

Aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

Die Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita:  
Modulation über das adaptive Immunsystem in der  
Effektorphase und Beeinflussung der Wundheilung durch  
Protein-Nukleinsäure-Komplexe

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

– aus der Sektion der Naturwissenschaften –

vorgelegt von  
Eva Maria Hauenschild, geb. Brylka  
aus Stettin

Lübeck 2014

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.11.2014

*„Man merkt nie, was schon getan wurde; man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“*

Marie Curie

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	vii
1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Die Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita.....	1
1.1.1 Modelle zur Untersuchung der EBA .....	5
1.1.2 Effektorphase und adaptives Immunsystem während der EBA .....	6
1.1.3 Neben Zytokinen relevante Moleküle bei der EBA .....	8
1.1.4 Beeinflussung der Wundheilung während der EBA .....	10
1.2 Fragestellung.....	11
2 MATERIALIEN UND METHODEN .....	12
2.1 Materialien.....	12
2.1.1 Mäuse .....	12
2.1.2 Medien, Puffer und Stocklösungen .....	13
2.1.3 Antikörper für FACS-Färbung.....	14
2.1.4 Antikörper für immunhistologische Präparate.....	14
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.6 Übrige Reagenzien.....	17
2.1.7 Geräte .....	22
2.1.8 Software.....	24
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Aufreinigung von Kaninchen-IgG.....	26
2.2.2 Induktion der passiven EBA.....	29

2.2.3	Färbung der Blutproben und FACS-Analyse .....	31
2.2.4	Immunhistologische Färbungen.....	31
2.2.5	qRT-PCR.....	35
2.2.6	<i>In vitro</i> -Kultur der humanen Hautstanzen (Wundheilungsmodell) .....	36
2.2.7	Färbung der humanen Hautstanzen.....	37
2.2.8	Statistik.....	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Beteiligung des drainierenden Lymphknotens an der passiven Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) .....	40
3.1.1	Etablierung des passiven EBA-Modells.....	40
3.1.2	Makroskopische Wundentstehung.....	45
3.1.3	Drainierender Lymphknoten an Erkrankung beteiligt .....	47
3.1.4	Zusammenfassung I.....	53
3.2	Rolle der T-Zellen im passiven Modell .....	54
3.2.1	FTY-Behandlung vermindert Zirkulation von T-Zellen .....	54
3.2.2	Zusammenfassung II .....	61
3.3	Modulierung mit PNACs.....	62
3.3.1	PNACs in passiver EBA .....	62
3.3.2	PNACs im humanen <i>in vitro</i> -Hautmodell .....	65
3.3.3	Flächenentwicklung der Wundheilungszungen .....	67
3.3.4	Länge der Wundheilungszungen .....	70
3.3.5	Proliferation als verantwortlicher Prozess.....	72
3.3.6	CD31-positive Zellen als Indikator der Angiogenese .....	75
3.3.7	Zusammenfassung III.....	77

4	DISKUSSION .....	78
4.1	Rolle des adaptiven Immunsystems in der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ..	78
4.1.1	Modelle der EBA.....	78
4.1.2	Beteiligung des Lymphknotens und indirekte Rolle der T-Zellen .....	85
4.2	Wundheilung durch Protein-Nukleinsäure-Komplexe (PNACs).....	90
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	98
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	111
8	TABELLENVERZEICHNIS .....	114
	DANKSAGUNG.....	115
	PUBLIKATIONEN.....	117
	ERKLÄRUNG .....	118

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

∪	Zentrifugation
α	alpha
APAAP	Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase, Enzymatische Methode in der Immunhistochemie
AUC	(engl.) area under the curve
β	beta
Balb/c	Albino-Mausstamm
°C	Grad Celsius
C3	Komplementfaktor
CD	(engl.) cluster of differentiation, Oberflächenmerkmal auf Zellen
CK6	Zytokeratin 6, ein Keratin des Epithels
C57BL/6	Mausstamm, schwarzer Phänotyp
DAB	3,3'-Diaminobenzidin, Farbstoff in der Immunhistochemie, Enzymsubstrat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff, zur DNA-Markierung eingesetzt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTH	(engl.) delayed type hypersensitivity (Typ IV Überempfindlichkeitsreaktion nach Coombs und Gell)
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FTY720	2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]-1,3-propandiol, Immunmodulator, auch bekannt als Fingolimod
g	Gramm

<i>g</i>	Erdbeschleunigung, liegt bei 9,80665m/s <sup>2</sup> , bei Zentrifugen wird die Beschleunigung häufig als Vielfaches der Erdbeschleunigung angegeben
Gr-1	(engl.) granulocyte differentiation antigen 1
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSP	Hitzeschutzprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
Ki-67	Protein, Marker für Zellproliferation
Koll.	Kollagen
MFI	(engl.) mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MHC	(engl.) major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NC	(engl.) non-collagenous, nicht-kollagene Domäne
OD	optische Dichte
PBS	(engl.) phosphate buffered saline, Pufferlösung
pH	Maß für sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PNACs	Protein-Nucleinsäuren-Komplexe
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion



rpm	(engl.) revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	(engl.) subcutaneous
SJL	Albino-Mausstamm
spezif.	spezifisch
TCR	(engl.) T cell receptor
TZZ	T-Zell-Zone

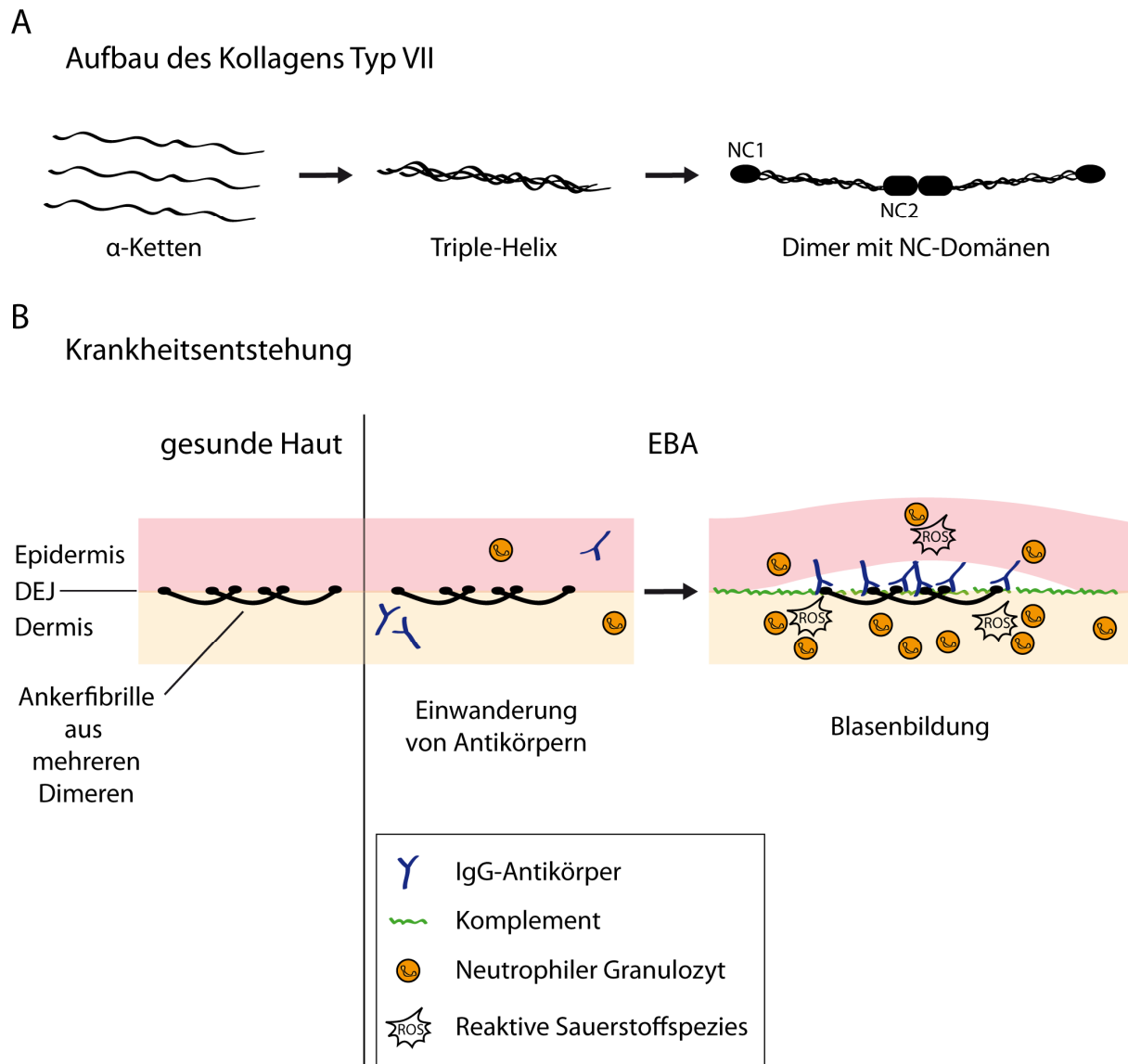
# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Autoimmunerkrankung Epidermolysis bullosa acquisita

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine Blasen bildende Autoimmunerkrankung der Haut, bei der Antikörper gegen das körpereigene Protein Kollagen Typ VII in der Haut gebildet werden (Woodley, Briggaman et al. 1984). Betrachtet man die einzelnen Hautschichten, so wird die Epidermis durch die Basalmembran von der Dermis abgegrenzt. Diese Membran wird auch als dermal-epidermale Junctionszone bezeichnet. Hier befindet sich das Kollagen Typ VII, das in Form von Verankerungsfibrillen die beiden Schichten miteinander verbindet. Es spannt sich von der Basallamina der Epithelzellen bis zur Lamina reticularis. Letztere besteht aus Bindegewebe vom Kollagen Typ III, um welches sich das Kollagen Typ VII wickelt. Kollagen Typ VII ist aus drei  $\alpha$ -Ketten aufgebaut, die eine kollagene Triple-Helix bilden. Diese wird von zwei nicht-kollagenen (NC) Domänen flankiert: NC1 am Amino-Terminus und NC2 am Carboxy-Terminus. Zwei solcher Monomere dimerisieren antiparallel (Abbildung 1A) und aggregieren schließlich zu mehreren Dimeren als Ankerfibrille (Bruckner-Tuderman 2009). Die Bindung der Antikörper an die NC1-Domäne des Kollagens Typ VII (Jones, Hunt et al. 1995) führt zum Abbau des Proteins und schließlich zur Entstehung von Blasen, die auf der Ablösung der Epidermis von der Dermis beruht. Die Erkrankung gehört zu einer der vier Gruppen der Epidermolysis bullosa. Die Prävalenz dieser seltenen Erkrankung wird mit etwa 0,2 pro 1 Million Einwohner angegeben (Ishii, Hamada et al. 2010).

Der Blasenbildung liegen mehrere Prozesse zugrunde: Nach der Bindung der zirkulierenden Antikörper an das Kollagen Typ VII kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems (Sitaru, Kromminga et al. 2002; Mihai, Chiriac et al. 2007). Dies führt wiederum zur Anlockung und Einwanderung von Neutrophilen sowie der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Klos, Tenner et al. 2009), die ebenfalls zur Schädigung des Gewebes beitragen (Sitaru and Zillikens 2005). Da das Kollagen Typ VII die Epidermis mit der Dermis verbindet, führt seine Zerstörung zur Lösung dieser beiden Gewebsschichten voneinander

und zur Abhebung der Epidermis von der Dermis in Form einer Blase (Woodley, Briggaman et al. 1984; Lapiere, Woodley et al. 1993; Ishii, Hamada et al. 2010) (Abbildung 1B). Während an der Entstehung der Erkrankung nur das Immunsystem beteiligt ist, indem spezifische Antikörper von B-Zellen produziert werden, spielt im weiteren Verlauf der Erkrankung auch die Wundheilung eine Rolle.



**Abbildung 1: Der Aufbau des Proteins Kollagen Typ VII und Angriff des Proteins während der EBA-Erkrankung.** A: Schematische Darstellung eines Kollagen Typ VII-Dimers (rechts), welches aus zwei antiparallel an der NC2-Domäne verbundenen Triple-Helices aus  $\alpha$ -Ketten besteht, wobei die NC1-Domänen nicht miteinander verbunden sind. B: Mehrere dieser Dimere bilden Ankerfibrillen (links), welche in der dermal-epidermalen Junctionszone (DEJ) die Dermis mit der Epidermis verbinden. Während der Entstehung der EBA wandern Antikörper (lila) in die Haut ein (Mitte) und binden an die NC1-Domänen. Dies führt zur Aktivierung und Bindung des Komplementsystems (grün), zur Anlockung und Einwanderung von Granulozyten (orange) sowie zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese tragen zur Gewebsschädigung bei und es kommt zur Abhebung der Epidermis von der Dermis in Form einer Blase (rechts).

Aktuell steht nur eine begrenzte Anzahl an Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, die teils mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen (Bernard, Vaillant et al. 1995; Ishii, Hamada et al. 2010; Kim, Kim et al. 2011). Neben der Behandlung mit systemischen Steroiden sowie mit Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Zytostatika wie Cyclophosphamid und Methotrexat (Remington, Chen et al. 2008) gibt es auch neue Therapien, die sich stärker auf die Ursache der Erkrankung fokussieren. So wird durch die Behandlung mit i.v. Immunglobulinen (IVIG) das Immunsystem moduliert (Schwab and Nimmerjahn 2013), auch wenn hierbei noch nicht alle Mechanismen genau geklärt sind (Furue, Iwata et al. 1986; Kofler, Wambacher-Gasser et al. 1997; Engineer and Ahmed 2001). IVIG ist ein Blutprodukt, welches Immunglobuline mehrerer tausend Spender enthält (Sokos, Berger et al. 2002). Auch der Einsatz des neuen Therapeutikums Rituximab (Schmidt, Benoit et al. 2006; Niedermeier, Eming et al. 2007), eines monoklonalen Antikörpers gegen das B-Zell-Antigen CD20, ist vielversprechend. Die B-Zellen, darunter auch die Antikörper-produzierenden B-Zellen, werden durch die Behandlung depletiert. Es werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert, die dieser Funktionsweise zugrunde liegen: die Komplement-abhängige Zytotoxizität und die Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (Zhou, Hu et al. 2008).

Schließlich lassen sich bei der sogenannten Immunadsorption die Antikörper aus dem Plasma des Patienten über Adsorber entfernen. Dazu wird der Patient einem Therapieverfahren unterzogen, bei dem sein Blutplasma aus dem Blutkreislauf abgetrennt und über Adsorber geleitet wird. Dort wird es von den Antikörpern gereinigt, indem diese an spezifisch generierte Säulen mit einer hohen Bindungsaffinität binden. Anschließend wird es wieder dem Patienten zugeführt. Diese Behandlung führt oft bereits nach wenigen Wochen zur Abheilung der Läsionen. In der Regel sind mehrere Therapieblöcke im Abstand von drei bis vier Wochen nötig (Schmidt 2009). Da der Körper weiterhin Immunglobuline produziert, muss die Behandlung regelmäßig wiederholt werden und wird in der Regel mit anderen Therapeutika wie Rituximab kombiniert (Niedermeier, Eming et al. 2007).

### 1.1.1 Modelle zur Untersuchung der EBA

Aufgrund der begrenzten Therapiemöglichkeiten ist es nötig, die Krankheitsentstehung besser zu verstehen, um neue Ansätze für Therapieformen zu finden. Um die Pathogenese dieser Erkrankung zu untersuchen, kann man auf verschiedene Modelle zurückgreifen (Sitaru, Kromminga et al. 2002; Sitaru, Mihai et al. 2005; Sitaru, Chiriac et al. 2006; Sitaru 2007; Bieber, Sun et al. 2010). Bei den Tiermodellen stehen das aktive und das passive Modell zur Verfügung, die sich im Hinblick auf die erforschten Phasen der Erkrankung unterscheiden.

Das aktive Modell umfasst die Induktionsphase und die Effektorphase der EBA. Die Erkrankung wird in der Maus induziert, indem sie mit einem rekombinanten Fragment der NC1-Domäne des Kollagens Typ VII immunisiert wird. Dazu muss die körpereigene Toleranz durchbrochen werden. Erreicht wird dies durch den Einsatz des Adjuvans' Titermax, welches das Immunsystem aktiviert (Bennett, Check et al. 1992). Nach der einmaligen oder wiederholten Immunisierung wird das körpereigene Kollagen Typ VII als „fremd“ angesehen, und es kommt zur Aktivierung von T- und B-Zellen sowie zur Keimzentrumsbildung. B-Zellen produzieren schließlich Autoantikörper (Sitaru, Chiriac et al. 2006). Auf diese Induktionsphase der Erkrankung folgt die Effektorphase, die unter Ziffer 1.1.2 genauer beschrieben wird. Kurz zusammengefasst zirkulieren in dieser Phase die Antikörper in der Maus und binden schließlich an das körpereigene Kollagen Typ VII in der Haut. Dieses wird abgebaut, zudem werden Neutrophile angelockt, die ROS freisetzen und somit das Gewebe schädigen. Zuletzt kommt es zur Trennung der Epidermis von der Dermis und damit zur Blasenbildung.

Beim passiven Modell wird demgegenüber alleine die Effektorphase reproduziert (Sitaru, Mihai et al. 2005). Die Antikörper müssen dazu im Vorfeld aus Kaninchen gewonnen werden, die mit einem rekombinanten Fragment des murinen Kollagens Typ VII immunisiert wurden. Die aufgereinigten Kaninchen-Antikörper werden der Maus wiederholt injiziert. Wie beim aktiven Modell binden diese zirkulierenden Antikörper an das Protein in der Haut, führen zu seinem Abbau sowie zur Gewebsschädigung, die schließlich in der Blasenbildung mündet.

Neben den *in vivo*-Tiermodellen gibt es auch *in vitro*-Modelle, die sich noch spezifischer auf die Effektorphase konzentrieren (Sitaru, Kromminga et al. 2002) und vor allem die Untersuchung von Patientenserum ermöglichen. Sie basieren auf Kryoschnitten der Haut (z.B. neonatale Vorhaut), auf welcher Patientenserum oder Antikörperpräparationen aufgetragen werden. Um die Einwanderung von Granulozyten zu ermöglichen, müssen diese zunächst aus gesunden Spendern gewonnen werden und extern auf den Schnitt gegeben werden. In der Folge kommt es auch in diesem Modell zu einer Abspaltung von Dermis und Epidermis.

### **1.1.2 Effektorphase und adaptives Immunsystem während der EBA**

In der Effektorphase des aktiven EBA-Modells entstehen durch die Bindung der gegen Kollagen Typ VII gerichteten Antikörper an das Kollagen Komplexe, die vom Immunsystem der Maus als „Nicht-Selbst“ erkannt werden. Durch dieses „Danger“-Signal werden Zellen des adaptiven Immunsystems angelockt: Patrouillierende T-Zellen sowie unspezifische Leukozyten wandern ein. Neutrophile bilden ROS und unter Einwirkung von Enzymen wird ein Teil des Komplexes abgebaut (Delves and Roitt 2000), aufgenommen und von Dendritischen Zellen im Lymphknoten präsentiert. Dort werden T-Zellen geprimt und wandern in die Haut ein, wo sie das Antigen ein zweites Mal präsentiert bekommen. Hierdurch werden sie aktiviert und proliferieren. Sobald das Antigen präsentiert wird, werden Antigen-spezifische T-Zellen rekrutiert. Diese agieren als „Pionierzellen“ am Ort der Entzündung und rekrutieren nach Antigenkontakt weitere T-Zellen sowie Neutrophile (Ghani, Feuerer et al. 2009). Daraufhin kommt es, auch unter der Ausschüttung von Chemokinen und weiteren Mediatoren, zu einer vollständig ausgeprägten Entzündungsreaktion. T-Zellen spielen dabei eine Rolle: So führt der Transfer von T-Zellen aus SJL-Mäusen in SJL-Nacktmäuse zur Produktion autoreaktiver Antikörper (Sitaru, Chiriac et al. 2006; Sitaru, Sesarman et al. 2010). Auch beim EBA-Modell, welches auf der Immunisierung mit vWFA2 (von-Willebrand-Faktor A-ähnliche Domäne 2) basiert, spielen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Induktion durch Antigen-präsentierende Zellen eine große Rolle (Iwata, Bieber et al. 2013). Weiterhin haben die Neutrophilen eine wichtige Funktion (Gupta,

Woodley et al. 2012; Ludwig 2013), während Mastzellen nicht in jedem EBA-Modell von Bedeutung sind (Sitaru 2007; Kim and Kim 2013). In den ersten Stunden der Entzündung sind weitere Mediatoren in die Rekrutierung der Zellen involviert, zu einem späteren Zeitpunkt der Entzündung (zwischen zwei und fünf Tagen) spielt IFN- $\gamma$  eine große Rolle (Ghani, Feuerer et al. 2009). Insgesamt sollen T-Zellen das Milieu im Gewebe modulieren und somit zur Entzündung beitragen. Die Anhäufung von Antigen-spezifischen T-Zellen ist entweder auf eine Retention dieser im Gewebe zurückzuführen (Debes, Arnold et al. 2005) oder auch auf eine Expansion der Population (Jenkins, Khoruts et al. 2001). Dendritische Zellen wandern von der entzündeten Haut bis in den Lymphknoten, aktivieren Antigen-spezifische T-Zellen und rekrutieren diese an den Ort der Entzündung (Dudda and Martin 2004; Sigmundsdottir and Butcher 2008). Eine Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen kann sowohl am Ort der Entzündung als auch im Lymphknoten nachgewiesen werden. Diese T-Zellen werden dann auch in die Blutlaufbahn entlassen und können zirkulieren (Doebis, Menning et al. 2011). Die lokal proliferierenden Zellen werden hingegen im Gewebe zurückgehalten. Die Wanderung vom Gewebe in den drainierenden Lymphknoten wird in Zusammenhang mit CCR7 gebracht. Wird dieser nur unzulänglich oder gar nicht exprimiert, bleiben die T-Zellen im Gewebe „gefangen“ (Debes, Arnold et al. 2005).

Die voranstehende Ausführung beschreibt die Effektorphase und die Beteiligung des adaptiven Immunsystems daran im aktiven Modell. Ob das adaptive Immunsystem auch eine Rolle während der Effektorphase im passiven Mausmodell spielt, ist bislang ungeklärt. Es ist daher von besonderem Interesse, dieser Frage im passiven Modell nachzugehen. Dazu wird ein experimenteller Ansatz gewählt, der sich rein mit der Effektorphase der Erkankung beschäftigt. Das bereits beschriebene *in vitro*-Modell, das auf Kryoschnitten basiert, kommt durch seine hohe Spezifizierung nicht infrage. Es bietet keine Möglichkeit zur Erforschung der Zellen des adaptiven Immunsystems.



### 1.1.3 Neben Zytokinen relevante Moleküle bei der EBA

Neben verschiedenen Zytokinen sind weitere Moleküle am Entzündungsprozess in der Haut beteiligt. Die wichtigsten in diesem Zusammenhang, die auch im Verlauf der Arbeit untersucht werden sollen, seien im Folgenden kurz vorgestellt.

IL-1 $\beta$  gilt als proinflammatorisches Zytokin und wird von hämatopoetischen Zellen produziert, wobei die inaktive Vorstufe durch Caspase-1 in ihre aktive Form gespalten werden muss (Fantuzzi and Dinarello 1999). Es ist an einer Vielzahl von angeborenen und adaptiven Immunprozessen beteiligt, unter anderem an der Rekrutierung von Leukozyten sowie der Lebensdauer und der Effektorfunktion von Neutrophilen (Garlanda, Dinarello et al. 2013).

IL-4 wird von T-Zellen, vor allem von Th2-Zellen, und Mastzellen exprimiert. Es fördert die Differenzierung von Th0-Zellen in Th2-Zellen (Kaplan, Schindler et al. 1996). Außerdem ist es an der Aktivierung von B-Zellen sowie dem Immunglobulin-Klassenwechsel beteiligt. IL-4 induziert dabei das für den Klassenwechsel benötigte Enzym AID (activation-induced cytidine deaminase) (Dedeoglu, Horwitz et al. 2004).

IL-10 wird von Monozyten und Th2-Zellen produziert und wirkt hemmend auf die Makrophagenfunktion. Es wurde auch der schützende Effekt von IL-10 auf die Autoimmunerkrankung Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in der Maus beschrieben (Fillatreau, Sweeney et al. 2002). Dabei stammte das IL-10 von Antigen-spezifischen B-Zellen, die zuvor T-Zell-abhängig aktiviert worden waren.

IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von verschiedenen T-Zellen wie Th17-Zellen, aber auch von Natürlichen Killerzellen und Neutrophilen produziert wird. Es reguliert die Expression proinflammatorischer Zytokine hoch, ist an der Rekrutierung von Neutrophilen an den Entzündungsort beteiligt und wird vor allem in Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen gebracht (Waite and Skokos 2012).

IFN- $\gamma$  wird von aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killerzellen freigesetzt und ist in verschiedenster Weise an der Immunantwort beteiligt: Unter anderem werden Antigene

vermehrt von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert und führen so zur Erkennung und Zerstörung von Pathogenen (Larkin, Ahmed et al. 2013). Dabei spielt die Ausgewogenheit dieses Signalwegs eine wichtige Rolle, da ein exzessives Signal mit Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythematoses in Verbindung gebracht werden konnte (Baechler, Batliwalla et al. 2003). Es gilt als charakteristisches Zytokin einer Th1-Antwort (Perona-Wright, Mohrs et al. 2010).

Gr-1 ist ein Molekül, das auf der Oberfläche von Neutrophilen (Granulozyten) exprimiert wird. Es gehört zur Ly6-Familie (Fleming, Fleming et al. 1993). Diese umfasst die beiden Moleküle Ly6C und Ly6G, welche auf murinen Neutrophilen vorkommen und an die der Gr-1-Antikörper RB6-8C5 bindet. Während es Nachweise für die Beteiligung von Ly6C am Homing von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gibt (Hickey 2012), scheint Ly6G womöglich eine Rolle für die Fähigkeit von Neutrophilen zur Rekrutierung zu spielen (Wang, Bair et al. 2012).

Der CC Chemokinrezeptor 5 (CCR5) wird von T-Zellen exprimiert und ist beteiligt an der chemotaktischen Anlockung von Leukozyten an Entzündungsorte, insbesondere der Rekrutierung von Makrophagen, T-Zellen und Monozyten (de Oliveira, Oda et al. 2014). Die Expression des Rezeptors konnte auch auf regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden (Bystry, Aluvihare et al. 2001). Hingegen wird eine Expression abhängig von der Polarisierung Richtung Th1 und Th2 kontrovers diskutiert (Bonicchi, Bianchi et al. 1998; Sallusto, Lenig et al. 1998). Werden T-Zellen aktiviert, kommt es auch zur Hochregulierung der Expression dieses Rezeptors. Dies ermöglicht den aktivierten T-Zellen die Einwanderung in das entzündete Gewebe.

FcγR2b ist ein inhibierender Rezeptor, der auf allen Zellen des Immunsystems, bis auf T-Zellen und Natürliche Killerzellen, exprimiert wird (Nimmerjahn and Ravetch 2006). Die Unterscheidung in die inhibierende oder aktivierende Eigenschaft des Rezeptors hängen mit dem von ihm getriggerten Signalweg zusammen. So reguliert dieser Rezeptor auf B-Zellen die aktivierenden Signale, die über den B-Zell-Rezeptor verarbeitet werden (Nimmerjahn and Ravetch 2008).

Fc $\gamma$ R4 hingegen ist ein aktivierender Rezeptor in der Maus, der auf Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert wird und von Th1-Zytokinen wie IFN- $\gamma$  hochreguliert wird (Nimmerjahn and Ravetch 2006).

#### **1.1.4 Beeinflussung der Wundheilung während der EBA**

Therapieformen wie das zuvor genannte IVIG-Verfahren geben einen Hinweis auf das Potential der vielfältigen Immunmodulation bei EBA-Patienten. Daher könnte ein Ansatz, um die Wundheilung zu modulieren, in der Anwendung verschiedener Proteine bestehen, die auf das Zytokinmilieu und die Immunzellen wirken. Dafür wurde eine kommerziell erhältliche Präparation aus Komplexen intrazellulärer Proteine und Nukleinsäuren ausgewählt, die unter normalen Umständen nicht in das umgebende Gewebe gelangen. Diese Komplexe aus Proteinen und Nukleinsäuren wurden in den 1980er Jahren am Friedrich-Loeffler-Institut entdeckt und unter der Bezeichnung RiV (Reaktionsmuster in Vertebratenzellen) bekannt (Solisch 1986). Es handelt sich um Partikel mit einem Durchmesser zwischen 30 und 70nm, die in ihrer Erscheinung Exosomen ähneln. Nachdem Vertebratenzellen (Zellen aus der Kälberniere) durch Nährstoffmangel unter Stress gesetzt wurden, konnte man oben genannte Partikel in Ultradünnschnitten nachweisen. Zu der Präparation isolierter Partikel liegen bisher kaum breit angelegte Studien vor. Sie wurden im Tiermodell als experimenteller Impfstoff bei laryngealer Papillomatose (Brandt, Christoph et al. 1980), Maul- und Klauenseuche in Meerschweinchen (Solisch, Nöckler et al. 1986), Mammakarzinom der Maus (Solisch, Wazel et al. 1987) und murinem Myelom eingesetzt. Auch bei – meist austherapierten – AIDS-, Krebs- und Hepatitis C-Patienten kam es in einigen Fällen zur Anwendung (Liebermann, Sietmann et al. 2005; Liebermann and Müller 2008). Diese Präparation, im Folgenden als Protein-Nukleinsäuren-Komplexe (PNACs) bezeichnet, enthält unter anderem Heat Shock Proteine.

## 1.2 Fragestellung

Für die vorliegende Arbeit ergeben sich daher zwei Fragestellungen:

Es soll untersucht werden, ob das adaptive Immunsystem, wie im aktiven Modell bereits bekannt, auch im passiven Modell beteiligt ist. Im passiven Modell wird – anders als im aktiven – nur die Effektorphase der EBA-Erkrankung reproduziert. So kommt es nach der Injektion von Kaninchen-Antikörpern zur Bindung an das Antigen, zur Aktivierung des Komplementsystems und letztlich zu einer Entzündung. Da es aber im passiven Modell zu einer zeitlichen Verzögerung von etwa vier bis sechs Tagen zwischen der Injektion der Antikörper und der Ausbildung der Wunden kommt, stellt sich darüber hinaus die Frage, worauf diese Beobachtung zurückzuführen ist. Womöglich könnten T-Zellen für die beschriebene Verzögerung verantwortlich sein. Daher soll weiterhin analysiert werden, ob und welche Rolle T-Zellen in diesem Modell spielen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll geklärt werden, ob es möglich ist, über PNACs Einfluss auf die Wundheilung zu nehmen. Der Schweregrad der EBA-Erkrankung hängt von zwei Faktoren ab: der Pathologie der Erkrankung und dem Grad der Wundheilung. Bei einer starken Ausprägung der Blasen und Wunden verschlimmert sich das Gesamterscheinungsbild. Liegt hingegen ein hohes Maß an Wundheilung vor, verbessert sich das Gesamterscheinungsbild. Daher bietet die Wundheilung einen möglichen Angriffspunkt, um die Erkrankung modulieren zu können. Dabei sollen Komplexe aus intrazellulären Proteinen und Nukleinsäuren (PNACs) zur Anwendung kommen.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Mäuse

Für die Experimente mit Mäusen wurden weibliche Mäuse vom Stamm C57BL/6NCrl verwendet. Die Mäuse wurden im Alter von zehn Wochen von Charles River Laboratories (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld) bezogen. C57BL/6Ly5.1-Mäuse stammten aus eigener Zucht (Prof. Dr. med. Jürgen Westermann, Universität zu Lübeck). Für körperliche Untersuchungen wurden die Tiere narkotisiert (Aqua dest., 5mg/ml Ketanest S, 1,5mg/ml Rompun, steril filtriert) und die Augen vor dem Austrocknen mit Bepanthen Augensalbe geschützt. Die Tötung erfolgte mit Kohlenstoffdioxid.

Die Tiere wurden aufgrund folgender Tierversuchsanträge genehmigt:

Tierversuchsanzeige: „Einfluss einer mechanischen Reizung der Haut auf die Entstehung von autoimmuninduzierten Blasen – Untersuchungen am passiven Mausmodell der EBA“ (61-4/12), Antragsteller: Dr. rer. nat. Kathrin Kalies.

Tierversuchsanzeige: „Modulation des Verlaufs einer Autoimmunerkrankung der Haut – Untersuchungen am passiven Mausmodell der EBA“ (195-10), gültig bis 30.12.2013, Antragsteller: Dr. rer. nat. Kathrin Kalies.

Tierversuchsanzeige zur Organentnahme: „Identifikation von relevanten Zellen und Faktoren bei der Epidermolysis bullosa acquisita“ (V 312-772241.12271 / 9277 / 09), gültig vom 15.07.2010, Antragsteller: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann, Stellvertreter: Prof. Dr. med. Peter König.

Die Tiere wurden gemäß dem Tierschutzgesetz Schleswig-Holstein gehalten.

