

Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck

Direktoren: Prof. Dr. S. Ibrahim, Prof. Dr. R. Ludwig, Prof. Dr. Dr. E Schmidt

**Neue Therapieoptionen der Epidermolysis bullosa acquisita bei
Beachtung des molekularen Wirkmechanismus von Propranolol auf
Immunkomplex-aktivierte neutrophile Granulozyten**

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von

Pia Rebecca Stüssel

aus Dortmund

Lübeck 2019

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichtstatter/Berichtstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Promotionskommission der Sektion Medizin

An die Musik

*Du holde Kunst, in wieviel grauen Stunden,
Wo mich des Lebens wilder Kreis umstrickt,
Hast du mein Herz zu warmer Lieb' entzunden,
Hast mich in eine bessere Welt entrückt!*

*Oft hat ein Seufzer, deiner Harf' entflossen,
Ein süßer, heiliger Akkord von dir
Den Himmel besserer Zeiten mir erschlossen,
Du holde Kunst, ich danke dir dafür!*

Franz von Schober

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1 Der Aufbau der Haut	8
1.2 Epidermolysis bullosa acquisita – eine blasenbildende Autoimmundermatose	10
1.2.1 Definition, Prävalenz und Symptome der EBA.....	11
1.2.2 Das Autoantigen Typ VII Kollagen	12
1.2.3 Verfahren zur Diagnose einer EBA.....	13
1.2.4 Therapieansätze zur Behandlung einer EBA	14
1.2.5 Erforschung der Pathomechanismen der EBA anhand von Tiermodellen.....	15
1.2.6 Neutrophile Granulozyten.....	19
1.2.7 Getestete Inhibitoren.....	21
1.3. Ziele der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Material	26
2.1.1 Antikörper	26
2.1.2 Inhibitoren, Stimuli.....	27
2.1.3 Reagenzien	27
2.1.4 Fertig-Reagensätze	29
2.1.5 Geräte.....	29
2.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.7 Puffer und Medien	32
2.1.8 Verwendete Programme und Internetdatenbanken	33
2.2 Isolierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.....	34
2.3 FACS-analytische Verfahren	37
2.3.1 Färbung neutrophiler Granulozyten im humanen Vollblut.....	37
2.3.2 Gating Strategy.....	38
2.4 ROS Release Assay.....	40

2.5 Molekularbiologische Methoden	41
2.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus stimulierten humanen Neutrophilen.....	41
2.5.2 Messung der RNA-Qualität und -Quantität.....	42
2.5.3 RNA-Genexpressionsanalyse (Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie Plön)	42
2.6 Herstellung von totalen mCOL7C.....	43
2.7 Tierexperimentelle Verfahren	44
2.7.1 Versuchsaufbau der lokalen, antikörpertransfer-induzierten EBA	45
2.7.1.1 Systemische Applikation der Inhibitoren	46
2.7.1.2 Topische Applikation der Inhibitoren.....	46
2.8 Lösung der Substanzen.....	47
2.8.1 Lösung der Substanzen für die systemische Applikation	47
2.8.2 Lösung der Substanzen für die topische Applikation	48
2.9 Direkte Immunfluoreszenz.....	48
2.10 Statistik.....	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Experimentelle EBA – systemische Applikation der Inhibitoren.....	50
3.1.1 Propranolol hemmt die Entzündung im lokalen Modell der EBA	50
3.1.2 BX-795 reduziert im lokalen Modell der EBA die klinische Symptomatik.....	52
3.1.3 Sotrastaurin verringert die klinische Ausprägung der EBA im lokalen Mausmodell	54
3.1.4 Die Injektion von PHA-665752 verringert im lokalen Modell der EBA die klinische Symptomatik, führt jedoch zu erheblichem Gewichtsverlust.....	56
3.1.5 NU 7441 hemmt in beiden getesteten Konzentrationen die Entzündung im lokalen Modell der EBA.....	58
3.2 Experimentelle EBA – topische Applikation der Inhibitoren.....	60
3.2.1 Topisch appliziertes Propranolol verringert in allen getesteten Konzentrationen die lokale EBA	60
3.2.2 Topisch appliziertes PHA-665752 reduziert die klinische Symptomatik der lokalen EBA ..	62

3.3 Genexpressionsanalyse des Effekts von Propranolol auf IC-stimulierte neutrophile Granulozyten.....	64
3.3.1 Kontrolle der Effekte von Propranolol – neutrophile Granulozyten werden durch Immunkomplexe aktiviert und die ROS-Freisetzung durch Propranolol gehemmt.....	64
3.3.2 Propranolol hat keinen Effekt auf die Zellvitalität und die Zellaktivierung von neutrophilen Granulozyten.....	65
3.3.3 Genexpressionsanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Propranolol auf IC-stimulierte neutrophile Granulozyten	66
4. Diskussion.....	71
5. Zusammenfassung.....	83
6. Literaturverzeichnis.....	84
7. Anhänge	102
8. Danksagung	109
9. Eigenständigkeitserklärung	111
10. Lebenslauf	112
11. Publikationen und Kongressbeiträge	113

Abkürzungsverzeichnis

5-LO	5-Lipoxygenase
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKT	eine Serin-und Threoninkinase
amCOL7C	anti-murines-Typ-VII-Kollagen-IgG
anti-hCOL7	anti-humanes-Typ-VII-Kollagen-IgG
b.i.d.	zweimal pro Tag
BLT1	ein Leukotrien-Rezeptor
bp	Basenpaare
BP	bullöses Pemphigoid
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C57BL/6	ein Mausstamm
ca.	circa
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
c-DNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLM	<i>Cell lysis Medium</i>
CMP	<i>Cartilage Matrix Subdomain</i>
c-Met	eine Rezeptortyrosinkinase
CXCL	<i>C-X-C-motif ligand</i> ; ein Chemokin
DEJ	dermal-epidermale Junktionszone
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1 und 2</i>
et al.	und andere
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FAK	<i>focal-adhesion kinase</i>

FcRIV	ein muriner Rezeptor
FLT1	<i>Fms-related tyrosine kinase 1</i> ; eine Rezeptortyrosinkinase
FSC	<i>Forward scatter</i> ; Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulozyten- und Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung
hCOL7	humanes Typ VII Kollagen
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
IC	Immunkomplex
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
i.d.	intradermal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
Lam332	Laminin 332
LIMK1	eine Serin-/Threoninkinase
LTB4	Leukotrien B4
M	molar
MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
mCOL7C	murines Typ VII Kollagen
min	Minuten
MIP α	<i>macrophage Inflammatory Protein α</i> ; ein Zytokin
MPO	Myeloperoxidase
MPV	Maus Parvovirus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert

NADPH	Nicotinamide Adenin Dinucleotid Phosphat
NC1/2	nicht-kollagene Domäne 1/2
NCF1	<i>neutrophil cytosolic factor 1</i>
n.s.	nicht signifikant
NMWL	<i>nominal Molecular Weight Limit</i> ; Porengröße der Filtertubemembran
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-D	<i>Phosphate buffered saline</i> nach Dulbecco
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PKD1	3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
pH	<i>potential hydrogenii</i>
PHLPP	<i>Plekstrin Homology domain and leucine rich repeat protein phosphatase</i>
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorphnukleäre Neutrophile
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROR α	<i>Retinoid-related orphan receptor α</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
SSC	<i>side scatter</i> ; Seitwärtsstreulicht
Subst.	Substanz
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> ; ein Transkriptionsfaktor
Syk	Syk Protein Tyrosinkinase
Tab	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
vgl.	vergleiche

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der humanen Haut im Querschnitt

Abb. 2 Aufbau von Typ VII Kollagen

Abb. 3 Pathomechanismen der Blasenbildung und Entzündung bei EBA

Abb. 4 intrazelluläre Signaltransduktion in einem neutrophilen Granulozyten

Abb. 5 *Gates* zur Detektion lebendiger, neutrophiler Granulozyten

Abb. 6 Versuchsaufbau systemische Applikation

Abb. 7 Versuchsaufbau topische Applikation

Abb. 8 Systemische Propranolol HCl-Gabe verbessert den klinischen Verlauf einer lokalen EBA

Abb. 9 Die klinische Symptomatik der lokalen EBA wird durch systemisch appliziertes BX-795 verbessert

Abb. 10 Die orale Gabe von Sotrastaurin verbessert die klinische Symptomatik der lokalen EBA

Abb. 11 Systemische Gabe von PHA-665752 verbessert den klinischen Verlauf einer lokalen EBA

Abb. 12 Der klinische Verlauf einer lokalen EBA wird durch systemische Gabe von NU 7441 verbessert

Abb. 13 Die klinische Symptomatik der lokalen EBA wird durch topisch appliziertes Propranolol verbessert

Abb. 14 PHA-665752 6,4 % verringert die klinische Symptomatik der lokalen EBA

Abb. 15 Propranolol 10 μ M hemmt die ROS-Freisetzung stimulierter neutrophiler Granulozyten

Abb. 16 Propranolol zeigt keinen signifikanten Einfluss auf Zellvitalität und Zellaktivität IC-stimulierter neutrophiler Granulozyten

Abb. 17 Die invers exprimierten Gene sind in verschiedenen pathways (a) und Krankheiten (b) angereichert

Abb. 18 *Heatmap* mit den am stärksten invers exprimierten Genen IC stimulierter und mit bzw. ohne Propranolol behandelte neutrophiler Granulozyten

Abb. 19 Venn-Diagramm zur Darstellung der Schnittmenge der invers regulierten Gene von mit Propranolol inkubierten humanen neutrophilen Granulozyten mit dem Genexpressionsprofil von Mäusen mit experimenteller EBA

1. Einleitung

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und hat als Grenzschicht zu unserer Umgebung vielerlei Funktionen. Sie schützt uns vor äußeren Einflüssen und ist für die Integrität unseres Organismus essenziell. Als anatomische und mechanische Barriere schützt sie den Menschen vor Pathogenen. Ergänzt wird dieser mechanische Schutz durch das Immunsystem, ein komplexes Netzwerk aus Organen, Zellen und Molekülen. Durch das Immunsystem ist der Körper in der Lage, Bakterien, Viren und Parasiten abzuwehren, ohne dass sich der Mensch seiner Bedrohung durch etwaige Keime überhaupt bewusst wird (Murphy und Weaver 2018c, S. 3–46).

Ein derart komplexes System ist allerdings fehleranfällig. Wenn das Immunsystem körpereigene Strukturen als vermeintlich pathogen erkennt und sich in der Folge gegen sie richtet, spricht man von Autoimmunität. Der Verlust der Eigentoleranz kann mit der Zerstörung von für den Organismus essentiellen Strukturen einhergehen (Murphy und Weaver 2018a, S. 835–911).

Auch die Haut kann durch das eigene Immunsystem angegriffen werden. Oft richten sich die Autoantikörper gegen Strukturproteine der Epidermis oder der Dermis – so auch im Falle der blasenbildenden Autoimmundermatose Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) (Schmidt und Zillikens 2013).

1.1 Der Aufbau der Haut

Die Haut setzt sich aus drei Schichten zusammen: der Epidermis, der Dermis und der Subkutis (vgl. Abb. 1). Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinozyten. Darüber hinaus enthält sie Melanozyten, Merkel-Zellen und die zum Immunsystem gehörenden Langerhans-Zellen (Röcken und Biedermann 2018, S. 23–34). Die äußerste Zone der Epidermis stellt das *Stratum corneum* dar und enthält kernlose Hornzellen. Von außen nach innen folgen das *Stratum granulosum*, das *Stratum spinosum* und das *Stratum basale*. Die Keratinozyten des *Stratum spinosum* sind über Desmosomen miteinander verbunden. Das an die Dermis grenzende *Stratum basale* ist über Hemidesmosomen fest in der Basallamina verankert (Hertl 2018, S. 3–21).

Die äußere Schicht der Dermis wird als *Stratum papillare* bezeichnet und enthält neben zahlreichen Zellen des Immunsystems lockeres Bindegewebe, das aus dünnen Kollagenfasern (Typ III) besteht. Dem *Stratum papillare* schließt sich das *Stratum reticulare* an, welches straffes, geflechtartiges Bindegewebe aus Kollagenfasern (Typ I) und elastische Fasern enthält (Hertl 2018, S. 3–21).

Die Basallamina ist die zentrale Struktur der dermal-epidermalen Junctionszone (DEJ) und besteht ihrerseits aus drei Teilen - der *Lamina lucida*, der *Lamina densa* und der *Lamina fibroreticularis*. An die Plasmamembran grenzt die *Lamina lucida*, die hauptsächlich aus Ankerfilamenten besteht, die die Hemidesmosomen der Basalzellen mit der *Lamina densa* verbinden. Letztere ist ein durch Proteoglykane und Proteine zusammengehaltenes Netz aus Kollagenfasern (Typ IV) und Laminin. Über in der *Lamina fibroreticularis* liegende Kollagenfasern (Typ VII) sind die Kollagenfibrillen (Typ III) der papillären Dermis mit der *Lamina densa* verbunden (Lüllmann-Rauch 2015, 588–568). Die zahlreichen molekularen Verbindungselemente ermöglichen die Übertragung von Scherkräften von der Epidermis auf die Dermis. Gleichzeitig sind sie jedoch auch Ziel verschiedener Autoantikörper, deren Ablagerungen zu blasenbildenden Autoimmundermatosen führen können (Sadik et al. 2018, S. 839–873).

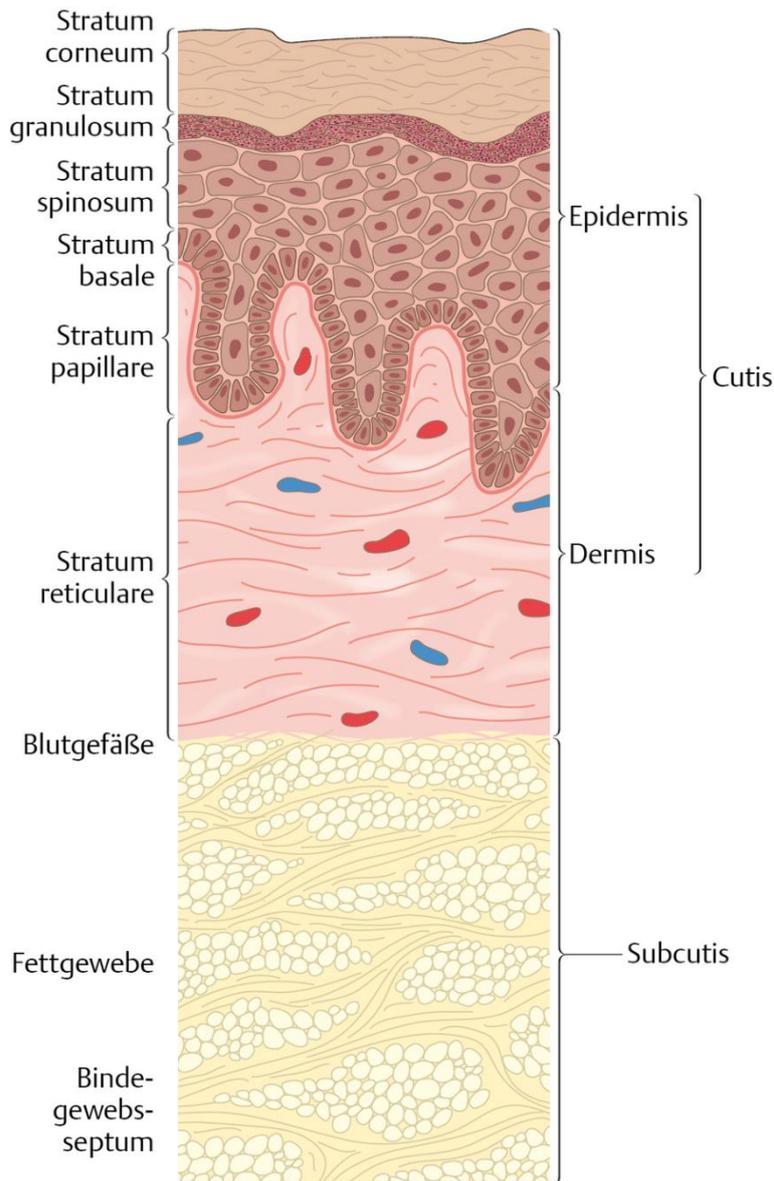


Abb. 1 Schematische Darstellung der humanen Haut im Querschnitt. Die drei Schichten Epidermis, Dermis und Subcutis sind zu erkennen, wobei die Basalmembran als feine, rosafarbene Linie zwischen dem *Stratum basale* und dem *Stratum papillare* dargestellt ist. (https://viamedici.thieme.de/api/images/l/b/r/i/e/f/histo_011900_steckbrief.png).

