macrophage cell line without inhibiting LPS uptake by a CD14-mediated pathway. *J Exp Med* 1992; 176: 485–494. doi:10.1084/jem.176.2.485
- [94] Schwenk HU, Schneider U. Cell cycle dependency of a T-cell marker on lymphoblasts. *Blut* 1975; 31: 299–306. doi:10.1007/BF01634146
- [95] Schneider U, Schwenk H-U, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 1977; 19: 621–626. doi:10.1002/ijc.2910190505
- [96] Michalewicz R, Taheri MR, Katz FE, et al. JM, a Thy-ALL cell line produces both inhibitory and stimulatory lymphokines for bone marrow progenitor cells. *Leuk Res* 1987;

11: 649–654. doi:10.1016/0145-2126(87)90038-5

[97] Pawelec G, Borowitz A, Krammer PH, et al. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. *Eur J Immunol* 1982; 12: 387–392. doi:10.1002/eji.1830120506

[98] Liu M, Yasmeen R, Fukagawa N, et al. Dose-Dependent Responses of I3C and DIM on T-Cell Activation in the Human T Lymphocyte Jurkat Cell Line. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1409. doi:10.3390/ijms18071409

[99] Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* 2016; 7: 550. doi:10.3389/fimmu.2016.00550

[100] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. THE B7 FAMILY REVISITED. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515–548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611

[101] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677–704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331

[102] Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5: 1365–1369. doi:10.1038/70932

[103] Qin W, Hu L, Zhang X, et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Front Immunol* 2019; 10: 2298. doi:10.3389/fimmu.2019.02298

[104] Zak KM, Grudnik P, Magiera K, et al. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure* 2017; 25: 1163–1174. doi:10.1016/j.str.2017.06.011

[105] Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, et al. PD-L1. *J Clin Pathol* 2018; 71: 189–194. doi:10.1136/jclinpath-2017-204853

[106] Najafian N, Khoury SJ. T cell costimulatory pathways: blockade for autoimmunity. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 227–236. doi:10.1517/14712598.3.2.227

[107] Prestipino A, Zeiser R. Clinical implications of tumor-intrinsic mechanisms regulating PD-L1. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaav4810. doi:10.1126/scitranslmed.aav4810

[108] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-

- L1 Checkpoint. *Immunity* 2018; 48: 434–452. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.014
- [109] Peña-Cruz V, McDonough SM, Diaz-Griffero F, et al. PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen-presenting cell activity. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 2222–2230. doi:10.1038/jid.2010.127
- [110] Wang S, Bajorath J, Flies DB, et al. Molecular Modeling and Functional Mapping of B7-H1 and B7-DC Uncouple Costimulatory Function from PD-1 Interaction. *J Exp Med* 2003; 197: 1083–1091. doi:10.1084/jem.20021752
- [111] Jalali S, Price-Troska T, Bothun C, et al. Reverse signaling via PD-L1 supports malignant cell growth and survival in classical Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J* 2019; 9: 22–22. doi:10.1038/s41408-019-0185-9
- [112] Esser C. Biology and function of the aryl hydrocarbon receptor: report of an international and interdisciplinary conference. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1323–1329. doi:10.1007/s00204-012-0818-2
- [113] Möglich A, Ayers RA, Moffat K. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure* 2009; 17: 1282–1294. doi:10.1016/j.str.2009.08.011
- [114] Hao N, Whitelaw ML. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem Pharmacol* 2013; 86: 561–570. doi:10.1016/j.bcp.2013.07.004
- [115] Stockinger B, Meglio PD, Gialitakis M, et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 403–432. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120245
- [116] Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2019; 19: 184–197. doi:10.1038/s41577-019-0125-8
- [117] Skazik-Voogt C. Myeloid human cell lines lack functional regulation of aryl hydrocarbon receptor-dependent phase I genes. *ALTEX* 2015. doi:10.14573/altex.1502041
- [118] Takei K, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, et al. Cynaropicrin attenuates UVB-induced oxidative stress via the AhR–Nrf2–Nqo1 pathway. *Toxicol Lett* 2015; 234: 74–80. doi:10.1016/j.toxlet.2015.02.007
- [119] Skazik C, Heise R, Ott H, et al. Active transport of contact allergens in human monocyte-derived dendritic cells is mediated by multidrug resistance related proteins.