### 2.1.2 Medien, Puffer und Stocklösungen

10x Stocklösung Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Aqua bidest, 2,5mM KCl, 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 140mM NaCl, 6,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,25 (mit HCl)	
10x Stocklösung Tris-gepufferte Saline (TBS)	Aqua dest., 0,5M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,6 (mit HCl)	
10x Stocklösung Tween-20	Aqua dest., 5% Tween-20	
APAAP-Substrat (100ml)	0,02g Naphthol AS-MX Phosphat, 2ml N,N-Dimethylformamid, 98ml 0,1M Tris pH 8,2, 100µl 1M Levamisol	
DEPC-H <sub>2</sub> O	Aqua bidest., 0,1% DEPC	
Eindeckmittel für Fluoreszenzfärbung Mowiol (Gebrauchslösung)	12g Mowiol in 30ml Aqua dest. lösen, 60ml 0,2M Tris Puffer (in Aqua dest., pH 8,5 mit HCl eingestellt) dazu geben, über Nacht rühren; Lösung im Wasserbad rühren, dabei langsam auf 90°C erhitzen, bei dieser Temperatur 45 Minuten rühren; langsam auf 50°C abkühlen lassen und 24ml fluoreszenzfreies Glycerin vorsichtig untermischen, mit 1N NaOH auf pH 8,5 einstellen	
MACS-Puffer	PBS, 2mM EDTA, 0,5% BSA	
TBS-Tween	TBS, 0,05% Tween® 20	
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Hxx-502	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Williams' E Kulturmedium	#F1115	Biochrom AG, Berlin

**2.1.3 Antikörper für FACS-Färbung**

Alexa Fluor® 647 Rat-Anti Mouse CD19 (1D3)	#557684	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
PE Hamster Anti-Mouse TCR $\beta$ Chain (H57-597)	#553172	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

**2.1.4 Antikörper für immunhistologische Präparate**

Hamster Anti-Mouse Fc $\gamma$ RIV (Clone 9E9)		Falk Nimmerjahn, Universität Erlangen, Erlangen
Hamster Anti-Mouse TCR- $\beta$ (biotinyliert)	553169	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Mouse Anti-Human CD31	M 0823	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Rat Anti-Mouse B220	01121	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rat Anti-Mouse F4/80	ab6640	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
Rat Anti-Mouse Ki-67 (Clone TEC-3)	M 7249	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Goat Anti-Mouse C3 (Fluoreszein-gekoppelt)	0855500	MP Biomedicals GmbH, Heidelberg

---

Goat Anti-Mouse IgG1 (Alexa Fluor® 555-gekoppelt)	A21127	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Goat Anti-Mouse IgG2c (FITC-gekoppelt)	A90-136F	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA
Red Goat Anti-Mouse IgG- Rhodamine	115-285-062	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, Suffolk, Großbritannien
Rabbit Anti-Mouse IgG (FITC-gekoppelt)	F 0261	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Rat Anti-Mouse IgG1 (FITC-gekoppelt)	553443	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rat Anti-Mouse IgG2b (FITC-gekoppelt)	553395	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Rabbit Anti-Mouse	Z 0259	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Rabbit Anti-Rat (biotinyliert)	E 0468	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase	E2636	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ExtrAvidin®-Peroxidase	E2886	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim



**2.1.5 Verbrauchsmaterialien**

6-Well Gewebekulturplatten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
96-Well Multiply®-PCR Platten, Polypropylen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Biopsiestanzen, 2mm (REF 48201, PZN 3010542)	KAI Europe GmbH, Solingen
Biopsiestanzen, 4mm (REF 48401, PZN 3010631)	KAI Europe GmbH, Solingen
Combitips, unsteril	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläschen	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
Einwegspritzen 1ml, steril (BD PlastiPak™)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FACS-Röhrchen, 5ml, steril	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Falcon-Gefäße, 15ml und 50ml	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Glasobjektträger Superfrost ISO 8037/1	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig
Handschuhe Safeskin Satin plus	Kimberly-Clark GmbH, Mainz
Injektionskanülen, 0,45 x 13mm (BD Microlance™ 3)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Injektionskanülen Sterican®, Gr. 18		B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Insulinspritzen 1ml (BD Micro-Fine™ + Insulinspritzen)		BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Kryoröhrchen		Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Petrischalen, 10cm		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1,5ml, Polypropylen		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 2ml Safe Seal		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Protein G Sepharose Fast Flow Column chromatography		Merck KGaA, Darmstadt
Safe Lock Tubes, 1,5ml		Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25ml)		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzenfilter PET, 0,2µm		C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Steritop-GP, 0,22µm (vakuumbetriebener Flaschenaufsatzfilter)		Merck Millipore, Billerica, MA, USA

### 2.1.6 Übrige Reagenzien

Aceton	9372.5	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Amphotericin (Fungizone)	#15290-026	Gibco, Darmstadt

BK-RiV		Varicula Biotec GmbH, Teterow
Bovines Serumalbumin (BSA)	A4503	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	1024312500	Merck KGaA, Darmstadt
DAB (3,3`-Diaminobenzidin) (Substrat-Chromogen System: DAB+ Chromogen, DAB+ Substratpuffer)	K 3468	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DAPI		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DEPC		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP-Mix (10mM)	20-301	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
EDTA		Serva GmbH, Heidelberg
Einbettmedium, Shandon Cryomatrix Embedding resin	67-690-06	Thermo Scientific, Karlsruhe
Einbettmedium, Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	#4583	Leica Instruments, Nussloch
Eindeckmittel, Aquatex®	108562	Merck KGaA, Darmstadt
Eindeckmittel, Entellan®	107960	Merck KGaA, Darmstadt

Eindeckmittel, Fluoromount-G	0100-01	SouthernBiotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA
Ethanol, 70% und 100%		C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fast Blue	F3378	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fast Red	F2768	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fettstift, Dako Pen	S 2002	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
First Strand Buffer, 5x		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd	1039992500	Merck KGaA, Darmstadt
Formamid	F7503	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FTY720	10006292, CAS 162359-56-0	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Glutaraldehyd	23114.01	Serva GmbH, Heidelberg
Glycerin für die Fluoreszenzmikroskopie	104095	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin		C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

HCl		C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hoechst 33342, Fluoreszenzfarbstoff	H3570	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hydrocortison	H0135	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
innuPREP RNA Mini Kit		Analytik Jena AG, Jena
Insulin	I1882	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KCl		Merck KGaA, Darmstadt
Ketanest S, 25mg/ml	PZN 8509909	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Merck KGaA, Darmstadt
Levamisol ((-)-Tetramisol Hydrochlorid)	L9756	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	M11-004	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Mayers Hämalaunlösung	1092490500	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	4627.5	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mowiol® 4-88		Hoechst AG, Frankfurt- Höchst

---

NaCl	106404	Merck KGaA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	106579	Merck KGaA, Darmstadt
NaN <sub>3</sub>	1066880100	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	6771.1	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Naphthol AS-MX Phosphat	N4875	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N,N-Dimethylformamid	40240 Fluka	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Normales Kaninchenserum		c.c.pro GmbH, Oberdorla
Normal Mouse Serum	10410	Caltag Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	0335.3	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	P11-010	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
qPCR Mastermix Plus		Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Random-Primer		MWG Biotech AG, Ebersberg
Reverse Transkriptase, BD PowerScript™		BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Rompun 20mg/ml	PZN 1320422	Bayer HealthCare AG, Leverkusen
Skalpellklingen No. 25		Dimeda Instrumente GmbH, Tuttlingen
Trinatriumcitrat Dihydrat	C7254	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	08003	Biomol GmbH, Hamburg
Tween® 20	37470	Serva GmbH, Heidelberg

### 2.1.7 Geräte

ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Windsor, Berkshire, Großbritannien
Digitaler Blockthermostat	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
FACSCanto II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Heizblock	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Laser-Scanning Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Magnetrührer IKA Combimag RET	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen

Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Operationsbesteck (Instrumente aus hochlegiertem Edelstahl)	Präparierschere, fein; Pinzette, anatomisch; Pinzette, chirurgisch; Uhrmacherpinzette; Skalpellhalter
Peristaltic Pump P-1	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
pH-Meter Beckman 3500 digital	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Serienschnittmikrotom, HYRAX C 50, Kryostat	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumkonzentrationszentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Waage, Kern 440-51N, Messgenauigkeit 1g	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage, OHAUS Adventurer™, Messgenauigkeit 0,1mg	Ohaus GmbH, Gießen



Wasserbad, Typ 3048	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen
Zählkammer, Neubauer improved (Tiefe 0,02mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0R /2.0R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zentrifuge MiniSpin® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
<b>2.1.8 Software</b>	
Adobe® Acrobat® 8 Professional	Adobe Systems, Inc., San José, CA, USA
Adobe® Illustrator® CS3	Adobe Systems, Inc., San José, CA, USA
Adobe® Photoshop® CS3	Adobe Systems, Inc., San José, CA, USA
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
EndNote X6	Thomson Reuters, Philadelphia, PA, USA
FACSDiva™ Version 6.1.1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
GraphPad Prism® 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ	<a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/">http://rsb.info.nih.gov/ij/</a>
LSM 510 Meta 3.2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
LSM Image Browser Rel. 4.2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Microsoft® Excel® 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

Microsoft ICE	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Word® 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
SDS 2.2.1	Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA
SDS 2.4	Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Aufreinigung von Kaninchen-IgG

Kaninchen-IgG wurde aus dem Serum von Kaninchen gewonnen, die bei einem kommerziellen Anbieter (Eurogentec S.A., Seraing, Belgien) mit einem rekombinanten Fragment des murinen Kollagens Typ VII immunisiert worden waren. Kontroll IgG, welches aus dem kommerziell erhältlichen Serum gesunder, nicht immunisierter Kaninchen gewonnen wurde, wurde ebenso aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte über eine hiTrap Protein G-Säule. Sie enthielt somit eine Vielzahl verschiedener IgG-Antikörper, die im Kaninchen zirkulierten. Zusätzlich dazu wurden auch Kollagen Typ VII-spezifische IgG-Antikörper über eine zuvor dafür hergestellte Säule (mColVIIc) aufgereinigt. Diese wurden in den Versuchen mit FTY (Abschnitt 3.2, Abbildungen 16 bis 21) verwendet. Bei allen anderen Versuchen wurde das „Gesamt-IgG“ der mit Kollagen Typ VII immunisierten Kaninchen verwendet. Um es jedoch vom Kontroll IgG abzugrenzen, werden beide Präparationen im weiteren Verlauf als „Kollagen Typ VII-spezifisches IgG“ bezeichnet.

**Aufreinigung über Protein G-Säule:** Am Tag vor der geplanten Aufreinigung wurde die Säule mit dem 10- bis 20-fachen Säulenvolumen an PBS gewaschen. Zu Beginn der Aufreinigung wurde das noch nicht angeschlossene Pumpsystem mit PBS gewaschen (Fließrate 1ml/min), dabei wurde Luftblasenbildung vermieden. 1,5ml-Reaktionsgefäße mit 75µl Tris-base (1M in Aqua bidest., pH 9) zur Neutralisierung wurden vorbereitet. Die Säule wurde an das Pumpsystem angeschlossen und mit 10ml PBS gewaschen. Das Kaninchenserum wurde auf die Säule aufgetragen, dabei wurde Luftblasenbildung vermieden. Die Säule wurde mit 20ml PBS gewaschen. Für die Eluierung wurden 10ml Glycin-HCl (0,1M in Aqua bidest., pH 2,8) aufgetragen. Das Eluat wurde in den vorbereiteten Gefäßen in 1ml-Fractionen aufgefangen und die Konzentration im Photometer (OD280) bestimmt. Die Fractionen mit der höchsten Konzentration wurden vereinigt und mit Tris-base auf pH 7,1 bis 7,2 eingestellt. Nach der Eluierung wurde die Säule so lange mit 0,1M Glycin-HCl gewaschen, bis keine Antikörper mehr von der Säule eluiert wurden und die OD 0,000 betrug.

Anschließend wurde die Säule mit 10ml PBS gewaschen. Zur Aufbewahrung wurde die Säule mit 10ml 20% Ethanol gewaschen und bei 4°C in 20% Ethanol aufbewahrt. Das Pumpsystem wurde zur Reinigung ebenfalls mit 20% Ethanol gewaschen. Die eluierten Antikörper wurden nun einer Dialyse in PBS unterzogen, zuerst mit 2,5ml PBS für 3 Stunden bei 4°C, anschließend mit 2,5ml frischem PBS über Nacht (4°C). Die vereinigte Fraktion wurde drei Mal für 10 Minuten zentrifugiert (4°C, 4000rpm). Dabei wurde jeweils der Durchlauf verworfen und 4ml frisches PBS hinzugefügt. Die Konzentration der vereinigten IgG-Fraktion wurde schließlich in einem Volumen von 5ml bestimmt. Die Antikörper wurden bei 4°C aufbewahrt.

**Herstellung einer mColVIIc-spezifischen Säule:** 1ml mCol7c-His (4,8mg/ml) wurde in einen Dialyseschlauch gegeben. Dieses wurde bei 4°C für 3 bis 4 Stunden in 2450ml MOPS-Puffer (0,1M MOPS, 0,08M CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5 mit NaOH) dialysiert. Anschließend erfolgte die Dialyse in 2500ml frischem MOPS-Puffer über Nacht (4°C). Das dialysierte Protein wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Affi-Gel 10 wurde durch Schütteln gleichmäßig suspendiert. 4ml davon wurden in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 2000rpm und 4°C herunterzentrifugiert. Der gelöste Überstand wurde verworfen. Das Gel wurde zwei Mal mit 2ml MOPS-Puffer gewaschen, dabei wurde es nach dem Hinzufügen gemischt und der Überstand nach der Zentrifugation verworfen. Nun wurde das dialysierte mCol7c-His hinzugefügt, dabei wurde aus einigen Mikrolitern die Konzentration vor der Vereinigung bestimmt. Das Gel wurde mit dem Protein gemischt und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert (RT). Anschließend wurde das Gemisch bei 2000rpm und 4°C herunterzentrifugiert, der gelöste Überstand wurde verworfen, nachdem aus einigen Mikrolitern die Konzentration bestimmt worden war. Die Bindungsrate zwischen Gel und His-Tag-Protein wurde bestimmt (obige Konzentrationsbestimmung im Photometer bei OD280), dabei sollte nach der Bindung möglichst kein freies Protein im Überstand zu finden sein. Zum Gemisch wurden nun 2ml MOPS-Puffer sowie 0,2ml 1M Ethanolamin (pH 8) hinzugefügt, gemischt und auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert (RT). Dies wurde bei 2000rpm und 4°C herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. 2ml PBS wurden hinzugefügt und

gemischt, dies wurde dann in eine Säule transferiert. Etwas PBS wurde zum verbliebenen Gelrest hinzugefügt und auf die Säule gegeben. Das untere Ende der Säule wurde geöffnet, sodass das PBS ablaufen konnte. Schließlich wurden 10ml PBS auf die Säule gegeben, dabei wurde ein Filter verwendet, um die Ablagerung von Staub auf der Säule zu vermeiden. Zur Aufbewahrung wurde die Säule mit 20% Ethanol gewaschen. Das untere Ende wurde verschlossen, 5ml 20% Ethanol hinzugefügt und die Säule bei 4°C aufbewahrt.

### **Aufreinigung von spezifischem Kaninchen-IgG unter Verwendung der hergestellten**

**Säule:** Oben hergestellte und aufbewahrte Säule wurde fünf Mal mit je 10ml PBS gewaschen. Flüssigkeiten wurden unter Verwendung eines Filters auf die Säule gegeben. Das dialysierte „Gesamt-IgG“ wurde auf die Säule gegeben, der Durchlauf wurde aufgefangen. Dieser wurde nun fünf weitere Male auf die Säule gegeben, dabei wurde der letzte Durchlauf als Gesamt-IgG-Fraktion ohne spezifisches mCol7c-IgG aufbewahrt. Die Säule wurde erst mit 50ml PBS, dann 25ml 0,85M NaCl mit 1% Triton-X 100 und schließlich erneut mit 50ml PBS gewaschen. Ein 15ml-Reaktionsgefäß mit 400µl 1M Tris-base (pH 9) zur Neutralisierung wurde vorbereitet. Die Eluierung wurde durch 500µl Glycin-HCl (pH 2,8) begonnen. Aus den letzten beiden Tropfen wurde im Photometer (OD280) die Konzentration bestimmt. Die Eluierung wurde fortgesetzt, bis die Konzentration das Hintergrundrauschen (OD=0,003) erreichte. Dann wurde mit 1M Tris-base (pH 9) der pH auf 7,1 bis 7,2 eingestellt. Die Säule wurde gewaschen, indem 50ml 20mM Tris (pH 7,5) aufgetragen wurden, anschließend konnte wieder Gesamt-IgG aufgetragen werden. Ansonsten wurde mit 50ml 20mM Tris (pH 7,5) mit 0,5M NaCl gewaschen und anschließend mit 50ml 20mM Tris (pH 7,5). Die Säule wurde in 20% Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Für den Pufferaustausch wurde eine Amicon Ultracel 50 NMWL Säule verwendet. Das aufgefangene Eluat wurde für 15 Minuten bei 5000g zentrifugiert, der Durchlauf wurde verworfen. Zur IgG-Suspension wurden 5ml PBS hinzugefügt, und der Zentrifugationsschritt zwei Mal wiederholt. Das Volumen der IgG-Suspension wurde auf 200µl aufkonzentriert und schließlich die Konzentration des spezifischen IgG bestimmt. Die Antikörper wurden bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Induktion der passiven EBA

Um EBA im passiven Mausmodell zu induzieren, wurde weiblichen Mäusen vom Stamm C57BL/6N wiederholt Kaninchen-IgG gegen murines Kollagen Typ VII (im Folgenden als Kollagen Typ VII-spezifisches IgG bezeichnet) injiziert. Die IgG-Antikörper wurden vier Mal, alle zwei Tage, in einer Konzentration von 5mg/Maus (100µg/Maus beim aufgereinigten spezifischen IgG) subkutan an der Bauchseite injiziert. Kontrollmäusen wurde nach demselben Injektionsschema 5mg (bzw. 100µg) unspezifisches IgG (im Folgenden als Kontroll IgG bezeichnet) pro Maus und Injektion verabreicht. Die Mäuse wurden je nach Gruppe an Tag 3, 6, 12 oder 21 (Kinetik, FTY-Behandlung) bzw. zwischen Tag 40 und 60 (PNACs-Behandlung) getötet. Die Ohrhaut sowie die inguinalen Lymphknoten als drainierende Lymphknoten der Injektionsstelle wurden für weitere Untersuchungen entnommen.

Um den Verlauf der Erkrankung zu bestimmen, wurden die Mäuse alle zwei bis drei Tage untersucht und der „Score“ als prozentual betroffene Körperoberfläche festgestellt. Dazu wurde die Körperoberfläche der Tiere in bestimmte Bereiche (z.B. Schnauze, Schwanz, Auge, Ohr) eingeteilt und analysiert. Jeder Bereich trug zu einem vorab definierten Prozentsatz zur gesamten Körperoberfläche (Tabelle 1) und dem damit verbundenen Score bei:

**Tabelle 1: Unterteilung des Körpers der Maus nach Regionen und der entsprechende prozentuale Anteil an der Körperoberfläche.**

Organ	% der Körperoberfläche
Rechtes Ohr	2,5
Linkes Ohr	2,5
Rechtes Auge	0,5
Linkes Auge	0,5
Schnauze	2,5
Mucosa	2,5
Kopf	9
Rechtes Vorderbein	5
Linkes Vorderbein	5
Rechtes Hinterbein	10
Linkes Hinterbein	10
Schwanz	10
Rücken	40

Die Behandlung mit FTY720 oder dem Vehikel (Aqua dest.) wurde zwei Tage vor der ersten IgG-Injektion begonnen. FTY720 bzw. das Vehikel wurden täglich in einer Konzentration von 1mg/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Um die Wirkung zu kontrollieren, wurden Blutproben (100µl) an Tag -2, 0, 3 und 6 entnommen und auf die Lymphozytenpopulationen hin untersucht.

Bei der Behandlung mit PNACs (200µg/ml) oder PBS erhielten die Mäuse drei Injektionen i.m. pro Woche.

### 2.2.3 Färbung der Blutproben und FACS-Analyse

In 100µl heparinisiertem Vollblut wurden die enthaltenen Erythrozyten für 5 Minuten mit 500µl 1% NH<sub>4</sub>Cl lysiert. Danach wurden die Proben für 6 Minuten bei 1100g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis der Überstand klar war (Indiz für erfolgreiche Lyse der Erythrozyten). Das Pellet wurde darauf zwei Mal mit 1000µl PBS gewaschen (☉ für 2 Minuten bei 1000g). Anschließend wurde das Pellet in 100µl MACS-Puffer gelöst, die T-Zellen mit Hamster Anti-Mouse TCR-β PE (1:500 in PBS) und die B-Zellen mit Rat-Anti Mouse CD19 Alexa 647 (1:1000 in PBS) gefärbt. Die Proben wurden für 20 Minuten im Kühlschrank im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Proben für 6 Minuten bei 1100g zentrifugiert und die ungebundenen Antikörper im Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 500µl MACS-Puffer gelöst und für die FACS-Analyse vorbereitet. Die FACS-Analyse erfolgte mit einem BD FACSCanto II unter Verwendung der FACSDiva Software. Die lebenden Zellen wurden auf die Anfärbung von TCR-β und CD19 hin untersucht, dabei wurden die Dubletten ausgeschlossen.

### 2.2.4 Immunhistologische Färbungen

Kryoschnitte von Haut und Lymphknoten von Mäusen wurden Färbungen für Gr-1, TCR-β, Ki-67 B220 und FcγR4 unterzogen. Im Folgenden sind die einzelnen Färbungen beschrieben.

**Gr-1:** Die Präparate wurden gegen F4/80, einen Marker für eosinophile Granulozyten, gefärbt, um in den Schnitten die neutrophilen Granulozyten zu detektieren. Die Objektträger wurden für 10 Minuten bei -20°C in Methanol/Aceton (1:1) inkubiert, anschließend mit TBS-Tween gewaschen (kurz, dann für 10 Minuten). Nun erfolgte für eine Stunde eine Inkubation mit dem Primärantikörper Rat Anti-Mouse F4/80 (1:1000). Die ungebundenen Antikörper wurden durch das Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Der biotinylierte Sekundärantikörper Rabbit Anti-Rat (1:500, mit 5% Normal Mouse Serum) wurde aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden erneut durch Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Nun wurde für 30 Minuten mit der ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase (1:100) inkubiert und ungebundene



Antikörper durch Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Das gekoppelte Substrat Fast Red (0,067% in APAAP-Substrat, 10 Minuten inkubiert vor Verwendung) für die Phosphatase wurde zugegeben und für 25 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) wurde für 20 Sekunden eine Kernfärbung mit Hämalaun (1:5 in PBS, pH 7,4, filtriert) durchgeführt. Die Präparate wurden schließlich mit PBS gewaschen (kurz, dann für 10 Minuten) und mit Aquatex eingedeckt.

**TCR-  $\beta$ :** Um die T-Zellen zu identifizieren, wurden die Präparate gegen den Rezeptor TCR- $\beta$  gefärbt. Zuerst wurden die Objektträger für 10 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Methanol/Aceton (1:1) inkubiert, anschließend mit TBS-Tween gewaschen (2 x 5 Minuten). Nun erfolgte für eine Stunde eine Inkubation mit dem biotinylierten Primärantikörper Hamster Anti-Mouse TCR- $\beta$  (1:100). Die ungebundenen Antikörper wurden durch das Waschen in TBS-Tween (5 Minuten) entfernt. Der Sekundärantikörper ExtrAvidin<sup>®</sup>-Peroxidase (1:100) wurde aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden erneut durch Waschen in TBS-Tween (5 Minuten) entfernt. Nun wurde für 5 Minuten mit DAB (1:100), einem Enzymsubstrat für die Peroxidase, inkubiert und ungebundener Farbstoff durch Waschen in TBS-Tween (2 x 5 Minuten) entfernt. Die Präparate wurden schließlich mit Aquatex eingedeckt.

**Ki-67 B220:** Um in Lymphknoten sowohl die Zellproliferation als auch die Verteilung der T- und B-Zellen betrachten zu können, wurden die Lymphknotenschnitte einer Doppelfärbung unterzogen. Der Antikörper gegen das Protein Ki-67 (Klon TEC-3) färbt dabei proliferierende Zellen rot an, während der Antikörper gegen B220 die B-Zellen blau markiert. Dafür wurden die Objektträger zu Beginn für 30 Minuten aufgetaut und bei RT erst für 10 Minuten in Chloroform inkubiert, dann für weitere 10 Minuten in Aceton (RT). Anschließend wurden sie mit TBS-Tween erst kurz und dann für 10 Minuten gewaschen. Für 45 Minuten erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$  eine Inkubation in 4% Paraformaldehyd. Nach dem Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) wurden die Präparate über Nacht mit dem Primärantikörper Rat Anti-Mouse Ki-67 (1:100 in PBS, 1% BSA, 0,1%  $\text{NaN}_3$ ). Die ungebundenen Antikörper wurden mit dem Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für

10 Minuten) entfernt. Der biotinylierte Sekundärantikörper Rabbit Anti-Rat (1:500, mit 5% Normal Mouse Serum) wurde aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden erneut durch Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 15 Minuten) entfernt. Nun wurde für 30 Minuten mit dem gekoppelten Enzymantikörper ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase (1:100) inkubiert, ungebundener Antikörper wurde durch Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Das gekoppelte Substrat Fast Red (0,067% in APAAP-Substrat, 10 Minuten inkubiert vor Verwendung) für die Phosphatase wurde zugegeben und für 25 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) wurden die Präparate gegen das zweite Antigen gefärbt. Für eine Stunde erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Rabbit Anti-Mouse B220 (1:100 in PBS, 1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub>). Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Anschließend wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper Rabbit Anti-Rat (1:500, mit 5% Normal Mouse Serum) aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Nun wurde der gekoppelte Enzymantikörper ExtrAvidin® Alkaline Phosphatase (1:100) aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Das gekoppelte Substrat Fast Blue (0,1% in APAAP-Substrat, 10 Minuten inkubiert und filtriert verwendet) wurde für 15 Minuten inkubiert und der Überschuss anschließend durch Waschen mit TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Schließlich wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

**FcyR4:** Die Präparate wurden gegen den FcyR4 gefärbt, um in den Schnitten die Zellen auszumachen, die diesen Rezeptor tragen, welcher einen aktivierenden Faktor während der EBA-Erkrankung darstellt. Die Objektträger wurden für 10 Minuten bei -20°C in Methanol/Aceton (1:1) inkubiert, anschließend mit TBS-Tween erst kurz und dann für 10 Minuten gewaschen. Über Nacht erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper Hamster Anti-Mouse 9E9 (1:500 in PBS, 1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub>). Die ungebundenen Antikörper wurden mit dem Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Der

Sekundärantikörper Goat Anti-Hamster Alkalische Phosphatase (1:50, mit 5% Normal Mouse Serum) wurde aufgetragen und für 1 Stunde inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden erneut durch Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Das gekoppelte Substrat Fast Red (0,067% in APAAP-Substrat, 10 Minuten inkubiert vor Verwendung) für die Phosphatase wurde zugegeben und für 25 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) wurde eine schwache Kernfärbung mit Hämalaun (1:5 in PBS, pH 7,4, filtriert) durchgeführt. Die Präparate wurden schließlich mit PBS gewaschen (kurz, dann für 10 Minuten) und mit Aquatex eingedeckt.

Die Proliferation in der T-Zell-Zone (TZZ) wurde bestimmt, indem die Anzahl der proliferierenden Zellen in zwei hochaktiven Bereichen der Lymphknoten jeder einzelnen Maus ausgezählt wurde, daraus wurde der Mittelwert gebildet.

Kryoschnitte der Haut wurden außerdem auch mit Fluoreszenzfarbstoffen gegen Kaninchen-IgG und C3 angefärbt. Anhand von Aufnahmen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Ablagerung an der dermal-epidermalen Junctionszone mittels ImageJ bestimmt.

**IgG:** Um die Ablagerung des Kaninchen-IgG zu detektieren, wurden die Präparate mit einem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper gefärbt. Dazu wurden die Objektträger zuerst für 10 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Methanol/Aceton (1:1) inkubiert, anschließend mit TBS-Tween erst kurz und dann für 10 Minuten gewaschen. Es folgte für eine Stunde eine Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Antikörper Rabbit Anti-Mouse IgG (1:100). Die ungebundenen Antikörper wurden lichtgeschützt durch das Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Nun wurde für 10 Minuten eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (1:10000 in PBS) durchgeführt. Nach dem lichtgeschützten Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurden die Präparate schließlich mit Mowiol eingedeckt.

**C3:** Die Präparate wurden gegen C3 gefärbt, einen Faktor der Komplementkaskade. Dazu wurden die Objektträger zuerst für 10 Minuten bei -20°C in Methanol/Aceton (1:1) inkubiert, anschließend mit TBS-Tween erst kurz und dann für 10 Minuten gewaschen. Es folgte für eine Stunde eine Inkubation mit dem fluoreszierenden Antikörper Goat Anti-Mouse C3 (1:200). Die ungebundenen Antikörper wurden lichtgeschützt durch das Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) entfernt. Nun wurde für 10 Minuten eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (1:10000 in PBS) durchgeführt. Nach dem lichtgeschützten Waschen in TBS-Tween (kurz, dann für 10 Minuten) zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurden die Präparate schließlich mit Mowiol eingedeckt.

### 2.2.5 qRT-PCR

Entnommene Haut sowie Lymphknoten von Mäusen wurden einer Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR unterzogen. Dafür wurde im ersten Schritt RNA aus den Proben extrahiert, anschließend in cDNA umgeschrieben und schließlich unter Verwendung verschiedener Primer amplifiziert.

Folgende Primer wurden verwendet:

MLN51 Sonde (5'-CACGGGAACCTTCGAGGTGTGCCTAAC-3')

MLN51 for (5'-CCAAGCCAGCCTTCATTCTTG-3')

MLN51 rev (5'-TAACGCTTAGCTCGACCACTCTG-3')

IFN- $\gamma$  Sonde (5'-TGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAG-3')

IFN- $\gamma$  for (5'-GCAAGGCGAAAAAGGATGC-3')

IFN- $\gamma$  rev (5'-GACCACTCGGATGAGCTCATTG-3')

IL-1 $\beta$  Sonde (5'-CATCTTTGAAGAAGAGCCCATCCTCTGTGAC-3')

IL-1 $\beta$  for (5'-CTTCCAGGATGAGGACATGAG-3')

IL-1 $\beta$  rev (5'-CACACCAGCAGGTTATCATC-3')

IL-4 Sonde (5'-CCTGGATTCATCGATAAGCTGCACCATG-3')

IL-4 for (5'-GAGACTCTTTCGGGCTTTTCG-3')

IL-4 rev (5'-AGGCTTTCAGGAAGTCTTTCAG-3')

IL-10 Sonde (5'-CTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCCC-3')

IL-10 for (5'-TCCCTGGGTGAGAAGCTGAAG-3')

IL-10 rev (5'-CACCTGCTCCACTGCCTTG-3')

IL-17 Sonde (5'-CACCTGGACTCTCCACCGCAATGAAG-3')

IL-17 for (5'-TCAGACTACCTCAACCGTTCC-3')

IL-17 rev (5'-CTTTCCTCCGCATTGACAC-3')

Gr-1 for (5'-GCGTTGCTCTGGAGATAGAAG-3')

Gr-1 rev (5'-CTTCACGTTGACAGCATTACC-3')

TCR- $\alpha$  for (5'-CTTCAAAGAGACCAACGCCAC-3')

TCR- $\alpha$  rev (5'-CTTTCAGCAGGAGGATTCGGAG-3')

Fc $\gamma$ R4 Sonde (5'-CTAGGCGATCCAGGGTCTCCATC-3')

Fc $\gamma$ R4 for (5'-GAGGGCTCATTGGACACAAC-3')

Fc $\gamma$ R4 rev (5'-GTCCTATCAGCAGGCAGAATG-3')

### **2.2.6 *In vitro*-Kultur der humanen Hautstanzen (Wundheilungsmodell)**

Es wurden humane Hautproben verwendet, die bei chirurgischen Eingriffen angefallen sind, nachdem der Patient über die Verwendung aufgeklärt wurde und seine Zustimmung gegeben hat. Dies erfolgte gemäß dem Ethikantrag 06-109 mit dem Titel „*In vitro*-Untersuchung der Biologie des humanen Haarfollikels in Bezug auf Wachstumseigenschaften, Apoptose, Wachstumsregulation, Pigmentierung und Immunprivileg in Haarorgankulturmodellen“ (erteilt am 18.07.2006, mit einer Ergänzung um die Wundheilungsversuche am 13.03.2012). Die Hautproben wurden in Isolationsmedium (Williams' E Kulturmedium, 1x Penicillin/Streptomycin, 2,5 $\mu$ g/ml Amphotericin) angeliefert. Sie wurden in 100mm-

Kulturschalen in Isolationsmedium ausgebreitet. Anschließend wurden 2mm-Stanzen gesetzt und durch Drehen entfernt. Um diese herum wurden 4mm-Stanzen gesetzt, sodass ausgestanzte „Ringe“ entstanden. In 6-Well Platten wurde 3ml Kulturmedium (Williams' E Kulturmedium, 1x Penicillin/Streptomycin, 1x L-Glutamin, 10µg/ml Insulin, 10ng/ml Hydrocortison) pro Well steril vorgelegt und in jedes Well zwei der Stanzen transferiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Epidermis der Hautstanzen oben lag. Die Platten mit den Proben wurden bis zu sieben Tagen im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 2 und 4 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel. Kontrollstanzen wurden sofort nach der Entnahme in Kryomedium eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C verwahrt. Die restlichen Proben wurden je nach Zeitpunkt nach drei bis vier und sechs bis sieben Tagen eingefroren. Neben den Kontrollen ohne Zusatz wurden die restlichen Proben mit dem Zusatz von 10% PBS, PNACs oder FCS inkubiert.

### **2.2.7 Färbung der humanen Hautstanzen**

Von den Hautproben wurden 12µm dicke Schnitte angefertigt und mit HE gefärbt, um das Flächen- und Längenwachstum zu analysieren.