1.2 Epidermolysis bullosa acquisita – eine blasenbildende Autoimmundermatose

Bullöse Autoimmundermatosen sind durch Blasenbildung der Haut und/oder der Schleimhaut gekennzeichnet und nehmen oft einen chronischen und zum Teil lebensbedrohlichen Verlauf. Den Erkrankungen liegt eine Autoimmunität gegenüber Strukturproteinen der Epidermis oder der Dermis zugrunde. Anhand unterschiedlicher Zielantigene können bullöse Autoimmundermatosen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Während sich die Autoantikörper bei den Pemphigus-Erkrankungen wie dem Pemphigus

vulgaris und Pemphigus foliaceus gegen Desmoglein 1 und 3, Strukturproteine der Epidermis, richten und zu einer intraepidermalen Spaltbildung führen (Amagai et al. 1991; Yokoyama und Amagai 2010), richten sich die Autoantikörper der Gruppe der Pemphigoid-Erkrankungen wie beim Bullösen Pemphigoid oder bei EBA gegen Strukturen der DEJ und führen zu einer subepidermalen Spaltbildung (Schmidt und Zillikens 2013; Kridin und Ludwig 2018; Koga et al. 2019).

1.2.1 Definition, Prävalenz und Symptome der EBA

Die EBA ist eine erworbene Autoimmundermatose, bei der Autoantikörper gegen das Typ VII Kollagen vorliegen, welche subepidermale Blasenbildung verursachen. Die Erkrankung hat eine Inzidenz von etwa 0,2–0,5 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner und Jahr, ist HLA-DR2 assoziiert (Gammon et al. 1988; Schmidt und Zillikens 2013) und tritt häufiger in der schwarzen Bevölkerung auf (Zumelzu et al. 2011). In den meisten Fällen erkranken die Patient*innen im Alter von 40 bis 60 Jahren, in seltenen Fällen können aber auch Kinder an EBA erkranken (Roeningk, JR et al. 1971; Yang et al. 2012; Plewig und Braun-Falco 2015, S. 803–806; Sadik et al. 2018; Iwata et al. 2018).

Es gibt verschiedene klinische Verläufe der EBA. Die klassische Form ist die nicht-entzündliche, mechanobullöse Form. Dabei treten pralle Blasen und Erosionen vornehmlich an mechanisch beanspruchten Körperregionen, wie zum Beispiel an den Streckseiten der Extremitäten oder an Fuß- und Handrücken auf. Das Abheilen der Blasen geht mit einer Narbenbildung einher. Ferner kommt es gelegentlich zur Ausbildung von Milien, zu narbiger Alopezie, Fibrosierung der Haut und zum Verlust der Nägel (Roeningk, JR et al. 1971; Kim et al. 2011).

Unter den entzündlichen Verläufen der EBA gibt es mehrere Subtypen: Die bullös-pemphigoidartige Variante mit den pathognomonischen IgG-Antikörpern, die sich linear an der DEJ ablagern, betrifft etwa 5–10 % der Patient*innen. Sie heilt im Gegensatz zur klassischen Form der EBA meist ohne Narbenbildung ab, wenngleich die generalisierten und entzündlichen Blasen häufig mit einem starken Juckreiz einhergehen (Roeningk, JR et al. 1971; Kim et al. 2011). Darüber hinaus wurden in der Literatur Formen der EBA beschrieben, die dem Schleimhaut-Pemphigoid, dem lokalisierten, vernarbenden Pemphigoid Brunsting-Perry und der linearen IgA-Dermatose des Kindesalters ähneln. Bei

der zuletzt genannten Form liegen anstelle der für EBA pathognomonischen IgG-Antikörper gegen Typ VII Kollagen entsprechende Autoantikörper vom IgA-Subtyp vor, die sich an der Basalmembran ablagern (Roeningk, JR et al. 1971; Kim et al. 2011). Antikörper vom IgA-Subtyp liegen häufiger bei der nicht-mechanobullösen Form der EBA und bei Befall von Schleimhaut vor als bei der mechanobullösen Form (Iwata et al. 2018). Zudem konnte eine Assoziation von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn mit EBA beobachtet und Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen im Serum von Patient*innen mit CED nachgewiesen werden (Oostingh et al. 2005).

1.2.2 Das Autoantigen Typ VII Kollagen

Typ VII Kollagen wird durch Epithelzellen und Fibroblasten synthetisiert und ist als Ankermolekül in der *Lamina densa* und *Sublamina densa* von Basalmembranen mehrschichtiger Epithelien zu finden (Uitto et al. 1992). Es liegt in Haut, Kornea, Mundschleimhaut, Oesophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm vor (Ishii et al. 2011; Wullink et al. 2015).

Das Gen *COL7A1* befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 und kodiert das Autoantigen Typ VII Kollagen. Drei identische α -Ketten lagern sich zu einer Tripelhelix zusammen, die aus einer kollagenen Domäne (~145 kDa) besteht und an deren Enden sich jeweils nicht-kollagene Domänen befinden. Eine in ihrer Größe der kollagenen Domäne ähnelnde, nicht-kollagene Domäne (NC1) liegt am N-Terminus vor und eine kleinere nicht-kollagene Domäne (NC2) (~30 kDa) am C-Terminus (vgl. Abb. 2) (Parente et al. 1991). Zwei C-terminale Enden sind über eine Disulfidbindung verbunden, wodurch es zur Ausbildung eines antiparallelen Dimers kommt. Die Ankerfibrillen bestehen aus mehreren parallel aneinander gelagerten Typ VII Kollagen-Dimeren und sind ein wichtiger Bestandteil der DEJ (Morris et al. 1986).

Über die NC1-Domänen sind die Ankerfibrillen mit Laminin 332, einem Strukturprotein der Epidermis, verbunden. Auf der dermalen Seite interagieren die kollagenen Domänen der Ankerfibrillen mit anderen, in der Dermis vorliegenden Kollagenen (COL I/III vgl. Abb. 2). Auch das Glykoprotein Fibronectin ist in der Dermis (*Lamina densa*) zu finden und mit einer Subdomäne des Typ VII Kollagens verknüpft. Die Bindungsstelle befindet sich auf der kollagenen Tripelhelix unmittelbar neben dem Carboxyl-Terminus (Lapiere et al. 1994).

Dadurch entsteht ein Geflecht, das die strukturelle Integrität der Haut durch Verknüpfung von Epidermis und Dermis gewährleistet (Uitto et al. 1992). Auf der NC1-Domäne am Übergang zur kollagenen Domäne befindet sich eine Cystein- und Prolin-reiche Region (Wegener et al. 2014). Die Tripelhelix der kollagenen Domäne ist durch eine etwa 39 Aminosäuren lange *Hinge Region* (39 AA Hinge Region vgl. Abb. 2) unterbrochen (Richer und Seeger 2014). Die Autoantikörper der Patient*innen richten sich hauptsächlich gegen die NC1-Domäne (Woodley et al. 1984; Woodley et al. 1988), wobei auch die Fibronektin-3-ähnliche Domäne (Lapierre et al. 1993), die von-Willebrand-ähnliche Domäne (Wegener et al. 2013) und die *Cartilage Matrix Subdomain* (CMP) (Chen et al. 2007) als Epitope der Autoantikörper beschrieben wurden (FNIII Domänen, vWF-ähnliche Domäne, CMP vgl. Abb. 2). In der NC2-Domäne (NC2) und der kollagenen Domäne hingegen wurden lediglich vereinzelte Epitope gefunden, an die Autoantikörper binden (Tanaka et al. 1997; Ishii et al. 2004; Ishii et al. 2009).

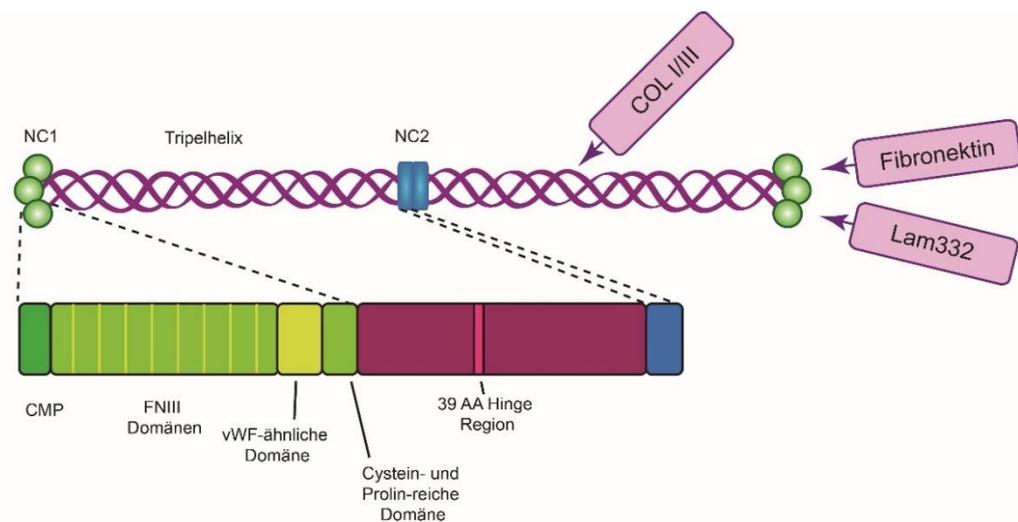


Abb. 2 Aufbau von Typ VII Kollagen. Darstellung der kollagenen Tripelhelix mit Bestandteilen der NC1 (grün) mit ihren Epitopen der Autoantikörper und der NC2 (blau) sowie der kollagenen Domäne (lila). Abkürzungen: CMP, *Cartilage Matrix Subdomain*; COL I/III, Kollagene 1 und 3; FNIII Domänen, Fibronektin-3-ähnliche Domänen; NC1, NC1-Domäne; NC2, NC2-Domäne; Lam332, Laminin 332; vWF-ähnliche Domäne, von-Willebrand-ähnliche Domäne. Abb. 2 Zur Verfügung gestellt von K. Bieber, LIED, Universität zu Lübeck.

1.2.3 Verfahren zur Diagnose einer EBA

Roeningk et al. veröffentlichten 1971 erstmals Diagnosekriterien der EBA, welche makroskopische EBA-typische Läsionen, das Auftreten der Klinik im Erwachsenenalter, eine negative Familienanamnese und den Ausschluss anderer bullöser Erkrankungen

beinhalteten (Roeningk, JR et al. 1971; Iwata et al. 2018). Bald darauf konnten bei erkrankten Patient*innen IgG- und C3-Ablagerungen entlang der DEJ nachgewiesen werden (Kushniruk 1973). Nach der anhand der Klinik gestellten Verdachtsdiagnose werden bullöse Autoimmunerkrankungen heute meist durch die Ablagerung von Autoantikörpern und/oder C3 in periläsionalen Hautbiopsien entlang der DEJ mittels direkter Immunfluoreszenz nachgewiesen (Yaoita et al. 1981). Im Gegensatz zu anderen subepidermalen Autoimmundermatosen, die ein v-förmiges Bindungsmuster der Autoantikörper an das Gewebe aufweisen, ist bei der EBA ein u-förmiges Bindungsmuster zu finden (Vodegel et al. 2004; Buijsrogge et al. 2011). Mit der Elektronenmikroskopie kann der genaue Bindungsort der Autoantikörper detektiert werden (Ishii et al. 2009).

Zusammen mit dem klinischen Bild der EBA (vgl. 1.2.1) ist ein u-förmiges Bindungsmuster der Autoantikörper ausreichend, um eine EBA zu diagnostizieren. Darüber hinaus kann insbesondere, wenn das u-förmige Bindungsmuster nicht eindeutig zu erkennen ist, auch durch den Nachweis von im Patientenserum zirkulierenden Antikörpern die Diagnose einer EBA gestellt werden (Komorowski et al. 2013). So können zirkulierende Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, indem das Patientenserum zunächst mit durch Salz gespaltener Haut inkubiert wird und sich die Autoantikörper an der dermalen Seite der Haut anlagern (Gammon et al. 1984; Komorowski et al. 2013). Die Spezifität der Autoantikörper kann anschließend entweder durch den Nachweis von Antikörpern gegen das 290 kDa große Protein Typ VII Kollagen mittels Western Blot (Woodley et al. 1988; Remington et al. 2008) oder mittels Nachweis von dessen NC1- und NC2-Domänen durch ELISA erfolgen. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 93.8 % und die Spezifität bei 98.1 %, wenn sowohl NC1- als auch NC2-Domänen nachgewiesen werden können (Saleh et al. 2011). Zudem korrelieren die mittels ELISA detektierten Serumspiegel von Autoantikörpern gegen Typ VII Kollagen mit dem Schweregrad der Hautläsionen und sind daher nicht nur geeignet, die Diagnose einer EBA zu stellen, sondern auch, den Krankheitsverlauf zu überwachen (Kim et al. 2013).

1.2.4 Therapieansätze zur Behandlung einer EBA

Da EBA eine Autoimmunerkrankung ist, basiert die Therapie bislang auf Immunsuppression. Zumeist werden systemische Glukokortikoide in hohen Dosen (0,5-2

mg/kg KG) als Basistherapeutika eingesetzt (Schmidt und Zillikens 2013). Allerdings birgt die Steroidtherapie schwerwiegende Nebenwirkungen und kann zu Hypertension, Osteoporose, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und Adipositas führen (Ishii et al. 2010). In therapierefraktären Fällen und schweren Verläufen können Steroide mit weiteren Immunmodulatoren wie Cyclosporin, Azathioprin (Engineer und Ahmed 2001; Gürcan und Ahmed 2011), Colchizin (Cunningham et al. 1996), Dapson (Gürcan und Ahmed 2009), Mycophenolat Mofetil (Sami 2015), Rituximab (Sadler et al. 2007; Schmidt et al. 2006) oder Plasmapherese (Schmidt und Zillikens 2010) ergänzt werden. Von Therapieerfolgen mit hochdosierten intravenösen Immunglobulinen wurde berichtet, allerdings sind mehrfache Wiederholungen nötig und der Effekt ist nicht langanhaltend (Campos et al. 2006; Ishii et al. 2010). In lokal begrenzten Fällen kann eine topische Therapie mit Glukokortikoiden erfolgen (Sadik et al. 2018, S. 839–873).

Bei den auf Immunsuppression basierenden Therapieoptionen handelt es sich lediglich um eine symptomatische Therapie der Erkrankung. In den letzten Jahren gewonnene Erkenntnisse über den molekularen Pathomechanismus der EBA ermöglichen die Erforschung neuer therapeutischer Mittel, die spezifisch in die Krankheitsentstehung der EBA eingreifen (Kasperkiewicz et al. 2016). Durch die sogenannte *targeted therapy* können in der Zukunft möglicherweise systemische Nebenwirkungen einer Immunsuppression reduziert werden.