Arch Biochem Biophys 2011; 508: 212–216. doi:10.1016/j.abb.2011.01.013

[120] Heise R, Skazik C, Rodriguez F, et al. Active transport of contact allergens and steroid hormones in epidermal keratinocytes is mediated by multidrug resistance related proteins. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 305–308. doi:10.1038/jid.2009.200

[121] Kalmes M, Neumeyer A, Rio P, et al. Impact of the arylhydrocarbon receptor on eugenol- and isoeugenol-induced cell cycle arrest in human immortalized keratinocytes (HaCaT). *Biol Chem* 2006; 387: 1201–1207. doi:10.1515/BC.2006.148

[122] Kalmes M, Hennen J, Clemens J, et al. Impact of aryl hydrocarbon receptor (AhR) knockdown on cell cycle progression in human HaCaT keratinocytes. *Biol Chem* 2011; 392: 643–651. doi:10.1515/bc.2011.067

[123] Jux B, Kadow S, Esser C. Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity Are Impaired in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice. *J Immunol* 2009; 182: 6709–6717. doi:10.4049/jimmunol.0713344

[124] Abron JD, Singh NP, Mishra MK, et al. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand, ITE, induces regulatory T cells and ameliorates experimental colitis. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2018; 315: G220–G230. doi:10.1152/ajpgi.00413.2017

[125] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346: 1258096. doi:10.1126/science.1258096

[126] Müller-Esparza H, Gleditsch D, Randau L. Vielfältige Genscheren: natürliche Aktivitäten von CRISPR-Cas-Systemen. *BIOspektrum* 2018; 24: 704–706. doi:10.1007/s12268-018-0978-6

[127] Marchfelder A. CRISPR-Cas: In Rekordzeit von der Grundlagenforschung zur Anwendung. *BIOspektrum* 2020; 26: 806–806. doi:10.1007/s12268-020-1500-5

[128] Behler J. Kidnapping der wirtseigenen Nuklease RNase E durch ein CRISPR-Cas-System. *BIOspektrum* 2019; 25: 790–791. doi:10.1007/s12268-019-1310-9

[129] Bannikov AV, Lavrov AV. CRISPR/CAS9, the king of genome editing tools. *Mol Biol* 2017; 51: 514–525. doi:10.1134/S0026893317040033

[130] Dimova EY, Kietzmann T. Genomveränderungen–CRISPR/Cas9 als Methode der Wahl oder Qual? *BIOspektrum* 2018; 24: 701–703. doi:10.1007/s12268-018-0977-7

- [131] Liu J-J, Orlova N, Oakes BL, et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature* 2019; 566: 218–223. doi:10.1038/s41586-019-0908-x
- [132] Sgodda S, Cantz T. Editierung induzierter pluripotenter Stammzellen mittels CRISPR/Cas9. *BIOspektrum* 2018; 24: 707–708. doi:10.1007/s12268-018-0984-8
- [133] Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 2018; 9: 1911. doi:10.1038/s41467-018-04252-2
- [134] Myers C, Katz F, Joshi G, et al. A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture. *Blood* 1984; 64: 152–155
- [135] Welte K, Platzer E, Lu L, et al. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 1526–1530. doi:10.1073/pnas.82.5.1526
- [136] Quentmeier H, Zaborski M, Drexler HG. The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. *Leuk Res* 1997; 21: 343–350. doi:10.1016/S0145-2126(96)00132-4
- [137] Mitachi T, Mezaki M, Yamashita K, et al. Acidic conditions induce the suppression of CD86 and CD54 expression in THP-1 cells. *J Toxicol Sci* 2018; 43: 299–309. doi:10.2131/jts.43.299
- [138] Kosten IJ, Spiekstra SW, de Gruijl TD, et al. MUTZ-3 derived Langerhans cells in human skin equivalents show differential migration and phenotypic plasticity after allergen or irritant exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 287: 35–42. doi:10.1016/j.taap.2015.05.017
- [139] Life Technologies. GeneArt® Genomic Cleavage Detection Kit User Guide. Life Technologies Corporation; 2014. Im Internet: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/A24372_GeneArt_GenomicCleavage_Detect_Kit_man.pdf
- [140] Miltenyi Biotech GmbH. Annexin V MicroBead Kit. Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotech GmbH. Im Internet: https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/71fa7b7672118c0a391c95e0b7f3111fa455eb95/DS_Annexin%20V%20MicroBead%20Kit.pdf; Stand: 19.08.2020
- [141] EMD Millipore Corporation. Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel, 96-Well Plate Assay. 2017. Im Internet:

https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/MILLIPLEX-MAP-Human-High-Sensitivity-T-Cell-Panel-Immunology-Multiplex-Assay,MM_NF-HSTCMAG-28SK;
Stand: 11.09.2019

[142] Sonnenburg A, Kreutz R. Optimierte In-vitro-Testung von Fremdstoffen auf sensibilisierendes Potenzial durch CRISPR/Cas9-vermittelten Knockdown der inhibitorischen Moleküle PD-L1 und Arylhydrocarbon -(Ah)-Rezeptor in dendritischen Zellen - „OpTest“. Berlin: Charité Universitätsmedizin Berlin; 2019. Im Internet: <https://www.tib.eu/de/suchen/id/TIBKAT%3A1728506565>

[143] Invitrogen. TrueCut Cas9 Protein v2 User Guide. Vilnius: Thermo Fisher Scientific Inc.; 2017

[144] Masterson AJ, Sombroek CC, de Gruijl TD, et al. MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+precursors. *Blood* 2002; 100: 701–703. doi:10.1182/blood.V100.2.701