**HE:** Um einen Überblick über das Zungenwachstum zu ermöglichen, wurden die Präparate einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (auch Hämalaun-Eosin-Färbung) unterzogen. Dabei werden durch Hämalaun saure/basophile Strukturen wie DNA enthaltende Zellkerne blau gefärbt, während Eosin basische/acidophile Strukturen wie Zytoplasma rot färbt. Die Objektträger wurden für 10 Minuten bei -20°C in Methanol/Aceton (1:1) inkubiert und anschließend mit PBS (pH 7,4) gewaschen (2 x 5 Minuten). Nun erfolgte je nach gewünschter Intensität eine Inkubation mit Hämalaun (1:5 in PBS pH 7,4, vor Gebrauch filtriert) für 1 bis 10 Minuten. Ungebundener Farbstoff wurde durch das Waschen mit PBS (2 x 5 Minuten) entfernt. Anschließend erfolgte das Bläuen durch 10-minütiges Waschen mit PBS. Dieses wurde durch einen kurzen Waschschrift in Aqua dest. entfernt. Darauf wurden die Präparate je nach gewünschter Intensität für 1 bis 3 Minuten mit 1% Eosin gefärbt, überschüssiger Farbstoff wurde durch einen kurzen Waschschrift mit Aqua dest. entfernt. Es folgte eine

Alkoholreihe, um die Schnitte zu entwässern: je ein kurzer Waschschrift in 70%, 80%, 90%, 96% und 2 x 100% Alkohol. Schließlich wurde der Alkohol durch das „Klären“ mit Xylol (3 x 2 Minuten) entfernt und die Präparate mit Entellan eingedeckt.

**MIB-1:** Um die Proliferation der Hautzellen darzustellen, wurden die Hautschnitte mit MIB-1, einem Antikörper gegen das Protein Ki-67, angefärbt. Dafür wurden die Objektträger zuerst für 10 Minuten bei -20°C in Methanol/Aceton (1:1) inkubiert, anschließend mit TBS-Tween gewaschen (2 x 5 Minuten). Nun erfolgte für eine Stunde eine Inkubation mit dem kreuzreaktiven Primärantikörper Rat Anti-Mouse MIB-1 (1:500). Die ungebundenen Antikörper wurden durch das Waschen in TBS-Tween (2 x 5 Minuten) entfernt. Der Sekundärantikörper Rabbit Anti-Mouse (1:50) wurde aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden erneut durch Waschen in TBS-Tween (2 x 5 Minuten) entfernt. Nun wurde für 30 Minuten mit dem gekoppelten Enzym Mouse APAAP (1:50) inkubiert und ungebundene Antikörper durch Waschen in TBS-Tween (2 x 5 Minuten) entfernt. Das gekoppelte Substrat Fast Red (0,067% in APAAP-Substrat, 10 Minuten inkubiert vor Verwendung) für die Phosphatase wurde zugegeben und für 25 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen in TBS-Tween (2 x 5 Minuten) wurde für 15 Sekunden eine Kernfärbung mit Hämalan (1:5 in PBS, pH 7,4, filtriert) durchgeführt. Anschließend erfolgte das Bläuen durch Waschen in PBS (2 x 5 Minuten) sowie das Eindecken in Aquatex.

**CD31:** Um die Angiogenese in den Hautschnitten zu untersuchen, wurden die Proben gegen CD31 angefärbt. In Paraffin eingebettete Schnitte wurden zwei Mal im Ofen bei 65°C für 10 Minuten in Citratpuffer (10mM NaCitrat) inkubiert, um die Antigene freizulegen. Anschließend wurden die Objektträger auf Raumtemperatur abgekühlt (1 Stunde) und bei dieser drei Mal für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden mit einem Fettstift umrandet und die Objektträger in einer Feuchtkammer platziert. Sie wurden über Nacht mit dem Primärantikörper Mouse Anti-Human CD31 (1:30) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie bei Raumtemperatur drei Mal für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Red Goat Anti-Mouse IgG-Rhodamine (1:200) aufgetragen und die Schnitte damit bei Raumtemperatur für 45 Minuten

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS (5 Minuten, RT) wurden die Schnitte mit DAPI (1µg/ml) gegengefärbt (1 Minute, RT) und überschüssiger Farbstoff mit dreimaligem Waschen in TBS (5 Minuten, RT) entfernt. Schließlich wurden sie mit Fluoromount eingedeckt.

### **2.2.8 Statistik**

Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) wiedergegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 5. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Dabei sind die Wahrscheinlichkeiten wie folgt indiziert: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  und \*\*\* $p < 0.001$ .

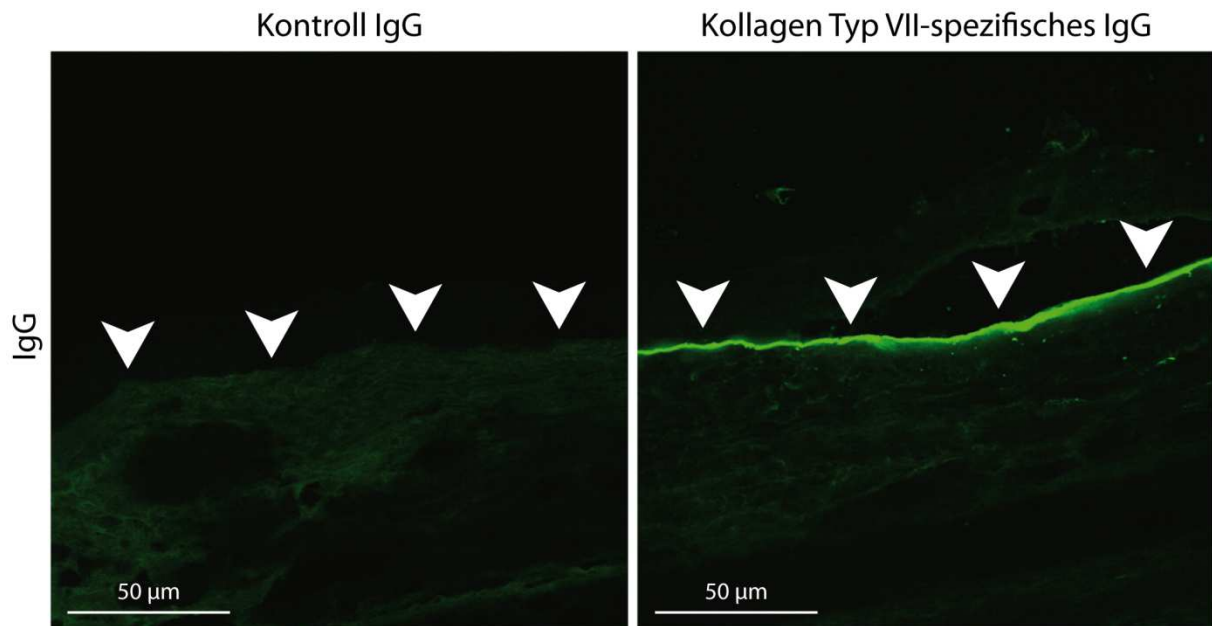


## 3 ERGEBNISSE

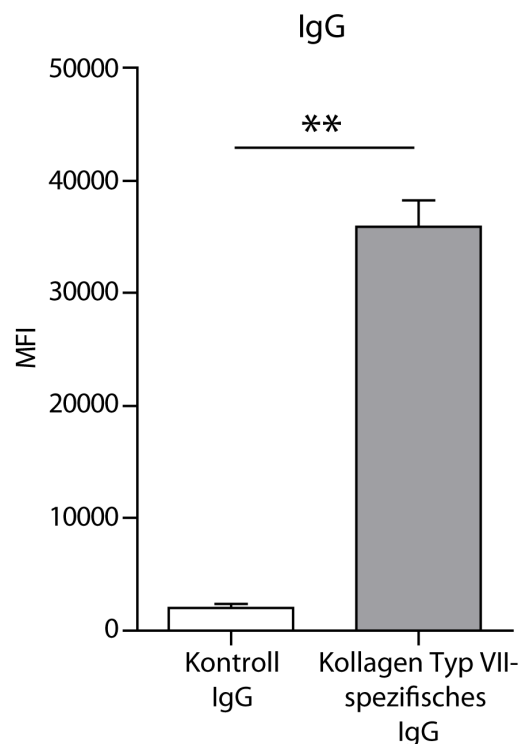
### 3.1 Beteiligung des drainierenden Lymphknotens an der passiven Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)

#### 3.1.1 Etablierung des passiven EBA-Modells

Zunächst sollte das Maus-Modell der passiven EBA im Rahmen der Doktorarbeit im Labor etabliert werden. Dazu wurde den Tieren an Tag 0, 2 und 4 Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG injiziert. An Tag 6 wurde die Ohrhaut entnommen und es wurde immunhistochemisch untersucht, ob sich die Antikörper in der Haut an der dermal-epidermalen Junctionszone (DEJ) abgelagerten. Dazu wurden Schnitte der Ohrhaut spezifisch gegen Kaninchen-IgG gefärbt (Abbildung 2). Nur in den Tieren, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, war eine Ablagerung zu sehen. Im nächsten Schritt wurde die Intensität der spezifischen Färbung gegen Kaninchen-IgG mittels ImageJ quantifiziert (Abbildung 3). In den Mäusen, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, war die Intensität der Färbung signifikant erhöht im Vergleich zu den Mäusen, die Kontroll IgG erhalten hatten. Nur das spezifische IgG lagerte sich ab.

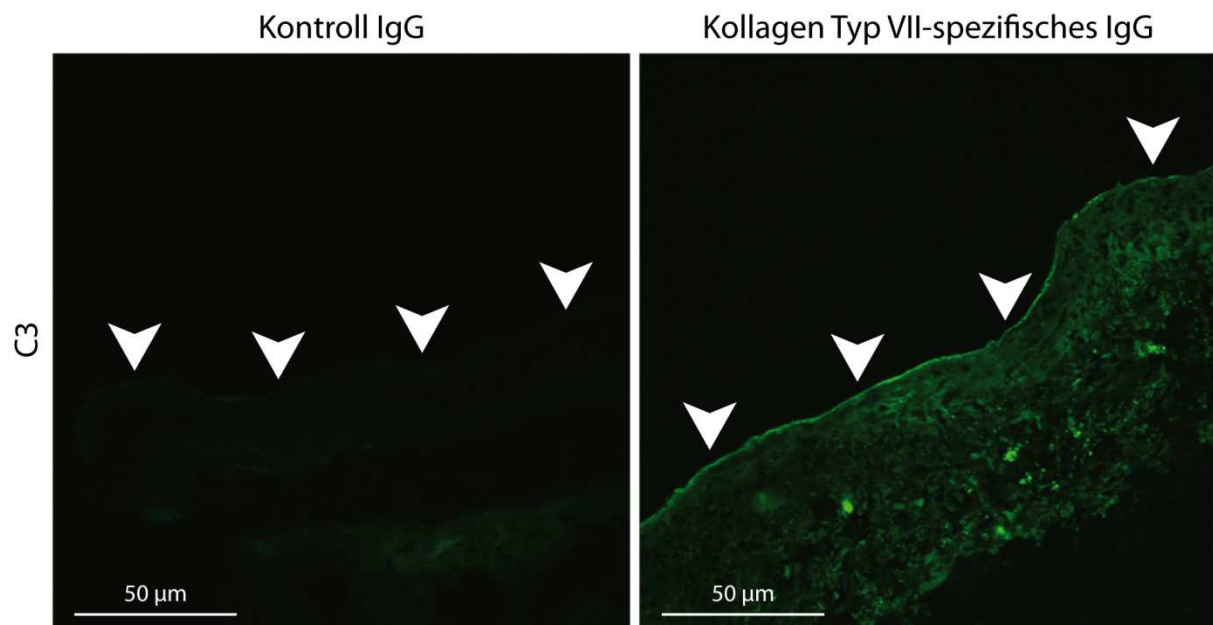


**Abbildung 2: Die Ablagerung von IgG an der dermal-epidermalen Junktionszone (DEJ) ist nur nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurde die Ohrhaut entnommen und gegen Kaninchen-IgG gefärbt. Die Pfeile markieren die DEJ. Nur auf der rechten Seite hat der Antikörper gebunden.

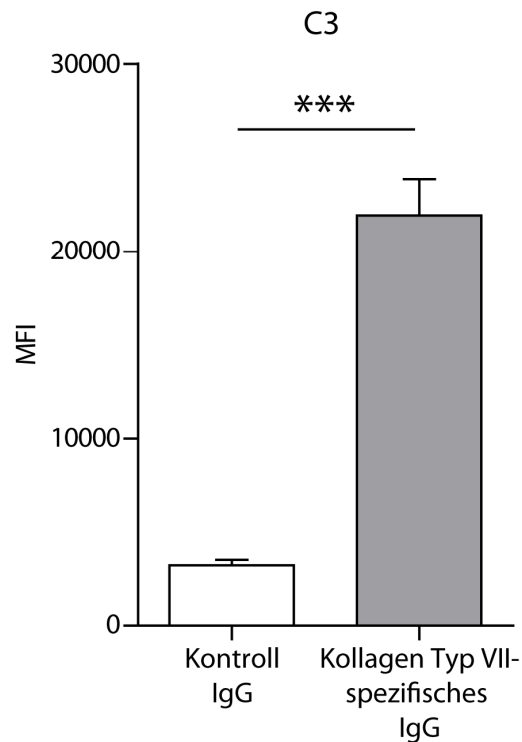


**Abbildung 3: Eine signifikante Ablagerung von IgG an der DEJ ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurde die Ohrhaut entnommen und gegen Kaninchen-IgG gefärbt. Die Intensität (MFI=mean fluorescence intensity) der spezifischen Färbung gegen Kaninchen-IgG an der DEJ wurde mittels ImageJ quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=4 bei Kontroll IgG, n=10 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG;  $**p < 0.01$ ).

Da durch IgG das Komplementsystem aktiviert wird, wurde im Folgenden die Ablagerung des Komplementfaktors C3 an der DEJ mittels Immunhistochemie untersucht. Dazu wurde den Tieren an Tag 0, 2 und 4 Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG injiziert. An Tag 6 wurde die Ohrhaut entnommen und die histologischen Schnitte wurden mit einem Fluoreszenz-Antikörper gegen C3 angefärbt (Abbildung 4). Nur in Tieren, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, war eine deutliche Färbung zu erkennen. Die Intensität der spezifischen Färbung gegen C3 wurde mittels ImageJ quantifiziert (Abbildung 5). In den Tieren, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, war die Intensität der Färbung signifikant erhöht verglichen mit den Tieren, die Kontroll IgG erhalten hatten. Nur das spezifische IgG war in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren.



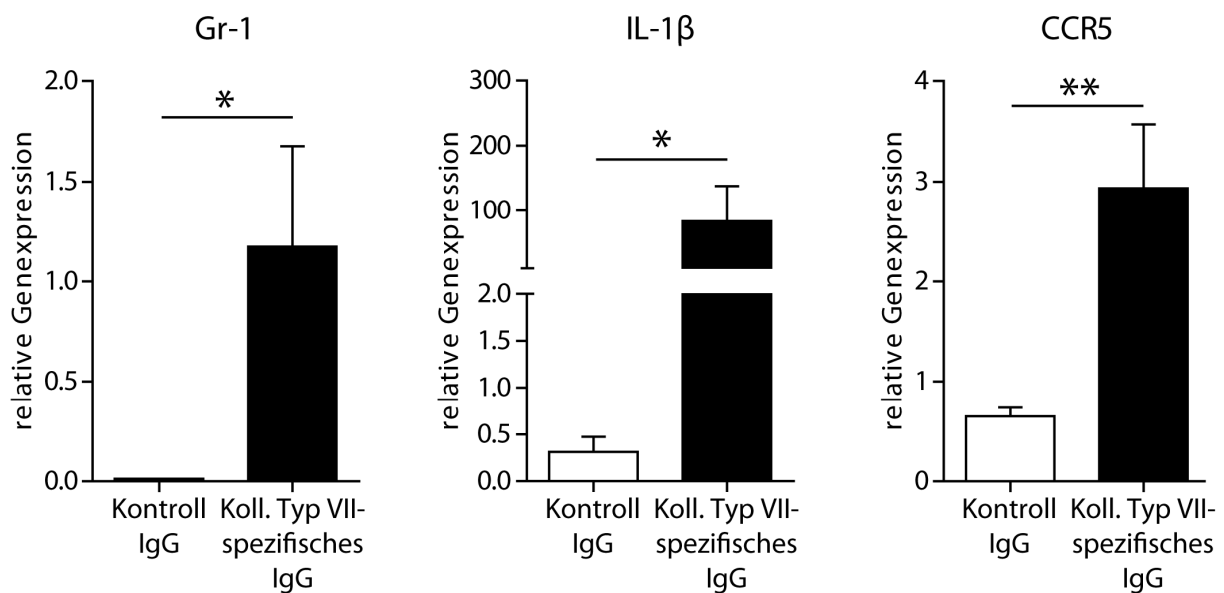
**Abbildung 4: Die Ablagerung von C3 an der DEJ ist nur nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu erkennen.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurde die Ohrhaut entnommen und gegen den Komplementfaktor C3 gefärbt. Die Pfeile markieren die DEJ. Nur auf der rechten Seite hat der Antikörper gebunden.



**Abbildung 5: Eine signifikante Ablagerung von C3 an der DEJ ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurde die Ohrhaut entnommen und gegen den Komplementfaktor C3 gefärbt. Die Intensität (MFI=mean fluorescence intensity) der spezifischen Färbung gegen C3 an der DEJ wurde mittels ImageJ quantifiziert. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=4 bei Kontroll IgG, n=10 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG; \*\*\* $p < 0.001$ ).

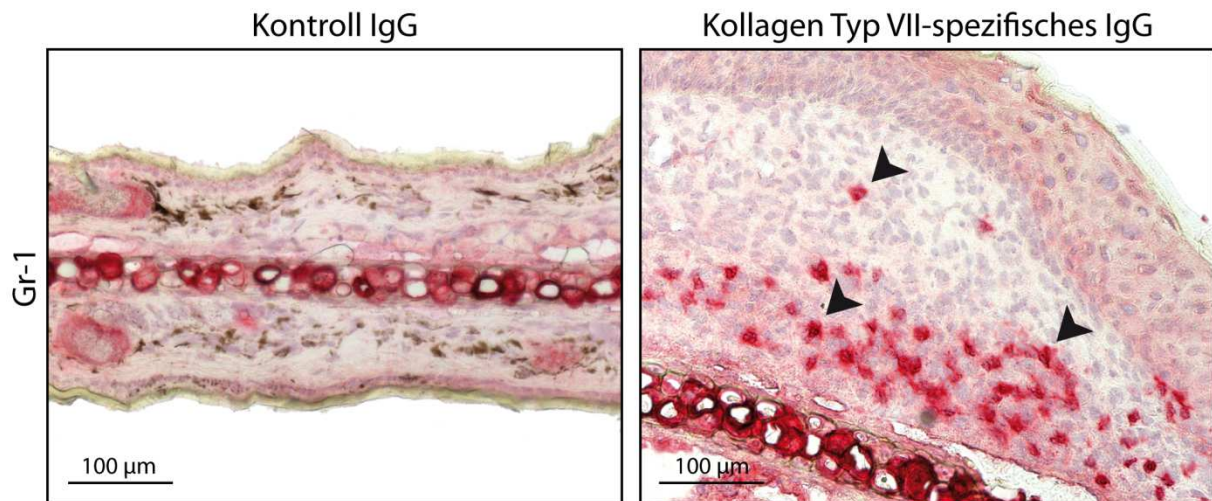
Um festzustellen, ob die Ablagerung von IgG und C3 zu einer Entzündung an der Haut führte, sollte die Genexpression bestimmter Marker in der Haut bestimmt werden. Mäusen, denen an Tag 0, 2 und 4 Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG injiziert worden war, wurde an Tag 6 die Ohrhaut entnommen. Es sollten Marker des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems untersucht werden. Beim innaten Immunsystem waren dies zum einen der Granulozytenmarker Gr-1 sowie zum anderen das Zytokin IL-1 $\beta$ , das hauptsächlich von Makrophagen abgegeben wird. CCR5 wurde als ein Marker des adaptiven Immunsystems untersucht, da dieser Rezeptor vor allem auf T-Zellen zu finden ist. Mittels qRT-PCR wurde die relative Genexpression bezogen auf das Housekeeping-Gen MLN51 bestimmt (Abbildung 6). Es zeigte sich ein einheitliches Muster: In den Mäusen, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, war die Expression von Gr-1, IL-1 $\beta$  und

CCR5 in der Haut signifikant erhöht im Vergleich zu Mäusen, denen Kontroll IgG injiziert worden war.



**Abbildung 6: Eine signifikant erhöhte Genexpression von Gr-1, IL-1β und CCR5 in der Haut ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurde die Ohrhaut entnommen und die relative Genexpression in Bezug auf MLN51 mittels qRT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=5 bei Kontroll IgG, n=5 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

Um festzustellen, ob die veränderte Genexpression auch auf Proteinebene nachweisbar war, wurde die Haut immunhistochemisch untersucht. Dies wurde am Beispiel der Granulozyten durchgeführt, die den Marker Gr-1 tragen. Mäusen wurde an Tag 0, 2, 4 und 6 Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG injiziert. An Tag 12 wurde die Ohrhaut entnommen und einer Färbung gegen Gr-1 unterzogen (Abbildung 7). Nur in den Tieren, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, konnten rot angefärbte Granulozyten nachgewiesen werden. Die Ablagerung von IgG und C3 führte sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene zu einer Entzündung.



**Abbildung 7: Granulozyten sind nur in der Haut von Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. An Tag 12 wurde die Ohrhaut entnommen und gegen Gr-1 gefärbt. Die Pfeile markieren entsprechend angefärbte Zellen.

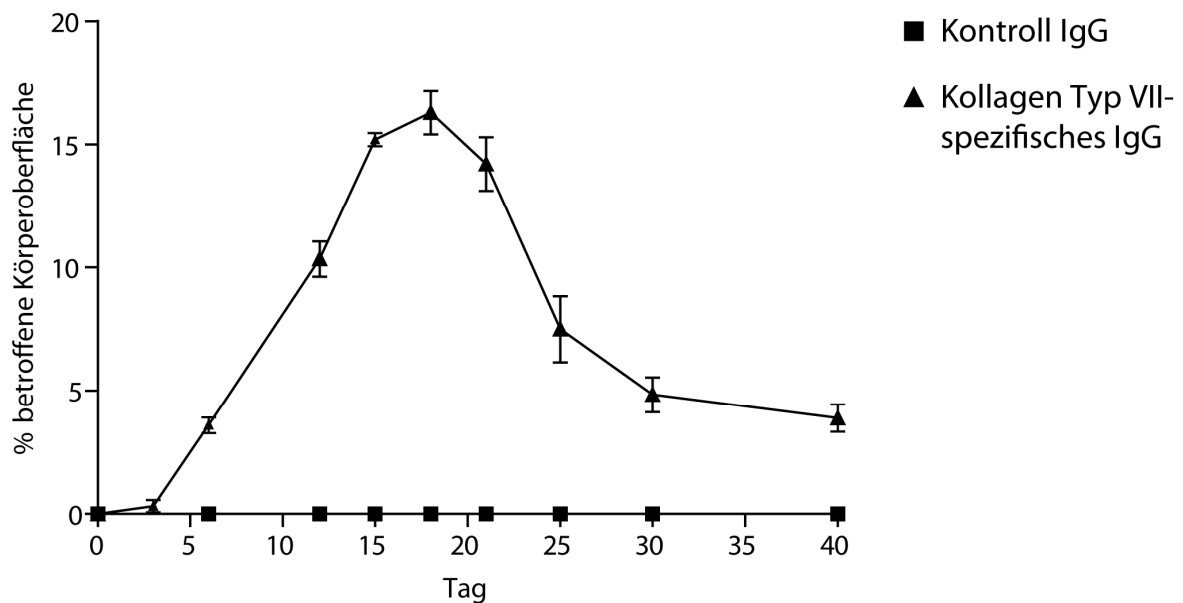
### 3.1.2 Makroskopische Wundentstehung

Um zu untersuchen, ob die nachgewiesene Entzündung an der Haut auch zu einer makroskopischen Blasenbildung führte, wurde die Körperoberfläche der Mäuse eingehend untersucht. Dazu wurden Tiere, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 erhalten hatten, an Tag 12 in Narkose gelegt, auf charakteristische Wunden und Hautveränderungen hin untersucht und fotografiert (Abbildung 8). Sie wiesen für die EBA typische Hautveränderungen wie Krusten, Erosionen, Erytheme und Alopezie an Ohren, Kopf und Schnauze sowie an den Gliedmaßen auf.



**Abbildung 8: Der charakteristische EBA-Phänotyp zeigt sich in Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG.** C57BL/6-Mäusen wurde Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 s.c. injiziert. An Tag 12 wurden die Tiere fotografiert. Sie wiesen typische Hautveränderungen (Krusten, Erosionen, Erytheme, Alopezie) an Schnauze, Kopf und Ohren sowie an den Beinen auf. Repräsentative Aufnahmen von drei Tieren wurden ausgewählt.

Um das Ausmaß der Erkrankung zu erfassen, wurde bei Mäusen der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche bestimmt und im zeitlichen Verlauf dargestellt. Dazu wurden Tiere, denen Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert worden war, zwischen Tag 0 und 40 regelmäßig untersucht (Abbildung 9). Die Mäuse, die Kontroll IgG erhalten hatten, zeigten erwartungsgemäß keinerlei Hautveränderungen (Woodley, Chang et al. 2005), während sich bei den Tieren, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, erste Wunden sechs Tage nach der ersten IgG-Injektion manifestierten. Der Anteil betroffener Körperstellen nahm in der zweiten Gruppe weiterhin zu, bis das Maximum der Erkrankung an Tag 18 beobachtet werden konnte. Anschließend nahm der Anteil der betroffenen Körperoberfläche wieder ab und erreichte nach vierzig Tagen etwa 4%. Daraus ergab sich die Frage, wodurch es zu der zeitlichen Verzögerung von sechs Tagen zwischen erster Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG und Wundentstehung kam.



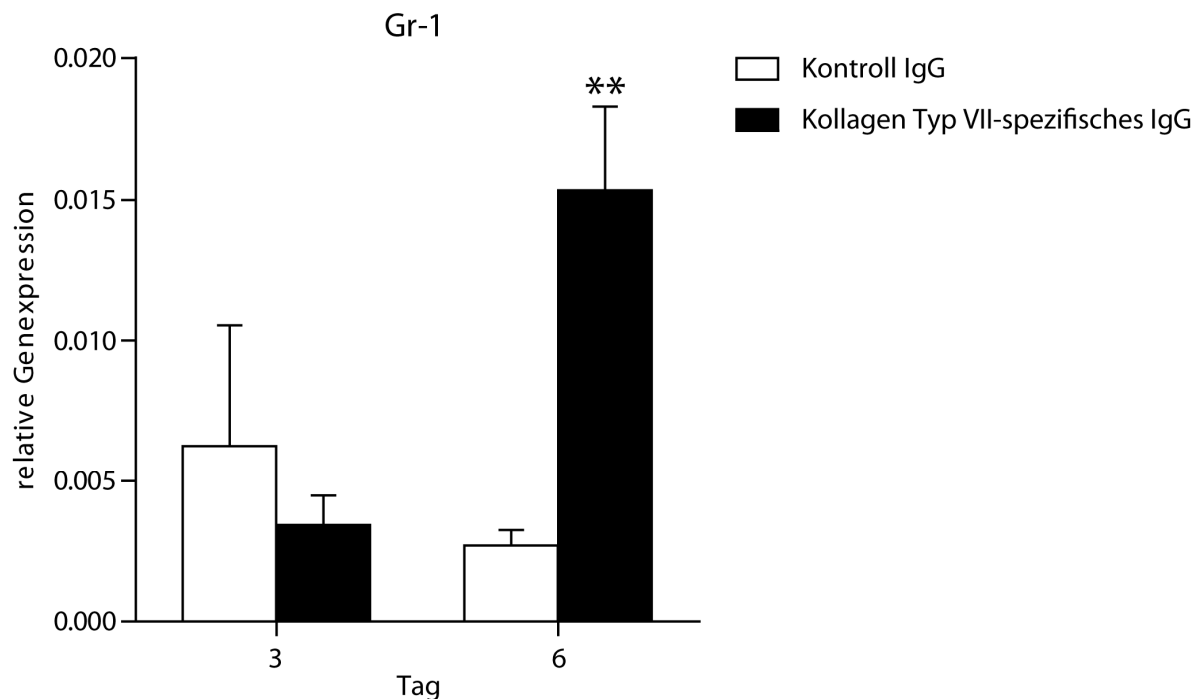
**Abbildung 9: Nur die Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG führt zu einer EBA-Erkrankung.** C57BL/6-Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 s.c. injiziert. Die Tiere wurden regelmäßig untersucht und der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche bestimmt. Mäuse, denen Kontroll IgG verabreicht wurde, zeigten über vierzig Tage hinweg keinerlei Veränderungen an der Körperoberfläche. In den Mäusen, die Injektionen mit Kollagen Typ VII-spezifischem IgG erhalten hatten, hatten sich an Tag 6 die ersten Wunden etabliert. Die Anzahl der Tiere lag in beiden Gruppen abhängig vom Zeitpunkt zwischen 5 und 20. Das Experiment wurde mit denselben Ergebnissen wiederholt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler (n=5-20 bei Kontroll IgG, n=5-20 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG).

### 3.1.3 Drainierender Lymphknoten an Erkrankung beteiligt

Um zu analysieren, wodurch es nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu der zeitlichen Verzögerung hinsichtlich der Wundentstehung an der Haut kam, wurden die Untersuchungen auf das adaptive Immunsystem ausgeweitet. Hinweise auf Zellen des adaptiven Immunsystems fanden sich bereits in der erhöhten Expression von CCR5. Um die mögliche Beteiligung des adaptiven Immunsystems zu überprüfen, wurde im Folgenden der drainierende inguinale Lymphknoten untersucht. Da es mit Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu einer Einwanderung von Granulozyten in die Haut kam, sollte auch im Lymphknoten überprüft werden, ob dies zu einer erhöhten Expression des Granulozytenmarkers Gr-1 führte. Dazu wurde Mäusen, denen Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert worden war, an Tag 3 und 6 der inguinale Lymphknoten entnommen. Die relative Genexpression von Gr-1 in Bezug auf das Housekeeping-Gen MLN51 wurde bestimmt (Abbildung 10). An Tag 3 gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

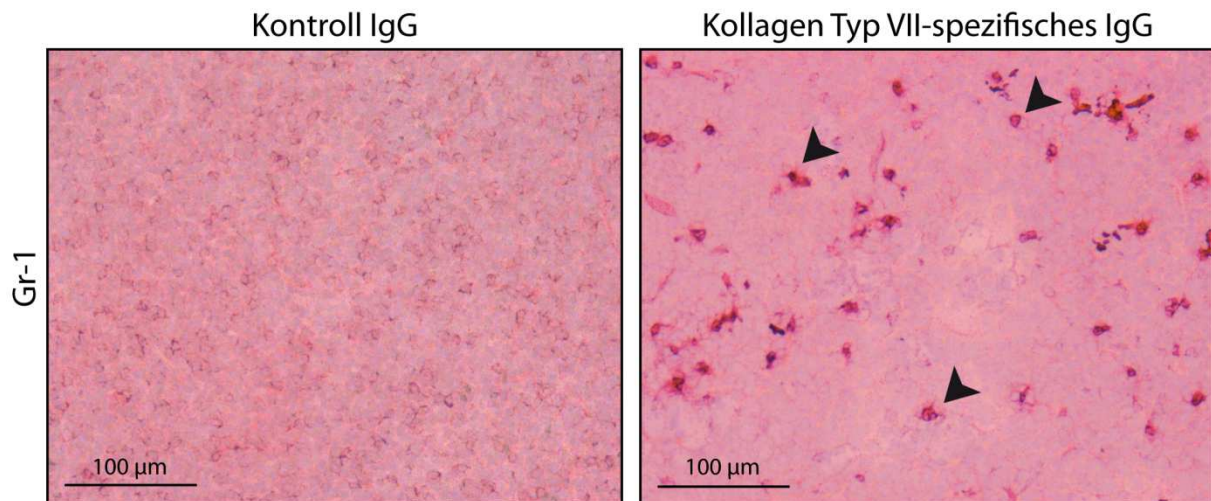


An Tag 6 war die Expression in den Mäusen, denen Kollagen Typ VII-spezifisches IgG verabreicht worden war, signifikant erhöht.