1.2.5 Erforschung der Pathomechanismen der EBA anhand von Tiermodellen

In der Pathogenese der EBA spielen Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen eine entscheidende Rolle. Weshalb es genau zum Verlust der Eigentoleranz und damit zur Produktion der Autoantikörper kommt, ist allerdings noch nicht hinreichend verstanden. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass es eine genetische Komponente gibt, die die Entstehung von EBA begünstigt. So gibt es bei an EBA erkrankten Menschen ein gehäuftes Vorkommen der Allele für MHC-Klasse II-Molekül HLA-DR2 und für HLA-DRB*15:03 (Gammon et al. 1988; Zumelzu et al. 2011).

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung muss häufig auf Tiermodelle zurückgegriffen werden, um Erkenntnisse über den Pathomechanismus von EBA zu erlangen. Dass T-Zellen für die Pathogenese von EBA im Menschen wie auch im Tiermodell in Mäusen essentiell

sind, legen die Abwesenheit von Autoantikörpern in T-Zell-defizienten Mäusen trotz Immunisierung mit Typ VII Kollagen (Sitaru et al. 2010) und das Vorliegen Typ VII-NC1 Kollagen reaktiver T-Zellen bei an EBA erkrankten Patienten nahe (Müller et al. 2010). Die autoreaktiven TH1-Zellen werden in der T-Zone von Lymphknoten durch die Präsentation von Typ VII Kollagen an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen aktiviert (Hammers et al. 2011). Dieser Vorgang verhilft ebenfalls aktivierten, autoreaktiven B-Zellen zur Produktion von Typ-VII-Kollagen-Antikörpern. Die Autoantikörper binden an ihr spezifisches Antigen, Typ VII Kollagen, in der DEJ und bilden dort Immunkomplexe. Während es sich bei Menschen mit EBA hauptsächlich um Antikörper der IgG1- und IgG4-Subtypen handelt (Bernard et al. 1991), liegen bei Mäusen zumeist Antikörper der Subtypen IgG1, IgG2a und IgG2b vor (Sitaru et al. 2005).

Die Entstehung einer experimentellen EBA in Mäusen ist stark mit der Vorlage des MHC-Haplotyps "H2s" verknüpft (Ludwig et al. 2011). Auch das kutane Mikrobiom scheint einen Einfluss auf die Manifestation klinischer Symptome zu haben – so ist im Mausmodell der EBA eine hohe Diversität des Mikrobioms mit einer geringeren klinischen Ausprägung der Symptome und eine geringe Diversität des Mikrobioms mit einer verstärkten klinischen Symptomatik assoziiert (Ellebrecht et al. 2016). Darüber hinaus wurden Gen-Mikrobiota-Interaktionen beschrieben, welche die Entstehung einer EBA begünstigen (Srinivas et al. 2013).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die einzelnen Krankheitsphasen der EBA *in vivo* an Mäusen zu simulieren. So ist es möglich, durch das passive Antikörpertransfer-Modell Vorgänge der Effektorphase der Erkrankung zu untersuchen (Bieber et al. 2010; Bieber et al. 2017a). In diesem Modell wird den Mäusen anti-murines-Typ-VII-Kollagen-IgG (amCOL7C) injiziert. Dieses stammt aus den Seren von Kaninchen, welche zuvor mit einem rekombinant hergestellten Peptid aus der NC1-Domäne des murinen Typ VII Kollagen immunisiert wurden (Sitaru et al. 2005). Bereits 2-4 Tage nach wiederholter Injektion der Antikörper entwickeln die Mäuse einen Phänotyp mit Erosionen, Blasen, Erythem und Krusten, die den Symptomen einer EBA beim Menschen ähneln. Zudem sind IgG- und C3-Ablagerungen an der DEJ nachzuweisen (Bieber et al. 2010). Darüber hinaus ist es möglich,

durch einmalige Injektion der Antikörper in die Ohren der Mäuse eine lokal begrenzte passive Form der EBA zu induzieren (Bieber et al. 2016; Bieber et al. 2017a).

Das aktive EBA-Mausmodell ist geeignet, die Mechanismen zu untersuchen, welche zum Verlust der Eigentoleranz führen. Da in diesem Modell im Gegensatz zum passiven Mausmodell die Symptome der experimentellen EBA über einen Zeitraum von 24 Wochen aufrechterhalten werden können, eignet sich dieses Modell zudem, die Langzeiteffekte potentieller Therapeutika zu untersuchen (Bieber et al. 2017a). Die Mäuse werden mehrfach mit rekombinanten Fragmenten der NC1-Domäne immunisiert, um die klinische Symptomatik der EBA zu induzieren. Dadurch wird in den Mäusen eine autoimmune Reaktion hervorgerufen, woraufhin Antikörper der Subtypen IgG1, IgG2a und IgG2b gegen Typ VII Kollagen gebildet werden, was zur Ausprägung des klinischen Phänotyps der EBA führt (Hirose et al. 2015).

Anhand der Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass der murine Rezeptor (FcγRIV) auf neutrophilen Granulozyten essentiell für die Entstehung einer experimentellen EBA ist, da einerseits eine erhöhte Expression von FcγRIV in Mausstämmen festgestellt wurde, die anfälliger gegenüber einer Krankheitsinduktion waren (Hammers et al. 2011), und andererseits die Abwesenheit oder Blockade des FcγRIV die Induktion einer experimentellen EBA verhinderte (Kasperkiewicz et al. 2012).

Sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen kommt es nach der Bindung der Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen an der DEJ zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1, GM-CSF und Leukotrienen (vgl. Abb. 3 (1 und 2)). Fc-Fragmente der Autoantikörper aktivieren im Folgenden das Komplementsystem über den alternativen Weg (Sitaru et al. 2005; Mihai et al. 2007) (vgl. Abb. 3.(3)), was zu einer proteolytischen Spaltung der Komplementfaktoren C3 und C5 führt. Da C5-defiziente Mäuse keine experimentelle EBA entwickeln können, liegt es nahe, dass die Aktivierung des Komplementsystems ein entscheidender Schritt der Effektorphase der EBA ist (Sitaru et al. 2005). Außerdem ist die Expression proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und GM-CSF sowie der Rezeptorproteine CXCL1/2 im Mausmodell hochreguliert, was unter anderem zur Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Blutzellen führt (Sadeghi et al. 2015; Samavedam et al. 2014; Hirose M et al. 2013). Während sich C3b und C5b an der DEJ anlagern, führt die Freisetzung

der Anaphylatoxine C3a und C5a zur Chemotaxis und zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Guo und Ward 2005). Zusätzlich werden humane neutrophile Granulozyten auch durch die Bindung der Autoantikörper an Fc γ -Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aktiviert (vgl. Abb. 3 (5)). Es kommt über die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade via Syk Protein Tyrosinkinase (Syk) (vgl. Abb. 3 (6)) zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase (MPO) und die Superoxiddismutase (SOD) (Samavedam et al. 2018) und zur Freisetzung von Gelatinasen und Matrix-Metalloproteinasen (Shimanovich et al. 2004) (vgl. Abb. 3 (7)), was die proteolytische Zerstörung verschiedener Strukturen der DEJ zur Folge hat. Der Verlust intakter Ankerfibrillen führt dazu, dass sich Dermis und Epidermis voneinander lösen und ist makroskopisch als Blasenbildung zu erkennen. Zudem sezernieren neutrophile Granulozyten *macrophage Inflammatory Protein α* (MIP α), wodurch Monozyten und Makrophagen rekrutiert werden (Kasama et al. 1993) (vgl. Abb. 3 (8)). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Monozyten und Makrophagen in der Lage sind, ROS freizusetzen und somit zur Effektorphase der EBA beitragen (Hirose et al. 2016). Während die Migration neutrophiler Granulozyten durch regulatorische T-Zellen (Treg) gehemmt wird (Bieber et al. 2017b), wirken natürliche Killerzellen (NKT) und $\gamma\delta$ T-Zellen proinflammatorisch auf die Effektorphase der EBA (Bieber et al. 2016) (vgl. Abb. 3 (4)).

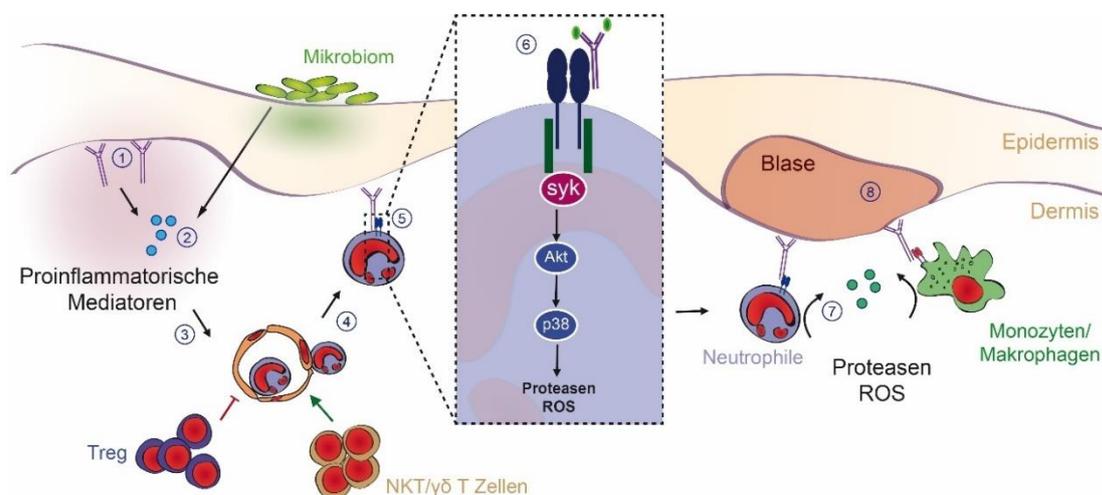


Abb. 3 Pathomechanismen der Blasenbildung und Entzündung bei EBA. Abkürzungen: Akt, eine Serin- und Threoninkinase; NKT, natürliche Killerzellen; ROS, reaktive Sauerstoffradikale; Treg, regulatorische T-Zellen. Abb. 3 zur Verfügung gestellt von K.Bieber, LIED, Universität zu Lübeck.

1.2.6 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten haben eine kurze Halbwertszeit und zirkulieren lediglich 6-9h im Blut (Jelkmann 2011, S. 477–502). Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und sind die ersten Blutzellen, die im Falle einer Infektion oder Entzündung durch proinflammatorische Zytokine getriggert die Blutgefäße verlassen, um Pathogene aufzunehmen und sie anschließend in ihrem Inneren mittels ROS abzutöten. Ein Mangel an funktionstüchtigen neutrophilen Granulozyten resultiert in Immundefekten, die schwere Infektionen mit sich ziehen – aber auch eine das physiologische Ausmaß überschreitende Aktivität kann negative Folgen für körpereigene Strukturen haben, wie es auch bei EBA der Fall ist (Murphy und Weaver 2018b, S. 95–173; Schmidt und Zillikens 2013).

Die Bindung von Leukotrien B4 (LTB4) an den Leukotrien-Rezeptor (BLT1) (vgl. Abb. 4) ist für die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Haut essenziell. Die 5-Lipoxygenase (5-LO) ist ein Schlüsselenzym in der Synthese von LTB4 und führt zu einer verminderten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Da aktivierte Neutrophile in der Haut eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der EBA spielen (vgl. 1.2.5), konnten Mäuse mit defizienten BLT1 bzw. mit defizienter 5-LO keine experimentelle EBA entwickeln (Sezin et al. 2017).

Nach der Bindung der Autoantikörper an den Fcγ-Rezeptor auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten wird die zelluläre Antwort über den Syk-Signalweg (Kiefer et al. 1998; Samavedam et al. 2018) oder über den *Pi3K/AKT/MAPK*-Signalweg eingeleitet (Burgering und Coffey 1995). Diese Aktivierung führt zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β and GM-CSF, welche wiederum die Signaltransduktion durch Moleküle der Src-Familie wie Hck, Fgr und Lyn zur Folge hat (Ludwig 2017; Kovács et al. 2014) (vgl. Abb. 4).

Der über den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems freigesetzte Komplementfaktor C5a führt mittels Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (Pi3K) zu einer Phosphorylierung von *extracellular signal–regulated kinases 1* und *2* (Erk1/2) und auf diesem Wege zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten (Ludwig 2013). Folglich wird die Aktivierung der Neutrophilen durch die Hemmung der Pi3K, insbesondere der Pi3Kβ-Untereinheit, verhindert (Kulkarni et al. 2011). Auch die pharmakologische Inhibition der

Erk1/2 sowie der *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und der Serin- und Threoninkinase (AKT), auch unter dem Namen Proteinkinase B (PKB) bekannt, konnte die IC-induzierte EBA verringern (Ludwig 2013; Hellberg et al. 2013).

Darüber hinaus trägt auch *heat shock protein 90* (HSP90) zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bei, was anhand der durch die Hemmung von HSP90 hervorgerufenen therapeutischen Effekte im Mausmodell deutlich wird (Ludwig 2017; Kasperkiewicz et al. 2011). *In vitro* hat auch die pharmakologische Inhibition von *retinoid-related orphan receptor α* (ROR α) die Hemmung der Immunkomplex-induzierten ROS-Freisetzung zur Folge (Ludwig 2017; Sadeghi et al. 2015).

Für die Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit für die ROS-Produktion muss eine Untereinheit der NADPH-Oxidase p47phox, auch *neutrophil cytosolic factor 1* (NCF1) genannt, phosphoryliert werden (Ago et al. 1999). Auf zwei Kinasen, die NCF1 direkt phosphorylieren, soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

Die Serin- und Threoninkinase AKT phosphoryliert NCF1 (Chen et al. 2003) (vgl. Abb. 4), wobei insbesondere die Isoform AKT 2 diese Funktion in neutrophilen Granulozyten übernimmt und damit die proinflammatorische Antwort der Zelle maßgeblich beeinflusst. Ferner scheint AKT 2 auch für Zellmigration und die Degranulation neutrophiler Granulozyten benötigt zu werden (Chen et al. 2010). Die Aktivität von AKT selbst wird durch verschiedene weitere Kinasen kontrolliert und mittels Phosphorylierung von Threonin308 durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) (Dangelmaier et al. 2014) und mittels Phosphorylierung von Serin473 bewirkt. Serin437 kann auf verschiedenen Wegen wie zum Beispiel durch *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) (Sarbasov et al. 2005) oder mit Hilfe der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) (Feng et al. 2004; Li et al. 2013) phosphoryliert werden.

Auch die PKC (Proteinkinase C) beeinflusst die Aktivierung von AKT, da sie in der Lage ist, Serin473 zu phosphorylieren (Kawakami et al. 2004) oder die DNA-PK zu aktivieren (Choi et al. 1991). Dadurch, dass die PKC zusätzlich NCF1 direkt phosphorylieren kann (El Benna et al. 1996), trägt die PKC maßgeblich zur Aktivierung der NADPH-Oxidase bei (Huang und Kleinberg 1999).