[145] Santegoets SJAM, Masterson AJ, van der Sluis PC, et al. A CD34+ human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14+CD11b+ Langerhans cell precursor. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1337–1344. doi:10.1189/jlb.0206111

[146] Tuschl H, Kovac R, Weber E. The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol In Vitro* 2000; 14: 541–549. doi:10.1016/S0887-2333(00)00051-5

[147] Rasaiyaah J, Noursadeghi M, Kellam P, et al. Transcriptional and functional defects of dendritic cells derived from the MUTZ-3 leukaemia line. *Immunology* 2009; 127: 429–441. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03018.x

[148] Kim H-S, Berstad A. Experimental Colitis in Animal Models. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 529–537. doi:10.3109/00365529209000116

[149] Wallace JL, Le T, Carter L, et al. Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 33: 237–239. doi:10.1016/1056-8719(95)00001-x

[150] Yunusi K, Zhang J, Zhong L, et al. Uygur Medicine Xipayi Kui Jie'an Affects Gene Expression profiles in intestinal tissue Lesions in a Rat Model of Ulcerative Colitis. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 152. doi:10.1186/s12906-015-0672-x

[151] Billsborough J, Fiorino MF, Henkle BW. Select animal models of colitis and

their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis. *Expert Opin Drug Discov* 2020; 1–11. doi:10.1080/17460441.2021.1851185

[152] Kuipers H, Muskens F, Willart M, et al. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell activation. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2472–2482. doi:10.1002/eji.200635978

[153] Zhang Shu, Qin Chunhua, Safe Stephen H. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 1877–1882. doi:10.1289/ehp.6322

[154] Feng J, Zheng T, Hou Z, et al. Luteolin, an aryl hydrocarbon receptor ligand, suppresses tumor metastasis in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2020; 44: 2231–2240. doi:10.3892/or.2020.7781

[155] Wójtowicz AK, Szychowski KA, Wnuk A, et al. Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and Neurotoxicity are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but not by Estrogen Receptor Alpha (ER α), Estrogen Receptor Beta (ER β), or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) in Mouse Cortical Neurons. *Neurotox Res* 2017; 31: 77–89. doi:10.1007/s12640-016-9665-x

[156] Wang C, Ye Z, Kijlstra A, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor affects activation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2014; 177: 521–530. doi:10.1111/cei.12352

[157] Murray IA, Perdew GH. How Ah Receptor Ligand Specificity Became Important in Understanding Its Physiological Function. *Int J Mol Sci* 2020; 21. doi:10.3390/ijms21249614

[158] Gustafsson A, Prgomet Z, Jankovskaja S, et al. Effect of IFN- γ on the kynurenine/tryptophan ratio in monolayer-cultured keratinocytes and a 3D reconstructed human epidermis model. *J Dermatol Sci* 2020; 99: 177–184. doi:10.1016/j.jdermsci.2020.07.005

[159] Hennen J, Aeby P, Goebel C, et al. Cross Talk between Keratinocytes and Dendritic Cells: Impact on the Prediction of Sensitization. *Toxicol Sci* 2011; 123: 501–510. doi:10.1093/toxsci/kfr174

[160] Wang G-Z, Zhang L, Zhao X-C, et al. The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to

immunotherapy. *Nat Commun* 2019; 10: 1125–1125. doi:10.1038/s41467-019-08887-7

[161] Zablocki-Thomas L, Menzies SA, Lehner PJ, et al. A genome-wide CRISPR screen identifies regulation factors of the TLR3 signalling pathway. *Innate Immun* 2020; 26: 459–472. doi:10.1177/1753425920915507

[162] Choi H, Shin MK, Ahn HJ, et al. Irritating effects of sodium lauryl sulfate on human primary keratinocytes at subtoxic levels of exposure. *Microsc Res Tech* 2018; 81: 1339–1346. doi:10.1002/jemt.23143

[163] De Jongh CM, Verberk MM, Withagen CET, et al. Stratum corneum cytokines and skin irritation response to sodium lauryl sulfate. *Contact Dermatitis* 2006; 54: 325–333. doi:10.1111/j.0105-1873.2006.00848.x

[164] Galbiati V, Mitjans M, Lucchi L, et al. Further development of the NCTC 2544 IL-18 assay to identify in vitro contact allergens. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 724–732. doi:10.1016/j.tiv.2010.12.011

[165] Bremner TA, Chatterjee D, Han Z, et al. THP-1 monocytic leukemia cells express Fas ligand constitutively and kill Fas-positive Jurkat cells. *Leuk Res* 1999; 23: 865–870. doi:10.1016/S0145-2126(99)00101-0

[166] Wang J, Shu L, Yang L, et al. 2-Hydroxy-3-methylantraquinone from *Hedyotis diffusa* WILLD Induces Apoptosis via Alteration of Fas/FasL and Activation of Caspase-8 in Human Leukemic THP-1 Cells. *Arch Med Res* 2011; 42: 577–583. doi:10.1016/j.arcmed.2011.11.003