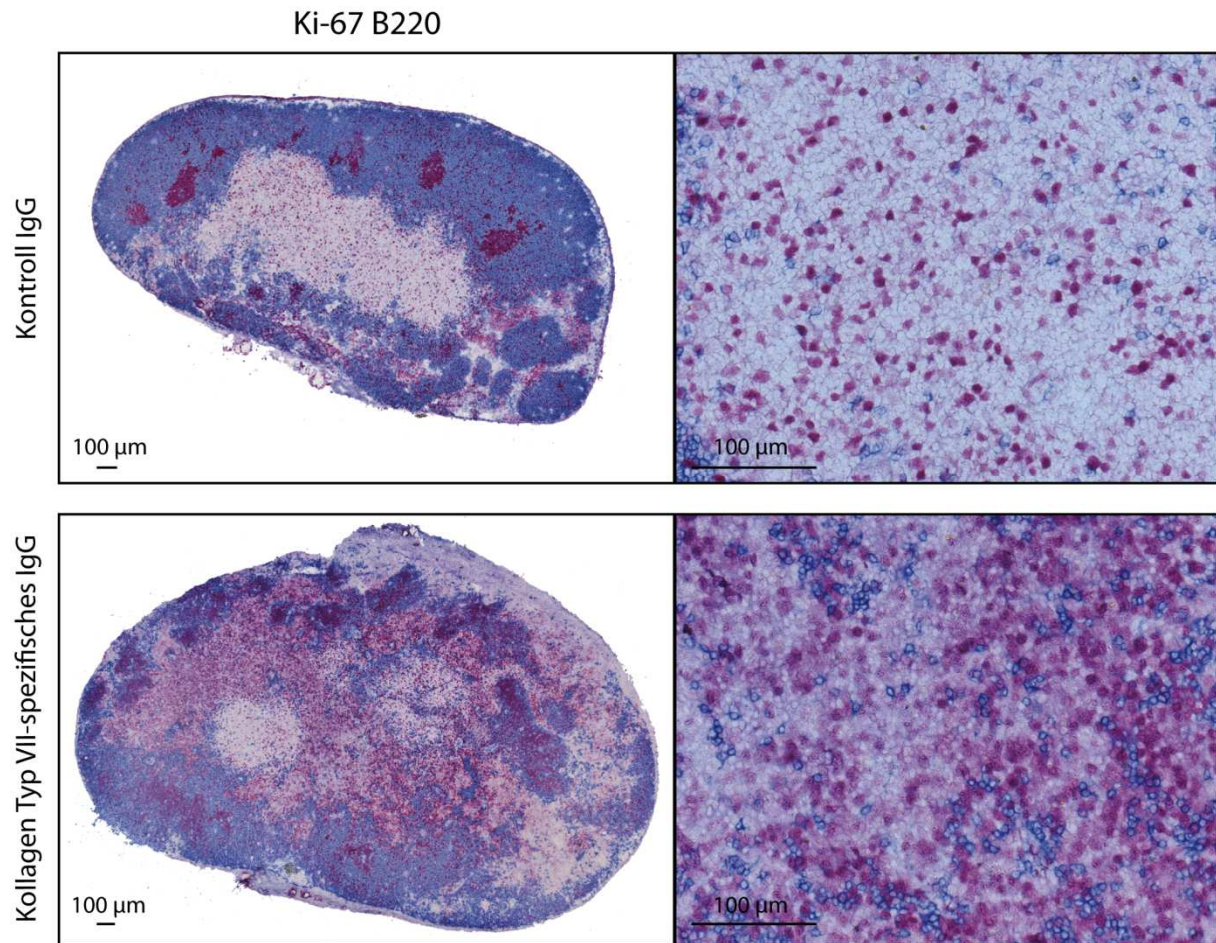
**Abbildung 10: Eine signifikant erhöhte Genexpression von Gr-1 im inguinalen Lymphknoten ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 3 und 6 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und die relative Genexpression in Bezug auf MLN51 mittels qRT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=5 bei Kontroll IgG an Tag 3 und 6; n=5 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG an Tag 3 und 6; \*\*p<0.01).

Um zu untersuchen, ob diese Veränderung auch auf Proteinebene nachzuweisen war, wurden Tieren, die Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 erhalten hatten, an Tag 6 die inguinalen Lymphknoten entnommen und histologische Schnitte gegen Gr-1 gefärbt (Abbildung 11). In der Gruppe mit Kontroll IgG wiesen die Tiere keine spezifische Färbung auf. In der Gruppe mit Kollagen Typ VII-spezifischem IgG waren deutlich und intensiv angefärbt einzelne Zellen auszumachen. Zum Zeitpunkt der Wundentstehung waren vermehrt Granulozyten in die drainierenden Lymphknoten der Mäuse mit Kollagen Typ VII-spezifischem IgG eingewandert.



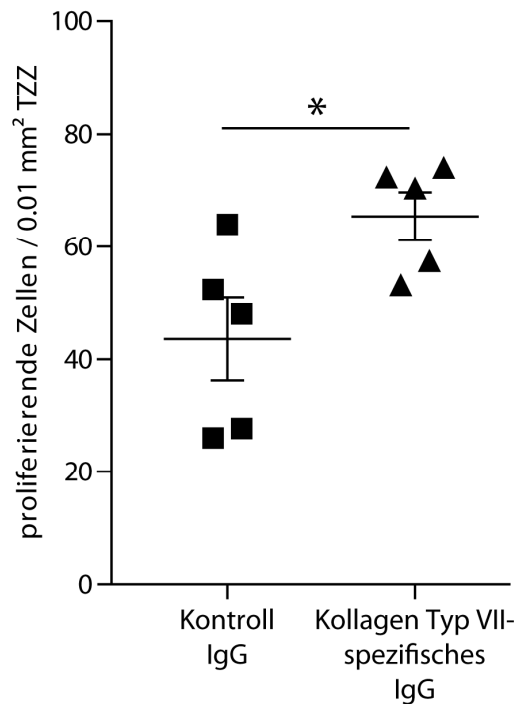
**Abbildung 11: Eindeutig angefarbte Granulozyten im Lymphknoten sind nur in Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und gegen Gr-1 gefärbt. Die Pfeile markieren entsprechend angefarbte Zellen, welche nur auf der rechten Seite auszumachen sind.

Um zu untersuchen, ob es auch zu einer Proliferation im Lymphknoten kam, wurden Mäusen nach Injektion von Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifischem IgG an Tag 0, 2 und 4 die inguinalen Lymphknoten an Tag 6 entnommen und einer Doppelfärbung gegen Ki-67 und B220 unterzogen (Abbildung 12). Die proliferierenden Zellen wurden dabei rot angefärbt gegen das Antigen Ki-67, welches nur zu finden ist, wenn sich eine Zelle im Zellzyklus befindet. Um die T-Zell-Zone von der B-Zell-Zone unterscheiden zu können, wurden die B-Zellen blau angefärbt. Die Lymphknoten der Mäuse, die Kontroll IgG verabreicht bekamen, wirkten klar strukturiert. Außen im blau angefärbten Bereich waren B-Zellen zu finden, innen im hellen Bereich waren einzelne rot angefarbte T-Zellen zu sehen. In der B-Zell-Zone fand man rot angefarbt die Keimzentren, in denen die B-Zell-Proliferation stattfindet, sie erschienen durch die Überlagerung der beiden Färbungen dunkler. Die Struktur des Lymphknotens der Mäuse, denen Kollagen Typ VII-spezifisches IgG injiziert wurde, sah verändert aus. Die Keimzentren waren nicht so klar abgegrenzt wie bei den Tieren nach Injektion von Kontroll IgG. Die T-Zell-Zone wies rot angefarbt viele proliferierende Zellen auf.



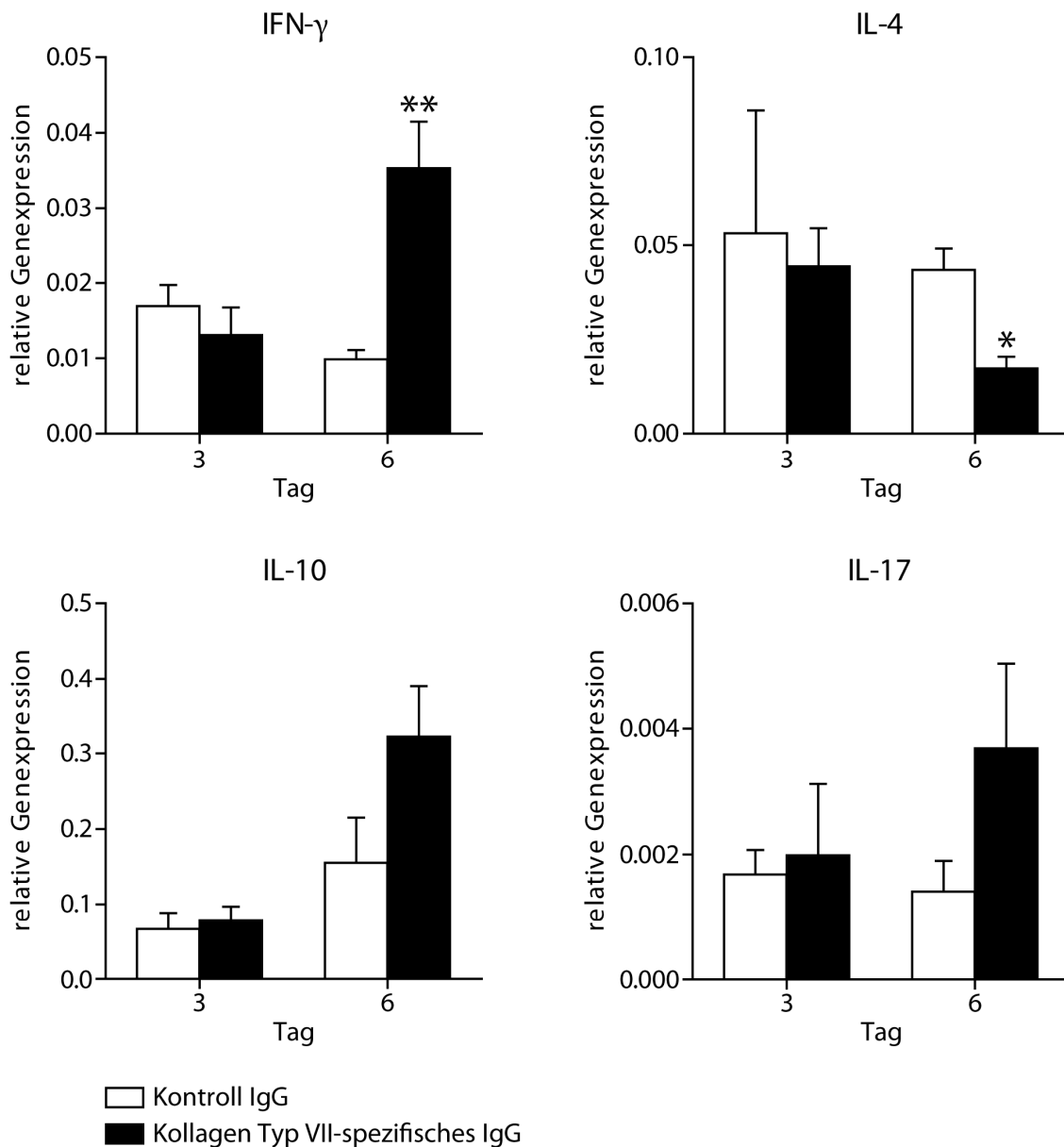
**Abbildung 12: Eine starke Proliferation in der T-Zell-Zone (TZZ) der Lymphknoten ist in Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und doppelt gegen Ki-67 (Proliferation) und B220 (B-Zell-Marker) gefärbt. Proliferierende Zellen sind rot markiert, B-Zellen blau.

Um dies zu quantifizieren, wurden in beiden Gruppen die proliferierenden Zellen in zwei 0,03 mm<sup>2</sup> großen Bereichen der T-Zell-Zone, die maximale Proliferation aufwiesen, ausgezählt (Abbildung 13). Die Proliferationsrate war in den Mäusen, denen Kollagen Typ VII-spezifisches IgG injiziert worden war, signifikant erhöht.



**Abbildung 13: Eine signifikant erhöhte Proliferation in der TZZ im inguinalen Lymphknoten ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 6 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und doppelt gegen Ki-67 (Proliferation) und B220 (B-Zell-Marker) gefärbt. Die Anzahl der proliferierenden Zellen in der TZZ wurde in zwei Bereichen von je 0,03 mm<sup>2</sup>, die maximale Proliferation aufwiesen, ausgezählt. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=5 bei Kontroll IgG, n=5 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG; \**p*<0.05).

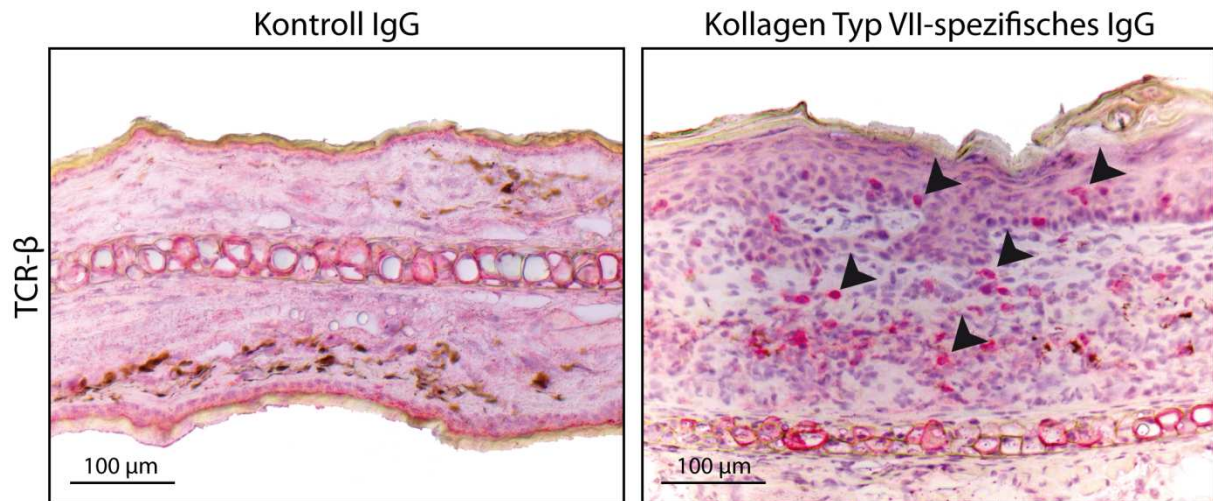
Ob die erhöhte Proliferation der Lymphknoten auch zu einer veränderten Produktion der Zytokine im Lymphknoten führte, sollte im nächsten Schritt geklärt werden. Dazu wurden Mäusen, die Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 erhalten hatten, die inguinalen Lymphknoten an Tag 3 und 6 entnommen. Die relative Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-17 wurde in Bezug auf das Housekeeping-Gen MLN51 bestimmt (Abbildung 14). An Tag 3 gab es zwischen beiden Gruppen keinen Unterschied. An Tag 6 zeigten sich in Tieren, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, drei Muster: Die Expression von IFN- $\gamma$  war signifikant erhöht, die Expression von IL-4 signifikant vermindert und bei IL-10 und IL-17 gab es keinen Unterschied zur Kontrollgruppe.



**Abbildung 14: Eine signifikant erhöhte Expression von IFN- $\gamma$  bei signifikant verminderter Expression von IL-4 im Lymphknoten ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2 und 4 injiziert. An Tag 3 und 6 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und die relative Genexpression in Bezug auf MLN51 mittels qRT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=5 bei Kontroll IgG an Tag 3 und 6, n=5 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG an Tag 3 und 6; \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01).

Da die erhöhte Proliferation in der TZZ der Lymphknoten sowie die Expression charakteristischer T-Zell-Zytokine einen Hinweis auf T-Zellen darstellten, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob T-Zellen in die Haut einwanderten. Dazu wurde Mäusen, denen Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert worden war, an Tag 12 die Ohrhaut entnommen und gegen den Rezeptor TCR- $\beta$  gefärbt

(Abbildung 15). Nur in Mäusen, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, waren T-Zellen in der Haut zu finden. In der Kontrollgruppe konnten sie nicht nachgewiesen werden. T-Zellen wanderten in die erkrankte Haut ein.



**Abbildung 15: T-Zellen sind nur in der Haut von Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.** Mäusen wurde Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. An Tag 12 wurde die Ohrhaut entnommen und gegen TCR- $\beta$  gefärbt. Die Pfeile markieren entsprechend angefärbte Zellen.

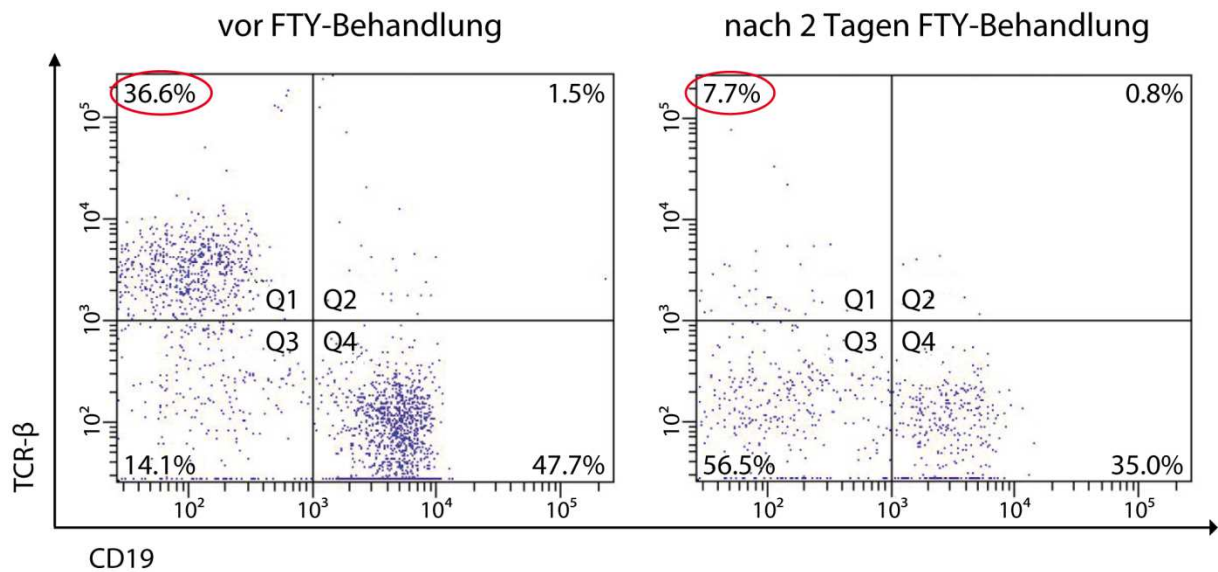
### 3.1.4 Zusammenfassung I

Im Rahmen der Doktorarbeit konnte das passive EBA-Modell im Labor etabliert werden. Es fanden sich charakteristische Ablagerungen von IgG und C3 an der DEJ. Dies führte zu einer Entzündung an der Haut mit erhöhter Zytokinexpression und äußerte sich in makroskopischen Blasen. Als neue Erkenntnis konnte zusätzlich gezeigt werden, dass T-Zellen im drainierenden Lymphknoten proliferierten, die Expression von IFN- $\gamma$  signifikant erhöht und die Expression von IL-4 signifikant vermindert war. Bisher nicht untersucht, konnte hier ebenfalls gezeigt werden, dass T-Zellen in die erkrankte Haut einwanderten.

## 3.2 Rolle der T-Zellen im passiven Modell

### 3.2.1 FTY-Behandlung vermindert Zirkulation von T-Zellen

Um eine mögliche Rolle der T-Zellen bei der Erkrankung genauer zu untersuchen, sollte ihre Zirkulation unterbunden werden. Mäusen wurde täglich der Immunmodulator FTY720, im Folgenden mit FTY abgekürzt, in einer Konzentration von 1mg/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Dieser ist ein Analogon des Sphingosin-1-Phosphats und verhindert durch Bindung an den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor die Auswanderung von T-Zellen aus den lymphatischen Organen (Matloubian, Lo et al. 2004; Rivera, Proia et al. 2008). Den Mäusen wurde vor der Behandlung und nach zwei Tagen Behandlung Blut aus der Schwanzvene entnommen und einer Erythrolyse unterzogen. Die übrigen Zellen wurden gegen TCR- $\beta$  und CD19 gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Leukozyten in einem Scatterplot angezeigt, der eine Unterscheidung der einzelnen Populationen nach Größe (Forward scatter=FSC) und Granularität (Side scatter=SSC) ermöglichte. Es wurde auf die Lymphozytenpopulation getaget, ihre Zellen wiesen unter den übrigen Leukozyten die geringste Größe und Granularität auf. In den Dot plots zweier Zeitpunkte ließen sich die unterschiedlich angefärbten Zellen unterscheiden (Abbildung 16). Diese Dot plots wurden in vier Quadranten aufgeteilt, in Q1 und Q4 fanden sich die Zellen, die eine spezifische Färbung aufwiesen, also jeweils positiv für den T-Zell-Marker TCR- $\beta$  oder den B-Zell-Marker CD19 waren. In Q2 fanden sich doppelt positive Zellen, während die Zellen in Q3 für beide Marker negativ waren. Betrachtet wurde nun Q1, in dem sich die T-Zellen befanden. Oben links ist der prozentuale Anteil dieser Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation zu sehen. Bereits nach zwei Tagen Behandlung nahm der Anteil der T-Zellen sowie ihre absolute Anzahl, zu sehen an den einzelnen Punkten, deutlich ab.

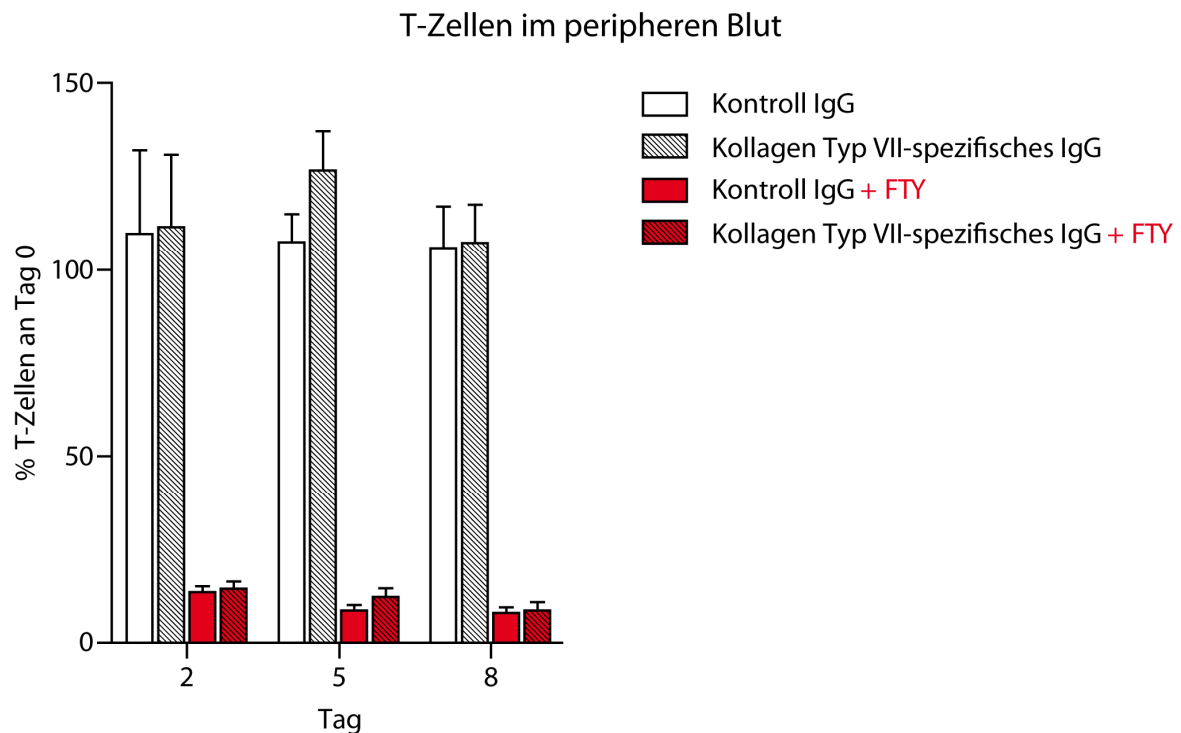


**Abbildung 16: Die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut wird durch die Behandlung mit FTY (Immunmodulator FTY720) bereits nach zwei Tagen deutlich reduziert.** Mäusen wurde täglich 1mg pro kg Körpergewicht FTY i.p. injiziert. Vor der Behandlung sowie nach zwei Tagen Behandlung wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen, einer Erythrolyse unterzogen und die Zellen gegen TCR-β und CD19 gefärbt. Anschließend wurden sie mittels Durchflusszytometrie untersucht und die Zellen im Lymphozyten-Gate wurden ausgewertet. Zu sehen sind zwei Dot plots, dabei sind die T-Zellen (TCR-β<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>) oben links im Quadranten Q1 zu finden. Ihr prozentualer Anteil an den Lymphozyten ist rot markiert.

Um festzustellen, wie sich diese Behandlung auf die T-Zellen im peripheren Blut von Mäusen, die Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG verabreicht bekamen, auswirkte, wurden die Tiere in vier Gruppen unterteilt. Es wurde an Tag 0 mit der Behandlung begonnen, dabei wurde ihnen für vierzehn Tage täglich ein Vehikel oder FTY injiziert. Nach zwei Tagen dieser vorbehandelnden Injektionen wurde mit der Injektion der Antikörper begonnen, die tägliche Injektion von Vehikel oder FTY wurde parallel dazu fortgeführt. Die Vehikel-Mäuse erhielten Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG, ebenso die Tiere der FTY-Gruppe. Die Antikörper wurden an Tag 2, 4 und 6 injiziert. Das Blut wurde an Tag 0, 2, 5 und 8 entnommen. Nach einer Erythrolyse wurden die Zellen gegen TCR-β und CD19 gefärbt. Im Lymphozytengate wurden die T-Zellen betrachtet. Dabei wurde ihr Anteil an Tag 0, also vor der Behandlung, als 100% gesetzt. Die späteren Zeitpunkte wurden jeweils in Relation zu diesem Wert gesetzt (Abbildung 17). Zwei Aussagen ließen sich nun treffen: Die Abnahme der T-Zellen im Blut stellte einen spezifischen FTY-Effekt dar, der mit dem Vehikel nicht auftrat. Weiterhin war dieser Effekt unabhängig von der Art der injizierten



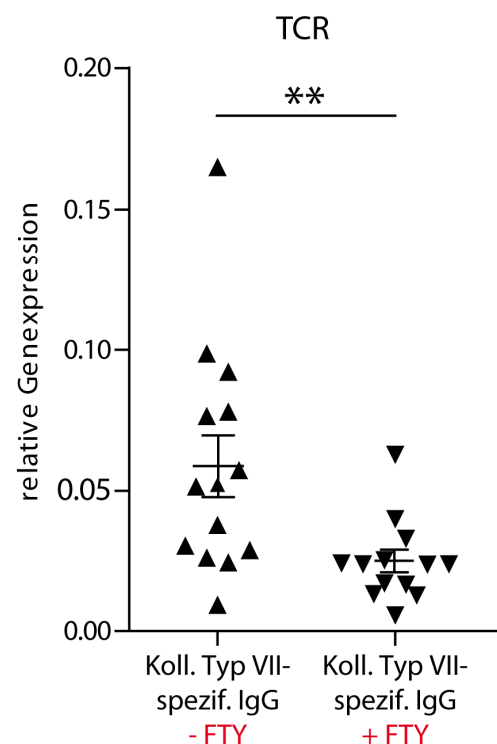
Antikörper, er trat sowohl bei Kontroll IgG als auch bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG auf.



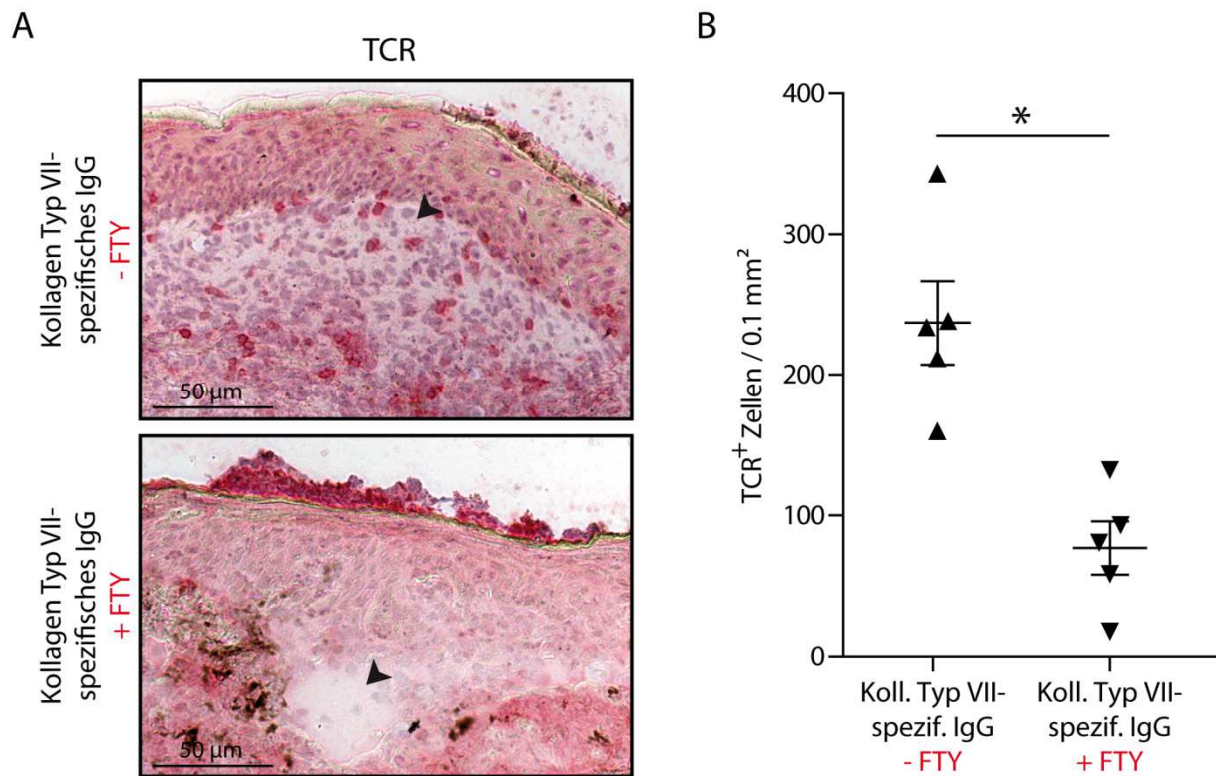
**Abbildung 17: Die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut ist während der Behandlung mit FTY, unabhängig vom applizierten Antikörper, deutlich reduziert.** Mäusen wurde für vierzehn Tage täglich ein Vehikel (weiß) oder 1mg/kg Körpergewicht FTY (rot) i.p. injiziert. Nach zwei Injektionen dieser Vorbehandlung wurde den Tieren Kontroll IgG (einfarbig) oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG (schraffiert) an Tag 2, 4 und 6 injiziert, dabei wurde die tägliche Injektion von Vehikel oder FTY fortgeführt. An Tag 0, 2, 5 und 8 wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen, einer Erythrolyse unterzogen und die Zellen gegen TCR- $\beta$  und CD19 gefärbt. Anschließend wurden sie mittels Durchflusszytometrie untersucht und die Zellen im Lymphozyten-Gate wurden ausgewertet. Die T-Zellen an Tag 0, also vor Beginn der Behandlung, wurden als 100% gesetzt und die Werte der folgenden Tage darauf bezogen. Die Anzahl der Tiere lag in allen Gruppen an Tag 2 und 5 bei 15 und an Tag 8 bei 10. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler (n=10-15 bei Kontroll IgG, n=10-15 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG, n=10-15 bei Kontroll IgG + FTY, n=10-15 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG +FTY).

Um zu untersuchen, ob die Abnahme der T-Zellen auch in der Haut nachzuweisen war, wurde im nächsten Schritt die Ohrhaut untersucht. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf Kollagen Typ VII-spezifisches IgG, da nach der Injektion von Kontroll IgG keine T-Zellen in der Haut zu finden waren. Mäuse wurden vierzehn Tage lang täglich mit einem Vehikel oder FTY behandelt, nach zwei Tagen dieser Vorbehandlung wurde ihnen Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert, während die Behandlung mit dem Vehikel oder FTY parallel fortgeführt wurde. An Tag 3, 6 und 12 wurde

die Ohrhaut entnommen und die relative Genexpression des Rezeptors TCR- $\alpha$  in Bezug auf das Housekeeping-Gen MLN51 bestimmt (Abbildung 18). Die Behandlung mit FTY führte zu einer signifikanten Abnahme der T-Zellen in der Haut, gemessen an der Expression des Rezeptors TCR. Um diese Feststellung auf Proteinebene zu untersuchen, wurde die Ohrhaut an Tag 12 entnommen und einer Färbung gegen TCR- $\beta$  unterzogen (Abbildung 19). Mit dem Vehikel waren T-Zellen in der Haut zu finden, mit FTY waren kaum bis keine zu sehen (A). Dies wurde quantifiziert, indem die Anzahl der T-Zellen je Fläche ausgezählt wurde (B). Ihre Anzahl war während der FTY-Behandlung signifikant vermindert.