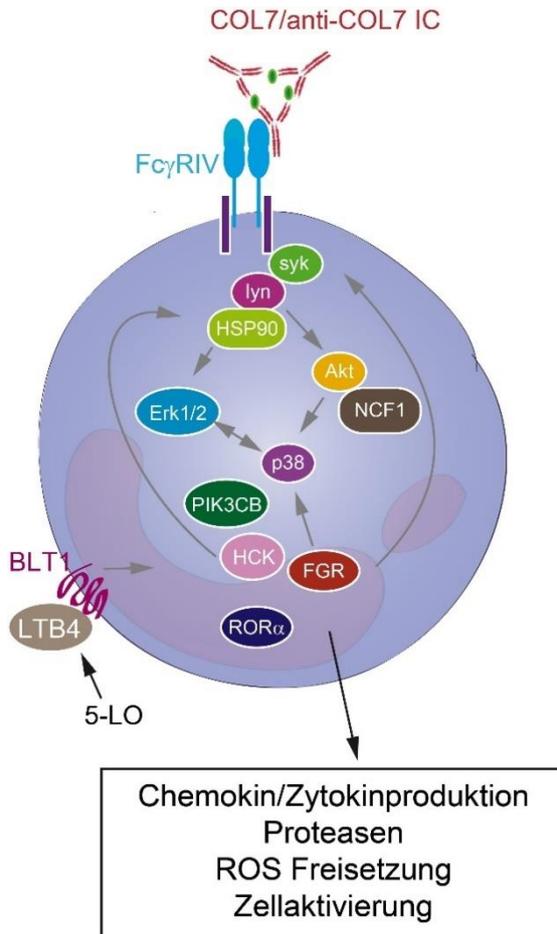


Abb. 4 intrazelluläre Signaltransduktion in einem neutrophilen Granulozyten. Dargestellt sind durch ICs induzierte Signaltransduktionswege in neutrophilen Granulozyten, die zur Produktion von Zytokinen, Proteasen, Chemokinen und zur Freisetzung von ROS führen. Abkürzungen: Akt, Serin- und Threoninkinase; BLT1, Leukotrien-Rezeptor; COL7, Typ VII Kollagen; Erk1/2, *extracellular signal-regulated kinases 1 und 2*; FcRIV, muriner Rezeptor; Hsp90, *heat shock protein 90*; IC, Immunkomplexe; LTB4, Leukotrien B4; PIK3CB *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Beta*; ROR α , *Retinoid-related orphan receptor α* , ROS, reaktive Sauerstoffspezies. Modifizierte Abbildung nach Kasperkiewicz et al. 2016.

1.2.7 Getestete Inhibitoren

Da es sich bei EBA um eine sehr seltene Erkrankung handelt, hat die Industrie wenig Interesse daran, Zielstrukturen im Pathomechanismus zu erforschen und neue Therapeutika zu entwickeln. Eine komfortable Möglichkeit, potenzielle Medikamente gegen EBA zu testen, ist die Nutzung von Bibliotheken kommerzieller Hersteller, da hier die konkreten Zielmoleküle, die durch die einzelnen Substanzen gehemmt werden, bereits bekannt sind. Die *Target Selective Inhibitor Library* von Selleckchem® enthält 601 Substanzen, die insgesamt über 174 Zielstrukturen hemmen, welche allesamt Elemente verschiedener Signaltransduktionswege sind. Alle Substanzen sind prinzipiell in der Lage

dazu, eine einzelne Zielstruktur zu hemmen und haben gegenüber anderen Zielmolekülen (*off-target*) eine mindestens 100-fach höhere Selektivität (<http://www.selleckchem.com/screening/selective-library.html>). Aus der *Target Selective Inhibitor Library* von Selleckchem® wurden 141 Substanzen getestet. Die *Prestwick Chemical Library*® enthält 1280 bereits zugelassene Medikamente mit abgelaufenem Patent, welche ebenfalls validiert wurden (<http://www.prestwickchemical.com/libraries-screening-lib-pcl.html>).

Zunächst wurden die Substanzen von Mikko Armbrust im Rahmen seiner Doktorarbeit *in vitro* im *ROS Release Assay* auf die spezifische Inhibition von ROS-Produktion der Haupteffektorzellen der EBA, den neutrophilen Granulozyten, *gescreent*. Da die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch ICs aus Typ VII Kollagen und anti-humanes-Typ-VII-Kollagen-Antikörpern ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese der EBA ist, ist der *ROS Release Assay* ein vereinfachtes Modell, um potenzielle therapeutische Wirkungen der Substanzen zu testen (Recke et al. 2010).

Im nächsten Schritt wurden 22 Substanzen, die im *ROS Release Assay* die Produktion von ROS hemmen konnten, von Georg Kaiser im Rahmen seiner Doktorarbeit in der AG Ludwig (LIED) auf ihre Zytotoxizität und im *ex vivo* EBA-Modell auf Hautgefrierschnitten getestet. Katharina Schulze Dieckhoff prüfte im Rahmen ihrer Doktorarbeit die Dosisabhängigkeit der Substanzen im *ROS Release Assay* und wandte die wirksamsten Substanzen im passiven, lokalen Antikörpertransfer-Modell (vgl. 1.2.8) der EBA *in vivo* an. Dadurch wurde einerseits die Effektivität der Substanzen auf die Unterdrückung einer experimentellen EBA geprüft und andererseits die Verträglichkeit der Substanzen *in vivo* getestet. Die fünf Substanzen, die von den Mäusen im Rahmen einer systemischen (oral oder i.p.) Gabe gut vertragen wurden und im Tiermodell den größten Effekt auf die Unterdrückung der experimentellen EBA hatten, sind Propranolol Hydrochlorid (HCl) (Zielmolekül: β -receptor), BX-795 (Zielmolekül: PDK1), Sotrastaurin (Zielmolekül: PKC), PHA-665752 (Zielmolekül: c-Met) und NU 7441 (Zielmolekül: DNA-PK) (<http://www.selleckchem.com/screening/selective-library.html>) und liegen dieser Arbeit zu Grunde.

Propranolol HCl ist ein kompetitiver und nicht selektiver Inhibitor des β -Adrenozeptors mit einer IC₅₀ von 12 nM. Es handelt sich um den ältesten klinisch gebräuchlichen β -Blocker und wird zur Behandlung sehr unterschiedlicher Krankheiten eingesetzt. Am bekanntesten

ist seine Indikation als Antihypertensivum. Darüber hinaus wird Propranolol auch zur Behandlung von Hyperthyreose verwendet, da es in hohen Dosen die Konversion von T4 in T3 hemmt (Oetjen 2017, S. 651). Propranolol kann außerdem zur Anfallsprophylaxe von Migräne eingesetzt werden (Feuerstein und Diener 2017, S. 177). Des Weiteren ist Propranolol 3 mg/kg KG oral zur Behandlung infantiler Hämangiome wirksam (Léauté-Labrèze et al. 2015). Auch die topische Applikation von Propranolol scheint zu einer Regression infantiler Hämangiome zu führen (Kunzi-Rapp 2012; Xu et al. 2012; Schneider et al. 2014). Propranolol ist stark lipophil und wirkt in hohen Konzentrationen membranstabilisierend (Starke 2017, S. 158).

BX-795 hemmt die PDK1 (3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1) im zellfreien Versuchsansatz mit einer IC50 von 6 nM (<https://www.selleckchem.com/products/bx-795.html>). *In vitro* wird durch die Hemmung der PDK1 die Phosphorylierung von AKT verhindert und somit werden verschiedene Zellfunktionen, die den PDK1/AKT-Signalweg beinhalten, gehemmt (Feldman et al. 2005; Dangelmaier et al. 2014).

Sotrastaurin ist ein potenter und selektiver Inhibitor der PKC. Die simultane Inhibition der verschiedenen Isoformen der PKC führt *in vitro* zu einer dosisabhängigen Reduktion der Chemotaxis von Neutrophilen und zu einer Hemmung der ROS-Produktion von stimulierten Neutrophilen (Capsoni et al. 2012). Insbesondere die Isoform PKC β trägt in neutrophilen Granulozyten zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit zur Produktion von ROS bei (Dekker et al. 2000). Darüber hinaus sind immunsuppressive Eigenschaften der Substanz durch die Hemmung der frühen T-Zellantwort bekannt (Evenou et al. 2009). Im Rattenmodell für Transplantatabstoßungen und nach kardialen Allografttransplantationen konnte durch orale Applikation von 30mg/kg KG b.i.d. eine immunsuppressive Wirkung von Sotrastaurin beobachtet werden (Weckbecker et al. 2010). In Phase-II-Studien wurde Sotrastaurin bereits als Ergänzung der immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantationen (Skvara et al. 2008) und als neue Therapieoption zur Behandlung der Psoriasis (Budde et al. 2010) getestet.

PHA-665752 inhibiert die Rezeptortyrosinkinase c-Met in einem zellfreien Versuchsaufbau mit einem IC50-Wert von 9 nM (<https://www.selleckchem.com/products/PHA-665752.html>). C-Met liegt am Anfang verschiedener Signaltransduktionswege und beeinflusst

dadurch die Migration und Proliferation von Tumorzellen (Christensen et al. 2003). *In vitro* konnte an verschiedenen Krebszellmodellen gezeigt werden, dass eine selektive Hemmung von c-Met durch PHA-665752 die der c-Met folgende Signaltransduktion via ERK, Akt, FAK, PLC γ , und STAT verhindert (Christensen et al. 2003; Furge et al. 2000).

NU 7441 hemmt im zellfreien Versuchsansatz die DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) mit einer IC₅₀ von 14 nM und in höheren Konzentrationen (IC₅₀ 5 μ M) die PI3K (<https://www.selleckchem.com/products/nu7441.html>). Die DNA-PK ist dazu in der Lage, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Zur Behandlung verschiedener Krebsarten können DNA-Doppelstrangbrüche provoziert werden, welche zytotoxisch auf Krebszellen wirken (Aktories und Unger 2017, S. 827–830). Die gewünschte therapeutische Wirkung verschiedener Chemotherapeutika kann durch die Aktivität der DNA-PK reduziert werden (Shen et al. 1998), weshalb die Hemmung des Enzyms zur Augmentation chemotherapeutischer und radiotherapeutischer Behandlungen von Tumoren Gegenstand aktueller Forschung ist (Sunada et al. 2016).

1.3. Ziele der Arbeit

Neutrophile Granulozyten spielen nicht nur in der Pathogenese der EBA, sondern auch in vielen weiteren Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle (Kaplan 2013). Daher ist die Erforschung von Substanzen, die die Aktivität neutrophiler Granulozyten modulieren können, auch im Hinblick auf die Erweiterung der Therapieoptionen anderer Autoimmunerkrankungen attraktiv.

Ziel dieser Arbeit ist es, validierte Substanzen chemischer Bibliotheken (*Selective Inhibitor Library* von Selleckchem® und *Prestwick Chemical Library*®), die bisher bereits im *ROS Release Assay* auf ihre Zytotoxizität und im Mausmodell der EBA (1.2.7) getestet wurden, *in vivo* auf ihre Dosisabhängigkeit zu evaluieren. Danach sollen diese Substanzen, die den Mäusen bisher lediglich systemisch (i.p. oder oral) verabreicht wurden, topisch appliziert werden. Damit soll geprüft werden, ob die Substanzen als mögliche neue topische Therapeutika der EBA in Frage kommen und gegebenenfalls eine Alternative zu einer kortikoidhaltigen Creme darstellen könnten.

Außerdem soll die im Hinblick auf die Milderung der experimentellen EBA im Mausmodell meistversprechende Substanz genauer auf ihren Wirkmechanismus in humanen neutrophilen Granulozyten untersucht werden. Hierzu wird eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, um mittels *RNA Sequencing* Rückschlüsse auf die Mediatoren und Mechanismen zu ziehen, mit denen die Substanz die IC-induzierte Freisetzung von ROS in neutrophilen Granulozyten inhibiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Spezifität	Isotyp	Konjugat	Hersteller	Anwendung
Kaninchen α -mCOL7 (part C) IgG	IgG		Dermatologie, Lübeck, D (Sitaru et al. 2005)	In vivo
Goat IgG fraction to mouse C3	IgG		MP Biomedicals, Santa Ana, USA	Immunhistochemie
Donkey IgG anti-goat IgG (H+L)	IgG	Alexa Flour 594	Dianova, Hamburg, D	Immunhistochemie
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) FITC-conjugated AffiniPure	IgG	FITC-	Dianova, Hamburg, D	Immunhistochemie
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)			Sigma-Aldrich, D-Steinheim, D	Immunhistochemie
anti-CD193- (Klon 5E8)		PE	Biolegend, San Diego, USA	Durchflusszytometrie
anti-CD16- (Klon 368)		PacBlue	Biolegend San Diego, USA	Durchflusszytometrie
anti-CD14 (Klon HCD14)		PE-Cy7	Biolegend San Diego, USA	Durchflusszytometrie
anti-CD66b- (Klon G10F5)		APC	Biolegend San Diego, USA	Durchflusszytometrie
anti-CD62L- (Klon DREG-56)		PerCP	Biolegend San Diego, USA	Durchflusszytometrie
Zombie NIR (fixable viability kit)		Zombie	Biolegend San Diego, USA	Durchflusszytometrie
Annexin V		FITC	Biolegend San Diego, USA	Durchflusszytometrie
anti-CD45 (Klon H130)		BV 510	Biolegend San Diego, USA	Durchflusszytometrie

2.1.2 Inhibitoren, Stimuli

Substanz	Hersteller
1 % Propranolol in Basiscreme DAC	Apotheke UKSH, Lübeck, D
2 % Propranolol in Basiscreme DAC	Apotheke UKSH, Lübeck, D
5 % Propranolol in Basiscreme DAC	Apotheke UKSH, Lübeck, D
Anti hCOL7-IgG (Recke et al. 2010)	Dermatologie UKSH, Lübeck, D
BX-795	Selleckchem, Houston, USA
DAC Basiscreme	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel, D
hCOL7 E-F (Recke et al. 2010)	Dermatologie UKSH, Lübeck, D
NU7441 (KU-57788)	Selleckchem, Houston, USA
PHA-665752	Selleckchem, Houston, USA
Propranolol HCl	Selleckchem, Houston, USA
Sotrastaurin	Selleckchem, Houston, USA

2.1.3 Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>aqua dest.</i>	Fresenius KABI, D-Bad Homburg, D
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
CLM RPMI	Genaxxon bioscience, Ulm, D
dd H ₂ O	Fisher Scientific, Hampton, USA
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dulbecco's Phosphate Buffered saline (DPBS)	Fisher Scientific, Hampton, USA
EtOH 70 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
EtOH Rotipuran®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

FBS Gold Plus	Bio & Sell, Feucht, D
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
HEPES Buffer	PAN Biotech, Aidenbach, D
Histofix [®] Formaldehydlösung 4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ketamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Luminol > 97 % (3-Aminophthalhydrazide)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Maisöl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxyd (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Nuklease-freies Wasser DNase/RNase Free	Fisher scientific, Hampton, USA
Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Polyethylenglycol 300	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Polyethylenglycol 400	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Polyethylenglycol 20.000	Serva, Heidelberg, D
Propylene Glycol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Protein G Resin	GenScript, New Jersey, USA
RPMI 1640 with Glutamine w/o Glucose w/o Phenol red with 2.0g/L NaCHO ₃	Genaxxon bioscience, Ulm, D
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Serva, Heidelberg, D
Tris Pufferan > 99,9 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween 80	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Xylazin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
---------	-----------------------------

2.1.4 Fertig-Reagenzsätze

Bezeichnung	Hersteller
Illumina NextSeq <i>MidOutput v2 150 cycles</i>	Illumina, San Diego, USA
Illumina TruSeqRNA <i>Sample Prep Kit v2</i>	Illumina, San Diego, USA
MACSxpress® <i>Neutrophil Isolation Kit, human</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Red Blood Cell Lysis Solution (10×)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, D