[167] Thatcher TH, Williams MA, Pollock SJ, et al. Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function. *Immunology* 2016; 147: 41–54. doi:10.1111/imm.12540

[168] Ilchmann A, Krause M, Heilmann M, et al. Impact of culture medium on maturation of bone marrow-derived murine dendritic cells via the aryl hydrocarbon receptor. *7th Int EMBO Workshop Antigen Present Process* 2012; 51: 42–50. doi:10.1016/j.molimm.2012.02.005

[169] Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki I-M, et al. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science* 2019; 364: 558–566. doi:10.1126/science.aav7062

[170] Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed Death-1 Ligand 1

Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity* 2007; 27: 111–122. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.016

[171] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 233–258. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.233

[172] Bar N, Costa F, Das R, et al. Differential effects of PD-L1 versus PD-1 blockade on myeloid inflammation in human cancer. *JCI Insight* 2020; 5: e129353. doi:10.1172/jci.insight.129353

[173] Lu D, Ni Z, Liu X, et al. Beyond T Cells: Understanding the Role of PD-1/PD-L1 in Tumor-Associated Macrophages. *J Immunol Res* 2019; 2019: 1919082. doi:10.1155/2019/1919082

[174] Thatcher TH, Maggirwar SB, Baglole CJ, et al. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice develop heightened inflammatory responses to cigarette smoke and endotoxin associated with rapid loss of the nuclear factor-kappaB component RelB. *Am J Pathol* 2007; 170: 855–864. doi:10.2353/ajpath.2007.060391

[175] Huang Y, He J, Liang H, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Apoptosis and Inflammation in a Murine Model of Experimental Autoimmune Uveitis. *Front Immunol* 2018; 9: 1713. doi:10.3389/fimmu.2018.01713

[176] Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 701-721.e70. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050

[177] Hou X-X, Chen G, Hossini AM, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates the Expression of TNF- α and IL-8 in Human Sebocytes via the MyD88-p65NF- κ B/p38MAPK Signaling Pathways. *J Innate Immun* 2019; 11: 41–51. doi:10.1159/000491029

[178] Ahrens B, Schulz G, Bellach J, et al. Chemokine levels in serum of children with atopic dermatitis with regard to severity and sensitization status. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol* 2015; 26: 634–640. doi:10.1111/pai.12431

[179] Kohler RE, Caon AC, Willenborg DO, et al. A role for macrophage inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand 20 in immune priming during T cell-

mediated inflammation of the central nervous system. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003; 170: 6298–6306. doi:10.4049/jimmunol.170.12.6298

[180] Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 1999; 190: 1755–1768. doi:10.1084/jem.190.12.1755

[181] Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 2000; 192: 705–718. doi:10.1084/jem.192.5.705

[182] Hirota M, Moro O. MIP-1 β , a novel biomarker for in vitro sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicol In Vitro* 2006; 20: 736–742. doi:10.1016/j.tiv.2005.10.013

[183] Lim Y-M, Moon S-J, An S-S, et al. Suitability of macrophage inflammatory protein-1beta production by THP-1 cells in differentiating skin sensitizers from irritant chemicals. *Contact Dermatitis* 2008; 58: 193–198. doi:10.1111/j.1600-0536.2007.01311.x

[184] Lee S, Greenstein T, Shi L, et al. Tri-culture system for pro-hapten sensitizer identification and potency classification. *Technology* 2018; 6: 67–74. doi:10.1142/S233954781850005X

[185] Starkebaum G, Loughran TPJ, Waters CA, et al. Establishment of an IL-2 independent, human T-cell line possessing only the p70 IL-2 receptor. *Int J Cancer* 1991; 49: 246–253. doi:10.1002/ijc.2910490218

[186] Andersson BS, Beran M, Pathak S, et al. Ph-positive chronic myeloid leukemia with near-haploid conversion in vivo and establishment of a continuously growing cell line with similar cytogenetic pattern. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 24: 335–343. doi:10.1016/0165-4608(87)90116-6

[187] Miltenyi S, Müller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11: 231–238. doi:10.1002/cyto.990110203

[188] Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565–577. doi:10.1002/ijc.2910170504

VI ANHANG

VI.1 Vorarbeiten

Das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem beruhte auf dem in der Arbeitsgruppe Stahlmann am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin etablierten *loose-fit coculture-based sensitization assay with lymphocyte endpoint* (LCSA-ly). Dieser stellte eine Weiterentwicklung des von Wanner und Schreiner vorgestellten LCSA dar. Die Verfasserin dieser Arbeit war an der Weiterentwicklung des Testsystems maßgeblich beteiligt. Aus diesen Arbeiten sind die nachfolgenden Publikationen hervorgegangen.