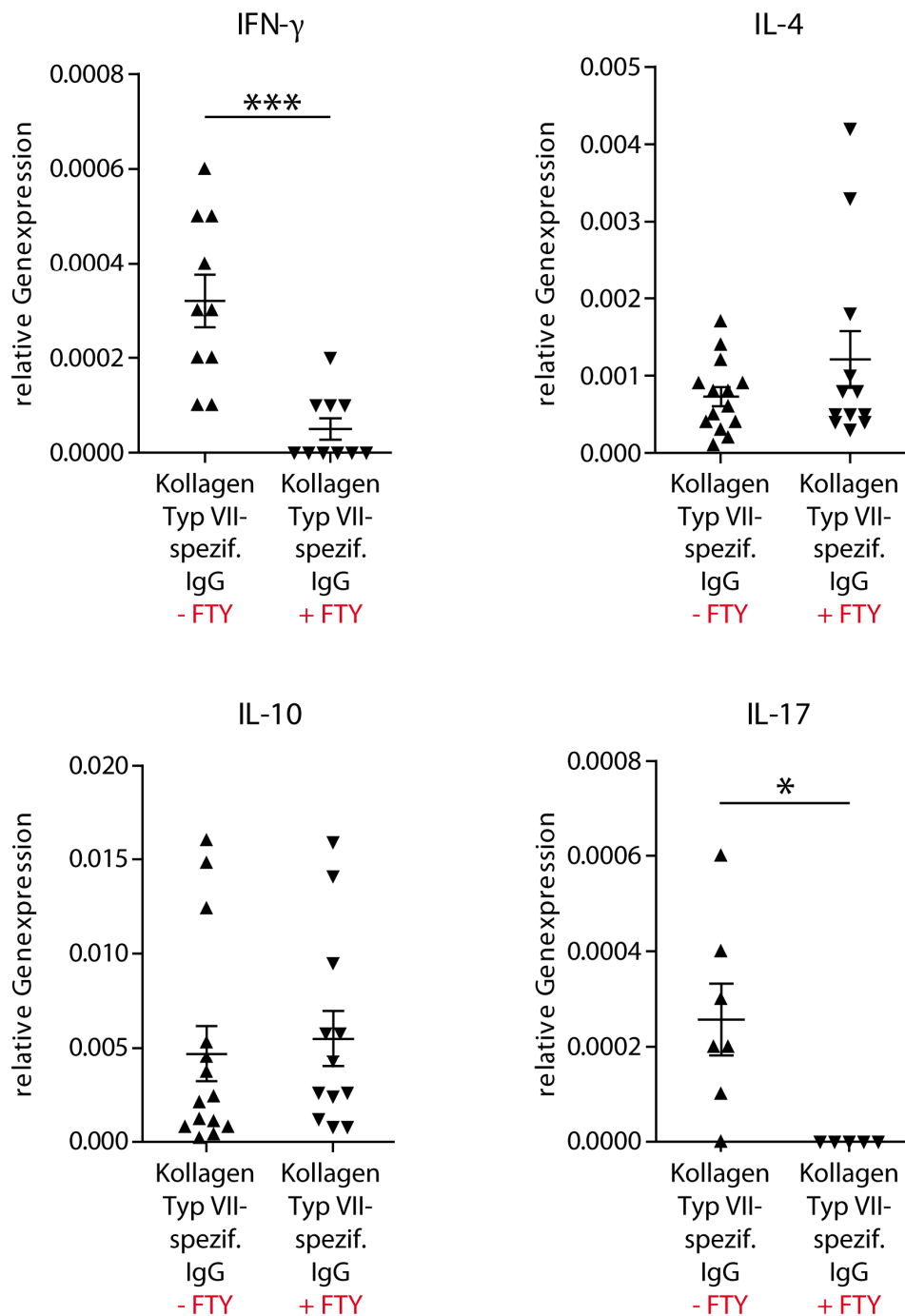


**Abbildung 18: Die Behandlung mit FTY reduziert signifikant die Expression von TCR (T-Zell-Rezeptor) in der Haut von Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG.** Mäusen wurde für vierzehn Tage täglich ein Vehikel oder 1mg/kg Körpergewicht FTY i.p. injiziert. Nach zwei Injektionen dieser Vorbehandlung wurde den Tieren Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert, dabei wurde die tägliche Injektion von Vehikel oder FTY fortgeführt. An Tag 3, 6 und 12 wurde die Ohrhaut entnommen. Die relative Genexpression von TCR- $\alpha$  in Bezug auf MLN51 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Mit FTY zeigte sich eine signifikant verminderte Expression. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=14 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG – FTY, n=13 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG + FTY; \*\* $p < 0.01$ ).



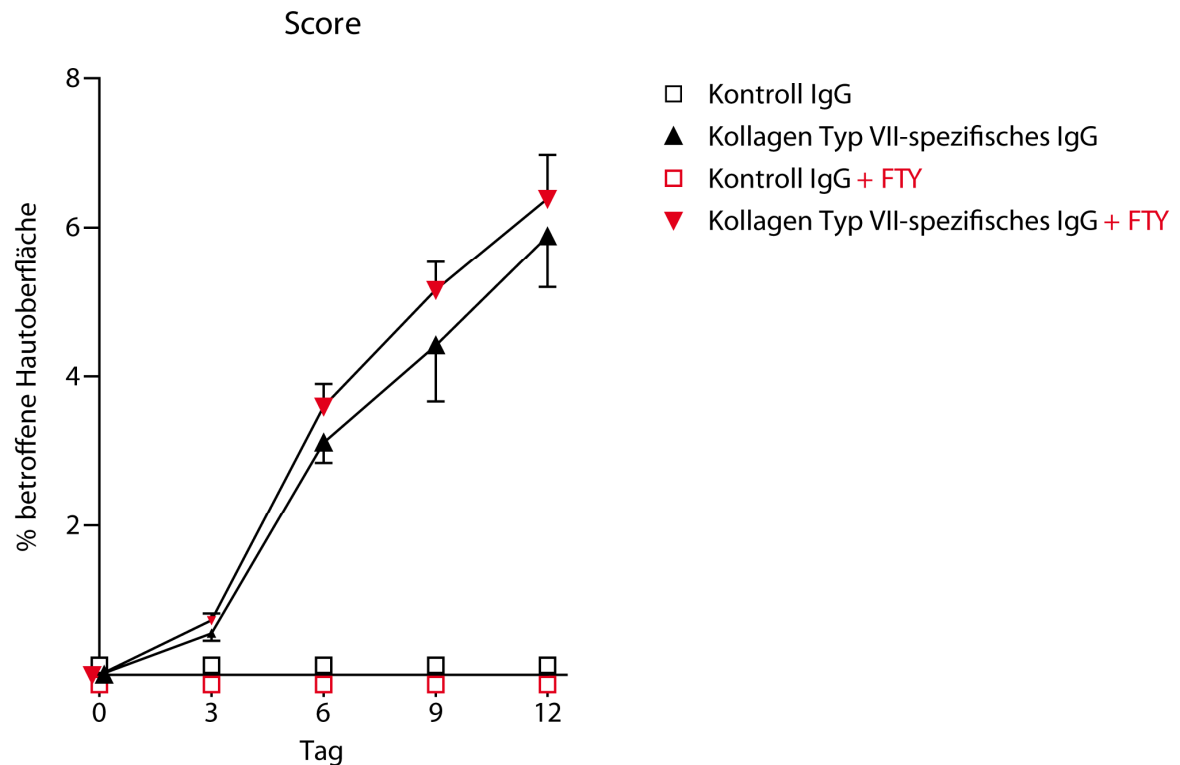
**Abbildung 19: Die Behandlung mit FTY reduziert signifikant die Anzahl der T-Zellen in der Haut von Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG.** Mäusen wurde für vierzehn Tage täglich ein Vehikel oder 1mg/kg Körpergewicht FTY i.p. injiziert. Nach zwei Injektionen dieser Vorbehandlung wurde den Tieren Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert, dabei wurde die tägliche Injektion von Vehikel oder FTY fortgeführt. An Tag 12 wurde die Ohrhaut entnommen und gegen TCR- $\beta$  gefärbt. A: Entsprechend angefärbte Zellen sind rot markiert. Sie sind nur im oberen Bild zu sehen. Die Pfeile markieren die Abhebung der Epidermis von der Dermis in Form einer Blase. B: Die Anzahl der positiven Zellen wurde in Bezug auf die Fläche quantifiziert. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=5 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG – FTY, n=5 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG + FTY; \* $p < 0.05$ ).

Um festzustellen, ob die reduzierte T-Zell-Anzahl in der Haut Auswirkungen auf die Zytokinexpression in der Haut hatte, wurde die Ohrhaut von Mäusen, denen Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert worden war, an Tag 3, 6 und 12, also nach fünf bis vierzehn Tagen Vehikel- oder FTY-Behandlung, entnommen. Die relative Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-17 wurde in Bezug auf das Housekeeping-Gen MLN51 bestimmt (Abbildung 20). Es ergaben sich zwei Muster: Mit FTY nahm die Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 signifikant ab, während es bei IL-4 und IL-10 keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen gab.



**Abbildung 20: Die Behandlung mit FTY reduziert signifikant die Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 in der Haut von Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG.** Mäusen wurde für vierzehn Tage täglich ein Vehikel oder 1mg/kg Körpergewicht FTY i.p. injiziert. Nach zwei Injektionen dieser Vorbehandlung wurde den Tieren Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert, dabei wurde die tägliche Injektion von Vehikel oder FTY fortgeführt. An Tag 3, 6 und 12 wurde die Ohrhaut entnommen. Die relative Genexpression in Bezug auf MLN51 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=7-14 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG - FTY, n=5-12 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG + FTY; \*p<0.05; \*\*\*p<0.001).

Ob die Reduzierung der T-Zellen in Blut und Haut einen Einfluss auf die Entwicklung der EBA hatte, wurde im folgenden Schritt geklärt. Mäuse wurden für vierzehn Tage täglich mit Vehikel oder FTY behandelt. Nach zwei Tagen Behandlung wurde den Tieren der Vehikel- sowie der FTY-Gruppe Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. An Tag 0, 3, 6, 9 und 12 wurden die Tiere eingehend auf Veränderungen an der Hautoberfläche untersucht und der jeweilige prozentuale Anteil bestimmt (Abbildung 21). Die Mäuse, denen Kontroll IgG injiziert worden war, zeigten erwartungsgemäß keinerlei Hautveränderungen, unabhängig davon, ob sie mit einem Vehikel oder mit FTY behandelt worden waren. Auch die Mäuse, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG und ein Vehikel erhalten hatten, wurden erwartungsgemäß krank. Wider Erwarten wurden jedoch auch die Mäuse krank, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG und eine FTY-Behandlung erhalten hatten. Es zeigte sich kein Unterschied zu den Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt worden waren. Die reduzierte T-Zell-Anzahl im Blut und in der Haut, sowie die verminderte Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 in der Haut beeinflusste die Entstehung der EBA-Erkrankung nicht.



**Abbildung 21: Die Behandlung mit FTY verändert den Krankheitsverlauf der EBA-Erkrankung nicht.** Mäusen wurde für vierzehn Tage täglich ein Vehikel (schwarz) oder 1mg/kg Körpergewicht FTY (rot) i.p. injiziert. Nach zwei Injektionen dieser Vorbehandlung wurde den Tieren Kontroll IgG (Quadrat) oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG (Dreieck) an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert, dabei wurde die tägliche Injektion von Vehikel oder FTY fortgeführt. Die Tiere wurden alle drei Tage untersucht und der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche bestimmt. Die Anzahl der Tiere lag in jeder Gruppe abhängig vom Zeitpunkt zwischen 5 und 15. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler (n=5-15 bei Kontroll IgG, n=5-15 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG, n=5-15 bei Kontroll IgG + FTY, n=5-15 bei Kollagen Typ VII-spezifischem IgG + FTY).

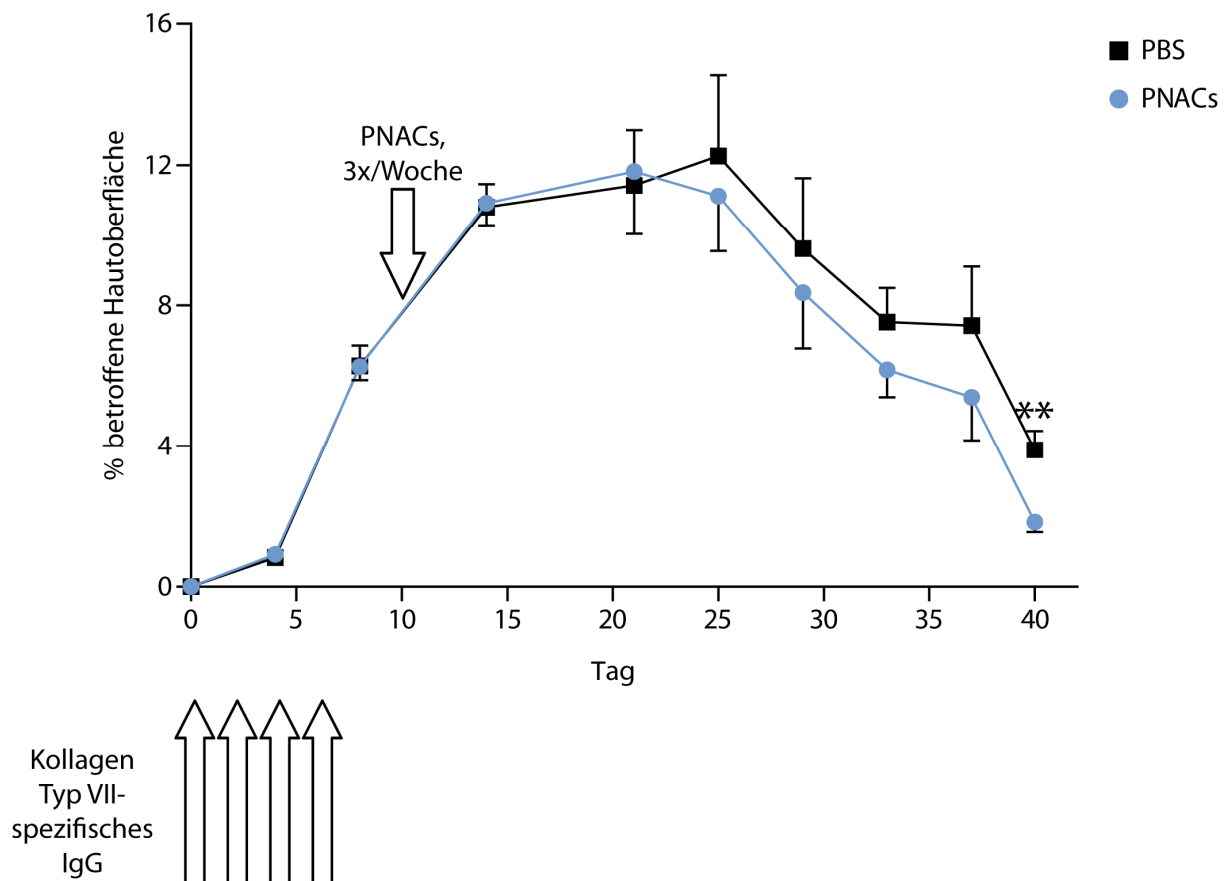
### 3.2.2 Zusammenfassung II

Mit FTY ließ sich die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut bereits nach zwei Tagen senken, dies geschah unabhängig davon, ob den Tieren Kontroll IgG oder Kollagen Typ VII-spezifisches IgG verabreicht worden war. Die Behandlung reduzierte des Weiteren die Anzahl der T-Zellen in der Haut. Dadurch kam es auch zu einer Veränderung im Zytokinmuster in der Haut: IFN- $\gamma$  und IL-17 wurden signifikant weniger exprimiert. Dennoch änderte sich dadurch nichts an der Entwicklung der EBA-Erkrankung.

### 3.3 Modulierung mit PNACs

#### 3.3.1 PNACs in passiver EBA

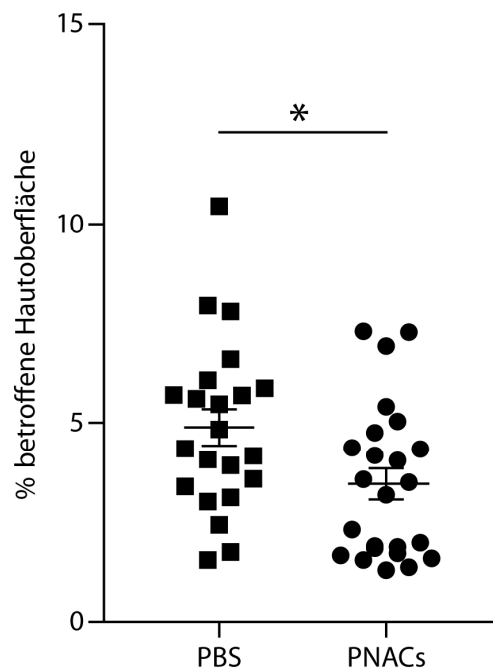
Im Folgenden wurde nun untersucht, ob zytosolische Proteine, wie sie in Protein-Nukleinsäuren-Komplexen (PNACs) enthalten sind, einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der EBA haben würden. Mäusen wurde Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. Nach Krankheitsinduktion wurden sie ab Tag 10 drei Mal wöchentlich mit PBS oder PNACs behandelt. Die Tiere wurden von Tag 0 bis Tag 40 regelmäßig auf Veränderungen der Hautoberfläche untersucht (Abbildung 22). Bis Tag 25 gab es keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Ab diesem Zeitpunkt war eine Tendenz in der PNACs-behandelten Gruppe zu erkennen: Verglichen mit der PBS-Gruppe war ein geringerer Prozentsatz der Hautoberfläche betroffen. Diese Tendenz führte an Tag 40 zu einem signifikanten Ergebnis.



**Abbildung 22: Die Behandlung mit PNACs (Protein-Nukleinsäure-Komplexe) verbessert den Krankheitsverlauf der passiven EBA.** Mäusen wurde Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. Ab Tag 10 wurde ihnen drei Mal wöchentlich PBS oder PNACs injiziert. Die Tiere wurden regelmäßig untersucht und der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche bestimmt. Die Anzahl der Tiere lag in beiden Gruppen abhängig vom Zeitpunkt zwischen 6 und 30. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test ( $n=6-30$  bei PBS,  $n=6-30$  bei PNACs;  $**p<0.01$ ).

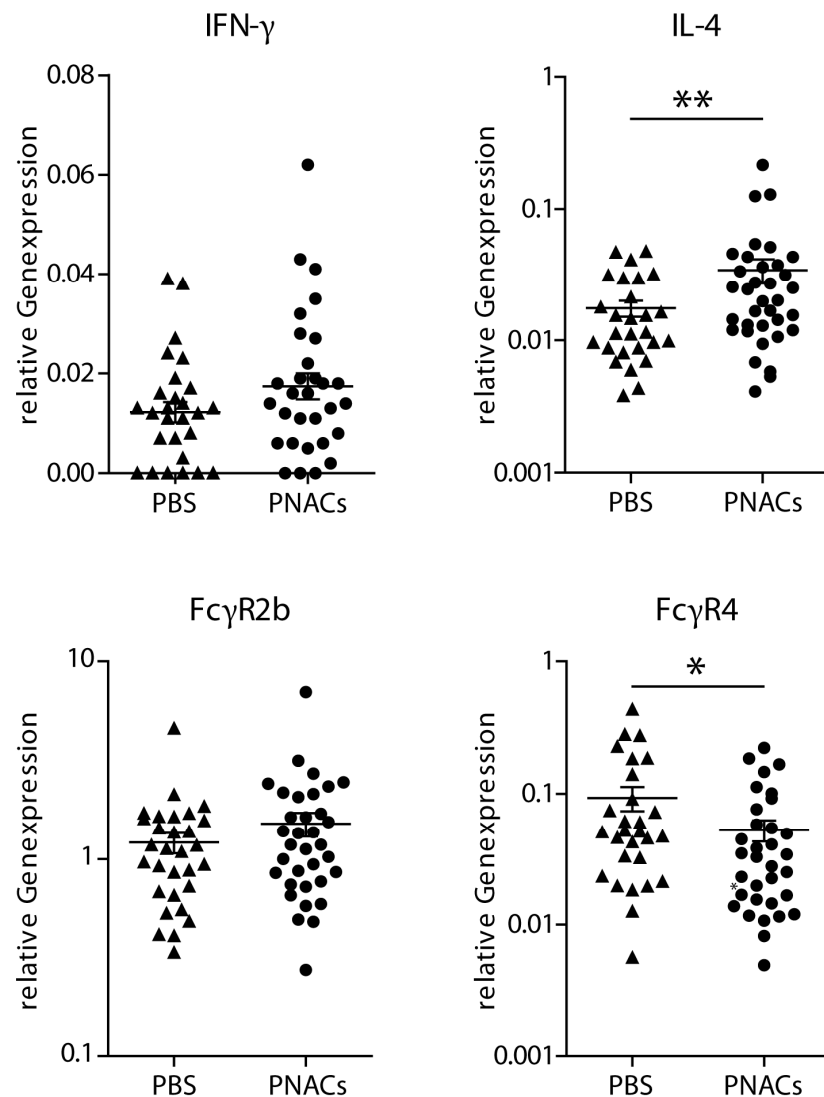
Um die Reproduzierbarkeit dieses feinen Unterschieds zu überprüfen, wurde der Versuch mehrmals wiederholt, die Werte bei Versuchsende (Tag 40 bis 46) wurden zusammengenommen betrachtet (Abbildung 23). Auch hier war der Anteil der betroffenen Hautoberfläche in PNACs-behandelten Mäusen signifikant niedriger.





**Abbildung 23: PNACs verringern die Erkrankung nach vierzig Tagen.** Mäusen wurde Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. Ab Tag 10 wurde ihnen drei Mal wöchentlich PBS oder PNACs injiziert. Der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche wurde in drei Versuchen an Tag 40 bis 46 bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=22 bei PBS, n=23 bei PNACs; \*p<0.05).

Um zu untersuchen, ob PNACs das Zytokinmilieu im drainierenden Lymphknoten veränderten, wurden Mäusen, die Kollagen Typ VII-spezifisches IgG und eine PBS- oder PNACs-Behandlung erhalten hatten, die inguinalen Lymphknoten bei Versuchsende (Tag 12 bei einem Versuch, Tag 40 bis 62 in vier Versuchen) entnommen. Die relative Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-4, Fc $\gamma$ R2b und Fc $\gamma$ R4 bezogen auf das Housekeeping-Gen MLN51 wurde analysiert (Abbildung 24). Fc $\gamma$ R2b und Fc $\gamma$ R4 wurden untersucht, da sie eine Rolle bei der EBA-Erkrankung spielen. Fc $\gamma$ R2b wirkt hemmend auf die Erkrankung, während Fc $\gamma$ R4 die Erkrankung fördert (Nimmerjahn and Ravetch 2008; Kasperkiewicz, Nimmerjahn et al. 2012). Es zeigten sich drei Muster: Bei IFN- $\gamma$  und Fc $\gamma$ R2b gab es keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Expression von IL-4 war durch die PNACs-Behandlung signifikant erhöht, während die Expression von Fc $\gamma$ R4 signifikant vermindert war. Die Behandlung mit PNACs modulierte das Zytokinmilieu und wies auf eine verbesserte Wundheilung hin.

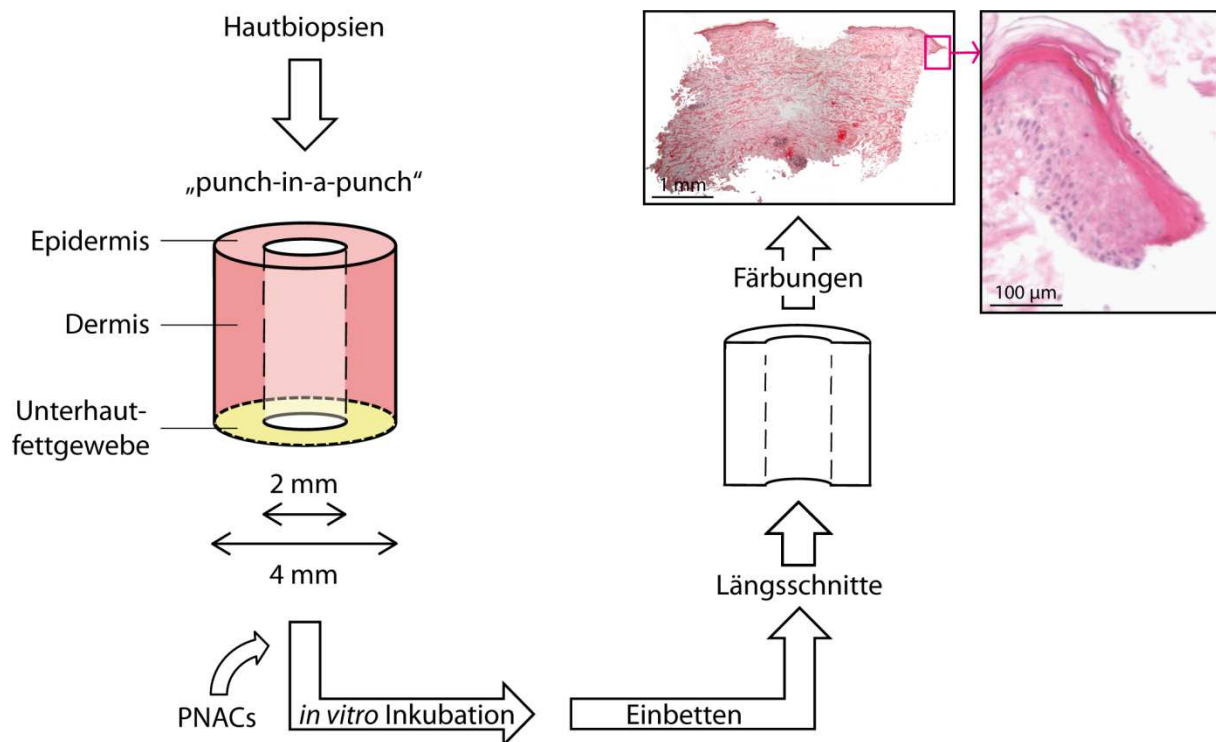


**Abbildung 24: Die Behandlung mit PNACs erhöht signifikant die Expression von IL-4 und reduziert signifikant die Expression von Fc $\gamma$ R4.** Mäusen wurde Kollagen Typ VII-spezifisches IgG an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. Anschließend erfolgte drei Mal wöchentlich die Behandlung mit PBS oder PNACs. Bei Versuchsende (Tag 12 bei einem Versuch, Tag 40-62 in vier Versuchen) wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen. Die relative Genexpression in Bezug auf MLN51 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=27-30 bei PBS, n=30-35 bei PNACs; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### 3.3.2 PNACs im humanen *in vitro*-Hautmodell

Um dem Hinweis auf eine verbesserte Wundheilung durch PNACs nachzugehen, wurde ein etabliertes humanes *in vitro*-Hautmodell benutzt. Dabei wurden aus Hautbiopsien, die aus chirurgischen Eingriffen stammten und nach Aufklärung und Einverständnis des Patienten verwendet wurden, Stanzen gewonnen. Dazu wurde eine Stanze mit einem Durchmesser von 4 mm entnommen, sie bestand aus der Epidermis, der Dermis und häufig dem Unterhautfettgewebe. Mittig wurde eine Stanze mit 2 mm Durchmesser entfernt. Somit

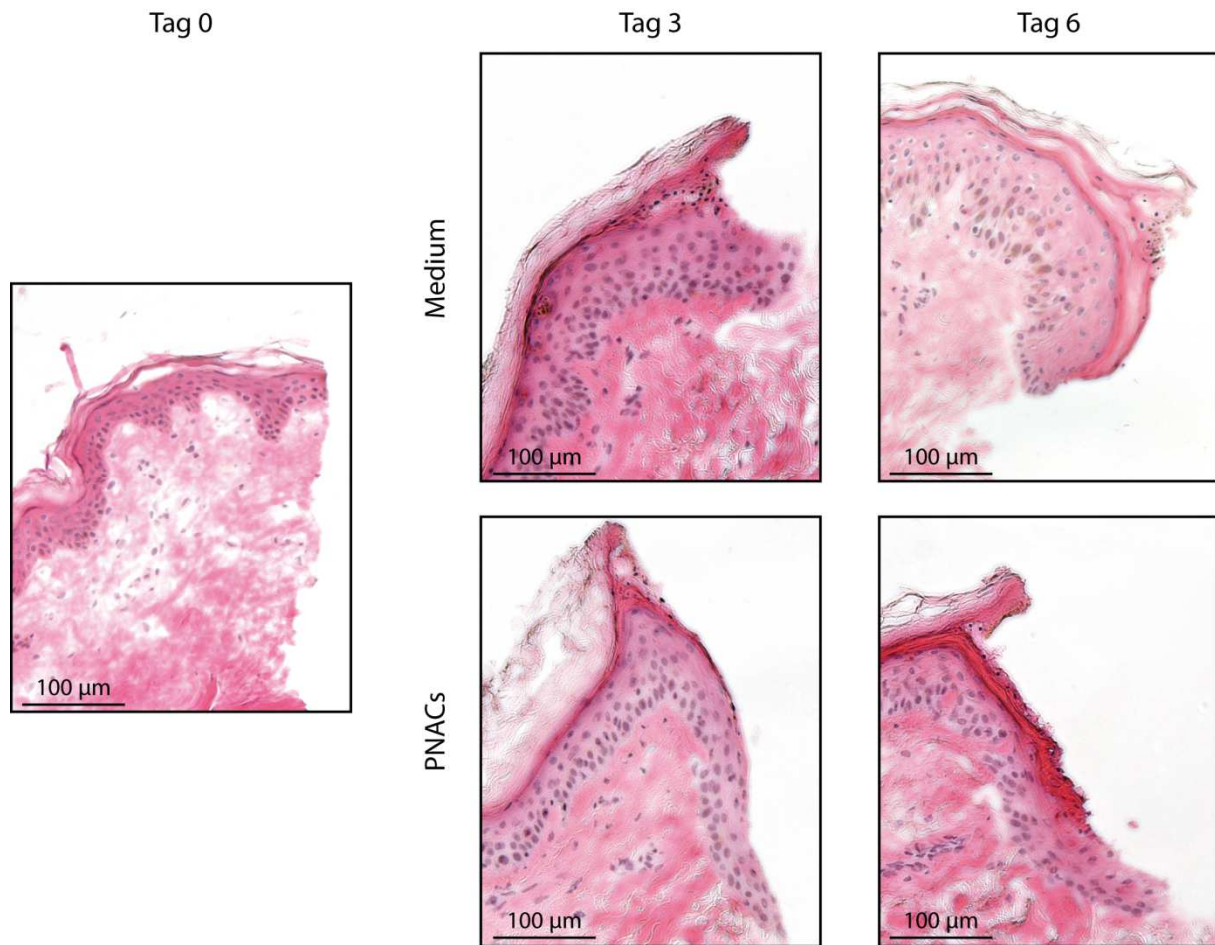
entstand die Form eines Hohlylinders. Diese Stanzen wurden in reinem Medium oder unter Zugabe von PNACs für drei und sechs Tage kultiviert und anschließend entnommen. Nach dem Einbetten in ein Kryomedium und dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden daraus Längsschnitte hergestellt, die jeweils alle Hautschichten beinhalteten (Abbildung 25). Dabei war die mittlere Stanze abhängig vom Schnitt nicht völlig durchgängig, sodass in der Mitte die Epidermis und nur ein Teil der Dermis fehlte, wie auf dem Übersichtsbild rechts oben zu sehen ist. Diese Vertiefung bildete das Wundbett. Somit ergaben sich vier Wundränder: zwei äußere und zwei innere. An diesen bildeten sich durch die Kultivierung sogenannte Wundheilungs- oder Epithelzungen. Solch eine ist ganz rechts oben dargestellt. Dabei wuchs die Epidermis um den Wundrand herum.



**Abbildung 25: In einem humanen *in vitro*-Hautmodell wird die Wundheilung an den Wundrändern untersucht.** Hautbiopsien, die bei chirurgischen Eingriffen anfielen, wurden nach Aufklärung und Einverständnis des Patienten für dieses Modell verwendet. Links ist eine Stanze schematisch dargestellt, die aus der Haut des Patienten gewonnen wurde. Sie erstreckte sich von der Epidermis über die Dermis bis zum Unterhautfettgewebe. Diese Stanzen wurden unter unterschiedlichen Bedingungen für drei und sechs Tage kultiviert. Nach dem Einfrieren wurden Längsschnitte der Stanzen abhängig von den untersuchten Parametern gefärbt. Oben mittig ist ein solcher Längsschnitt mit HE-Färbung in der Übersicht zu sehen. An den vier Wundkanten entstanden die sogenannten Wundheilungs- oder Epithelzungen. Oben rechts ist eine Epithelzunge dargestellt.