2.1.5 Geräte

Laborgerät	Hersteller
Feuchtkammer	Hassa Laborbedarf, Lübeck, D
Feinwaage Analytical Plus	Ohaus, Parsippany, NJ, USA
Fluoreszenzmikroskop Eurostar	Euroimmun, Lübeck, D
Fotometer Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, D
<i>GloMax GM3000 Microplate Reader</i>	Promega, Fitchburg, WI, USA
Inkubator B	Binder, Tuttlingen, D
Kryostat CM3040S	Leica, Nußloch, D
Lichtmikroskop Keyence Biorevo BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, D
MACSQuant® Analyzer 10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MACSxpress® Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Magnetrührer MR3002	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Messuhr Dickenmesser Serie 7	Mitutoyo, Takatsu-ku, Japan
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, D

Multipipette stream	Eppendorf, Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Nanodrop NP80	Implen, Westlake Village, USA
Pipetten Sartorius	Sartorius, Göttingen, D
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg D
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Rotator test-tube-rotator 34528	Snijders, Tilburg, Niederlande
Schüttler polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Schüttler TPM4	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sequenzierer NextSeq 500	Illumina, San Diego, USA
Sterilwerkbank LaminAir HB2448	Heraeus, Hanau, D
Vakuumpumpe WISA	Steinkopf Laborausrüster, Lübeck, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wärmebad, 37 °C	Köttermann, Uetze, D
Zellzähler CASY Model TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen, D
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR, Darmstadt, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, D

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
1,5 mL, 2 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D

15 mL, 50 mL Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
6-well Platte, steril, <i>non-treated</i>	Thermo Fisher, Massachusetts, USA
96-well Microplatten, <i>high-binding</i> , weiß	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
96-well V-Bodenplatte, PP	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Deckgläser 24x60 mm	Th. Geyer, Renningen, D
Dialysemembran <i>Dialysis tubing cellulose membrane avg. flat width 25 mm</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EDTA- haltiges Blutentnahmeröhrchen 9 mL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Staufen, D
Einbettschälchen Tissue-Tek® <i>Intermediate Cryomold</i>	Sakura Finetek, Staufen, D
Kapillare <i>End-to-end</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
Filterplatte AcroPrep Advana 96 Filter Plate	Pall Corporation, New York, USA
Filtertip Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Filtertube</i> Millipore® UFC903008 Amicon® Ultra-15 centrifugal filter concentrator with Ultracel® 30 regenerated cellulose membrane, NMWL: 300000D	Merck, Darmstadt, D

Glassäule Chromatography Columns 2.5 cm x 20 cm	Santa Cruz Biotechnology, INC., Dallas, USA
Kanülen, BDmicrolance 3, 26 G	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kanülen Sterican 30 G	B Braun, Melsungen, D
Küvetten 1.5 mL	Brand, Wertheim, D
Minisart-Plus Filter, Porengröße 0.45 µm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Minisart-Plus Filter, Porengröße 0.2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Objektträger Superfrost Plus	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Pipettenspitzen mit Filter 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Flügelkanüle <i>Safety-Multifly</i> 21G 200 mm lang	Eppendorf, Hamburg, D
Serologische Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht, D
S-Monovette 9 mL (1,6 mg EDTA/mL Blut)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Spritzen Omnican F	Braun, Melsungen, D
Spritzen-Fütterungsaufsatz	Fuchigami, Kyoto, Japan
Verschlussfolie 96-well Platte, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.1.7 Puffer und Medien

Puffer	Zusammensetzung
CL-Medium	472,5 mL RPMI 1640 12,5 mL <i>HEPES Buffer solution</i> 1M 5 mL FBS 10 mL Glucose (10%)

ROS	
<i>Blocking Buffer</i>	1 % BSA, 0,05 % Tween-20 in 1x DPBS
<i>Coating Buffer (0,05 M; pH=9,6)</i>	0,53 % Na ₂ CO ₃ , 0,42 % NaHCO ₃ in <i>aqua dest.</i>
<i>Washing Buffer</i>	0,05 % Tween-20 in 1x DPBS
FACS	
<i>Annexin V Binding Buffer</i>	Biolegend, San Diego, USA
FACS-Puffer	0,5 % BSA, 2 mM EDTA in 1x PBS
<i>Fixation Buffer</i>	2 % PFA (Paraformaldehyd) in 1x DPBS
<i>MACSQuant Running Buffer</i>	Biolegend, San Diego, USA
Aufreinigung von Kaninchen IgG	
Bindungspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,0
Glycinpuffer	0.1 M Glycin, pH 2,5
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9,0
PBS	150 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2
direkte Immunfluoreszenz	
Immunoblocklösung	1 % Albumin Fraktion V, biotinfrei in PBS

2.1.8 Verwendete Programme und Internetdatenbanken

GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla, USA
Jensen DISEASES	JensenLab, Kopenhagen, Dänemark

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	Kanehisa Laboratories, Kyoto, Japan
MACSQuant Analysis Software Version 2.6	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, USA
Venny 2.1	BioinfoGP Spanish National Biotechnology Centre, Barcelona, Spanien

2.2 Isolierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden mit Hilfe des MACSxpress® *Neutrophil Isolation Kit human* von Miltenyi Biotec aus antikoaguliertem Vollblut gesunder Spender isoliert. Dafür wurden den Spender*innen 16 mL Blut in EDTA-haltige Blutentnahmeröhrchen abgenommen und unmittelbar danach weiterverarbeitet. Das Verfahren der Isolierung neutrophiler Zellen aus humanem Vollblut beruht auf der Aggregation und Sedimentation der Erythrozyten und auf immunomagnetischer Markierung von Leukozyten mit Ausnahme der neutrophilen Granulozyten. Der MACSxpress® Separator trennt die magnetisch markierten Zellen von den neutrophilen Granulozyten, sodass sich diese als einzige Fraktion der Leukozyten im Überstand befinden, welcher abpipettiert wird und weiterverarbeitet werden kann.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilwerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Materialien sind Bestandteile des MACSxpress® *Neutrophil Isolation Kit human*. Zunächst wurde der MACSxpress® *neutrophil isolation Cocktail* hergestellt, indem 2 mL von *Buffer A* je einem Vial mit MACSxpress® *neutrophil isolation Cocktail, lymphilized* hinzugefügt und das Pellet durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren rekonstituiert wurde. Anschließend wurden die Vials mit jeweils 2 mL des *Buffer B* gemischt. Für die Verarbeitung von insgesamt 16 mL Vollblut aus den EDTA-Röhrchen wurden 2 aufbereitete Vials des *Isolation Cocktails* benötigt. In einem 30 mL Röhrchen wurde das Blut mit der entsprechenden Menge des *Isolation Cocktails* gemischt und für 5 min auf dem Rotator bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Röhrchen wurde

anschließend geöffnet und 15 min in den MACSxpress® Separator gestellt, damit sich die magnetisch markierten Zellen von den Zielzellen, den neutrophilen Granulozyten, trennten und sich ein Pellet mit Erythrozyten am Boden des Röhrchens absetzen konnte. Die sich nun im Überstand befindenden Zielzellen wurden vorsichtig abpipettiert und in einem 15 mL Röhrchen gesammelt. Da trotz Sedimentation vereinzelt Erythrozyten im Überstand verblieben, wurde der gesammelte Überstand zur Lyse zunächst 10 min bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand aspiriert und das Pellet mit *Red Blood Cell Lysis Solution* resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung zunächst für 5 s gevortext und erneut für 10 min bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das die neutrophilen Granulozyten enthaltende Zellpellet mit 4 mL *Cell lysis Medium* (CLM) resuspendiert.

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer ermittelt, indem 10 µL der Zellsuspension mit 190 µL Trypanblau Lösung verdünnt wurden und die Anzahl der sich in zwei 4x4-Feldern der Zählkammer befindenden Zellen unter dem Mikroskop bestimmt wurde. Das arithmetische Mittel wurde mit dem Kammerfaktor 10.000 und dem Verdünnungsfaktor 20 multipliziert, um die Zellzahl pro mL Suspension zu erhalten. Die Zellen wurden mit CLM weiter verdünnt, bis die gewünschte Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro mL erreicht war.

Die mit Hilfe des MACSxpres® *Neutrophil Isolation Kit human* isolierten Granulozyten wurden anschließend durch ICa, bestehend aus Antigen (Typ VII Kollagen) und Antikörper (Anti-Typ-VII-Kollagen-IgG1, oder IgG4) (Recke et al. 2010), aktiviert. Im Rahmen der Arbeit von Annika Munko, (LIED) Universität zu Lübeck, wurden die verschiedenen Subtypen der Immunglobuline hinsichtlich ihres Potentials zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten getestet (unveröffentlichte Daten). Da sich hier kein signifikanter Unterschied feststellen ließ, wurden IgG1 und IgG4 analog verwendet. Für die Genexpressionsanalyse ist eine große Zellausbeute nötig, weshalb zur Stimulation und Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor eine 6-well Platte verwendet wurde. Parallel dazu wurde mit zwei 96-well Platten gearbeitet, um im *ROS Release Assay* die Aktivierbarkeit der isolierten neutrophilen Granulozyten zu prüfen und in der FACS-Analyse die Zytotoxizität des Inhibitors auszuschließen. Dadurch, dass sowohl Zellen der 6-well Platte wie auch der 96-well Platte

im FACS analysiert wurden, konnten Rückschlüsse von einem möglichen Einfluss der Plattenbeschaffenheit auf die Aktivierung der Zellen gezogen werden.

Dazu wurden zunächst die Wells der 96-well Microplatten *high-binding* mit 50 μL Antigen (Typ VII Kollagen) der Konzentration 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ *Coating Buffer* beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Analog dazu wurde mit der 6-well Platte mit 800 μL Antigen der gleichen Konzentration verfahren. Wenn nicht anders angegeben, bezieht sich im Folgenden die erste Mengenangabe auf die 96-well Platte und die Mengenangabe nach dem doppelten Schrägstrich (//) auf die 6-well Platte. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Antigene in drei Waschschrritten mit *Washing Buffer* (300 μL // 5 mL pro Well) entfernt und die Platte mit *Blocking Buffer* (200 μL // 2,5 mL pro Well) für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells erneut auf gleiche Weise mit dem *Washing Buffer* gewaschen. Anstelle des *Blocking Buffers* wurden anschließend 100 μL // 2,5 mL Antikörper (anti-Typ-VII-Kollagen-IgG1, IgG3 oder IgG4) der Konzentration 2,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Blocking Buffer* in die vorgesehenen Wells gegeben. Wells, die für die Negativkontrollen nur Zellen oder nur Antigen enthalten sollten, wurden mit der der Zellsuspension entsprechenden Menge an *Blocking Buffer* beschichtet. Darauf folgte eine einstündige Inkubation zur Ausbildung von ICs und ein weiterer dreifacher Waschschrtritt der Wells mit *Washing Buffer*. Anschließend wurden die Wells einmalig mit CLM (100 μL // 2,5 mL pro Well) gewaschen und 100 μL // 2,5 mL CLM als Vorlage für die isolierten Zellen in die Wells gegeben. Die Wells, die mit dem Inhibitor oder seinem Lösungsmittel inkubierte Zellen enthalten sollten, wurden anstelle von CLM mit einer 10 μM Lösung des Inhibitors in CLM oder dem entsprechenden Anteil des Lösungsmittels PBS in CLM befüllt, sodass am Ende in allen Wells ein Volumen von 100 μL // 2,5 mL vorlag.

Anschließend wurden in alle Wells jeweils 100 μL // 2,5 mL der wie oben beschriebenen vorbereiteten Zellsuspension von $2 \times 10^6/\text{mL}$ CLM der neutrophilen Granulozyten hinzugegeben. Durch die Bindung der Zellen an die ICs wurden die Zellen aktiviert und setzten ROS frei. Anschließend wurde der *ROS Release Assay* (siehe 2.4) durchgeführt und die Zellen der 6-well Platte nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C geerntet. Von diesen Zellen wurden je 200 μL auf eine 96-well V-Boden Platte übertragen, um die FACS-Analyse durchzuführen (vgl. 2.3). Die restlichen Zellen wurden in 15 mL Röhrchen 10 min bei RT und

330 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit je 2 mL RLT-Puffer des *Qiagen RNeasy Mini Kit*[®] resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.3 FACS-analytische Verfahren

Anhand durchflusszytometrischer Messungen können gemischte Zellpopulationen einer Probe voneinander unterschieden und quantifiziert werden. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion von Streulichtsignalen, die eine Zelle verursacht, während sie einen Laserstrahl passiert. Dabei gibt die Messung des Streulichts unveränderter Wellenlänge Auskunft über die Größe und die Granularität einer Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC), das in der ursprünglichen Richtung des Lichtstrahls gemessen wird, ermöglicht die Bestimmung der Größe einer Zelle. Anhand des Seitwärtsstreulichts (SSC), das im 90°-Winkel detektiert wird, kann die optische Dichte einer Zelle gemessen werden. Dabei ist das gemessene SSC proportional zur optischen Dichte, welche wiederum abhängig von der Granularität der Zelle ist (Luttmann et al. 2006b, S. 63–66).

Mittels spezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die Oberflächenmoleküle einer Zelle markieren, wird die Identifizierung einer Zellpopulation über den Immunphänotyp einer Zelle ermöglicht. Dabei wird das Fluorochrom von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert Licht einer spezifischen Wellenlänge, das von einem Photodetektor im 90°-Winkel erfasst wird. Jede Zelle wird als einzelnes Ereignis detektiert und erscheint in einem Dot-Plot als Punkt (Luttmann et al. 2006a, S. 81–84).

2.3.1 Färbung neutrophiler Granulozyten im humanen Vollblut

Die Isolation und Aktivierung neutrophiler Granulozyten aus humanem Vollblut erfolgte wie in den oben genannten Ausführungen beschrieben (vgl. 2.2). Nach der 4-stündigen Inkubation der Platten bei 37 °C wurden jeweils 200 µL aus den Wells für die FACS-Färbung auf eine 96-well V-Boden Platte übertragen.

Wenn nicht anders angegeben, fanden alle folgenden Arbeitsschritte bei Raumtemperatur statt. Nach Zentrifugation der Platte für 6 min bei 450 x g wurden die entstandenen Überstände mit der Vakuumpumpe abgesaugt und verworfen. Die Pellets enthielten die Zellen und wurden jeweils mit 40 µL *Annexin V Binding Buffer* resuspendiert. Ein Vial mit Zombie NIR wurde zunächst mit 100 µL DMSO gelöst. Diese Lösung wurde weiter 1:1000

mit DMSO verdünnt. Davon wurden jeweils 10 µL in jedes Well pipettiert und die Platte anschließend bei 4 °C und lichtgeschützt für 15 min inkubiert. Danach wurden pro Well 10 µL *Anti-CD-Master Mix* hinzugefügt. 10 µL des *Anti-CD-Master Mix* setzten sich aus 0,08 µL BV 510 anti-CD45, 0,31 µL FITC Annexin V, je 0,38 µL PE-Cy7 anti-CD14, PacBlue anti-CD16, PE anti-CD193, PerCP anti-CD62L und APC anti-CD66b und 7,71 µL *Annexin V Binding Buffer* zusammen. Der *Anti-CD-Master Mix* wurde lichtgeschützt und auf Eis gelagert, da die verwendeten anti-CD-Marker, FITC Annexin V und Zombie NIR Fluorochrom-gekoppelt sind. Die Platte wurde für 15 min bei RT lichtgeschützt inkubiert und anschließend für 6 min bei 450 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit der Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellpellets mit je 200 µL *Annexin V Binding Buffer* resuspendiert. Anschließend wurde die Platte erneut für 6 min bei 450 x g zentrifugiert und das Pellet in 200 µL FACS-Puffer aufgenommen. Dieser Schritt wiederholte sich, wobei das Pellet anschließend mit 100 µL Fixation Buffer gelöst wurde. Zur Fixierung der Zellen wurde die Platte 20 min unter Lichtschutz inkubiert und danach pro Well 100 µL FACS-Puffer hinzugefügt. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension gemischt und die Platte anschließend erneut für 6 min bei 450 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in je 200 µL FACS-Puffer aufgenommen und die Platte wurde bis zur Messung kühl (4 °C) und dunkel gelagert.