1. Frombach J, **Sonnenburg A**, Krapohl BD, Zuberbier T, Peiser M, Stahlmann R, Schreiner M. Lymphocyte surface markers and cytokines are suitable for detection and potency assessment of skin-sensitizing chemicals in an in vitro model of allergic contact dermatitis: the LCSA-ly. Arch Toxicol. 2018 92(4):1495-1505.
2. Frombach J, **Sonnenburg A**, Krapohl BD, Zuberbier T, Stahlmann R, Schreiner M. A novel method to generate monocyte-derived dendritic cells during coculture with HaCaT facilitates detection of weak contact allergens in cosmetics. Arch Toxicol. 2017; 91(1):339-350.
3. Frohwein TA, **Sonnenburg A**, Zuberbier T, Stahlmann R, Schreiner M. Unsaturated compounds induce up-regulation of CD86 on dendritic cells in the in vitro sensitization assay LCSA. Arch Toxicol. 2016; 90(4):927-36.
4. **Sonnenburg A**, Schreiner M, Stahlmann R. Assessment of the sensitizing potency of preservatives with chance of skin contact by the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA). Arch Toxicol. 2015; 89(12):2339-44.
5. **Sonnenburg A**, Ahuja V, Schreiner M, Platzek T, Stahlmann R. Assessment of the sensitizing potential of textile disperse dyes and some of their metabolites by the loose-fit coculture-based sensitization assay (LCSA). Arch Toxicol. 2012; 86(5):733-40.

6. Wanner R, **Sonnenburg A**, Quatchadze M, Schreiner M, Peiser M, Zuberbier T, Stahlmann R. Classification of sensitizing and irritative potential in a combined in-vitro assay. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 245(2):211-8.

VI.2 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

VI.2.1 *Genomic Cleavage Detection Kit*, molekularbiologische Messung gespaltener DNA in AhR-Knockout-Zellen

Der AhR- und HPRT-Knockouterfolg in den Ansätzen CCM VII und CCT II wurde molekularbiologisch mittels des vom Hersteller der CRIPSR/Cas-Reagenzien empfohlenen *Genomic Cleavage Detection Kit* überprüft. Die Auswertung erfolgte anhand der in **Abbildung 68** gezeigten Spektren optischer Dichten für Banden in der Gelelektrophorese nach Enzymverdau (siehe II.7.2 für Details zur Methode). Die Verwendung der HPRT-Primer mit beiden nicht geneditierten Kontrollen (THP-1 und MUTZ-3) führte in der Gelelektrophorese nach Enzymverdau zu ähnlichen verschmierten Banden, die als Artefakte eingestuft wurden.