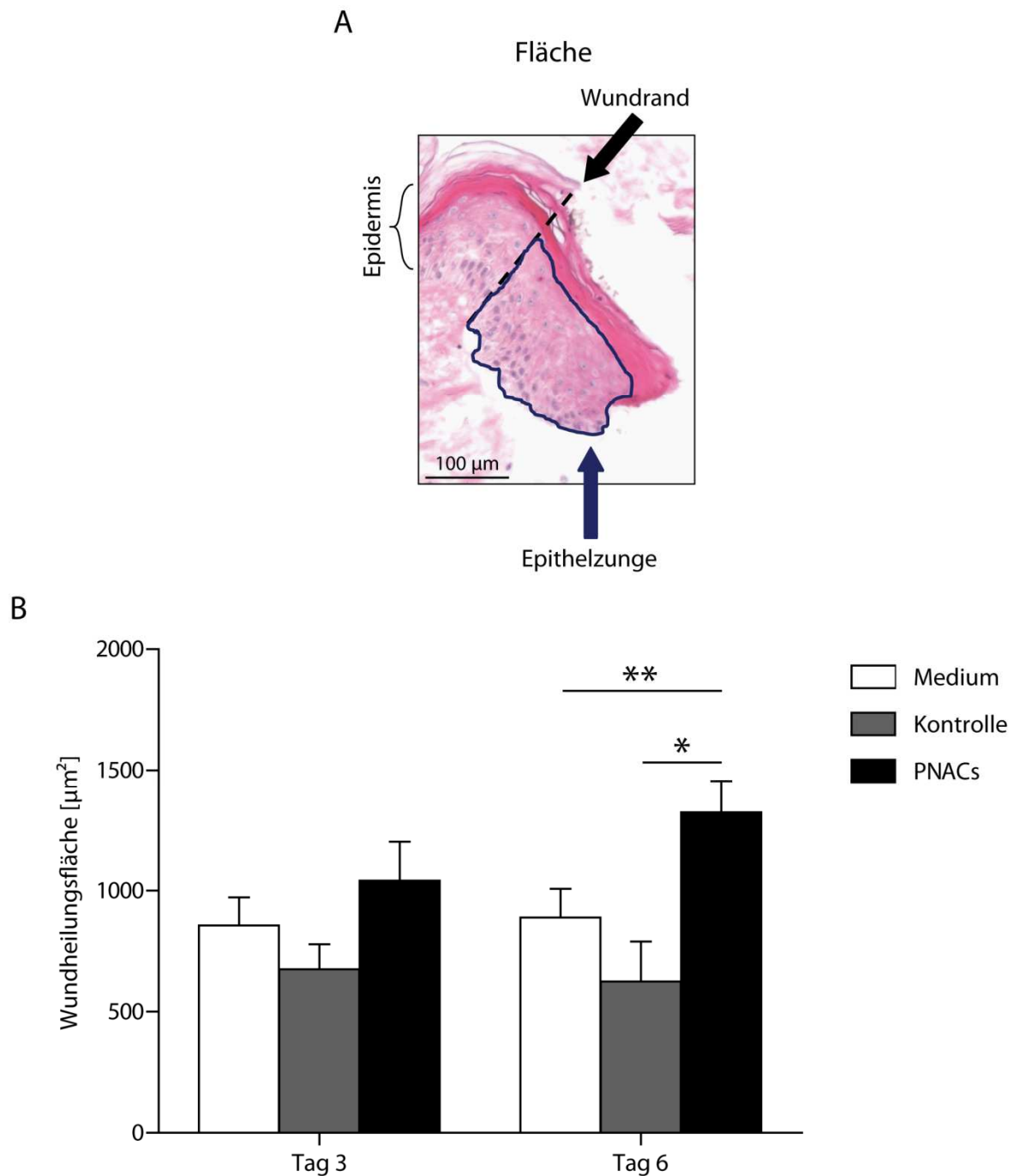
### 3.3.3 Flächenentwicklung der Wundheilungszungen

Die Stanzen wurden für drei und sechs Tage in reinem Medium oder unter Zugabe von 10% PNACs kultiviert. Anschließend wurden sie entnommen. Als Kontrolle wurden frische Stanzen an Tag 0 entnommen. Die Schnitte wurden HE gefärbt (Abbildung 26). In den Kontrollen an Tag 0 war deutlich eine scharfe Wundkante zu sehen, die durch das Stanzen verursacht wurde. Die Fläche der Epithelzungen der Kontrolle war daher definitionsgemäß null. Der Wundrand zu den späteren Zeitpunkten wurde so bestimmt, dass eine imaginäre Linie zwischen Stratum corneum der Epidermis und Wundkante der Dermis angelegt wurde, jenseits des Wundrands befand sich die gewachsene Epithelzunge. Anhand der Epidermis ließ sich erkennen, welche Bereiche bereits ausdifferenziert waren im Vergleich zu den Bereichen, in denen noch „Bewegung“ stattfand. Morphologisch betrachtet konnte man auch im Stratum basale einen Unterschied in der Anordnung der Zellen feststellen. Waren sie im intakten Gewebe vor dem Wundrand relativ klar in eine Richtung angeordnet, so ging diese Ordnung in der Zunge verloren. Die beiden untersuchten Zeitpunkte unterschieden sich voneinander. Die Größenzunahme war insbesondere zum frühen Zeitpunkt deutlich. Drei Tage später war diese nicht mehr so stark. Es konnte hier jedoch eine Differenzierung beobachtet werden. Das Stratum corneum wurde deutlich dicker. Mit PBS wurden häufig kleinere, dickliche Zungen beobachtet, während sie mit PNACs vor allem lang und dünn waren.



**Abbildung 26: Es entstehen größere und längere Zungen mit PNACs.** Die Hautstanzen wurden in reinem Medium oder unter Zugabe von 10% PNACs kultiviert und nach drei und sechs Tagen entnommen. Zur Kontrolle wurden an Tag 0 frische Stanzen entnommen. Alle Stanzen wurden HE gefärbt. Nur nach Kultivierung sind gewachsene Epithelzungen am Wundrand zu erkennen. Repräsentative Aufnahmen wurden ausgewählt.

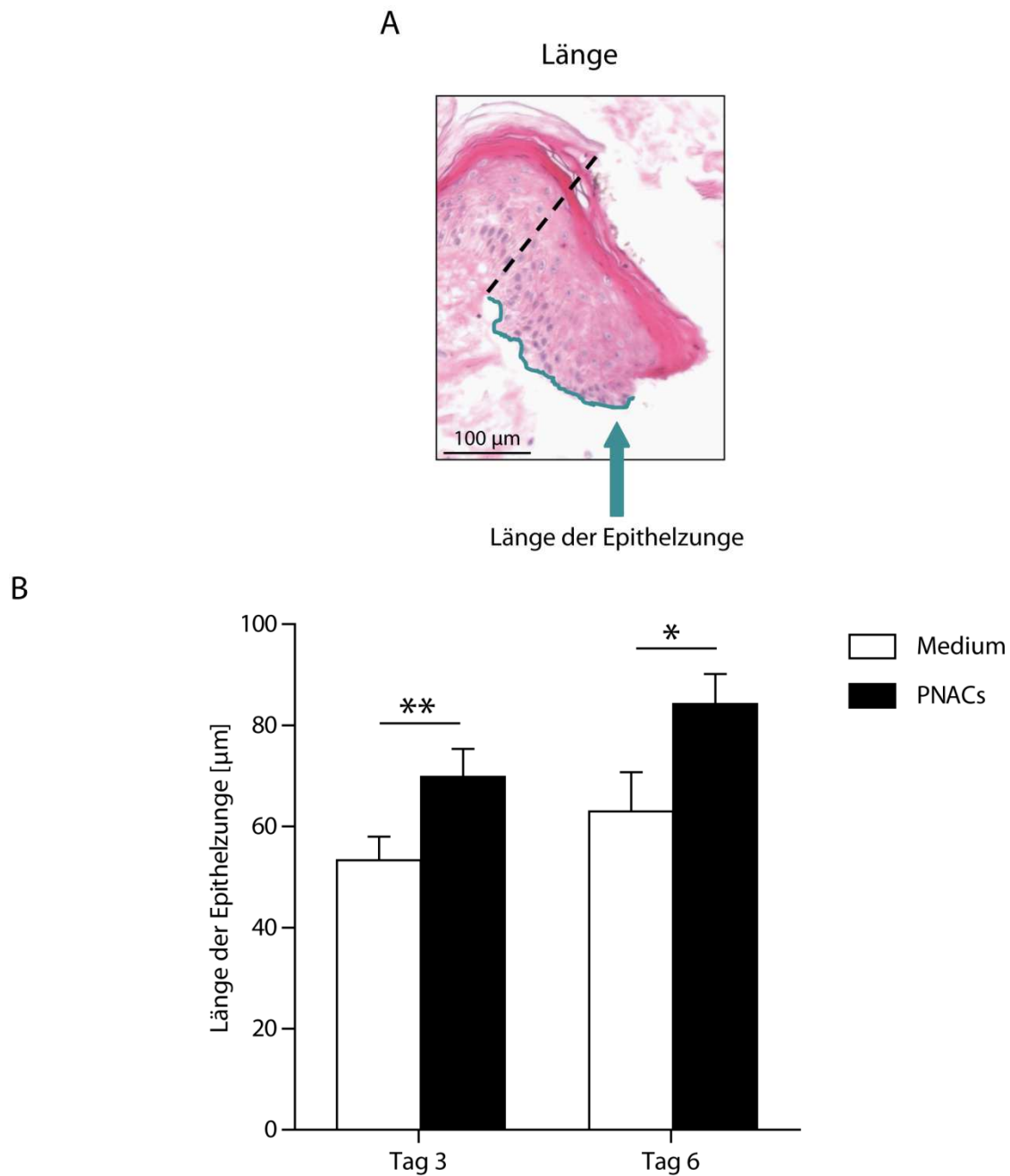
Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde die Fläche von Zungen bestimmt, die drei und sechs Tage in reinem Medium, unter Zusatz einer Proteinkontrolle (fetales Kälberserum=FCS) oder unter Zugabe von PNACs kultiviert worden waren. Es wurden je Stanze alle vier Zungen, zwei äußere und zwei innere, analysiert. Zur Abgrenzung der Fläche wurden alle lebenden Zellen der Wundheilungszunge betrachtet, nicht jedoch die bereits abgestorbenen Zellen der oberen Epidermisschichten (Abbildung 27). Nach drei Tagen gab es keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Nach sechs Tagen war die Fläche der Epithelzungen mit PNACs signifikant größer, sowohl im Vergleich zu reinem Medium als auch zu der Kontrolle mit unspezifischen Proteinen.



**Abbildung 27: Nach PNACs-Behandlung entsteht eine signifikant größere Wundheilungsfläche an Tag 6.** Die Hautstanzen wurden in reinem Medium, unter Zugabe von 10% einer Proteinkontrolle (FCS) oder unter Zugabe von 10% PNACs kultiviert und nach drei und sechs Tagen entnommen. Alle Stanzen wurden HE gefärbt. A: Die Fläche der gewachsenen Epithelzungen (Wundheilungsfläche) wurde markiert (unterer Pfeil) und mittels ImageJ quantifiziert. B: Es wurden an beiden Tagen jeweils vier Patienten analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=4 bei Medium, n=4 bei Kontrolle, n=4 bei PNACs; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

### 3.3.4 Länge der Wundheilungszungen

Ein verbessertes Flächenwachstum der Wundheilungszungen könnte auf vier verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Die Migration von Zellen würde ebenso zu einer größeren Fläche beitragen wie eine längere Epithelzunge. Zusätzlich zur Länge könnte auch die Proliferation zunehmen, wobei beides durch Angiogenese gefördert würde. Diese würde durch die Bildung neuer Gefäße für eine verbesserte Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen sorgt. Diese Faktoren sollten in den nächsten Schritten untersucht werden, beginnend mit der Länge der Epithelzungen. Dabei wurden Zungen verglichen, die für drei und sechs Tage in reinem Medium oder unter Zugabe von PNACs kultiviert worden waren (Abbildung 28). Es wurde von der Schnittkante apikal entlang der Basalzellschicht gemessen. Ähnlich wie bei der Fläche war auch das Längenwachstum bereits zu einem frühen Zeitpunkt größtenteils abgeschlossen. Die Steigerung des Längenwachstums zwischen Tag 3 und Tag 6 war nicht mehr so deutlich. Dies fiel zeitlich zusammen mit der Differenzierung der Epithelzunge. Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich ein signifikant besseres Längenwachstum mit dem Zusatz von PNACs.

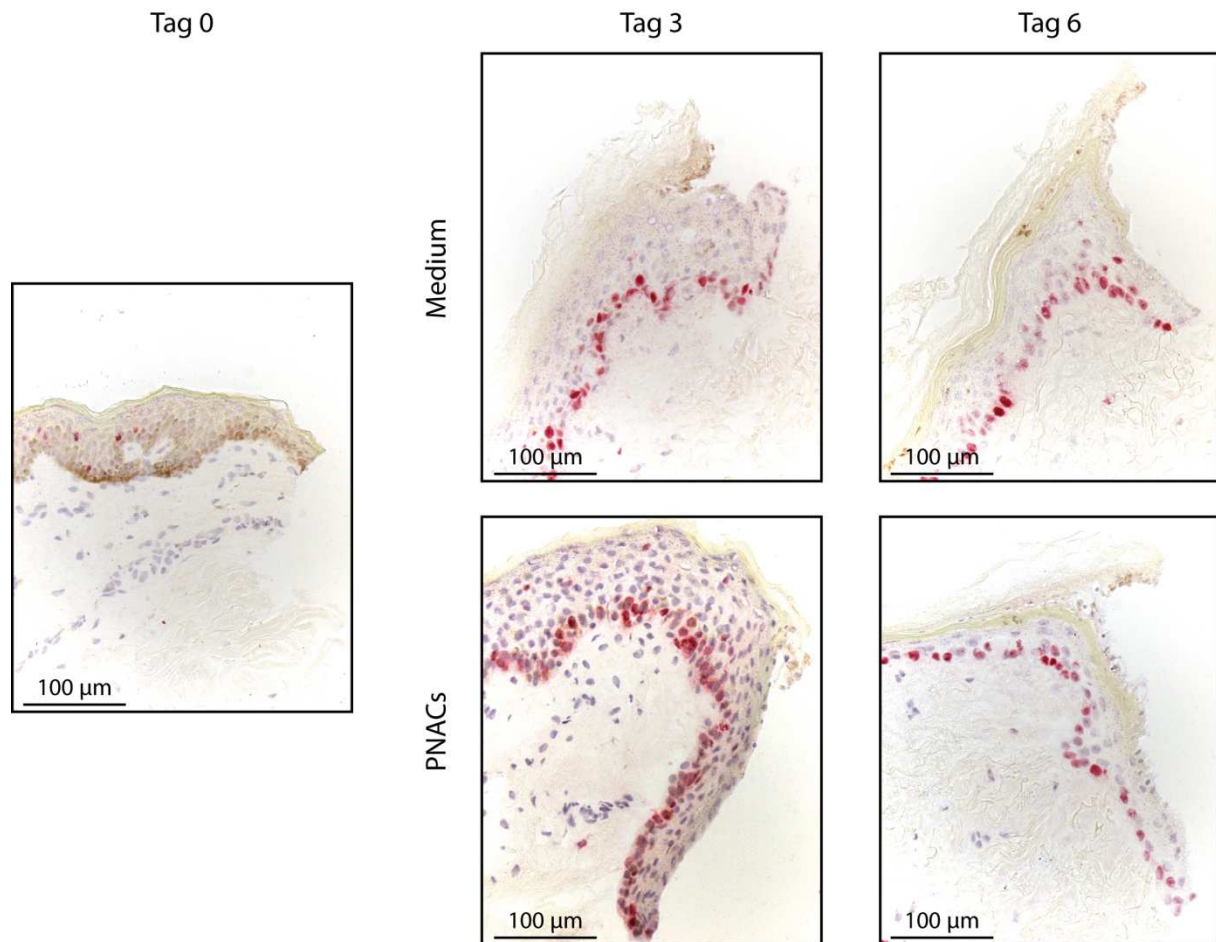


**Abbildung 28: Nach PNACs-Behandlung sind signifikant längere Epithelzungen an Tag 3 und 6 zu finden.** Die Hautstanzen wurden in reinem Medium oder unter Zugabe von 10% PNACs kultiviert und nach drei und sechs Tagen entnommen. Alle Stanzen wurden HE gefärbt. Die Länge der gewachsenen Epithelzungen wurde mittels ImageJ quantifiziert. A: Die Länge der gewachsenen Epithelzunge wurde entlang der Basalzellschicht markiert (Pfeil) und mittels ImageJ ausgewertet. B: Es wurden an beiden Tagen jeweils vier Patienten analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=4 bei Medium, n=4 bei PNACs; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



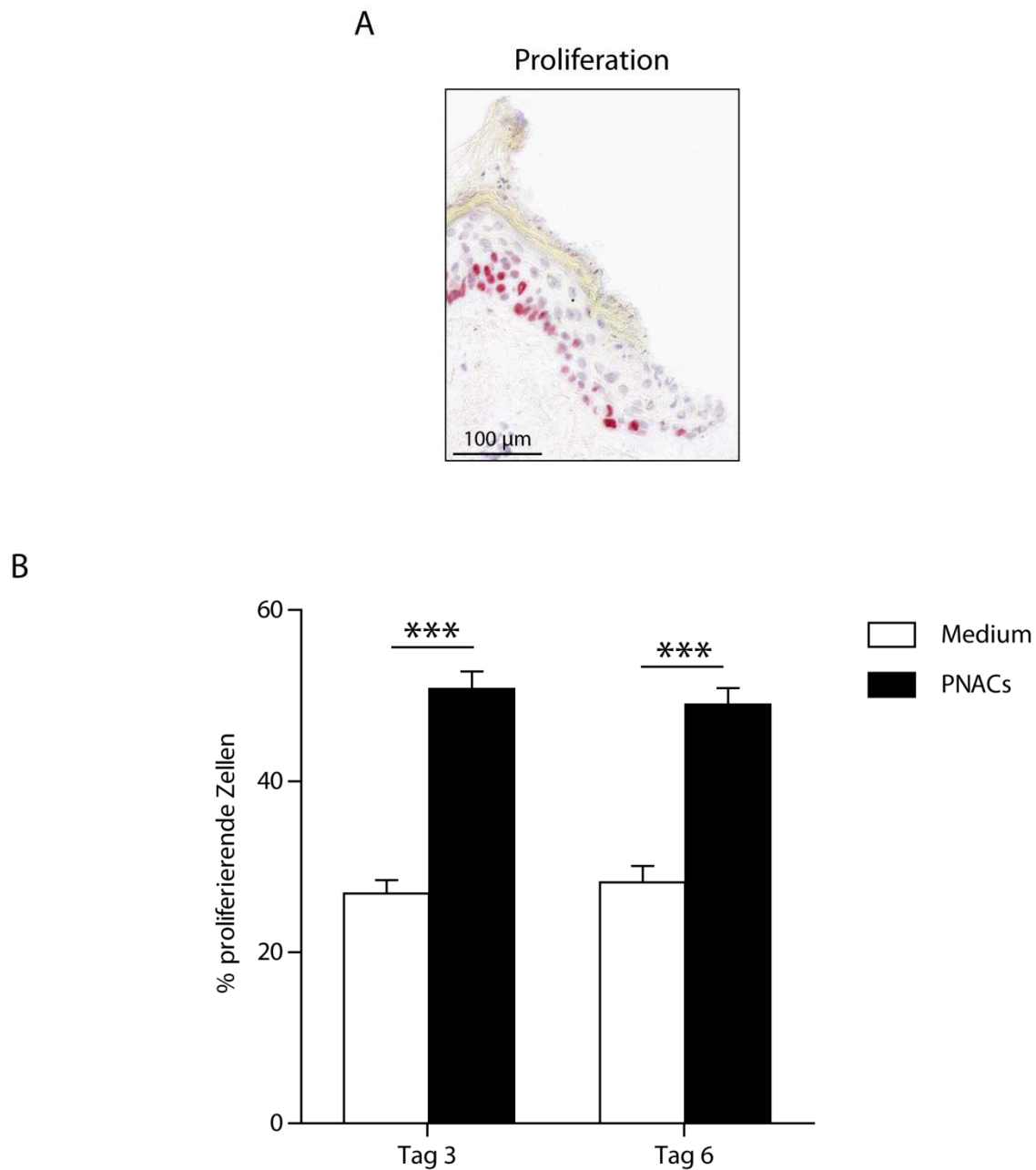
### **3.3.5 Proliferation als verantwortlicher Prozess**

Um die Proliferation genauer zu untersuchen, wurden Stanzen für drei und sechs Tage in reinem Medium oder unter Zugabe von PNACs kultiviert und anschließend entnommen. Als Kontrolle wurden frische Stanzen von Tag 0 verwendet, die nicht kultiviert wurden. Die Schnitte wurden gegen Ki-67 gefärbt (Abbildung 29). An Tag 0 war eine schwache Proliferation zu sehen, dabei war im Bereich der Wundkante keine Proliferation zu beobachten. Nach drei und sechs Tagen änderte sich diese Situation jedoch. Vor allem im Stratum basale war eine starke Proliferation kennzeichnend. Diese war nicht nur auf die Epithelzunge beschränkt, sondern auch im angrenzenden epidermalen Gewebe zu finden. Die Basalzellen zeigten die stärkste Proliferation in der Epithelzunge.



**Abbildung 29: Nach PNACs-Behandlung ist in den Epithelzungen vermehrte Proliferation zu finden.** Die Hautstanzen wurden in reinem Medium oder unter Zugabe von 10% PNACs kultiviert und nach drei und sechs Tagen entnommen. Zur Kontrolle wurden an Tag 0 frische Stanzen entnommen. Alle Stanzen wurden gegen Ki-67 gefärbt. Nach Kultivierung ist eine gesteigerte Proliferation in den gewachsenen Epithelzungen zu sehen. Repräsentative Aufnahmen wurden ausgewählt.

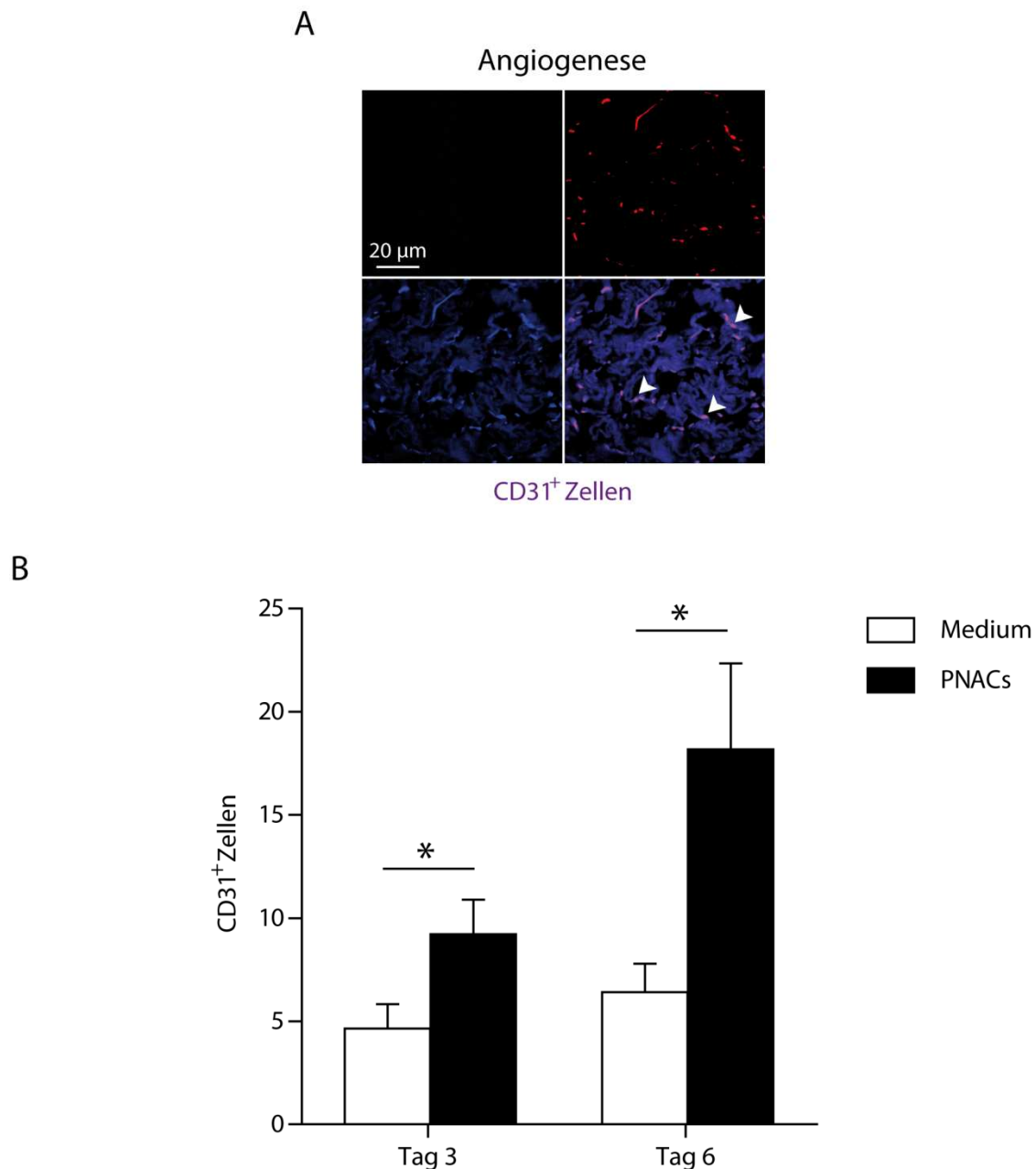
Um die Proliferation zu quantifizieren, wurden Stanzen nach drei und sechs Tagen Kultur in reinem Medium oder unter Zugabe von PNACs entnommen und die proliferierenden Zellen angefärbt. Die Anzahl der proliferierenden Zellen in der Epithelzunge wurde gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl aller lebenden Zellen der Epithelzunge gesetzt (Abbildung 30). Die Proliferation mit PNACs war zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht im Vergleich zu reinem Medium. Deutlich wurde auch, dass sich die Proliferation über die Zeit nicht veränderte. Die starke Proliferation in der PNACs-Gruppe war unter anderem auf die lange Epithelzunge zurückzuführen, die dadurch mehr Basalzellen beinhaltet.



**Abbildung 30: PNACs erhöhen signifikant die Proliferation in den Epithelzungen.** Die Hautstanzen wurden in reinem Medium oder unter Zugabe von 10% PNACs kultiviert und nach drei und sechs Tagen entnommen. Alle Stanzen wurden gegen Ki-67 gefärbt. A: Die proliferierenden Zellen wurden rot angefärbt. B: Ihre Anzahl wurde in Bezug auf alle lebenden Zellen der Epithelzunge quantifiziert. Es wurden an beiden Tagen jeweils vier Patienten analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=4 bei Medium, n=4 bei PNACs; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.3.6 CD31-positive Zellen als Indikator der Angiogenese

Da bei der Wundheilung weitere Faktoren bei der Versorgung der Haut eine Rolle spielen, wurde schließlich die Gefäßbildung, die Angiogenese, in der Dermis untersucht. Analysiert wurden je Stanze sechs Felder mit den Maßen 1024x1024 Pixel in 40-facher Vergrößerung. Je ein Feld in direkter Relation zur Wundheilungszunge wurde so gewählt, dass es direkt am dermalen Wundrand unter/neben der Zunge lag. Zusätzlich wurde ein weiterer, vermutlich hochaktiver Bereich betrachtet, das Wundbett. Dieses entstand dadurch, dass es bei der Dicke humaner Haut nur unzulänglich möglich war, die innere Stanze von 2 mm Durchmesser durch alle Gewebsschichten zu setzen. So wurde häufig nur die Epidermis entfernt, die Dermis darunter bildete somit das Wundbett. Zwei Felder in der Mitte des Wundbettes wurden daher ebenfalls untersucht. Diese sechs Felder wurden in Schnitten, die gegen den Angiogenesemarker CD31 angefärbt worden waren, auf die Anzahl der positiven Zellen untersucht. CD31 ist ein Protein, das als Marker für Endothelzellen gilt, da es eine große Rolle bei den endothelialen Zellkontakten spielt. Verglichen wurden Stanzen, die für drei und sechs Tage in reinem Medium oder unter Zugabe von PNACs kultiviert worden waren (Abbildung 31). In der PNACs-Gruppe war die Anzahl der CD31-positiven Zellen zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht. Beim Vergleich der beiden Zeitpunkte gab es vor allem in der PNACs-Gruppe zum späteren Zeitpunkt mehr positive Zellen. Der spätere Zeitpunkt schien also sowohl durch die Differenzierung als auch durch vermehrte Angiogenese gekennzeichnet zu sein.



**Abbildung 31: PNACs erhöhen signifikant die Angiogenese in der Dermis in der unmittelbaren Umgebung der Epithelzungen.** Die Hautstanzen wurden in reinem Medium oder unter Zugabe von 10% PNACs kultiviert und nach drei und sechs Tagen entnommen. Alle Stanzen wurden gegen CD31 gefärbt. Sechs verschiedene Felder pro Schnitt wurden auf die Anzahl der CD31-positiven Zellen hin untersucht: direkt an den vier Wundrändern neben oder unter den Epithelzungen sowie zwei Felder im Wundbett. Dieses entstand, wenn die mittlere 2 mm-Stanze häufig nur die Epidermis, nicht aber die darunter liegende Dermis entfernte und gilt als hochaktiver Bereich. A: Oben rechts ist die CD31-Färbung (rot) dargestellt, unten links die Kernfärbung (blau). Unten rechts ist die Überlagerung beider Färbungen dargestellt, doppelt positive Zellen erscheinen daher violett. Sie sind durch weiße Pfeile markiert. B: CD31-positive Zellen wurden ausgezählt. Es wurden an beiden Tagen jeweils vier Patienten analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (n=4 bei Medium, n=4 bei PNACs; \* $p < 0.05$ ).

### **3.3.7 Zusammenfassung III**

Die Behandlung der passiven EBA mit PNACs lieferte Hinweise auf eine Wirkung in der späten Phase. Daher wurde die Wundheilung in einem humanen Hautmodell untersucht. Betrachtet wurde der Einfluss von PNACs auf das Wachstum von Epithelzungen. Diese zeigten mit PNACs ein größeres Flächenwachstum, was auf verbessertes Längenwachstum, erhöhte Proliferation sowie erhöhte Angiogenese in der Dermis zurückzuführen war.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Rolle des adaptiven Immunsystems in der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)

#### 4.1.1 Modelle der EBA

Um die Pathophysiologie der EBA-Erkrankung zu erforschen, stehen unterschiedliche experimentelle Ansätze in Form verschiedener Modelle zur Verfügung (Sitaru, Kromminga et al. 2002; Shimanovich, Mihai et al. 2004; Sitaru, Mihai et al. 2005; Sitaru, Chiriac et al. 2006; Sitaru 2007; Bieber, Sun et al. 2010). Sie umfassen dabei entweder beide, die Induktions- und die Effektorphase, oder nur die Effektorphase der Erkrankung. Die drei gängigsten Modelle, die sich grundlegend voneinander unterscheiden, werden im Folgenden vorgestellt.

Beim aktiven Immunisierungsmodell werden Mäuse empfänglicher Mausstämmen, wie SJL, wiederholt mit einem Adjuvans und dem autologen Protein Kollagen Typ VII immunisiert. Dabei wird ein rekombinantes Peptidfragment der nicht-kollagenen (NC1) Domäne des murinen Kollagens Typ VII alle drei Wochen subkutan in die Fußsohle oder die Schwanzbasis injiziert. Durch das Adjuvans soll das Immunsystem angeregt werden, das injizierte Antigen zu erkennen. Als Adjuvans wird hierbei TiterMax (Bennett, Check et al. 1992; Stills 2005) verwendet, welches unter anderem ein patentiertes Blockcopolymer und Squalen enthält. Auf die wiederholte Immunisierung hin kommt es zu einem Durchbrechen der körpereigenen Toleranz, das Antigen wird als „fremd“ erkannt, es werden T- und B-Zellen aktiviert, in den Lymphknoten entstehen Keimzentren und Antikörper gegen das körpereigene Protein Kollagen Typ VII werden gebildet. Die Keimzentren entstehen nach dem Kontakt mit einem T-Zell-abhängigen Antigen. Sie sind an der Produktion von Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen beteiligt. Dabei werden B-Zellen ihrerseits durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert. Bei diesem Kontakt interagiert der T-Zell-Rezeptor mit dem MHCII-Komplex, während der CD40-Ligand CD154 auf der T-Zelle mit CD40 auf der B-Zelle interagiert. Somit wird die B-Zelle befähigt ein Keimzentrum zu bilden (Banczyk, Kalies et al. 2014). Auch

T-Zellen können an der Induktion von Keimzentren beteiligt sein: So konnte in der Milz nachgewiesen werden, dass nur aktivierte, nicht jedoch ruhende, CD4<sup>+</sup> T-Zellen Keimzentren und Autoantikörper induzieren können (Banczyk, Kalies et al. 2014). Dies geschieht in zwei Schritten: Im ersten werden B-Zellen unabhängig vom T-Zell-Rezeptorrepertoire und der Expression des CD40-Liganden CD154 über MHCII aktiviert. Diese aktivierten B-Zellen bilden im zweiten Schritt Keimzentren aus, wobei sie nun CD154-abhängige T-Zell-Hilfe benötigen. Die Differenzierung der B-Zellen erfolgt mit Hilfe follikulärer T-Helferzellen, deren Aufgabe in der T-Zell-Hilfe für B-Zellen im Rahmen der Antigen-spezifischen B-Zell-Immunität besteht. Sie können aus naiven T-Helferzellen nach Antigen-spezifischem Priming durch Dendritische Zellen entstehen (McHeyzer-Williams, Okitsu et al. 2012). Naive B-Zellen werden durch Antigenpräsentation und T-Zell-Hilfe geprimt und aktiviert. Dies ermöglicht die Differenzierung einiger B-Zellen zu Plasmazellen. Außerdem wird dieser Kontakt für die Reifung von B-Zellen zu B-Gedächtniszellen benötigt. Schließlich kommt es durch den Kontakt auch zum sogenannten Klassenwechsel von IgM zu IgG. Dabei werden verschiedene Subklassen des IgG gebildet, die sich darin unterscheiden, dass einige wie IgG2a/c und IgG2b das Komplementsystem aktivieren können, andere wie IgG1 jedoch nicht. IgG2b und IgG2c hängen dabei mit der Ausbildung des klinischen Phänotyps der EBA zusammen (Hammers, Bieber et al. 2011). Die Antikörper gelangen über den Blutkreislauf an die Haut und binden in der dermal-epidermalen Junktionszone (DEJ) an das Kollagen Typ VII. Daraufhin wird das Komplementsystem aktiviert und es werden schließlich Granulozyten angelockt, es kommt zu einer lokalen Entzündung und zur Blasenbildung (Abbildung 32A). Dies sind vereinfacht dargestellt die Charakteristika der Antikörper-vermittelten Gewebsschädigung während der Effektorphase. Genauer betrachtet wird das Komplementsystem auf dem alternativen Weg aktiviert. Dies ergab eine Studie an Mäusen, denen entweder das für den klassischen Aktivierungsweg benötigte C1q, das beim Lektin-Weg benötigte Mannose-bindende Lektin oder der beim alternativen Weg involvierte Faktor B fehlte (Mihai, Chiriac et al. 2007). Die Injektion von Kaninchen-Antikörpern gegen murines Kollagen Typ VII (passives Modell) rief in den beiden ersten Knock-out-Mäusen vergleichbare Ergebnisse mit dem Wildtyp hervor, während das Fehlen des Faktors B zu einer



verzögerten und abgeschwächten Erkrankungsform führte, die eine reduzierte Einwanderung von Neutrophilen aufwies. Dabei gelten die Spaltprodukte C3a und C5a des alternativen Aktivierungswegs des Komplementsystems als Anaphylatoxine, welche in der Lage sind, Granulozyten chemotaktisch anzulocken und zu aktivieren (Klos, Tenner et al. 2009). Durch die Spaltprodukte werden Neutrophile angelockt ins Gewebe einzuwandern und geben nach der Bindung an die bestehenden Immunkomplexe reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie Matrix-Metalloproteasen (MMP) frei, welche das Gewebe schädigen (Ludwig 2013). Dabei spielt auch das Fragment Fc der Antikörper eine Rolle: Die Fc-Domäne von IgG2b und IgG2c lockt über den FcγR4 Granulozyten an (Kasperkiewicz, Nimmerjahn et al. 2012). Durch die Dauer bis zum Toleranzdurchbruch sowie bis zur eigenständigen Produktion der Antikörper in der Maus entstehen die ersten Wunden nach etwa drei Wochen. Die Mäuse bleiben über mehrere Wochen hinweg erkrankt. Somit kann in diesem Langzeitmodell sowohl die Produktion der Antikörper durch die Maus (Induktionsphase) als auch die Blasenbildung (Effektorphase) untersucht werden. Von Nachteil ist sowohl die lange Dauer des Modells bis zum Ausbruch der Erkrankung als auch der forcierte Aspekt der Immunisierung mittels Adjuvans zwecks Toleranzdurchbruchs (Beníšek, Süli et al. 2004).