Vor der Messung wurden alle Proben mit einer Filterplatte gefiltert. Hierzu wurden die gefärbten und fixierten Zellen durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in die Wells der Filterplatte übertragen. Diese wurde auf eine neue 96-well V-Boden Platte gelegt und die beiden übereinander gelagerten Platten so lange bei 450 x g zentrifugiert, bis die sich in den Wells der Filterplatte befindende Zellsuspension über den Filter in die Wells der neuen 96-well V-Boden Platte überführt wurde. Vor der Messung wurden Zellen, die sich am Boden der Platte abgesetzt hatten, durch Auf- und Abpipettieren mobilisiert. Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem *MACS Quant® Analyzer 10*.

2.3.2 Gating Strategy

Anhand der Messung des FSC und SSC konnten Granulozyten aufgrund ihrer sich von den Zellpopulationen der Monozyten und Lymphozyten unterscheidenden Zellgröße und Granularität ausgewählt werden. Es wurde davon ausgehend eine Diskrimination der

Doublets durchgeführt, um ausschließlich Einzelzellen zu erhalten und eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden. Phagozyten sind im Gegensatz zu Lymphozyten CD16 positiv. Die Herunterregulierung von CD45 (*CD45 diminished*) zeigt eine Aktivierung der Zellen an, da es sich bei CD45 um eine membranöse, auf Leukozyten vorkommende Tyrosinphosphatase handelt, die durch die Ausschüttung der von der NADPH-Oxidase produzierten ROS vermindert exprimiert wird (Fialkow et al. 1997). Um neutrophile Granulozyten von Mastzellen und Makrophagen abzugrenzen, wurden zusätzlich ausschließlich CD193- und CD14-negative Zellen davon ausgewählt.

Nach Anwendung der oben beschriebenen *Gating Strategy* wurden neutrophile Granulozyten von anderen Zellpopulationen der Proben abgegrenzt. Um Aussagen über die Zellvitalität treffen zu können und lebendige von toten Zellen zu unterscheiden, wurde eine Detektion der FITC Annexin-positiven (apoptotischen) und der Zombie NIR-positiven (nekrotischen) Zellen durchgeführt.

FITC Annexin V bindet Calcium-abhängig intrazellulär an Phosphatidylserin, einen Bestandteil der Zellmembran (<https://www.biolegend.com/en-us/products/fitc-annexin-v-5161>). Da die Zellmembran bei Apoptose ihre intakte Struktur verliert, wird Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran verlagert. Das Fluorochrom-gekoppelte Annexin V, befindet sich folglich ebenfalls an der Zelloberfläche und macht eine Detektion von apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie möglich. Zombie NIR permeiert zerstörte Membranen und reagiert mit freien Aminogruppen. Intakte Zellen werden nicht gefärbt, sodass im Durchflusszytometer nekrotische Zellen detektiert werden können (<https://www.biolegend.com/en-us/products/zombie-nir-fixable-viability-kit-8657>).

Um die Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu messen, wurden die Zellen mit anti-humanen CD62L und CD66b-Antikörpern gefärbt. Bei CD62L handelt es sich um das Glykoprotein L-Selektin, das bei der Migration peripherer Blutzellen ins Gewebe als Adhäsionsmolekül dient (Wedepohl et al. 2012). Nach der Aktivierung kommt es zum Verlust von CD62L, was auch als *CD62L-shedding* bezeichnet wird, sodass aktivierte Zellen in der Durchflusszytometrie CD62L-negativ erscheinen. CD66b, ein über einen GPI-Anker verknüpftes Glykoprotein, induziert die Aktivierung der Granulozyten und wird bei

aktivierten Neutrophilen vermehrt nachgewiesen, sodass sich in der Durchflusszytometrie aktivierte Neutrophile CD66b-positiv darstellen (Kim und Haynes 2013).

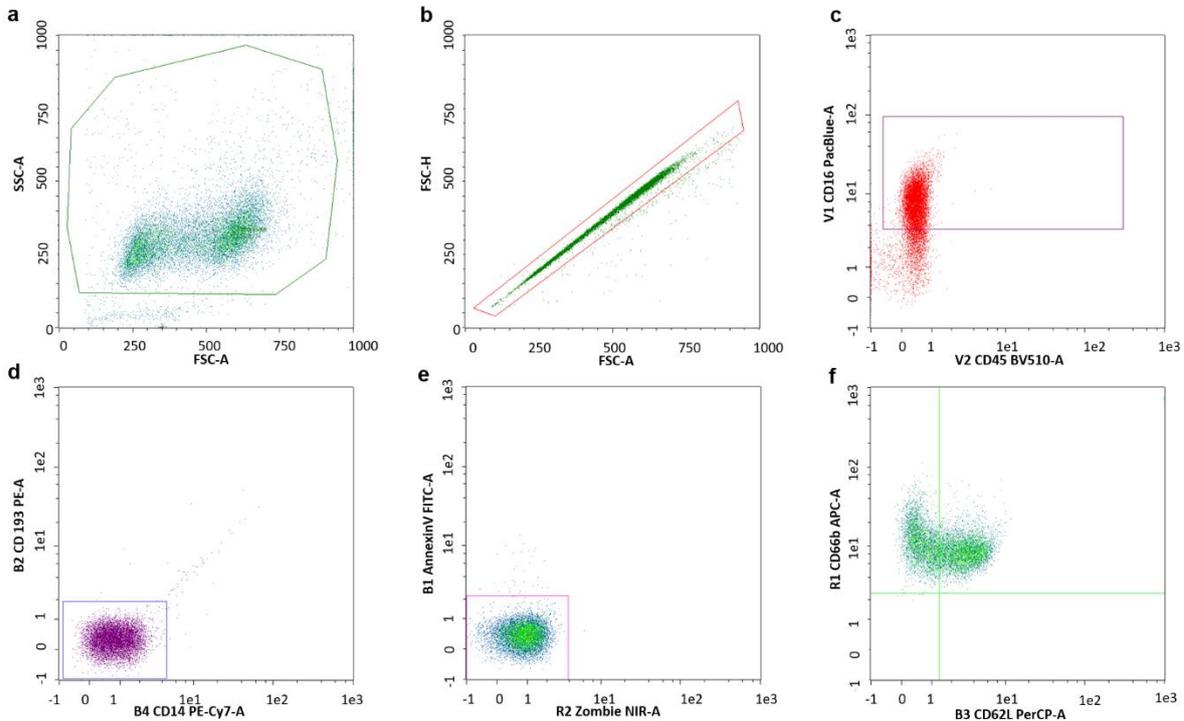


Abb. 5 Gates zur Detektion lebendiger, neutrophiler Granulozyten. Für die durchflusszytometrische Analyse neutrophiler Granulozyten im Scatter Gate wurden Zellen mittels MACSxpress® *Neutrophil Isolation Kit human* von Miltenyi Biotec aus antikoaguliertem Vollblut gesunder Spender isoliert und wie in 2.3.1 beschrieben gefärbt (a, b). Die Granulozytenpopulation wurde anhand ihrer charakteristischen Position im FSC und SSC ermittelt und die (c-f) Expression der Oberflächenproteine anhand des Fluoreszenzsignals der Zellen detektiert. Identifikation der Zellpopulation der Granulozyten anhand ihrer Größe und Granularität (a). Einzelzellen (b). CD16-positive und CD45-dim-Zellen (c). CD193- und CD14-negative Zellen (d). FITC Annexin-negative und Zombie-NIR negative Zellen (e). CD62L-negative und CD66b-positive Zellen befinden sich im oberen, linken Quadranten (f).

2.4 ROS Release Assay

Anhand der Detektion von ROS nach Bildung eines ICs aus Antigen (Typ VII Kollagen) und Antikörper (Anti-Typ-VII-Kollagen-IgG1, -IgG3 oder -IgG4) kann der Grad der Aktivierung neutrophiler Granulozyten bestimmt werden (Kulkarni et al. 2011) und im Anschluss der inhibitorische Effekt einer Substanz auf die Produktion von ROS beurteilt werden. Luminol reagiert mit freigesetzten ROS, sodass die Messung der Intensität der Chemolumineszenz des Luminols im *GloMax Microplate Reader* Aufschluss über die quantitative Ausschüttung von ROS gibt. Dazu wurden 2 mg Luminol zunächst in 8 µL NaOH gelöst und mit 1,1 mL *aqua dest.* verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Luminol 1:20 zu den

Zellsuspensionen aller Wells hinzugefügt. Die Messung erfolgte bei 37 °C und 450 nm mit 102 Iterationen in etwa 120 min.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus stimulierten humanen Neutrophilen

Die Isolation fand bei Raumtemperatur und unter Verwendung der Puffer und Reagenzien aus dem *Qiagen RNeasy Mini Kit*[®] statt. Das Kit basiert auf einer Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Bei dieser Methode werden die Proben zunächst lysiert und homogenisiert. Der Guanidinium-Isothiocyanat und 2 Mercaptoethanol enthaltende Lysispuffer (*RLT-Buffer*) inaktiviert RNAsen. Durch Zugabe von Ethanol wird die Bindung der RNA an die Membran aus Silicagel optimiert. In den nachfolgenden Schritten werden Kontaminationen entfernt und zum Schluss die RNA durch *RNase-free water* eluiert. Zur Vermeidung einer Kontamination der Proben erfolgten alle folgenden Arbeitsschritte unter Verwendung von Mundschutz und Pipettenspitzen mit Filter.

Die Stimulation und Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit Propranolol erfolgten wie in 2.2 beschrieben. Die in 2 mL *RLT-Buffer* gelagerten Zellen wurden aufgetaut und 2 mL EtOH 70 % hinzugefügt. Anschließend wurde das gesamte Zelllysat mit einer 30 G Kanüle dreimal geschert. Davon wurden 750 µL auf die im *Qiagen RNeasy Mini Kit*[®] enthaltenen *Spin Columns* gegeben, diese in den 2 mL *Collection Tubes* bei 16.000 x g für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis das gesamte Zelllysat über die Membranen der *Spin Columns* zentrifugiert wurde und sich die Zellen in den Membranen befanden. Die *Spin Columns* wurden erneut in 2 mL *Collection Tubes* platziert und 700 µL *RW1-Buffer* hinzugegeben. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 s bei 16.000 x g, der Überstand wurde verworfen und die *Spin Columns* wieder vorsichtig in die *Collection Tubes* gestellt. Anschließend wurden je 500 µL *RPE-Buffer* auf die *Spin Columns* gegeben und die Zentrifugation wie oben beschrieben wiederholt. Nachdem erneut 500 µL *RPE-Buffer* auf die *Spin Columns* pipettiert wurden, erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation, um die Membranen der *Spin Columns* zu trocknen. Diese wurden danach in ein neues 2 mL *Collection Tube* gestellt und bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert, um Reste des *RPE-Buffers* zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde die RNA

eluiert. Dazu wurden die *Spin Columns* in neue 1,5 mL *Collection Tubes* platziert. Auf die Membranen wurden je 30 μ L *RNase-free water* pipettiert und die Proben für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Im Durchfluss befand sich die extrahierte RNA.

2.5.2 Messung der RNA-Qualität und -Quantität

Zur Messung der RNA-Qualität und -Quantität wurde das Photometer Nanodrop mit 2 μ L RNA-freiem Wasser kalibriert. Anschließend wurde die Konzentration der RNA durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, indem jeweils 2 μ L der wie in 2.5.1 beschrieben aufgereinigten Proben unverdünnt in die Messkammer gegeben wurden. Durch die Messung des Absorptionsquotienten 260 nm/280 nm wurde die Verunreinigung der Proben durch Lösungsmittel, durch die Bestimmung von A260 nm/A230 nm die Verunreinigung durch Proteine quantifiziert. Im optimalen Fall ergeben 260 nm/280 nm = 2 und A260 nm/A230 nm = 1 (Desjardins und Conklin 2010).

2.5.3 RNA-Genexpressionsanalyse (Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie Plön)

Für die Genexpressionsanalyse von humanen neutrophilen Granulozyten unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurde das *Illumina TruSeqRNA Sample Prep Kit v2* verwendet. Die Durchführung des *Arrays* erfolgte durch das Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie in Plön entsprechend den Angaben der Hersteller der verwendeten Kits. Die aus den Proben isolierte Gesamt-RNA (vgl. 2.5.1) wurde auf Trockeneis verschickt.

Mithilfe des *Illumina TruSeqRNA Sample Prep Kit v2* wurde die mRNA zunächst fragmentiert und dann mit Hilfe der reversen Transkriptase in einen cDNA-Strang überschrieben. Ein zweiter cDNA-Strang wurde durch DNA-Polymerase und RNase H synthetisiert. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente am 3'-Terminus mit einer einzelnen Adenin-Base versehen, um falsche Bindungen der cDNA-Fragmente zu verhindern. Im nächsten Schritt erfolgte die Legierung der für die Hybridisierung benötigten Adapter. Die mit den Adaptern markierten cDNA-Fragmente wurden auf dem Sequenzierer NextSeq 500 mit dem Reagensatz *Illumina NextSeq MidOutput v2 150 cycles* sequenziert und mittels PCR amplifiziert.

Die Auswertung der Rohdaten und die quantitative Auswertung der Genexpression erfolgte mit der Hilfe von Yask Gupta (LIED, Universität zu Lübeck). Die im *FastQ-Format*

präsentierten Rohdaten wurden zunächst durch *FastQC Software* (Andrews S. 2010) auf ihre Qualität überprüft, wobei *FastQ reads*, die nicht den *Phred quality score* von > 20 erfüllten, sowie Sequenzen < 35 bp verworfen wurden. Sequenzen, deren Qualität an ihren Enden nicht ausreichte, wurden mit *Trimmomatic Software* (Bolger et al. 2014) getrimmt. Anschließend wurden die Daten mit Hilfe des *RNA-seq aligner tool STAR* (Dobin et al. 2013) mit dem humanen Referenzgenom *human* verglichen. Für die quantitative Auswertung der Genexpression durch Zählung der die Exons überlappenden Sequenzen wurden *HTSeq-count* (Anders et al. 2015) und zur anschließenden Bestimmung der relativen Genexpression *DESeq2 R package* (Love et al. 2014) verwendet.

2.6 Herstellung von totalen mCOL7C

Das totale Kaninchen IgG wurde aus dem Serum von zuvor mit mCOL7C immunisierten Kaninchen des kommerziellen Anbieters Eurogentec, Belgien, aufgereinigt. Dazu wurde eine mit insgesamt 10 mL Protein G Resin gefüllte Glassäule verwendet, die zunächst mit 100 mL Bindungspuffer gewaschen wurde. Danach wurde das Serum durch einen Filter in die Säule gegeben und mit dem Bindungspuffer aufgefüllt, bis die Säule insgesamt etwa 100 mL beinhaltete. Die mit Serum gefüllte Säule wurde für 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und der Durchfluss aufgefangen. Die Säule mit den gebundenen Antikörpern wurde mit Bindungspuffer so lange gewaschen, bis eine $\text{OD}_{280} < 0,1$ erreicht war. Vor der Eluierung der Antikörper wurde ca. 2,5 mL Neutralisationspuffer in ein Auffanggefäß vorgelegt. Das IgG wurde mit Glycin eluiert, bis die OD_{280} des Eluats $< 0,05$ betrug. Danach wurde mit Neutralisationspuffer ein pH von 7,4 eingestellt.