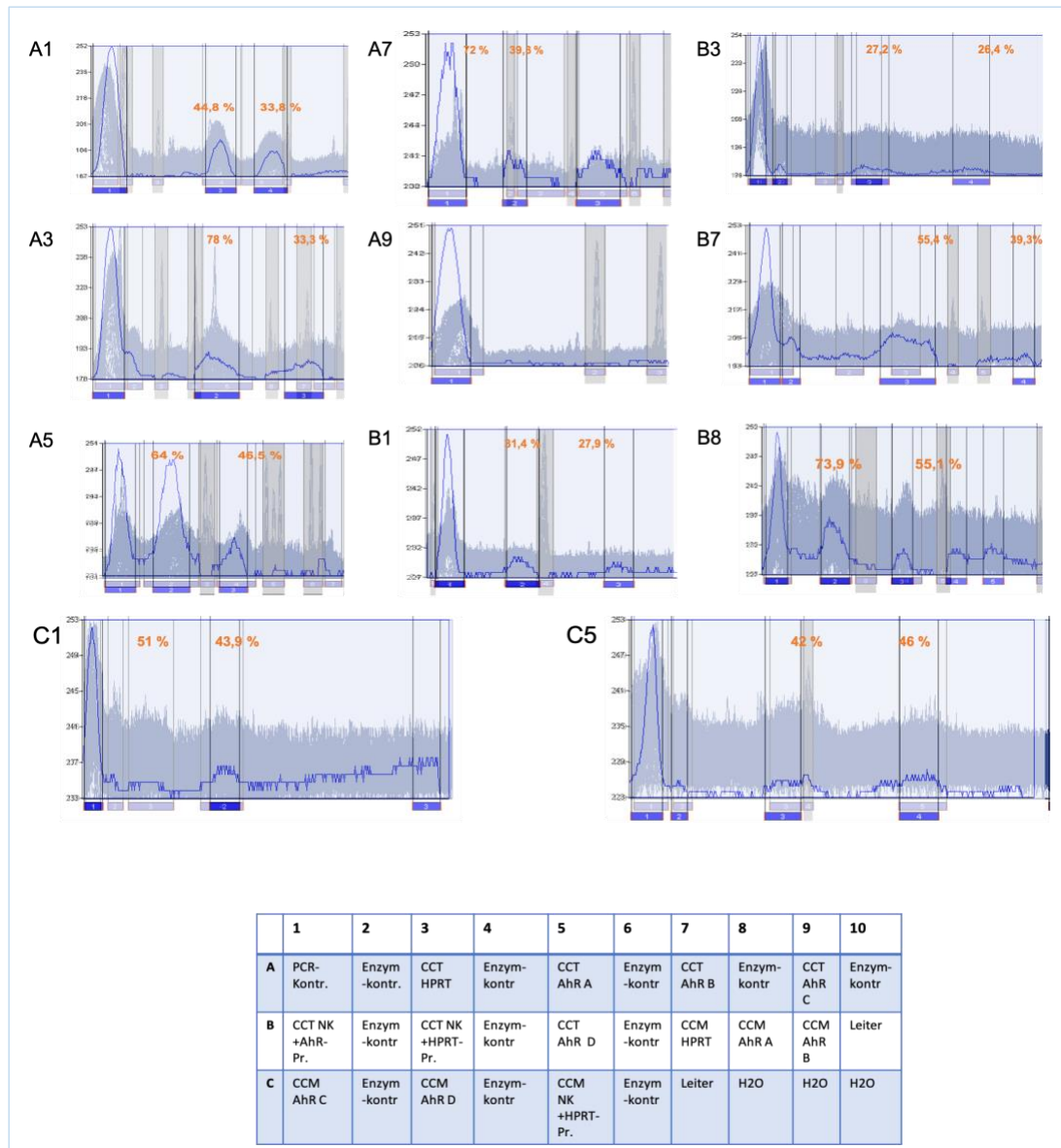


Abbildung 68. Profile ausgewerteter Spuren aus der Gelelektrophorese nach Enzymverdau zu Ermittlung der Editierungseffizienz im CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout des AhR als Überlagerung des Originalprofils mit den Durchschnittswerten für die optische Dichte der Banden. Prozentzahlen geben die Höhe der Peaks im Verhältnis zum Mutterpeak an, graue Zonen kennzeichnen manuell ausgeschlossene Peaks (Verunreinigungen und Fotoartefakte). Legende siehe Tabelle; CCM: geneditierte MUTZ-3, CCT: geneditierte THP-1, Kontr: Kontrolle, Leiter: Größenstandard, NK: Nullkontrolle, Pr.: Primer.

VI.2.2 Selektionsprotokoll für AhR-defiziente Zellen mit Dibutylphthalat

Um einen möglichst hohen Prozentsatz AhR-negativer Zellen in den Populationen über einige Passagen dem nach Knockout zu erhalten, wurde ein Selektionsprotokoll entwickelt, in welchem die geneditierten Populationen zunächst mit steigenden Konzentrationen von Dibutylphthalat (DBP) behandelt wurden, welches AhR-mediert Apoptose induziert. Die folgende Abbildung zeigt, dass diese Behandlung die allgemeine Viabilität der Kulturen nur wenig beeinflusste (**Abbildung 69**).

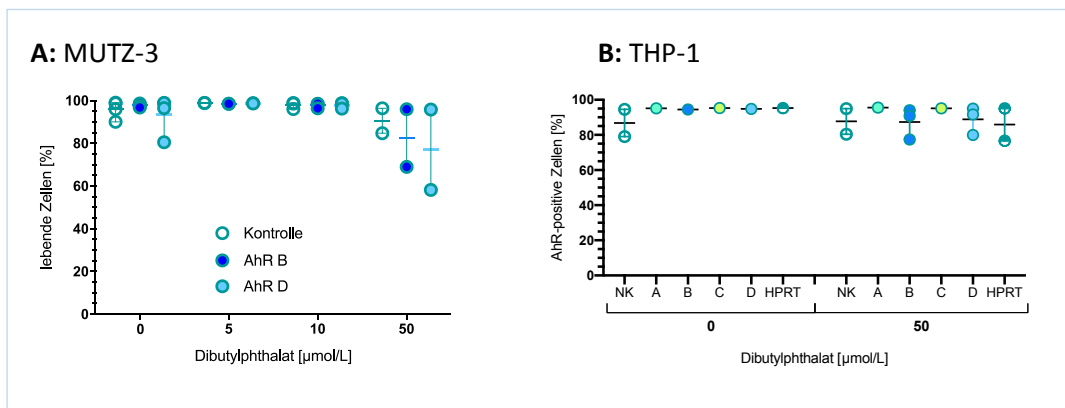


Abbildung 69. Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz lebender Zellen in mit sgRNA A bis D und der HPRT-Kontrolle (HPRT) geneditierten Populationen von MUTZ-3, Ansatz V (A) und THP-1 (B) nach Behandlung mit bis zu 50 µmol/l DBP im Vergleich zu nicht-editierten Kontrollen (Kontrolle, NK). Gezeigt sind Einzelwerte aus zwei Messungen.

VI.2.3 ELISA, IL-8 in Überständen der HaCaT/THP-1 bzw. THP-1/Jurkat-Kokulturen

Das proinflammatorische Zytokin IL-8 wurde in den Überständen der Jurkat-Kokultur (Kokultur C, siehe III.7.3) gefunden. Um einen übermäßigen Eintrag des Zytokins aus Kokultur B (THP-1/CCT und HaCaT) in die Jurkat-Kultur auszuschließen, wurden Überstände aus Kokultur B daraufhin mittels ELISA überprüft. Die in die Kokultur mit Jurkat übertragenen Mengen von IL-8 bewegten sich im Rahmen von im Mittel 0,4 bis 1,6 % der in der Jurkat-Kokultur gemessenen Konzentrationen (**Abbildung 70**), so dass nicht von einem übermäßigen Eintrag aus der vorgeschalteten HaCaT-Kokultur auszugehen ist.