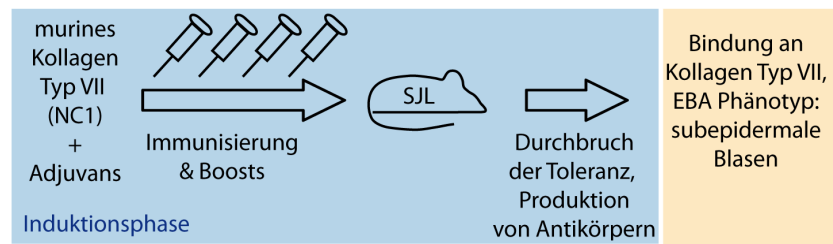
Möchte man gezielt die Effektorphase der Erkrankung untersuchen, steht das passive Mausmodell, auch Transfermodell genannt, zur Verfügung. Dort müssen in einem ersten Schritt die Antikörper generiert werden. Dazu werden Kaninchen mit rekombinantem Protein in Form von Fragmenten der NC1-Domäne des murinen Kollagens Typ VII immunisiert, woraufhin sie polyklonale Antikörper bilden. Diese können nun aus dem Serum der Tiere mittels Aufreinigung über eine Protein G-Säule gewonnen werden. Die so gewonnenen Antikörper werden erwachsenen Mäusen empfänglicher Mausstämmen, wie C57BL/6 oder BALB/c, repetitiv injiziert. Nach der Injektion, die alle zwei Tage subkutan erfolgt, zirkulieren diese Antikörper im Blut und gelangen darüber an die Haut. Dort binden sie an das Kollagen Typ VII in der DEJ, aktivieren wie bereits beschrieben das Komplementsystem und locken Granulozyten an, wodurch es nach der Freisetzung von ROS und MMP schließlich zu einer Entzündung mit Blasenbildung kommt (Sitaru, Mihai et al.

2005) (Abbildung 32B). Da die Antikörper im passiven Modell nicht erst gebildet werden müssen, ist die Dauer bis zum Ausbruch der Erkrankung im Vergleich zum aktiven Modell deutlich verkürzt. Die ersten Wunden lassen sich zwischen vier und sechs Tagen nach der ersten IgG-Injektion nachweisen. Somit wird in diesem Modell auf die Effektorphase der Erkrankung fokussiert. Es wäre jedoch möglich, dass die Maus auf die injizierten Antikörper als Fremdprotein reagiert und wiederum selbst Antikörper gegen das Kaninchen-IgG bildet. Zusätzlich zu den Kaninchen-Antikörpern würden in der Maus also auch eigene Antikörper zirkulieren.

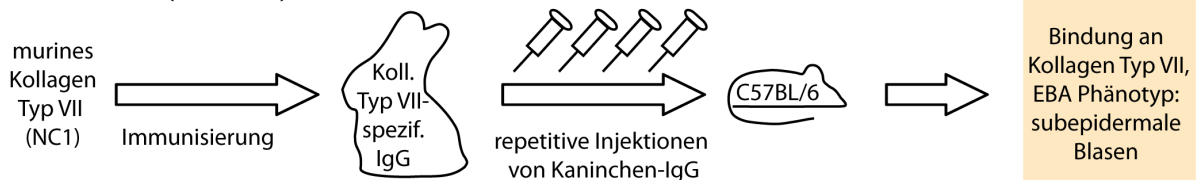
Ein weiterer, jedoch noch spezifischerer Ansatz, der die Effektorphase reproduziert, besteht im sogenannten Kryo-Assay (Sitaru, Kromminga et al. 2002). Im Vergleich zum passiven Modell besteht seine Spezifikation darin, dass er sich nur mit der Interaktion von Serum und Granulozyten auf Hautschnitten befasst. In diesem Modell werden Kryoschnitte von kutanen Gewebeproben verwendet, auf die Patientensera oder Antikörperpräparationen aufgetragen werden, die Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII enthalten. Im Detail werden die Schnitte auf Objektträgern aufgebracht und anschließend die mit PBS verdünnten Sera oder die Antikörperpräparationen hinzugefügt. Nach der Inkubation werden die Objektträger mit einem weiteren Objektträger bedeckt. Durch Abstandhalter entstehen dabei Inkubationskammern, die im nächsten Schritt ein Wandern der Leukozyten ermöglichen. Diese werden schließlich aus gesunden Spendern isoliert, in die Kammern gegeben und inkubiert. Die Objektträger mit der Gewebeprobe werden zum Schluss nach entsprechenden Waschschritten gefärbt. Die Autoantikörper binden an das Protein und führen zu einer Anlockung der zuvor hinzugefügten Granulozyten. Somit kommt es zur charakteristischen Abspaltung der Epidermis von der Dermis an der DEJ (Abbildung 32C). Dies geschieht innerhalb weniger Stunden, da weder Antikörper gebildet noch über die Blutlaufbahn zum Zielprotein befördert werden müssen. Es ist jedoch ein *ex vivo/in situ*-Modell, wodurch die Untersuchung der einzelnen Komponenten des Immunsystems schwer bis unmöglich ist. So müssen die Granulozyten aus gesunden Spendern gewonnen werden und extern hinzugefügt werden, weiterhin kann ihre Einwanderung ins Gewebe nicht untersucht werden.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Effektorphase der EBA untersucht werden sollte, wurde ein Modell benötigt, das die Induktionsphase unberücksichtigt lässt (Überblick in Tabelle 2). Das aktive Immunisierungsmodell schied somit aus. Weiterhin war die Frage von Interesse, warum Blasen an der Haut im passiven Modell erst nach vier bis sechs Tagen auftreten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das adaptive Immunsystem dabei eine Rolle spielen könnte. Dieses ist jedoch nur im passiven Modell, nicht aber im Kryo-Assay zu finden. Somit bot einzig das passive Modell die Möglichkeit, Untersuchungen in einem auf die Effektorphase beschränkten EBA-Modell durchzuführen, welches dennoch über ein vollständiges adaptives Immunsystem verfügt.

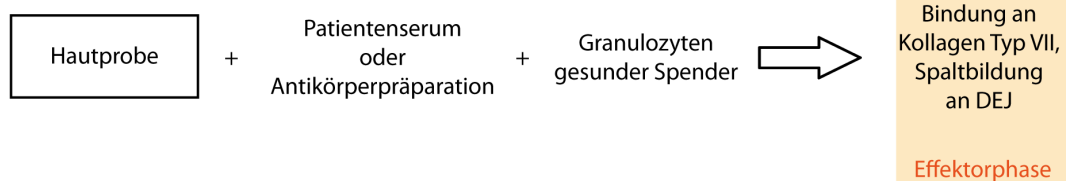
## A Aktives Immunisierungsmodell



## B Passives (Transfer-)Modell



## C Kryo-Assay



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der verschiedenen EBA-Modelle.** A: Beim aktiven Immunisierungsmodell werden SJL-Mäuse mit einem rekombinanten Fragment der NC1-Domäne des murinen Kollagens Typ VII zusammen mit einem Adjuvans immunisiert. Nach wiederholten Boost-Injektionen kommt es zum Durchbruch der Toleranz und zur Antikörperproduktion. Nach der Bindung der Antikörper an das Antigen entwickelt sich ein EBA-Phänotyp mit subepidermalen Blasen. B: Beim passiven Modell werden Kaninchen mit einem rekombinanten Fragment der NC1-Domäne des murinen Kollagens Typ VII immunisiert. Die Kaninchen bilden daraufhin Antikörper, die nach der Aufreinigung wiederholt C57BL/6-Mäusen injiziert werden. Nach der Bindung der Antikörper an das Antigen entwickelt sich ein EBA-Phänotyp mit subepidermalen Blasen. C: Beim Kryo-Assay werden Hautproben mit Patientenserum oder einer Antikörperpräparation inkubiert. Danach werden Granulozyten gesunder Spender hinzugefügt. Nach der Bindung der Antikörper an das Antigen kommt es zur Spaltbildung an der DEJ. Die zur Induktionsphase gehörenden Schritte sind blau hinterlegt, die Schritte der Effektorphase orange. NC1: nicht-kollagene Domäne 1. DEJ: dermal-epidermale Junctionszone. SJL, C57BL/6: verschiedene Mausstämme.

**Tabelle 2: Verschiedene experimentelle Ansätze bei der Erforschung der Grundlagen der EBA**

<b>Modell</b>	Aktives Immunisierungsmodell	Passives Modell (Transfermodell)	Kryo-Assay
<b>Induktionsmodus</b>	Wiederholte Immunisierung mit Adjuvans und NC1-Domäne des Kollagens Typ VII	Wiederholte Injektion von Kaninchen-Antikörpern gegen NC1-Domäne des Kollagens Typ VII	Aufbringen von Sera mit Autoantikörpern gegen Kollagen Typ VII auf Kryoschnitte der Haut, Hinzufügen von Granulozyten
<b>Art</b>	<i>in vivo</i> (SJL-Mäuse)	<i>in vivo</i> (C57BL/6-Mäuse)	<i>ex vivo/in situ</i> (Kryoschnitte der Haut, z.B. neonatale Vorhaut)
<b>Dauer</b>	Mehrere Wochen (erste Wunden nach ca. drei Wochen)	Mehrere Tage (erste Wunden nach vier bis sechs Tagen)	Mehrere Stunden
<b>Reproduktion welcher Phase der EBA</b>	Induktionsphase und Effektorphase	Effektorphase	Effektorphase
<b>Vorteile</b>	Reproduziert gesamte Pathophysiologie, Maus produziert selbst Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII	Dauer bis Krankheitsetablierung	Dauer bis Blasenentstehung
<b>Nachteile</b>	Dauer des Modells, Einsatz von Adjuvans	Fokus auf Effektorphase, mögliche Reaktion auf Kaninchen-Antikörper	Fokus auf Effektorphase, nicht physiologisch: Granulozyten müssen extern hinzugefügt werden
<b>Literatur</b>	Sitaru, Chiriac et al. 2006	Sitaru, Mihai et al. 2005	Sitaru, Kromminga et al. 2002

#### 4.1.2 Beteiligung des Lymphknotens und indirekte Rolle der T-Zellen

Einen Hinweis auf die Beteiligung von T-Zellen im aktiven Modell fand man in Experimenten mit athymischen SJL-Nacktmäusen, die nach Immunisierung nicht an EBA erkrankten: Erst die Rekonstitution mit T-Zellen aus dem immunisierten Wildtyp führte zu einer Erkrankung (Sitaru, Sesarman et al. 2010). Die Vermutung, dass T-Zellen auch im passiven Modell beteiligt sein könnten, ergab sich aus der zeitlichen Verzögerung von vier bis sechs Tagen zwischen der Antikörper-Injektion und der Ausbildung von Wunden. Diese vier bis sechs Tage entsprechen der Zeit, die das adaptive Immunsystem der Maus benötigen würde, um Antikörper gegen die injizierten Kaninchen-Antikörper zu bilden. Daraus wurde die Hypothese entwickelt, dass das adaptive Immunsystem an der EBA-Erkrankung im passiven Maus-Modell beteiligt sein könnte.

Neben einer verstärkten Proliferation im drainierenden Lymphknoten fand sich auch eine erhöhte Expression von T-Zell-Zytokinen in der Haut und im Lymphknoten. Im ersten Schritt wurde das passive Modell im Labor reproduziert. Dabei ließ sich die Bindung von Kaninchen-IgG an der DEJ, die Aktivierung des Komplementsystems und die daraus resultierende Ablagerung des Komplementfaktors C3 an der DEJ nachweisen. Granulozyten wanderten in die Haut ein und nach vier bis sechs Tagen waren charakteristische Wunden zu finden. Neben dieser zeitlichen Verzögerung zwischen erster IgG-Injektion und Wundentstehung fand sich auch eine erhöhte Expression von CCR5 in der Haut. CCR5 wird von T-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert (Mackay and Sallusto 2006) und ist dabei ein wichtiger Mediator der Chemotaxis im adaptiven Immunsystem, wie z.B. von regulatorischen T-Zellen (Kroetz and Deepe 2011).

Im drainierenden, inguinalen Lymphknoten fanden sich vermehrt Granulozyten, außerdem zeigte sich eine erhöhte Proliferation in der T-Zell-Zone. Zusätzlich wiesen zwei T-Zell-Zytokine an Tag 6 nach der ersten IgG-Injektion eine charakteristische Expression auf: IFN- $\gamma$  war signifikant erhöht, während IL-4 signifikant vermindert war. Dies stand also in zeitlichem Zusammenhang mit der Etablierung der ersten Wunden. Zusätzlich zum beobachteten Expressionsmuster waren auch T-Zellen in der Haut zu finden. Es war daher

wahrscheinlich, dass die T-Zellen eine Rolle bei der EBA-Erkrankung im passiven Modell spielten. Der Hypothese zufolge wandern spezifische T-Zellen aus dem Lymphknoten in die Haut aus, um dort mit dem entsprechenden Antigen, einem Epitop der injizierten Kaninchen-Antikörper, in Kontakt zu treten. Diese Wanderung sollte durch die Verwendung des Immunmodulators FTY720 (FTY) verhindert werden. Die Tiere wurden täglich mit FTY behandelt. Durch die unterbundene Zirkulation der T-Zellen fanden sich weniger T-Zellen in der Haut, außerdem war die dortige Zytokinexpression verändert: Es wurden weniger IFN- $\gamma$  und IL-17 exprimiert. Dies beeinflusste jedoch die Ausprägung der Erkrankung nicht. Verglichen mit den Tieren, die ebenfalls Kollagen Typ VII-spezifisches IgG erhalten hatten, jedoch zusammen mit einem Vehikel statt FTY, wurden die FTY-Tiere genauso krank. Daraus lässt sich schließen, dass die T-Zellen nicht direkt an der Blasenbildung in der Haut beteiligt sind. Allerdings ließ sich eine verstärkte Proliferation der T-Zellen im Lymphknoten nachweisen. Ihre Rolle könnte in der Aktivierung von B-Zellen bestehen. Dies könnte nach folgender Hypothese ablaufen: T-Zellen induzieren B-Zellen über MHCII und CD40-Ligand/CD40. Dabei besteht das präsentierte Antigen aus Fragmenten der injizierten Kaninchen-Antikörper. Nun bilden die aktivierten B-Zellen Keimzentren und produzieren Antikörper gegen die injizierten Kaninchen-Antikörper. Die sezernierten Antikörper zirkulieren und binden schließlich in der Haut an die dort lokalisierten Kaninchen-Antikörper. Dadurch aktivieren sie das Komplementsystem, wodurch es im passiven Modell zu einer Erkrankung mit dem EBA-Phänotyp kommt. Somit würde sich die Beteiligung des adaptiven Immunsystems an der Ausbildung der Erkrankung im passiven EBA-Modell äußern.

Ein Hinweis für die Rolle der T-Zell-abhängigen Antikörperproduktion bei der Ausbildung der passiven EBA ergibt sich dabei aus der Literatur (Bieber, Sun et al. 2010): Es konnte beobachtet werden, dass eine Erkrankung in neonatalen C57BL/6-Mäusen durch Injektion pathogener Antikörper nicht induziert werden kann, während dies bei erwachsenen Mäusen desselben Stamms erfolgreich möglich ist. Sowohl im aktiven als auch im passiven EBA-Modell liegt eine Th1-Polarisierung vor. Es werden charakteristische Zytokine wie IFN- $\gamma$

verstärkt exprimiert. Neonatale Mäuse weisen hingegen eher eine Th2-Polarisierung auf. Es wurde beschrieben, dass sich die neonatale T-Zell-abhängige Antikörperproduktion deutlich von der adulter Mäuse unterscheidet (Adkins, Leclerc et al. 2004). Während der Behandlung mit FTY wurde eine mögliche Aktivierung der B-Zellen nicht unterbunden. Durch FTY werden sie zwar auch, aber in deutlich geringerem Umfang in lymphatischen Organen zurückgehalten. Um nun die Rolle der B-Zellen in der Ausbildung der Erkrankung zu untersuchen, müssten andere Ansätze, beispielsweise Knock-out (KO)-Mäuse herangezogen werden. In bisher unveröffentlichten Studien der Arbeitsgruppe wurde CD40-Ligand-KO-Tieren vier Mal alle zwei Tage je 5mg Kollagen Typ VII-spezifisches IgG injiziert, ebenso der Kontrollgruppe, die aus C57BL/6-Mäusen bestand. Dabei ist für diesen KO-Stamm charakteristisch, dass es keine B-Zell-Hilfe durch T-Zellen gibt. In Mäusen ohne diesen Defekt präsentieren B-Zellen ein Antigen an T-Zellen. Wird dieses über MHCII erkannt, bindet der CD40-Ligand auf der T-Zelle an den CD40-Rezeptor auf der B-Zelle. Durch das Zusammenspiel dieser beiden Interaktionen wird diese aktiviert. Dieser Schritt bleibt bei KO-Mäusen aus. Tatsächlich wiesen die KO-Tiere an Tag 23 einen geringeren Score auf, gemessen an dem Areal unter der Kurve (area under the curve=AUC). Das Ergebnis wurde in der Wiederholung des Experiments reproduziert. Dies bestätigt eine mögliche Beeinflussung der Erkrankung über die Antikörperproduktion der B-Zellen.

Um die Rolle des adaptiven Immunsystems hinsichtlich der B-Zellen weiter aufzuklären, wurde das Experiment mit einem weiteren Mausstamm wiederholt (bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Neben der Kontrollgruppe, bestehend aus C57BL/6-Mäusen, wurden B-Zell-defiziente JHT-Mäuse verwendet. Diesen fehlen J<sub>H</sub>-Segmente und ein Intron-Enhancer im IgH-Locus, wodurch sie keine B-Zellen produzieren können (Gu, Zou et al. 1993). Diese Tiere wiesen nach obigem Injektionsschema ebenfalls einen geringeren Score (AUC an Tag 23) als die Kontrolltiere auf.

Die Ergebnisse dieser Versuche weisen darauf hin, dass B-Zellen und damit auch das adaptive Immunsystem im passiven Modell der EBA eine Rolle spielen. Diese besteht in der Produktion von Antikörpern mithilfe der T-Zellen. Zusätzlich dazu wäre ein Einfluss auf die



Erkrankung an anderer Stelle möglich, was erklären könnte, warum die KO-Mäuse in den oben beschriebenen Experimenten zwar weniger krank werden, aber auch nicht völlig gesund bleiben. Diese Beeinflussung könnte beispielsweise über die Zytokinproduktion oder die Antigenpräsentation geschehen.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass endogene Antikörper an der Krankheitsentstehung im passiven Modell beteiligt sind. Dabei würden sie das Komplementsystem aktivieren. Somit ließe sich sowohl das Ausmaß als auch der verspätete Onset der Erkrankung erklären. Um den Zusammenhang zwischen T- und B-Zellen im Modell der passiven EBA aufzuklären, sowie ihre konkrete Rolle bei der Erkrankung zu untersuchen, wären weitere Experimente nötig:

Hautschnitte der Maus könnten gegen murines IgG1, IgG2 und IgG3, außerdem gegen IgA und IgE gefärbt werden. Eine deutliche Färbung an der Haut würde die Produktion von Maus-Antikörpern gegen Kaninchen-IgG nachweisen sowie ihre Bindung an letztere.

Eine weitere Herangehensweise bestünde in einem spezifischen ELISA: Platten könnten mit Kaninchen-Antikörpern gecoatet werden, die zur Krankheitsinduktion verwendet wurden. Anschließend würde ein Assay mit Mausserum aus erkrankten Tieren durchgeführt werden. Bei vorhandenen murinen Antikörpern gegen Kaninchen-IgG ergäbe sich ein positives Signal.

Die Injektion von IgG zur Krankheitsinduktion in einer Kontrollgruppe (C57BL/6) verglichen mit T-Zell-defizienten Mäusen, B-Zell-defizienten Mäusen sowie Mäusen, denen sowohl T- als auch B-Zellen fehlen, würde den Einfluss der Kommunikation zwischen T- und B-Zellen auf die Erkrankung untersuchen. Bei einer Beteiligung der T-Zellen, z.B. durch Kommunikation, wäre die Erkrankung in der letzten Gruppe am schwächsten ausgeprägt.

Den bereits erwähnten Versuch mit JHT-Mäusen könnte man um eine zusätzliche Stufe erweitern, in der B-Zell-defizienten Mäusen B-Zellen aus anderen Mäusen injiziert würden. Bei B-Zellen aus normalen C57BL/6-Tieren wäre ein Anstieg im Krankheitswert auf das Level der Kontrollgruppe zu erwarten. Würde man ihnen B-Zellen aus Mäusen injizieren, denen

CD40 fehlt, könnte man untersuchen, ob die Kommunikation zwischen T- und B-Zellen zu bestimmten Phasen der Krankheit eine Rolle spielen könnte.

Um weitere Erkenntnisse über die Rolle der Zytokinexpression und -produktion zu erhalten, würde man in erster Linie die vorhandene Zytokinexpression in den Lymphknoten untersuchen. In einem zweiten Schritt könnte man Mäuse verwenden, deren spezifische Zytokinproduktion eines Zelltyps, z.B. IL-6 der B-Zellen (Barr, Shen et al. 2012), ausgeschaltet ist. Dazu müssen Knochenmark-chimäre Mäuse generiert werden (Fillatreau, Sweenie et al. 2002). So könnte man Rückschlüsse auf die Herkunft eines bestimmten Zytokins ziehen und die verschiedenen Zelltypen und Zytokine in einen kausalen Zusammenhang für die Krankheitsentstehung bringen.

## 4.2 Wundheilung durch Protein-Nukleinsäure-Komplexe (PNACs)

Das Ausmaß der EBA-Erkrankung wird nach der Krankheitsinduktion nicht nur durch die Blasenbildung bestimmt, sondern auch durch die Wundheilung. Während sich durch das Ausmaß der Pathologie das Krankheitsbild verschlechtert, verbessert sich auf der anderen Seite der Verlauf durch den Grad der Wundheilung. Daher wurde versucht, die Wundheilung – und somit das gesamte Krankheitsbild – durch die Verwendung von PNACs zu beeinflussen.

Nach der Induktion einer EBA-Erkrankung (passives Modell) in Mäusen wurden diese entweder mit PBS oder PNACs behandelt. Der Einsatz von PNACs zeigte seine Wirkung insbesondere in der späten Phase der Erkrankung: Das Ausmaß der Blasenbildung an der Haut der Mäuse, abzulesen am Score, verbesserte sich. PNACs spielen daher eine Rolle in der Wundheilung. Sie ließen während der EBA die Blasen besser abheilen. Dabei war im Lymphknoten eine veränderte Zytokinexpression nachzuweisen: Während IL-4 signifikant erhöht war, wurde FcγR4 signifikant weniger exprimiert. Dabei hat IL-4 eine anti-inflammatorische Wirkung (Hart, Vitti et al. 1989), es reguliert die Th1-Zellen herunter (Gramaglia, Mauri et al. 1999), fördert die Differenzierung von Th2-Zellen (Croft and Swain 1995) und stimuliert aktivierte B-Zellen (Hudak, Gollnick et al. 1987). FcγR4 spielt eine Rolle in der EBA (Nimmerjahn and Ravetch 2008; Kasperkiewicz, Nimmerjahn et al. 2012). Er gilt als aktivierender Faktor der Erkrankung. Somit hängt eine verminderte Expression mit einer geringeren Ausprägung der Erkrankung zusammen. Dabei könnten PNACs auch einen Einfluss auf das Aktin-bindende Protein Flightless 1 haben. Dieses wurde in der Literatur im Zusammenhang mit der verschlechterten Wundheilung sowie der Ausbildung schwerer Wunden während der EBA-Erkrankung beschrieben (Kopecki, Arkell et al. 2011). Eine weitere Rolle könnte das Heat Shock Protein (HSP) 90 spielen. Es ist ein Bestandteil von PNACs und sein positiver Einfluss auf die Wundheilung während der EBA ist aus der Literatur bekannt (Kim and Kim 2013).

Um Hinweise auf die molekularen Wirkansätze der PNACs in der Wundheilung zu erlangen, wurden diese in einem humanen Modell eingesetzt. Wundheilungsstanzen wurden in einem *in vitro*-Assay mit PNACs inkubiert. An den Wundheilungsrändern entstanden dabei Epithelzungen. Diese gelten dabei als Maß für die Wundheilung (Yu, Stojadinovic et al. 2012; Meier, Haslam et al. 2013) und wurden daher näher untersucht. Analysiert wurden die Länge dieser entstandenen Zungen entlang der Basalzellmembran jenseits der zugefügten Wundkante sowie ihre Fläche. Dieser liegen die Faktoren Proliferation und Angiogenese zugrunde. Das Maß der Proliferation wurde als Anteil der proliferierenden Zellen in Bezug auf alle lebenden Zellen der Zunge bestimmt. Als Marker der Angiogenese wurde das Molekül CD31 herangezogen (Lee, Liu et al. 2014), das von Endothelzellen exprimiert wird und Gefäße immunhistochemisch markiert.

Durch die Zugabe von PNACs wiesen die Epithelzungen eine größere Fläche auf, die auf Proliferation und Angiogenese zurückgeführt werden konnte. Mit der Proliferation hing auch die signifikant erhöhte Länge der Zungen zusammen: Durch eine vermehrte Proliferation in der Basalzellschicht entstehen längere Zungen. Die Angiogenese führte zu einer erhöhten Anzahl an Gefäßen. Darüber beeinflusst sie das Wachstum der Zungen durch eine verbesserte Nährstoffversorgung des Epithels. Die Länge, Proliferation und Angiogenese waren unter der Zugabe von PNACs bereits nach drei Tagen Kultivierung signifikant erhöht. Auch an Tag 6 waren Länge, Proliferation und Angiogenese mit PNACs signifikant erhöht. Dabei steigerten sich Länge und Angiogenese sogar noch weiter verglichen mit Tag 3, was bei der Länge auf die konstant erhöhte Proliferationsrate zurückzuführen ist. Diese signifikant erhöhten Werte an Tag 6 führten zu diesem Zeitpunkt schließlich auch zu einer signifikant größeren Fläche der Epithelzungen.

Diesen Ergebnissen könnte eine Vielzahl molekularer Wirkmechanismen zugrunde liegen. Da PNACs aus Komplexen von Proteinen und Nukleinsäuren bestehen, wären komplexierende Chaperone eine naheliegende Möglichkeit. Diese werden verstärkt unter Stressbedingungen gebildet, die ebenfalls bei der Herstellung von PNACs vorherrschen, und könnten daher auch

prozentual einen Großteil der PNACs ausmachen. So enthalten PNACs die Moleküle HSP90, HSP27 und Calreticulin.

HSP90 $\alpha$  verbesserte in einer Studie die Wundheilung, indem es die Migration dermalen Fibroblasten anregte (Li, Li et al. 2007). Dabei wurde es während des hypoxischen Zustands der Haut sekretiert. Eine andere Forschergruppe fand mit HSP90 $\alpha$  ebenfalls eine verbesserte Wundheilung, diese war auch auf eine verbesserte Migration der Zellen in der Haut zurückzuführen (Tsen, Bhatia et al. 2013). Dabei beschäftigten sich die Forscher mit dem zugrunde liegenden Mechanismus. Sie fanden einen Transmembran-Signalweg am Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)1, der die Kinasen Akt1 und Akt2, auch bekannt als Proteinkinase B  $\alpha$  und  $\beta$ , aktivierte. Im Gegensatz zu der verbesserten Wundheilung steht eine Studie, welche die Rolle von HSP90 im aktiven EBA-Modell untersuchte und einen Zusammenhang mit autoreaktiven T-Zellen zeigte (Kasperkiewicz, Müller et al. 2011). Dabei wurden Inhibitoren gegen HSP90 eingesetzt, die zu einer Reduzierung der T-Zell-Proliferation und daher zu einem verbesserten Krankheitsbild führten. Somit war das HSP90 in diesem Fall nicht protektiv, sondern förderte die Proliferation der T-Zellen. Da die T-Zellen im passiven Modell aber keine ursächliche Rolle spielen, wie dies im aktiven Modell der Fall ist, kann diese Wirkweise des HSP90 vernachlässigt werden.

Ein anderes HSP ist das HSPB1, auch bekannt in seiner humanen Form als HSP27 oder als murines HSP25. In einer Studie mit HSPB1-defizienten Mäusen in einem Exzisions-Wundheilungsmodell stellte man fest, dass HSPB1 mit seiner anti-inflammatorischen Wirkung die Wundheilung beeinflusste (Crowe, Aubareda et al. 2013). Dabei veränderte HSPB1 das Zytokinmilieu in einer anti-inflammatorischen Weise, es reduzierte die Einwanderung von Neutrophilen in Wunden und erhöhte die Proliferation von Fibroblasten.

Ein weiteres Chaperon, das auch einen Bestandteil von PNACs bildet, ist das Protein Calreticulin. In einer Studie an diabetischen Mäusen ließ sich durch seinen topischen Einsatz die Wundheilung beschleunigen (Greives, Samra et al. 2012). Die Zeit bis zur vollständigen

Schließung einer Wunde war mit Calreticulin deutlich verkürzt. Dabei steigerte Calreticulin *in vitro* die Proliferation muriner Fibroblasten, jedoch nicht stärker als die Zugabe von Serum. Als ursächlich für die verbesserte Wundheilung hielten die Verfasser dieser Studie die Steigerung der Migration von Fibroblasten durch Calreticulin, welche sie *in vitro* nachweisen konnten. Auch bei humanen Fibroblasten *in vitro* konnte Calreticulin die Migration und Proliferation steigern. Eine andere Gruppe fand bei der Behandlung mit einem Calreticulin-Fragment eine deutlich geringere Ausprägung der Erkrankung in einem murinen DTH-Modell sowie im EAE-Modell (Qiu, Hong et al. 2012). Dieser immunmodulatorische Effekt war nicht auf eine Wirkung bei der Aktivierung von T-Zellen zurückzuführen, sondern auf eine Produktion von IgG-Antikörpern, die gegen das Calreticulin-Fragment gerichtet waren. Diese Antikörper waren in der Lage, Antigen-spezifische T-Zellen *in vitro* zu inhibieren. Zelloberflächen-Calreticulin ist auf T-Zellen, aber auch auf Makrophagen und Dendritischen Zellen zu finden.

Zusätzlich zu den einzelnen Proteinen stellen die Proliferation und die Migration Prozesse dar, die nach der Verletzung und der folgenden Entzündungsreaktion stattfinden (Braiman-Wiksman, Solomonik et al. 2007). Die Proliferation der Keratinozyten in der Epidermis trägt dabei zur Reepithelialisierung und schließlich zum Wundverschluss bei (Büth, Buttigieg et al. 2007). Dies konnte auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen am humanen Wundheilungsmodell beobachtet werden, wo eine erhöhte Proliferation bei Zugabe von PNACs zu größeren Wundheilungszunahmen führte, die die Reepithelialisierung darstellen.

Der Ansatzpunkt der beschriebenen Chaperone wären verschiedene Chaperonrezeptoren, die ebenfalls im Zusammenhang mit der Wundheilung beschrieben wurden. So kann der Rezeptor Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX1) HSPs wie HSP70 erkennen (Inoue and Sawamura 2007). Dabei wird LOX1 vor allem auf Endothelzellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass es eine Rolle in der Angiogenese spielt (Jiang, Yan et al. 2011). Das stimmt mit den vorliegend dargestellten Ergebnissen aus dem Wundheilungsmodell überein, in welchem PNACs die Angiogenese anregten. Dabei wäre es möglich, dass die enthaltenen HSPs über LOX1 Einfluss auf die Angiogenese nahmen.

Weiterhin ist in der Literatur der Zusammenhang von CD91 (auch bekannt als Chaperonrezeptor LRP1) mit der Migration dermalen und epidermalen Zellen beschrieben (Cheng, Fan et al. 2008). Er bindet dabei das Chaperon HSP90 $\alpha$ . Auch dieser Rezeptor könnte über das HSP90 aus PNACs angesprochen werden, die daraus resultierende Migration könnte zu einem Teil auch zu der Entstehung der Wundheilungszungen beitragen.

Vergleicht man PNACs mit dem Zusatz der Proteinkontrolle in Form von FCS, so führte dieser zu einer signifikant kleineren Wundheilungsfläche an Tag 6. Somit besitzt FCS nicht nur wachstumsfördernde Eigenschaften. Der Einsatz von FCS in einem Fibroblastenmodell führte sowohl zur Erhöhung anti-apoptotischer als auch pro-apoptotischer Proteine (Kobayashi, Liu et al. 2005). Weiterhin wurden Antikörper gegen FCS bei Patienten gefunden, die mit kultivierten Lymphozyten unter dem Zusatz von FCS behandelt worden waren (Selvaggi, Walker et al. 1997). Beide Studien verdeutlichen, dass der Einsatz von FCS in der Zellkultur und im Modell auch negative Aspekte birgt, die den vergleichsweise geringen Einfluss auf das Wachstum der Epithelzungen im Vergleich zu PNACs erklären könnten.