Anschließend wurde die Säule mit Glycinpuffer gereinigt, bis die OD_{280} bei $< 0,01$ lag, danach jeweils einmal mit 1 M NaCl und Bindungspuffer gewaschen, mit 20 % EtOH in Bindungspuffer aufgefüllt und erneut bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Das Eluat mit den Antikörpern wurde zur Aufkonzentrierung zunächst in Dialyseschläuche gefüllt, welche für 2 h bei RT in Polyethylenglykol (PEG) 20.000 inkubiert wurden. Darauf folgten 3 Dialyseschritte in 5 L PBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, um den Puffer auszutauschen. Dazu wurden die Dialyseschläuche zunächst über Nacht und anschließend erneut für 2 bzw. 4 h in PBS inkubiert.

Der Inhalt der Dialyseschläuche wurde zunächst in 50 mL Röhrchen für 5 min bei 3220 x g zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der die Antikörper enthaltende Überstand wurde in *Filtertubes* gefüllt, welche mehrfach für 20 min bei 3220 x g zentrifugiert wurden, bis das gesamte Eluat konzentriert war. Mit dem Photometer konnte eine Extinktion von 1,144 (OD280) gemessen werden, was einer IgG-Konzentration von 42,7 mg/mL entspricht.

Nach steriler Filtration der konzentrierten Antikörper mit den Filtern 0.45 µm Minisart® plus und anschließend 0,2 µm Minisart® plus betrug die Konzentration der Antikörper 32 mg/mL.

Aus dem totalen amCOL7C wurde mit Hilfe entsprechender Säulen spezifisches amCOL7C hergestellt und mir von Astrid Fischer (LIED) zur Verfügung gestellt.

2.7 Tierexperimentelle Verfahren

Für die Induktion der lokalen EBA wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Mäuse für den ersten Versuchsteil der systemischen Applikation der 5 Inhibitoren stammen aus eigener Zucht (Katja Bieber, LIED). Für den Versuchsteil der topischen Applikation der Inhibitoren wurden 8 Wochen alte Mäuse des gleichen Stammes von Charles River, Sulzfeld bezogen.

Die Tierversuche wurden aufgrund folgender Tierversuchsanzeige von der Tierschutz-Ethikkommission des Umwelt- und Landwirtschaftsministeriums Schleswig-Holstein genehmigt (Tierversuchsantrag im Anhang) und von mir als zertifizierte Person (FELASA-B Äquivalent im Anhang) durchgeführt:

Tierversuchsantrag:

„Inhibition von intrazellulären Signalwegen bei Epidermolysis bullosa acquisita“ 5(108-8/15), Antragsteller Katja Bieber.

Alle verwendeten Mäuse wurden an der Gemeinsamen Tierhaltung Lübeck unter einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus in spezifisch-pathogenfreier Umgebung gehalten und hatten Standard-Mausfutter sowie angesäuertes Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung.

2.7.1 Versuchsaufbau der lokalen, antikörpertransfer-induzierten EBA

Das von Sitaru et al. beschriebene Tiermodell liegt der lokalen, antikörpertransfer-induzierten EBA zugrunde (Sitaru et al. 2005). Es wurde für die Versuche zu einem lokalen, auf die Ohren der Mäuse begrenzten, Krankheitsmodell modifiziert (Bieber et al. 2016; Bieber et al. 2017a).

Hierzu wurde den mit 10 µg/g KG Xylazin und 100 µg/g KG Ketamin narkotisierten Mäusen an Tag 0 einmalig je 30 µg spezifisches Kaninchen amCOL7C intradermal in die Ohrbasis des linken sowie des rechten Ohrs injiziert, wobei das Injektionsvolumen 50 µL betrug. Vor der Injektion wurde die Ohrdicke mit der Messuhr gemessen, um einen Ausgangswert für die Veränderung der Ohrdicke im Verlauf des Experimentes zu erhalten. Der klinische Schweregrad der Erkrankung wurde anhand einer klinischen Untersuchung der Tiere festgestellt. Dazu wurde die Ohrdicke gemessen und der mit Krusten, Blasen, Erythemen und Erosionen befallene prozentuelle Anteil des Ohrs bestimmt und durch ein Foto dokumentiert (Bieber et al. 2016). Nach finaler Blutentnahme aus dem Auge wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Tötung erfolgte die Entnahme der Ohren für histologische Analysen. Die Ohren wurden geteilt, wobei eine Hälfte für Gefrierschnitte in mit Einbettmedium O.C.T. Compound befüllten Einbettschälchen senkrecht und luftblasenfrei aufgestellt wurde. Die eingebetteten Proben wurden zunächst auf Trockeneis gelegt und anschließend bei -80 °C gelagert. Mit dem Kryostaten CM3040S von Leica wurden die Proben zu 6 µm dicken Gefrierschnitten weiterverarbeitet. Die andere Hälfte des Ohrs wurde unmittelbar nach der Entnahme in Histofix fixiert. Die Blutproben wurden zunächst auf Eis gelagert und anschließend zweimal bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert und nach jeder Zentrifugation das Serum vom Sediment abpipettiert und in Aliquots gesammelt. Das aliquotierte Serum wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

Vorzeitige Abbruchkriterien waren mehr als 2 Tage andauernde Gewichtsreduktion um mehr als 20 % gegenüber dem Ausgangsgewicht, Abnahme der Körpertemperatur und livide Verfärbung der Bauchhaut als Hinweise auf eine gestörte Kreislauffunktion, Verkrampfungen, anhaltendes Zittern, Koordinationsschwierigkeiten, schwere Automutilation und flache, angestrengte Atmung.

2.7.1.1 Systemische Applikation der Inhibitoren

An Tag -2 bis Tag 1 wurden die Mäuse täglich je nach Gruppe mit dem Lösungsmittel oder einer niedrigen, mittleren oder hohen Konzentration des Inhibitors behandelt. Je nach Substanz und Lösungsmittel erfolgte die Applikation ein-, zwei- oder dreimal pro Tag entweder oral oder i.p. am wachen Tier (vgl. Abb. 6). An Tag 1 und Tag 2 wurden die Tiere erneut narkotisiert, um im Rahmen der klinischen Untersuchung den prozentualen Anteil der von Läsionen betroffenen Ohren zu erheben und die Ohrdicke erneut zu messen.

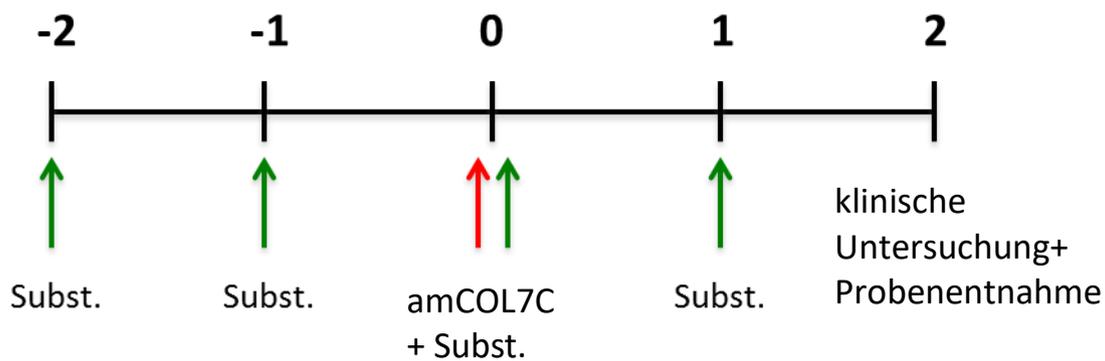


Abb. 6 Versuchsaufbau systemische Applikation. Abkürzungen: Subst., zu testende Substanz; amCOL7C, anti-murines-Typ-VII-Kollagen-IgG.

2.7.1.2 Topische Applikation der Inhibitoren

Der oben beschriebene prophylaktische, systemische Behandlungsansatz wurde für den topischen Behandlungsansatz leicht modifiziert (vgl. Abb. 7). Die Mäuse wurden nur einen Tag vor Injektion der 30 µg amCOL7C prophylaktisch mit dem in DAC Basiscreme gelösten Inhibitor behandelt. Die Applikation des Inhibitors erfolgte zweimal täglich. An Tag 3 und Tag 1 nach Injektion der Antikörper wurde anhand der klinischen Untersuchung der Schweregrad der experimentellen EBA festgestellt und die Ohrdicke bestimmt.

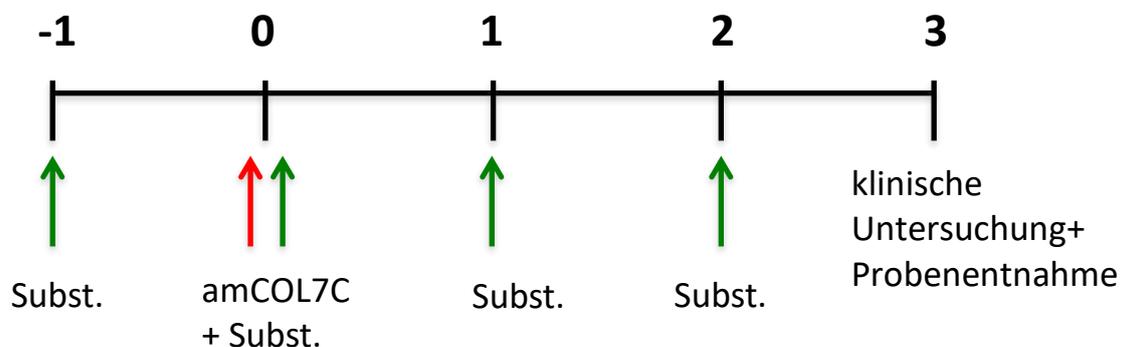


Abb. 7 Versuchsaufbau topische Applikation. Abkürzungen: Subst., zu testende Substanz; amCOL7C, anti-murines-Typ-VII-Kollagen-IgG.

2.8 Lösung der Substanzen

Alle fünf Substanzen wurden auf Dosisabhängigkeit systemisch und vier der fünf Substanzen als topische Applikation *in vivo* getestet.

2.8.1 Lösung der Substanzen für die systemische Applikation

Die Substanzen wurden jeweils in der höchsten Konzentration im entsprechenden Lösungsmittel gelöst (Stammlösung) und mit diesem weiter verdünnt, um drei bzw. zwei verschiedene Konzentrationen für die Testung der Dosisabhängigkeit zu erhalten. Die Kontrollgruppen erhielten das jeweilige Lösungsmittel der Stammlösung.

Propranolol HCl wurde zur Herstellung einer Stammlösung in einer Konzentration von 0,2 mg Propranolol HCl in 100 µL PBS gelöst. Nach Verdünnung der Stammlösung wurden die drei Lösungen steril filtriert und den Mäusen je nach Gruppenzugehörigkeit entweder 2 mg/kg KG, 4 mg/kg KG oder 8 mg/kg KG einmal täglich i.p. injiziert.

BX-795 wurde in einer Konzentration von 0,6 mg in 100 µL Lösungsmittel, bestehend aus 30 % PEG 400, 0,5 % Tween 80 und 5 % Propylene Glycol *ad* ddH₂O, gelöst. Je nach Gruppe wurden den Mäusen b.i.d. 7,5 mg/kg KG, 15 mg/kg KG oder 30 mg/kg KG der entsprechenden Verdünnung der Stammlösung oral mittels Spritzen-Fütterungsaufsatzes verabreicht.

Sotrastaurin wurde in einer Konzentration von 1 mg in 100 µL aus 2 % DMSO *ad* Maisöl gelöst. Den Mäusen wurden 15 mg/kg KG bzw. 30 mg/kg KG oder 60 mg/kg KG dreimal pro Tag oral verabreicht.

Die beiden folgenden Substanzen wurden direkt vom Hersteller Selleckchem® in der höchsten zu verabreichenden Konzentration gelöst. Die Verdünnung erfolgte mit dem entsprechenden Lösungsmittel.

PHA-665752 wurde in einer Konzentration von 0,5 mg in 100 µL Lösungsmittel bestehend aus 8 % DMSO, 5 % Tween80, 50 % PEG 300 *ad* ddH₂O gelöst. Es wurden einmal pro Tag 15 mg/kg KG bzw. 30 mg/kg KG oder 60 mg/kg KG i.p. injiziert.

NU7441 (KU-57788) wurde 0,1 mg in 100 µL aus 4 % DMSO, 5 % Tween80, 30 % PEG 300 *ad* ddH₂O gelöst. Den Mäusen wurden entweder 5 mg/kg KG oder 2,5 mg/kg KG zweimal pro Tag i.p. injiziert.

2.8.2 Lösung der Substanzen für die topische Applikation

Propranolol HCl wurde in Konzentrationen von 5 %, 2 % und 1 % in DAC Basiscreme von der Apotheke des UKSH Lübeck gelöst. Die Kontrollgruppe wurde mit DAC Basiscreme behandelt.

BX-795, **Sotrastaurin** und **PHA-665752** wurden zunächst in der höchstmöglichen Konzentration in DMSO gelöst und dann in einem Verhältnis von 1:1 in DAC Basiscreme eingearbeitet, sodass am Ende BX-795 zu 5 %, Sotrastaurin zu 4,35 % und PHA-665752 zu 6,4 % jeweils in DMSO und DAC Basiscreme vorlagen. Die Kontrollgruppe wurde mit DMSO in DAC einem Verhältnis von 1:1 behandelt.

Mit der Feinwaage wurden 10-20 mg der Cremes abgewogen. Je Ohr wurde diese Menge b.i.d. vorsichtig mit den Fingerspitzen aufgetragen.

2.9 Direkte Immunfluoreszenz

Das im Gewebe der Mausohren gebundene amCOL7C und der Komplementfaktor C3 wurden mit einer immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung simultan nachgewiesen (Sitaru et al. 2005).

Dazu wurden die 6 µm dicken, von Diana Scheppan (LIED) angefertigten Gefrierschnitte bei RT aufgetaut und zunächst mit einer Immunoblocklösung 30 min lang blockiert, um Hintergrundfärbungen zu minimieren. Nach dem Blockieren wurden die Objektträger in eine Feuchtkammer gelegt und die Schnitte mit dem primären Antikörper Goat IgG fraction to mouse C3 (8 µg/mL PBS) 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschschritten (einmal kurz und zweimal je 7,5 min in PBS) wurden die Schnitte simultan mit den sekundären Antikörpern Donkey IgG anti-goat IgG (H+L) und Donkey anti-rabbit IgG (H+L) FITC-conjugated AffiniPure (jeweils 15 µg/mL) für 1 h in der Feuchtkammer inkubiert. Nach drei weiteren wie oben beschriebenen Waschschritten wurden die Schnitte in der Feuchtkammer für 10 min mit DAPI (1 µg/mL PBS) inkubiert und anschließend erneut gewaschen (einmal kurz und zweimal 5 min in PBS). Die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Schnitte mit

Mowiol und Deckgläsern eingedeckt. Nach der mikroskopischen Auswertung am folgenden Tag wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert.

2.10 Statistik

Die Daten wurden mithilfe des *Shapiro-Wilk normality test* auf Normalverteilung getestet. Die statistische Analyse der normalverteilten Daten erfolgte mit dem *ONE-way Anova*. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde eine Einzelpunktdarstellung mit den Mittelwerten und den Standardabweichungen gewählt. In den *in vivo*-Versuchen waren die Daten mehrheitlich nicht normalverteilt. Die Prüfung der Signifikanz erfolgte hier mit dem *Kruskal Wallis Test* und dem *Two-way Anova*. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) und der Probenumfang (n) wurden im Ergebnisteil bzw. in den Abbildungen benannt und Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Die Prüfung der Signifikanz sowie die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 7.0 und Excel 2016.