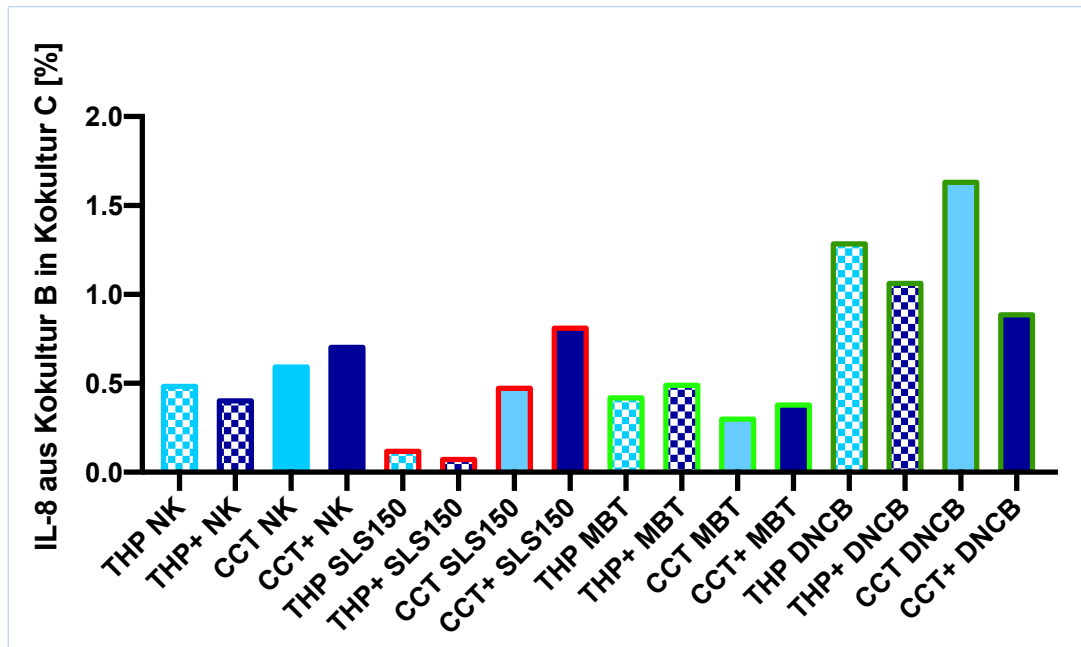


Abbildung 70. Mittels ELISA bestimmte Prozentsätze von IL-8 aus der Kokultur mit HaCaT (Kokultur B) in Überständen der Kokultur mit Jurkat (Kokultur C) nach Zelltyp und Behandlung. THP: THP-1 (hellblau gemustert), THP+: THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau gemustert), CCT: AhR-k.o. THP-1 (hellblau), CCT+: AhR-k.o. THP-1 mit PD-L1-Blockade (dunkelblau), NK: Nullkontrolle, SLS150: 150 $\mu\text{mol/l}$ SLS (rote Rahmen), MBT: 200 $\mu\text{mol/l}$ MBT (hellgrüne Rahmen), DNCB: 10 $\mu\text{mol/l}$ DNCB (dunkelgrüne Rahmen). Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

VI.3 Verwendete Laborverbrauchsmaterialien und Geräte

Die folgenden Tabellen (**Tabelle 18** und **Tabelle 19**) listen Standardmaterialien und -geräte auf, die im experimentellen Teil dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 18. Verwendete Laborverbrauchsmittel (Plastikware) mit Hersteller und Artikelnummer.

Verbrauchsmittel	Hersteller, Vertrieb/ Artikelnr.
Aspirationspipetten Greiner Bio-One	Thermo Fisher Scientific Inc. 10763934
Combitips plus für Handdispenser 5, 10, 25 ml	Eppendorf AG Institutsbestände
Eppendorf-Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf AG 003012 1023, -0086, -0094
Pipettenspitzen, steril Biosphere 10, 100, 300 µl	Sarstedt AG & Co. KG 70.1130.215, -.760.212, -.340.205
ART 1000 µl	Thermo Fisher Scientific Inc. 10313272
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25 µl	Sarstedt AG & Co. KG 86.1252.-, -.1253.-, -.1254.-, - 1685.01
Zellkulturflaschen, nunc 25 cm ² für Jurkat	Thermo Fisher Scientific Inc. 12034917
Zellkulturflaschen, TPP 25 und 75 cm ² für adhärenente Zellen	TPP Techno Plastic Products AG 90026, 90075
Zellkulturplatten, nunc 12- und 24-well für Suspensionskulturen	Thermo Fisher Scientific Inc. 10098870, 10604903
Zellkulturplatten, TPP 12-well für Kokultur A und B	TPP Techno Plastic Products AG 92012
Zentrifugenröhrchen, Falcon 15 und 50 ml	BD Biociences/ Corning 352097, 352070

Tabelle 19. Verwendete Geräte mit Modell und Hersteller.