Zusammenfassend sind vor allem die Chaperone vielversprechende Kandidaten, die für die Verbesserung der Wundheilung durch PNACs infrage kommen. Die Hinweise aus der Literatur auf die vielfältigen Moleküle stützen die Hypothese, dass nicht ein einziges Molekül als Bestandteil der PNACs verantwortlich für deren Einfluss auf die Wundheilung ist. Vielmehr ist der Wundheilungseffekt der PNACs vermutlich auf das Zusammenspiel der Komplexe aus unterschiedlichen Proteinen und Nukleinsäuren zurückzuführen. Da dies jedoch schwierig zu untersuchen ist, sollte in erster Linie der Fokus auf den einzelnen Bestandteilen liegen und deren Potential in weiteren Versuchen genauer analysiert werden.

Um den Einfluss der einzelnen Proteine wie HSP90, HSPB1 und Calreticulin zu erforschen, könnte man diese in einem ersten Schritt im Wundheilungsmodell einsetzen und ihren Einfluss auf das Wachstum der Epithelzungen untersuchen. Ausgehend von einem oder mehreren vielversprechenden Kandidaten wäre es in einem zweiten Schritt möglich, die passive EBA in Mäusen zu induzieren, die für das jeweilige Protein defizient sind. Während

die Zufuhr der Proteine über PNACs das Krankheitsbild verbesserte, sollte ein Fehlen dieser Proteine zu einer Verschlechterung der Erkrankung führen. In einem weiteren Versuchsaufbau könnte man Mäuse im passiven EBA-Modell zusätzlich zu PNACs mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne darin enthaltene Proteine behandeln. Somit würde deren Wirkung in der Maus unterbunden werden, während der Rest aus den Komplexen nach wie vor vorhanden wäre. Beschränkt man sich auf *in vitro*-Versuche, könnte man im Wundheilungsmodell das Wachstum der Epithelzungen unter der Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen oben genannte Proteine untersuchen. Bei dem oder den an der Wundheilung beteiligten Proteinen sollten mit entsprechenden Antikörpern die Epithelzungen Defizite im Wachstum zeigen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob das adaptive Immunsystem eine Rolle im passiven Modell spielt. Dazu wurde das passive EBA-Modell im Labor etabliert, neben Ablagerungen von IgG und C3 an der DEJ fand sich in der Haut eine Entzündungsreaktion, gemessen an einer erhöhten Zytokinexpression, die zu makroskopischen Blasen führte. Eine Beteiligung des adaptiven Immunsystems konnte im drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden, der eine Proliferation von T-Zellen aufwies, welche auch in die erkrankte Haut einwanderten.

Da es zwischen der Injektion der Antikörper und der Ausbildung von Wunden zu einer zeitlichen Verzögerung von vier bis sechs Tagen kam, stellte sich die Frage hinsichtlich einer möglichen Rolle der T-Zellen bei der Pathogenese der Erkrankung. Dazu wurde der Lymphozytenegress an die Haut durch den Immunmodulator FTY unterbunden. Dieser konnte die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut bereits nach zwei Tagen senken. Durch die Behandlung konnte weiterhin die Anzahl der T-Zellen in der Haut reduziert werden, was auch das exprimierte Zytokinmuster veränderte. So wurden IFN- $\gamma$  und IL-17 signifikant weniger exprimiert. Jedoch hatte dies keinen Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung. Somit spielen die T-Zellen keine direkte Rolle bei der passiven EBA, jedoch ist eine indirekte Rolle denkbar. Dabei könnten sie B-Zellen induzieren, welche ihrerseits Antikörper gegen die injizierten Antikörper bilden würden. Die darauf folgende Entzündungskaskade würde zur Ausbildung des EBA-Phänotyps führen. Durch die Bindung der gebildeten Antikörper käme es zur Aktivierung des Komplementsystems und schließlich zur lokalen Entzündung an der Haut.

Der Schweregrad der Erkrankung setzt sich zusammen aus einer stark ausgeprägten Effektorphase auf der einen Seite, resultierend in der Entstehung von Blasen, Wunden und Krusten, und der Wundheilung auf der anderen Seite. Während Komplementfaktoren, Granulozyten und ROS, die zur Ausbildung der Blasen führen, die Erkrankung

verschlimmern, trägt das Maß der Wundheilung zur Verbesserung des Krankheitsbildes bei. Eine mögliche Modulation der Erkrankung zeigte sich bei der Behandlung der EBA mit PNACs, die in der späten Phase das Krankheitsbild verbesserten. Daher wurde die Wundheilung durch PNACs in einem humanen Hautmodell anhand des Wachstums von Epithelzellen untersucht. Mit PNACs wiesen diese eine größere Fläche auf, welche auf verbessertes Längenwachstum, erhöhte Proliferation sowie erhöhte Angiogenese in der Dermis zurückzuführen war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das adaptive Immunsystem die Effektorphase der Erkrankung bestimmt. Über die Wundheilung lässt sich die bereits ausgebildete Erkrankung positiv beeinflussen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Baechler, E. C., Batliwalla, F. M., Karypis, G., Gaffney, P. M., Ortmann, W. A., Espe, K. J., Shark, K. B., Grande, W. J., Hughes, K. M., Kapur, V., Gregersen, P. K. and Behrens, T. W. (2003). "Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(5): 2610-2615.

Banczyk, D., Kalies, K., Nachbar, L., Bergmann, L., Schmidt, P., Bode, U., Teegen, B., Steven, P., Lange, T., Textor, J., Ludwig, R. J., Stöcker, W., König, P., Bell, E. and Westermann, J. (2014). "Activated CD4+ T cells enter the splenic T-cell zone and induce autoantibody-producing germinal centers through bystander activation." European Journal of Immunology **44**(1): 93-102.

Barr, T. A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor, R. A., Anderton, S. M., Bar-Or, A., Fillatreau, S. and Gray, D. (2012). "B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells." The Journal of Experimental Medicine **209**(5): 1001-1010.

Beníšek, Z., Süli, J., Eliáš, D., Lenhardt, L. u. t., Ondřejková, A., Ondřejka, R., Švrček, Š. and Bajová, V. (2004). "Experimental squalene adjuvant." Vaccine **22**(25-26): 3470-3474.

Bennett, B., Check, I. J., Olsen, M. R. and Hunter, R. L. (1992). "A comparison of commercially available adjuvants for use in research." Journal of Immunological Methods **153**(1-2): 31-40.

Bernard, P., Vaillant, L., Labeille, B., Bedane, C., Arbeille, B., Denoeux, J. P., Lorette, G., Bonnetblanc, J. M. and Prost, C. (1995). "Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three french regions." Archives of Dermatology **131**(1): 48-52.

Bieber, K., Sun, S., Ishii, N., Kasperkiewicz, M., Schmidt, E., Hirose, M., Westermann, J., Yu, X., Zillikens, D. and Ludwig, R. J. (2010). "Animal models for autoimmune bullous dermatoses." Experimental Dermatology **19**(1): 2-11.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A. and Sinigaglia, F. (1998). "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." The Journal of Experimental Medicine **187**(1): 129-134.

Braiman-Wiksmann, L., Solomonik, I., Spira, R. and Tennenbaum, T. (2007). "Novel insights into wound healing sequence of events." Toxicologic Pathology **35**(6): 767-779.

Brandt, R. H., Christoph, B., Hahnefeld, H., Solisch, P. and Liebermann, H. E. H. (1980). "[Vaccination therapy of laryngeal papillomatosis]." Zeitschrift für Erkrankungen der Atmungsorgane **155**(2): 254-261.

Bruckner-Tuderman, L. (2009). "Can type VII collagen injections cure dystrophic epidermolysis bullosa?" Molecular Therapy **17**(1): 6-7.

Büth, H., Buttigieg, P. L., Ostafe, R., Rehders, M., Dannenmann, S. R., Schaschke, N., Stark, H. J., Boukamp, P. and Brix, K. (2007). "Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes." European Journal of Cell Biology **86**(11-12): 747-761.

Bystry, R. S., Aluvihare, V., Welch, K. A., Kallikourdis, M. and Betz, A. G. (2001). "B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4." Nature Immunology **2**(12): 1126-1132.

Cheng, C. F., Fan, J., Fedesco, M., Guan, S., Li, Y., Bandyopadhyay, B., Bright, A. M., Yerushalmi, D., Liang, M., Chen, M., Han, Y. P., Woodley, D. T. and Li, W. (2008). "Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing." Molecular and Cellular Biology **28**(10): 3344-3358.

Croft, M. and Swain, S. L. (1995). "Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines." The Journal of Immunology **154**(9): 4269-4282.

Crowe, J., Aubareda, A., McNamee, K., Przybycien, P. M., Lu, X., Williams, R. O., Bou-Gharios, G., Saklatvala, J. and Dean, J. L. (2013). "Heat shock protein B1-deficient mice display impaired wound healing." PLoS One **8**(10): (e77383) 1-12.

de Oliveira, C. E., Oda, J. M., Losi Guembarovski, R., de Oliveira, K. B., Ariza, C. B., Neto, J. S., Banin Hirata, B. K. and Watanabe, M. A. (2014). "CC Chemokine receptor 5: The interface of host immunity and cancer." Disease Markers **2014**(2014): (Article ID 126954) 1-8.

Debes, G. F., Arnold, C. N., Young, A. J., Krautwald, S., Lipp, M., Hay, J. B. and Butcher, E. C. (2005). "Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues." Nature Immunology **6**(9): 889-894.

Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F. W. and Geha, R. S. (2004). "Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB." International Immunology **16**(3): 395-404.

Delves, P. J. and Roitt, I. M. (2000). "The immune system. First of two parts." The New England Journal of Medicine **343**(1): 37-49.

Doebis, C., Menning, A., Neumann, K., Ghani, S., Schlawe, K., Lauer, U., Hamann, A., Huehn, J. and Syrbe, U. (2011). "Accumulation and local proliferation of antigen-specific CD4+ T cells in antigen-bearing tissue." Immunology and Cell Biology **89**(4): 566-572.

Dudda, J. C. and Martin, S. F. (2004). "Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments." Trends in Immunology **25**(8): 417-421.

Engineer, L. and Ahmed, A. R. (2001). "Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita." Journal of the American Academy of Dermatology **44**(5): 818-828.

Fantuzzi, G. and Dinarello, C. A. (1999). "Interleukin-18 and interleukin-1beta: Two cytokine substrates for ICE (caspase-1)." Journal of Clinical Immunology **19**(1): 1-11.

Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. and Anderton, S. M. (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." Nature Immunology **3**(10): 944-950.

Fleming, T. J., Fleming, M. L. and Malek, T. R. (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." The Journal of Immunology **151**(5): 2399-2408.

Furie, M., Iwata, M., Yoon, H.-I., Kubota, Y., Ohto, H., Kawashima, M., Tsuchida, T., Oohara, K., Tamaki, K. and Kukita, A. (1986). "Epidermolysis bullosa acquisita: Clinical response to plasma exchange therapy and circulating anti-basement membrane zone antibody titer." Journal of the American Academy of Dermatology **14**(5): 873-878.

Garlanda, C., Dinarello, C. A. and Mantovani, A. (2013). "The interleukin-1 family: back to the future." Immunity **39**(6): 1003-1018.

Ghani, S., Feuerer, M., Doebis, C., Lauer, U., Loddenkemper, C., Huehn, J., Hamann, A. and Syrbé, U. (2009). "T cells as pioneers: antigen-specific T cells condition inflamed sites for high-rate antigen-non-specific effector cell recruitment." Immunology **128**(1 Suppl): e870-880.

Gramaglia, I., Mauri, D. N., Miner, K. T., Ware, C. F. and Croft, M. (1999). "Lymphotoxin alphabeta is expressed on recently activated naive and Th1-like CD4 cells but is down-regulated by IL-4 during Th2 differentiation." The Journal of Immunology **162**(3): 1333-1338.

Greives, M. R., Samra, F., Pavlides, S. C., Blechman, K. M., Naylor, S. M., Woodrell, C. D., Cadacio, C., Levine, J. P., Bancroft, T. A., Michalak, M., Warren, S. M. and Gold, L. I. (2012). "Exogenous calreticulin improves diabetic wound healing." Wound Repair and Regeneration **20**(5): 715-730.

Gu, H., Zou, Y.-R. and Rajewsky, K. (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." Cell **73**(6): 1155-1164.

Gupta, R., Woodley, D. T. and Chen, M. (2012). "Epidermolysis bullosa acquisita." Clinics in Dermatology **30**(1): 60-69.

Hammers, C. M., Bieber, K., Kalies, K., Banczyk, D., Ellebrecht, C. T., Ibrahim, S. M., Zillikens, D., Ludwig, R. J. and Westermann, J. (2011). "Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice." The Journal of Immunology **187**(10): 5043-5050.

Hart, P. H., Vitti, G. F., Burgess, D. R., Whitty, G. A., Piccoli, D. S. and Hamilton, J. A. (1989). "Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(10): 3803-3807.

Hickey, M. J. (2012). "Has Ly6G finally found a job?" Blood **120**(7): 1352-1353.

Hudak, S. A., Gollnick, S. O., Conrad, D. H. and Kehry, M. R. (1987). "Murine B-cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) increases expression of the Fc receptor for IgE on mouse B cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **84**(13): 4606-4610.

Inoue, N. and Sawamura, T. (2007). "Lectin-like oxidized LDL receptor-1 as extracellular chaperone receptor: its versatile functions and human diseases." Methods **43**(3): 218-222.

Ishii, N., Hamada, T., Dainichi, T., Karashima, T., Nakama, T., Yasumoto, S., Zillikens, D. and Hashimoto, T. (2010). "Epidermolysis bullosa acquisita: what's new?" The Journal of Dermatology **37**(3): 220-230.

Iwata, H., Bieber, K., Tiburzy, B., Chrobok, N., Kalies, K., Shimizu, A., Leineweber, S., Ishiko, A., Vorobyev, A., Zillikens, D., Köhl, J., Westermann, J., Seeger, K., Manz, R. and Ludwig, R. J. (2013). "B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita." The Journal of Immunology **191**(6): 2978-2988.

Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A. and Pape, K. A. (2001). "In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells." Annual Review of Immunology **19**: 23-45.

Jiang, J., Yan, M., Mehta, J. L. and Hu, C. (2011). "Angiogenesis is a link between atherosclerosis and tumorigenesis: role of LOX-1." Cardiovascular Drugs and Therapy **25**(5): 461-468.

Jones, D. A., Hunt, S. W. I., Prisanh, P. S., Briggaman, R. A. and Gammon, W. R. (1995). "Immunodominant autoepitopes of type VII collagen are short, paired peptide sequences within the fibronectin type III homology region of the noncollagenous (NC1) domain." Journal of Investigative Dermatology **104**(2): 231-235.

Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T. and Grusby, M. J. (1996). "Stat6 Is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells." Immunity **4**(3): 313-319.

Kasperkiewicz, M., Müller, R., Manz, R., Magens, M., Hammers, C. M., Somlai, C., Westermann, J., Schmidt, E., Zillikens, D., Ludwig, R. J. and Orosz, A. (2011). "Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets." Blood **117**(23): 6135-6142.



Kasperkiewicz, M., Nimmerjahn, F., Wende, S., Hirose, M., Iwata, H., Jonkman, M. F., Samavedam, U., Gupta, Y., Möller, S., Rentz, E., Hellberg, L., Kalies, K., Yu, X., Schmidt, E., Häslner, R., Laskay, T., Westermann, J., Köhl, J., Zillikens, D. and Ludwig, R. J. (2012). "Genetic identification and functional validation of FcγR4 as key molecule in autoantibody-induced tissue injury." The Journal of Pathology **228**(1): 8-19.

Kim, J. H. and Kim, S. C. (2013). "Epidermolysis bullosa acquisita." Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology **27**(10): 1204-1213.

Kim, J. H., Kim, Y. H. and Kim, S. C. (2011). "Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases." Acta Dermato-Venereologica **91**(3): 307-312.

Klos, A., Tenner, A. J., Johswich, K. O., Ager, R. R., Reis, E. S. and Köhl, J. (2009). "The role of the anaphylatoxins in health and disease." Molecular Immunology **46**(14): 2753-2766.

Kobayashi, T., Liu, X., Kim, H. J., Kohyama, T., Wen, F. Q., Abe, S., Fang, Q., Zhu, Y. K., Spurzem, J. R., Bitterman, P. and Rennard, S. I. (2005). "TGF-β1 and serum both stimulate contraction but differentially affect apoptosis in 3D collagen gels." Respiratory Research **6**(Dec 2005): (Article 141) 1-12.

Kofler, H., Wambacher-Gasser, B., Topar, G., Weinlich, G., Schuler, G., Hintner, H., Romani, N. and Fritsch, P. (1997). "Intravenous immunoglobulin treatment in therapy-resistant epidermolysis bullosa acquisita." Journal of the American Academy of Dermatology **36**(2): 331-335.

Kopecki, Z., Arkell, R. M., Strudwick, X. L., Hirose, M., Ludwig, R. J., Kern, J. S., Bruckner-Tuderman, L., Zillikens, D., Murrell, D. F. and Cowin, A. J. (2011). "Overexpression of the Flii gene increases dermal-epidermal blistering in an autoimmune ColVII mouse model of epidermolysis bullosa acquisita." The Journal of Pathology **225**(3): 401-413.

Kroetz, D. N. and Deepe, G. S., Jr. (2011). "An aberrant thymus in CCR5<sup>-/-</sup> mice is coupled with an enhanced adaptive immune response in fungal infection." The Journal of Immunology **186**(10): 5949-5955.

Lapiere, J. C., Woodley, D. T., Parente, M. G., Iwasaki, T., Wynn, K. C., Christiano, A. M. and Uitto, J. (1993). "Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa." The Journal of Clinical Investigation **92**(4): 1831-1839.

Larkin, J. III., Ahmed, C. M., Wilson, T. D. and Johnson, H. M. (2013). "Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells." Frontiers in Immunology **4**(Dec 2013): (Article 469) 1-8.

Lee, C., Liu, A., Miranda-Ribera, A., Hyun, S. W., Lillehoj, E. P., Cross, A. S., Passaniti, A., Grimm, P. R., Kim, B. Y., Welling, P. A., Madri, J. A., Delisser, H. M. and Goldblum, S. E. (2014). "NEU1 sialidase regulates the sialylation state of CD31 and disrupts CD31-driven capillary-like tube formation in human lung microvascular endothelia." The Journal of Biological Chemistry **289**(13): 9121-9135.

Li, W., Li, Y., Guan, S., Fan, J., Cheng, C. F., Bright, A. M., Chinn, C., Chen, M. and Woodley, D. T. (2007). "Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing." The EMBO Journal **26**(5): 1221-1233.

Liebermann, H. E. H. and Müller, H. (2008). "Reaction pattern in vertebrate cells (RiV): Studies of the course of tumor therapy using an anti-RiV ELISA (Initial Results)." Engineering in Life Sciences **8**(2): 148-156.

Liebermann, H. E. H., Sietmann, R., Bange, R., Wazel, W. and Riebe, R. (2005). "RiV particles are heat stable." Engineering in Life Sciences **5**(3): 240-246.

Ludwig, R. J. (2013). "Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita." ISRN Dermatology **2013**(2013): (Article ID 812029) 1-25.

Mackay, C. R. and Sallusto, F. (2006). "A new role for CCR5 in innate immunity--binding to bacterial heat shock protein 70." European Journal of Immunology **36**(9): 2293-2295.

Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L. and Cyster, J. G. (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." Nature **427**(6972): 355-360.

McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N. and McHeyzer-Williams, L. (2012). "Molecular programming of B cell memory." Nature Reviews Immunology **12**(1): 24-34.

Meier, N. T., Haslam, I. S., Pattwell, D. M., Zhang, G. Y., Emelianov, V., Paredes, R., Debus, S., Augustin, M., Funk, W., Amaya, E., Kloepper, J. E., Hardman, M. J. and Paus, R. (2013). "Thyrotropin-releasing hormone (TRH) promotes wound re-epithelialisation in frog and human skin." PLoS One **8**(9): (e73596) 1-16.

Mihai, S., Chiriac, M. T., Takahashi, K., Thurman, J. M., Holers, V. M., Zillikens, D., Botto, M. and Sitaru, C. (2007). "The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita." The Journal of Immunology **178**(10): 6514-6521.

Niedermeier, A., Eming, R., Pfütze, M., Neumann, C. R., Happel, C., Reich, K. and Hertl, M. (2007). "Clinical response of severe mechanobullous epidermolysis bullosa acquisita to combined treatment with immunoadsorption and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibodies)." Archives of Dermatology **143**(2): 192-198.

Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2006). "Fcγ receptors: old friends and new family members." Immunity **24**(1): 19-28.

Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2008). "Fcγ receptors as regulators of immune responses." Nature Reviews Immunology **8**(1): 34-47.

Perona-Wright, G., Mohrs, K. and Mohrs, M. (2010). "Sustained signaling by canonical helper T cell cytokines throughout the reactive lymph node." Nature Immunology **11**(6): 520-526.

Qiu, X., Hong, C., Zhong, Z., Li, Y., Zhang, T., Bao, W., Xiong, S. and Gao, X. M. (2012). "Modulation of cellular immunity by antibodies against calreticulin." European Journal of Immunology **42**(9): 2419-2430.

Remington, J., Chen, M., Burnett, J. and Woodley, D. T. (2008). "Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita." Current Directions in Autoimmunity **10**: 195-205.

Rivera, J., Proia, R. L. and Olivera, A. (2008). "The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity." Nature Reviews Immunology **8**(10): 753-763.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R. and Lanzavecchia, A. (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." The Journal of Experimental Medicine **187**(6): 875-883.

Schmidt, E. (2009). "[Optimizing therapy in patients with severe autoimmune blistering skin diseases]." Hautarzt **60**(8): 633-640.

Schmidt, E., Benoit, S., Bröcker, E. B., Zillikens, D. and Goebeler, M. (2006). "Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab." Archives of Dermatology **142**(2): 147-150.

Schwab, I. and Nimmerjahn, F. (2013). "Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system?" Nature Reviews Immunology **13**(3): 176-189.

Selvaggi, T. A., Walker, R. E. and Fleisher, T. A. (1997). "Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions." Blood **89**(3): 776-779.

Shimanovich, I., Mihai, S., Oostingh, G. J., Ilenchuk, T. T., Bröcker, E. B., Opdenakker, G., Zillikens, D. and Sitaru, C. (2004). "Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid." The Journal of Pathology **204**(5): 519-527.

Sigmundsdottir, H. and Butcher, E. C. (2008). "Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking." Nature Immunology **9**(9): 981-987.

Sitaru, A. G., Sesarman, A., Mihai, S., Chiriac, M. T., Zillikens, D., Hultman, P., Solbach, W. and Sitaru, C. (2010). "T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita." The Journal of Immunology **184**(3): 1596-1603.

Sitaru, C. (2007). "Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita." Experimental Dermatology **16**(6): 520-531.

Sitaru, C., Chiriac, M. T., Mihai, S., Büning, J., Gebert, A., Ishiko, A. and Zillikens, D. (2006). "Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice." The Journal of Immunology **177**(5): 3461-3468.

Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Bröcker, E. B. and Zillikens, D. (2002). "Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc $\gamma$ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin." The American Journal of Pathology **161**(1): 301-311.

Sitaru, C., Mihai, S., Otto, C., Chiriac, M. T., Hausser, I., Dotterweich, B., Saito, H., Rose, C., Ishiko, A. and Zillikens, D. (2005). "Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen." The Journal of Clinical Investigation **115**(4): 870-878.

Sitaru, C. and Zillikens, D. (2005). "Mechanisms of blister induction by autoantibodies." Experimental Dermatology **14**(12): 861-875.

Sokos, D., Berger, M. and Lazarus, H. M. (2002). "Intravenous immunoglobulin: Appropriate indications and uses in hematopoietic stem cell transplantation." Biology of Blood and Marrow Transplantation **8**(3): 117-130.

Solisch, P. (1986). "[Hitherto unknown pattern of reaction in vertebrate cells--ultrastructural studies of virus-host cell relationship and cell cultures. 1]." Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie **131**(1): 49-57.

Solisch, P., Nöckler, A., Schäfer, D., Riebe, R., Holl, U., Schirrmeier, H., Kretzschmar, C., Wazel, W., Dietz, G. and Sulk, J. (1986). "[A hitherto unknown reaction pattern in vertebrate cells (RiV). 2. The protective effect of RiV particle preparations against foot-and-mouth disease in guinea pigs]." Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie **131**(6): 563-568.

Solisch, P., Wazel, W., Steinmann, W., Riebe, R. and Meyer, U. (1987). "[A hitherto unrecognized pattern of reactions in vertebrate cells (RiV). 3. Experimental therapy with the help of RiV particle preparations in mice with mammary carcinomas]." Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie **133**(3): 293-298.

Stills, H. F. (2005). "Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's Complete and other adjuvants." ILAR Journal **46**(3): 280-293.

Tsen, F., Bhatia, A., O'Brien, K., Cheng, C. F., Chen, M., Hay, N., Stiles, B., Woodley, D. T. and Li, W. (2013). "Extracellular heat shock protein 90 signals through subdomain II and the NPVY motif of LRP-1 receptor to Akt1 and Akt2: a circuit essential for promoting skin cell migration in vitro and wound healing in vivo." Molecular and Cellular Biology **33**(24): 4947-4959.

Waite, J. C. and Skokos, D. (2012). "Th17 response and inflammatory autoimmune diseases." International Journal of Inflammation **2012**(2012): (Article ID 819467) 1-10.

Wang, J. X., Bair, A. M., King, S. L., Shnayder, R., Huang, Y. F., Shieh, C. C., Soberman, R. J., Fuhlbrigge, R. C. and Nigrovic, P. A. (2012). "Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism." Blood **120**(7): 1489-1498.

Woodley, D. T., Briggaman, R. A., O'Keefe, E. J., Inman, A. O., Queen, L. L. and Gammon, W. R. (1984). "Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita." The New England Journal of Medicine **310**(16): 1007-1013.

Woodley, D. T., Chang, C., Saadat, P., Ram, R., Liu, Z. and Chen, M. (2005). "Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita." Journal of Investigative Dermatology **124**(5): 958-964.

Yu, G., Stojadinovic, O., Tomic-Canic, M., Flach, C. R. and Mendelsohn, R. (2012). "Infrared microscopic imaging of cutaneous wound healing: lipid conformation in the migrating epithelial tongue." Journal of Biomedical Optics **17**(9): (Article 096009) 1-8.

Zhou, X., Hu, W. and Qin, X. (2008). "The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy." The Oncologist **13**(9): 954-966.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Der Aufbau des Proteins Kollagen Typ VII und Angriff des Proteins während der EBA-Erkrankung.....	3
Abbildung 2: Die Ablagerung von IgG an der dermal-epidermalen Junktionszone (DEJ) ist nur nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.....	41
Abbildung 3: Eine signifikante Ablagerung von IgG an der DEJ ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.....	41
Abbildung 4: Die Ablagerung von C3 an der DEJ ist nur nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu erkennen .....	42
Abbildung 5: Eine signifikante Ablagerung von C3 an der DEJ ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden.....	43
Abbildung 6: Eine signifikant erhöhte Genexpression von Gr-1, IL-1 $\beta$ und CCR5 in der Haut ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen .....	44
Abbildung 7: Granulozyten sind nur in der Haut von Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden .....	45
Abbildung 8: Der charakteristische EBA-Phänotyp zeigt sich in Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG.....	46
Abbildung 9: Nur die Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG führt zu einer EBA-Erkrankung.....	47
Abbildung 10: Eine signifikant erhöhte Genexpression von Gr-1 im inguinalen Lymphknoten ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen .....	48



Abbildung 11: Eindeutig angefärbte Granulozyten im Lymphknoten sind nur in Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden..... 49

Abbildung 12: Eine starke Proliferation in der T-Zell-Zone (TZZ) der Lymphknoten ist in Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen..... 50

Abbildung 13: Eine signifikant erhöhte Proliferation in der TZZ im inguinalen Lymphknoten ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG nachzuweisen ..... 51

Abbildung 14: Eine signifikant erhöhte Expression von IFN- $\gamma$  bei signifikant verminderter Expression von IL-4 im Lymphknoten ist in Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden ..... 52

Abbildung 15: T-Zellen sind nur in der Haut von Mäusen nach Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG zu finden ..... 53

Abbildung 16: Die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut wird durch die Behandlung mit FTY (Immunmodulator FTY720) bereits nach zwei Tagen deutlich reduziert..... 55

Abbildung 17: Die Anzahl der T-Zellen im peripheren Blut ist während der Behandlung mit FTY, unabhängig vom applizierten Antikörper, deutlich reduziert ..... 56

Abbildung 18: Die Behandlung mit FTY reduziert signifikant die Expression von TCR (T-Zell-Rezeptor) in der Haut von Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG..... 57

Abbildung 19: Die Behandlung mit FTY reduziert signifikant die Anzahl der T-Zellen in der Haut von Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG..... 58

Abbildung 20: Die Behandlung mit FTY reduziert signifikant die Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 in der Haut von Mäusen nach der Injektion von Kollagen Typ VII-spezifischem IgG.. 59

Abbildung 21: Die Behandlung mit FTY verändert den Krankheitsverlauf der EBA-Erkrankung nicht .....	61
Abbildung 22: Die Behandlung mit PNACs (Protein-Nukleinsäure-Komplexe) verbessert den Krankheitsverlauf der passiven EBA .....	63
Abbildung 23: PNACs verringern die Erkrankung nach vierzig Tagen .....	64
Abbildung 24: Die Behandlung mit PNACs erhöht signifikant die Expression von IL-4 und reduziert signifikant die Expression von FcγR4 .....	65
Abbildung 25: In einem humanen <i>in vitro</i> -Hautmodell wird die Wundheilung an den Wundrändern untersucht.....	66
Abbildung 26: Es entstehen größere und längere Zungen mit PNACs .....	68
Abbildung 27: Nach PNACs-Behandlung entsteht eine signifikant größere Wundheilungsfläche an Tag 6.....	69
Abbildung 28: Nach PNACs-Behandlung sind signifikant längere Epithelzungen an Tag 3 und 6 zu finden .....	71
Abbildung 29: Nach PNACs-Behandlung ist in den Epithelzungen vermehrte Proliferation zu finden.....	73
Abbildung 30: PNACs erhöhen signifikant die Proliferation in den Epithelzungen.....	74
Abbildung 31: PNACs erhöhen signifikant die Angiogenese in der Dermis in der unmittelbaren Umgebung der Epithelzungen .....	76
Abbildung 32: Schematische Darstellung der verschiedenen EBA-Modelle .....	83

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Unterteilung des Körpers der Maus nach Regionen und der entsprechende prozentuale Anteil an der Körperoberfläche.....	30
Tabelle 2: Verschiedene experimentelle Ansätze bei der Erforschung der Grundlagen der EBA .....	84

# DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei meiner direkten Projektbetreuerin Dr. rer. nat. Kathrin Kalies. Die Entwicklung neuer Ideen und der, nicht nur wissenschaftliche, Austausch mit ihr waren stets inspirierend. Mit viel Geduld und Ausdauer hat sie mir geholfen Tiefpunkte zu überwinden und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ein besonderer Dank gilt darüber hinaus Prof. Dr. med. Jürgen Westermann, der die Experimente in konstruktiver Weise hinterfragte und mir einen anderen Blickwinkel darauf ermöglichte. Insbesondere in den letzten Monaten hat er mich mit seiner ruhigen, verlässlichen und auch fordernden Art motiviert. Liebe Kathrin, lieber Jürgen, die Arbeit mit Euch beiden und generell der ganzen Arbeitsgruppe hat mir viel Freude bereitet. Die Zeit in Lübeck wird mir in guter Erinnerung bleiben.

Einen großen Dank auch an unsere technischen Mitarbeiterinnen (in alphabetischer Reihenfolge) Daniela Rieck, Karola von Lingelsheim, Lidija Gutjahr, Marie-Luise Leppin und Petra Lau. Euer Fleiß und die praktischen Ideen haben so manchen Arbeitsablauf erleichtert.

Weiterhin möchte ich mich auch bei meinen lieben Kollegen in der Arbeitsgruppe und im Institut bedanken, mit denen man einen tollen wissenschaftlichen Austausch hatte und den Arbeitsalltag auch mal hinter sich lassen konnte. Danke vor allem an Kristin Döring und David Banczyk – ihr habt mir auf so vielen Ebenen geholfen, dies alles zu meistern.

Danke auch an Prof. Dr. med. Ralf Ludwig, die Doktoranden und Mitarbeiter der Dermatologie sowie das GRK 1727: Es hat Spaß gemacht, ein „Teil“ von Euch zu sein und die Gespräche und Projektvorstellungen waren stets anregend und eine Inspiration.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Ralf Paus und Dr. phil. nat. Natalia Meier aus der Dermatologie, die mich in das Wundheilungsmodell eingeführt haben und mir somit neue Versuchsansätze ermöglichten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich herzlichst bei meiner (wachsenden) Familie: Ihr habt mich immer unterstützt und an mich geglaubt. Philipp, danke, dass Du mir stets so viel Kraft gegeben und Mut zugesprochen hast!

## PUBLIKATIONEN

*Aktuell in Vorbereitung:*

Hauenschild, E. M., Maass, S., Banczyk, D., Iwata, H., Ludwig, R. J., Westermann, J. and Kalies, K. (2014). „T cell activation in draining lymph nodes during experimental epidermolysis bullosa acquisita does not affect skin inflammation.”

Hauenschild, E. M., Kunz, N., Meier, N., Paus, R., Ludwig, R. J., Westermann, J. and Kalies, K. (2014). "Intracellular proteins isolated from stressed cells support skin wound healing."

# ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe sowie ohne weitere Hilfsmittel als die darin angegebenen angefertigt zu haben. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

gez. Eva Hauenschild

Lübeck 2014