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	Function line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage	MC1 Analytik AC 210P	Sartorius AG, Göttingen
Handdispenser	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer	MSH basic	IKA –Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop	Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Ulm
Pipetten	Research variabel	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Plattenphotometer	iMark	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sterilbank	Hera safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortex Mixer	7-2020	neoLab, Heidelberg
Wasserbad	Aqualine AL 5	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zählkammer	Neubauer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
Zentrifugen	5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
	Galaxy Mini	VWR International LLC. (avantor)

VI.4 Kommentiertes Abbildungsverzeichnis

Abbildungen, die im Abschlussbericht des zugrundeliegenden BMBF-Projekts [142] und der vorliegenden Dissertationsschrift verwendet wurden, sind im Folgenden aufgelistet und mit Kommentaren bezüglich der vorgenommenen Veränderungen versehen. Die Nummerierung in diesem Verzeichnis entspricht der in der vorliegenden Arbeit. Alle anderen Abbildungen enthalten im Vergleich zu ähnlichen Abbildungen im Abschlussbericht (sofern dort vorhanden) Daten aus weiteren

Experimenten und wurden vollständig überarbeitet, wobei die zugrundeliegenden Datensätze einer modifizierten Auswertestrategie unterzogen wurden.

Abbildung 9. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von Langerin (A) und HLA-DR (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 10. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von CD1a (A) und CD1c (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 11. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 12. Veränderung des Anteils CD14-positiver Zellen und dessen Expression auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 13. Veränderung des Anteils positiver Zellen und der Expression von PD-L1 (A) und AhR (B) auf MUTZ-3 in der Differenzierungskultur zu MUTZ-LC über sieben Tage.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 16. Veränderung der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des extremen Allergens DNCB.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 17. Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von DNCB.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 18. Veränderung der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des starken Allergens TNBS.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 19. Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von TNBS.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

Abbildung 20. Veränderung der Expression von CD86 (A) und CD54 (B) auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des moderaten Allergens MBT.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert

- Abbildung 21.** Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von MBT.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert
- Abbildung 22.** Veränderung der Expression von CD86 auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen der irritierenden Substanz SLS.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert
- Abbildung 23.** Veränderung der Expression von CD54 auf MUTZ-LC mit (dunkelblau) und ohne (hellblau) PD-L1-Blockade in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen der irritierenden Substanz SLS.- Datenübertragungsfehler für den Punkt 1000 μ M SLS ohne anti-PD-L1 korrigiert, Achsenaufteilung und Farbschema geändert
- Abbildung 24.** Anteil lebender MUTZ-LC in der Kokultur mit HaCaT nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von SLS.- erweitert um statistische Auswertung, Achsenaufteilung und Farbschema geändert
- Abbildung 29.** Durchflusszytometrisch bestimmte relative AhR-Expression bezogen auf unbehandelte Kontrollen in Populationen von MUTZ-3, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden.- erweitert um zusätzliche Messwerte und statistische Auswertung, Farbschema geändert
- Abbildung 30.** Prozentualer Anteil lebender Zellen nach AhR-Knockout in MUTZ-3 mit *guide*RNAs A bis D oder HPRT-Knockout.- erweitert um zusätzliche Messwerte und statistische Auswertung, Farbschema geändert
- Abbildung 31.** Durchflusszytometrisch bestimmte Prozentsätze AhR-positiver Zellen in Populationen von THP-1, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden.- erweitert um zusätzliche Messwerte und statistische Auswertung
- Abbildung 32.** Durchflusszytometrisch bestimmte relative AhR-Expression bezogen auf unbehandelte Kontrollen in Populationen von THP-1, die mittels CRISPR/Cas9-Methode einem AhR-Knockout unterzogen wurden.- erweitert um zusätzliche Messwerte und statistische Auswertung, Farbschema geändert
- Abbildung 33.** Prozentualer Anteil lebender Zellen nach AhR-Knockout in THP-1 mit *guide*RNAs A bis D oder HPRT-Knockout.- erweitert um zusätzliche Messwerte und statistische Auswertung, Farbschema geändert
- Abbildung 37.** Gelelektrophorese des Enzymverdaus gespaltener DNA in Proben von MUTZ-3 (CCM) und THP-1 (CCT) nach CRISPR/Cas9-vermittelter Geneditierung.- Markierung aller ausgewerteten Banden und Kontrast verstärkt
- Abbildung 39.** Durchflusszytometrisch bestimmter Prozentsatz AhR-positiver Zellen in mit sgRNA B (AhR B) und sgRNA D (AhR D) geneditierten Populationen von MUTZ-3 aus Ansatz V nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen DBP.- Farbschema und Fehlermaß geändert