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelle EBA – systemische Applikation der Inhibitoren

Alle Mäuse wurden zunächst prophylaktisch mit der zu testenden Substanz behandelt. Anschließend wurde eine experimentelle EBA induziert (vgl. 2.7.1), um am letzten Tag des Experimentes Proben für histologische Analysen zu entnehmen und die Klinik der verschiedenen Versuchsgruppen zu beurteilen.

3.1.1 Propranolol hemmt die Entzündung im lokalen Modell der EBA

Den Mäusen wurde je nach Gruppenzugehörigkeit jeweils einmal täglich 2 mg/kg KG, 4 mg/kg KG oder 8 mg/kg KG Propranolol i.p. injiziert. Die Kontrollgruppe wurde mit einer äquivalenten Menge des Lösungsmittels PBS behandelt. An Tag 0 wurde durch Injektion von amCOL7C in die Ohrbasis der Mäuse die experimentelle EBA induziert. An Tag 2 unterschied sich die Differenz der Ohrdicke zu Tag 0 in den vier Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander (vgl. Abb. 8a), allerdings wiesen die Tiere, die Propranolol in der höchsten Konzentration erhielten, an Tag 2 signifikant weniger klinische Symptome einer experimentellen EBA auf (** p=0,0013) (vgl. Abb. 8b). Im Versuchsverlauf verloren alle vier Gruppen an Gewicht, wobei sich der Gewichtsverlust zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant unterschied (vgl. Abb. 8c). Auf den Fotos ist zu erkennen, dass die Ohren der Kontrollgruppe (Abb. 8d) etwas stärker gerötet waren als die der mit Propranolol behandelten Gruppen (Abb. 8g). Auch in den H&E-gefärbten histologischen Schnitten stellt sich eine stärkere Krusten- und Spaltbildung an der DEJ und eine verdickte Epidermis in der Kontrollgruppe (Abb. 8e) im Vergleich zur Behandlung mit 8mg/kg KG Propranolol dar (Abb. 8h). Darüber hinaus sind bei der Kontrollgruppe mehr Leukozyteninfiltrate an der DEJ zu sehen als bei der mit Propranolol behandelten Gruppe. In einer Simultanfärbung konnten sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den mit Propranolol behandelten Gruppen amCOL7C (grün) wie auch die C3-Ablagerung (rot) in ähnlichem Maße an der DEJ nachgewiesen werden (vgl. Abb. 8f und i).

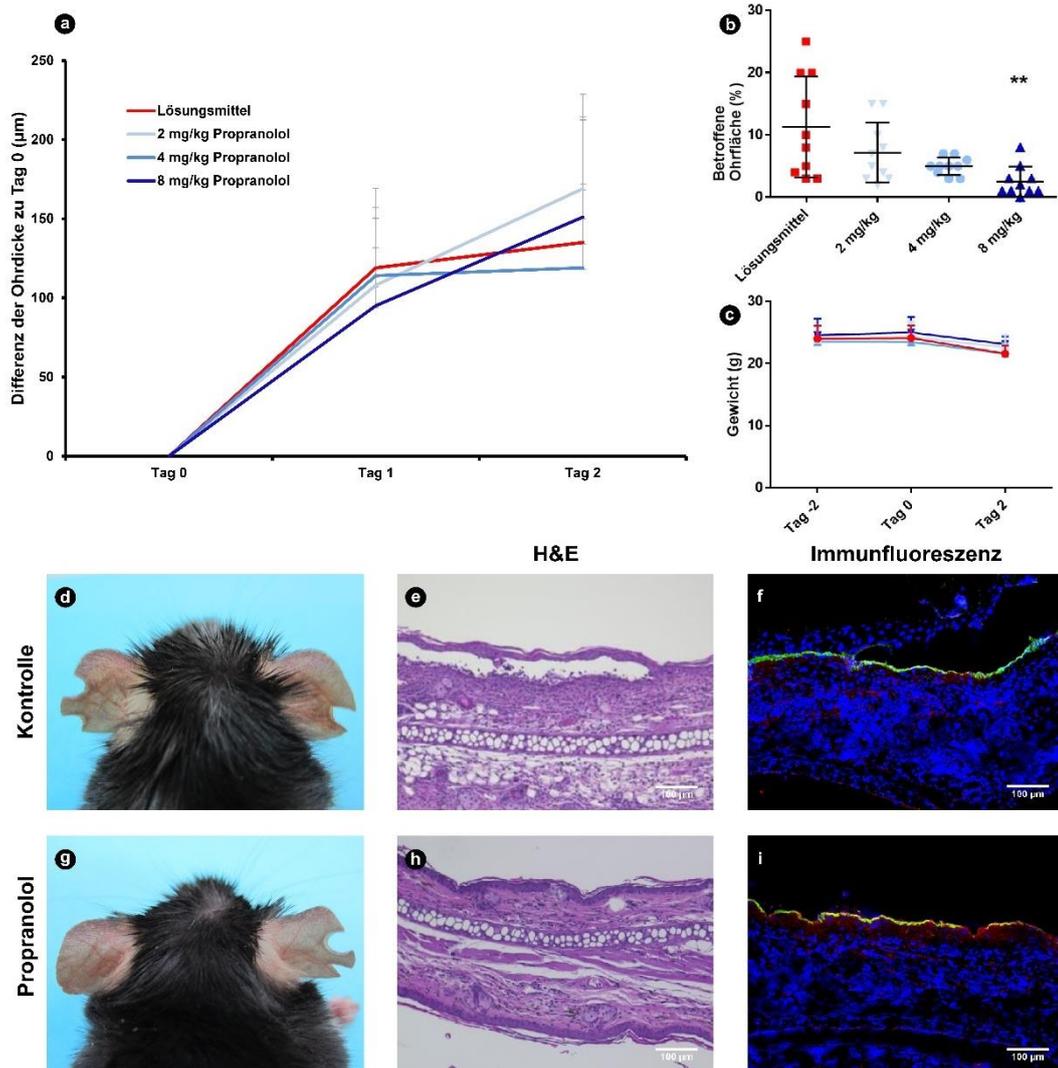


Abb. 8 Systemische Propranolol HCl-Gabe verbessert den klinischen Verlauf einer lokalen EBA. In C57BL/6J Tieren wurde durch Injektion von $30 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren eine lokale EBA induziert. (a) Eine zusätzliche Gabe von 2, 4 oder 8 mg/kg KG Propranolol hatte keinen Einfluss die Ohrdicke. (b) Die betroffene Ohrfläche wurde an Tag 2 nach Gabe von amCOL7C analysiert und zeigte ein verbessertes klinisches Bild für die Gabe von 8 mg/kg KG Propranolol. (c) Gewichtsverlauf der Tiere nach Gabe von amCOL7C und Propranolol. (d) Klinisches Bild (d und g), H&E-Färbung (e und h) und Immunfärbung (f und i) an Tag 2 nach amCOL7C-Injektion in die Ohrbasis und nach Behandlung mit PBS (obere Zeile) oder 8 mg/kg KG Propranolol (untere Zeile). Die Immunfärbung erfolgte mit einem anti-Kaninchen IgG (grün) und einem anti-Maus C3 Antikörper (rot). $n=5$, signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Kruskal Wallis Test ermittelt und als Stern dargestellt. Der Gewichtsverlust im Experiment in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe wurde mit einem Two-way Anova ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

** $p < 0,01$. Maßstabsbalken = $100 \mu\text{m}$

3.1.2 BX-795 reduziert im lokalen Modell der EBA die klinische Symptomatik

Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden den Mäusen an Tag -2 und Tag -1 b.i.d. oral mittels Spritzen-Fütterungsaufsatzes 7,5 mg/kg KG, 15 mg/kg KG, 30 mg/kg KG oder die dem KG entsprechende Menge des Lösungsmittels bestehend aus 30 % PEG 400, 0.5 % Tween 80 und 5 % Propylene Glycol *ad* ddH₂O verabreicht. Durch Injektion von amCOL7C in die Ohrbasis wurde an Tag 0 die experimentelle EBA induziert. Die Differenz der Ohrdicke zu Tag 0 unterschied sich zum Endzeitpunkt des Experimentes in der höchsten Konzentration signifikant zur Kontrollgruppe (***) $p=0,0002$) (vgl. Abb. 9a). Der prozentuale Anteil der klinisch betroffenen Ohrfläche der Gruppe der höchsten Konzentration unterschied sich am Tag 2 signifikant von dem der Kontrollgruppe (***) $p=0,0002$) (vgl. Abb. 9b). Alle Versuchsgruppen verloren im zeitlichen Verlauf des Experimentes an Gewicht, wobei der Gewichtsverlust der verschiedenen Gruppen sich nicht signifikant voneinander unterschied (vgl. Abb. 9c). Die Fotos zeigen, dass die Kontrolltiere im Vergleich zu den mit BX-795 behandelten Tieren eine deutlich stärkere Rötung der Ohren und vermehrt Krusten aufwiesen (vgl. Abb. 9d und g). Die wesentlich geringere Verdickung der Dermis der mit der Substanz behandelten Tiere ist in den H&E-gefärbten Präparaten deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 9e und h). Ferner ist zu sehen, dass im Gegensatz zu den Interventionsgruppen in der Kontrollgruppe die typische Spaltbildung und die Infiltration von Lymphozyten an der DEJ vorlagen. In allen vier Versuchsgruppen konnte die Ablagerung von C3-Komplement (rot) wie auch im Gewebe immobilisiertem amCOL7C an der DEJ durch direkte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9f und i).

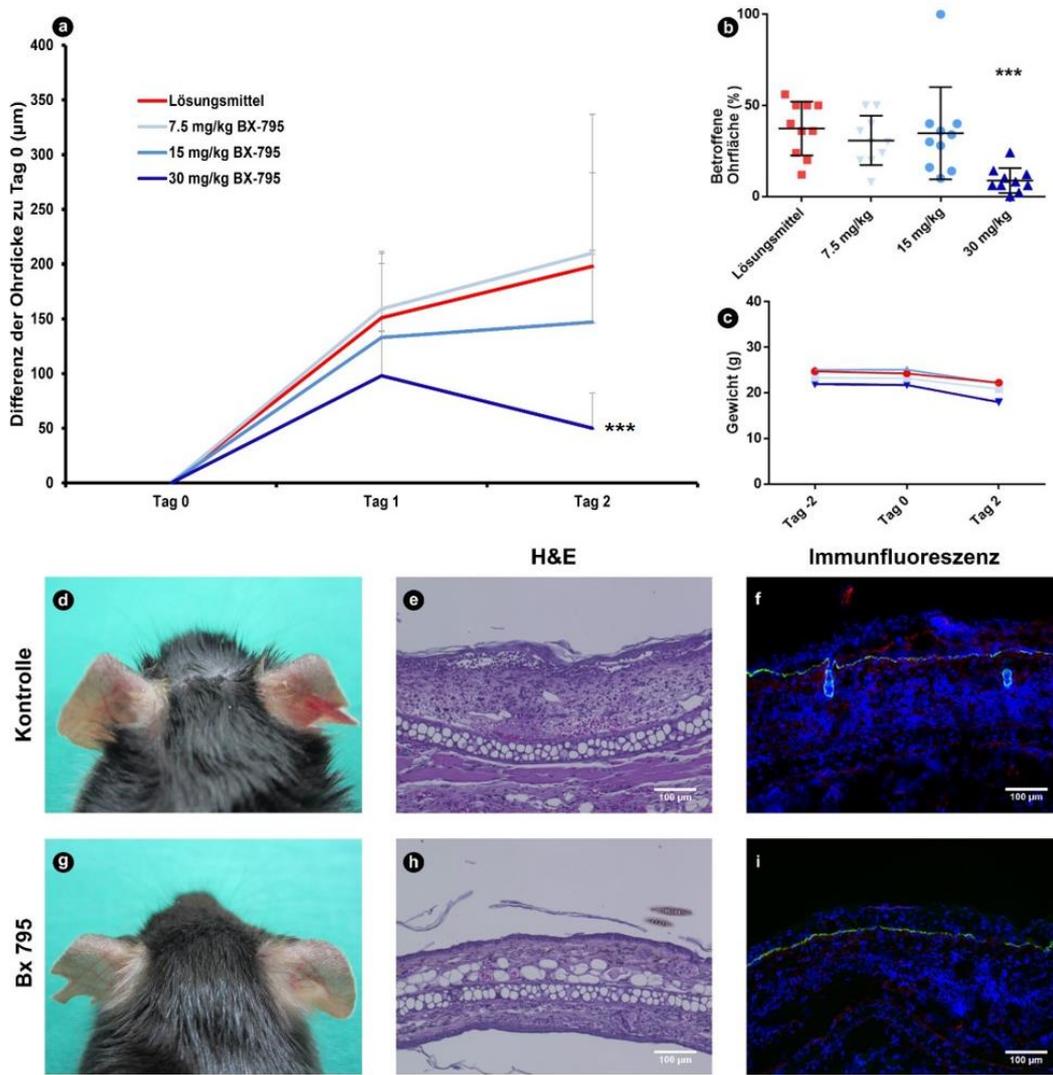


Abb. 9 Die klinische Symptomatik der lokalen EBA wird durch systemisch appliziertes BX-795 verbessert. Durch Injektion von $30\ \mu\text{g}/50\ \mu\text{L}$ amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren wurde in C57BL/6J Tieren eine lokale EBA induziert. (a) Die Gabe von $30\ \text{mg}/\text{kg}$ KG BX-795 konnte den Anstieg der Ohrdicke signifikant verringern. (b) Auch der prozentuale Anteil der betroffenen Ohrfläche war an Tag 2 nach Gabe von amCOL7C in dieser Versuchsgruppe geringer. (c) Gewichtsverlauf der Tiere nach Gabe von amCOL7C und BX-795. (d) Klinisches Bild (d und g), H&E-Färbung (e und h) und Immunfärbung (f und i) an Tag 2 nach amCOL7C-Injektion in die Ohrbasis und nach Behandlung mit 30 % PEG 400, 0,5 % Tween 80 und 5 % Propylene Glycol *ad* ddH₂O (obere Zeile) oder $30\ \text{mg}/\text{kg}$ KG BX-795 (untere Zeile). Die Immunfärbung erfolgte mit einem anti-Kaninchen IgG (grün) und einem anti-Maus C3 Antikörper (rot). $n=5$, signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Kruskal Wallis Test ermittelt und als Stern dargestellt. Der Gewichtsverlust im Experiment in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe wurde mit einem Two-way Anova ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. *** $p < 0,001$. Maßstabsbalken = $100\ \mu\text{m}$

3.1.3 Sotrastaurin verringert die klinische Ausprägung der EBA im lokalen Mausmodell

Den Mäusen wurden vor Induktion der experimentellen EBA durch Injektion von amCOL7C in die Ohrbasis prophylaktisch dreimal pro Tag oral 15 mg/kg KG bzw. 30 mg/kg KG, 60 mg/kg KG oder das Lösungsmittel 2 % DMSO *ad* Maisöl Lösungsmittel verabreicht. Während an Tag 1 jeweils signifikante Unterschiede in der Zunahme der Ohrdicke zwischen der Gruppe, die 30 mg/kg erhielt und der Kontrollgruppe (** $p=0,0052$) bzw. zwischen der Gruppe, die 60 mg/kg erhielt und der Kontrollgruppe (* $p=0,0335$) vorlagen, waren am Endpunkt des Experimentes keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu verzeichnen (vgl. Abb. 10a). In den Interventionsgruppen unterschied sich der prozentuale Anteil der Ohren, der von den für die lokale EBA typischen Symptomen betroffen war, nicht signifikant von der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 10b). Auch in diesem Versuch verloren alle Tiere an Gewicht, wobei der Gewichtsverlust nicht gruppenabhängig war (* $p=0,0130$) (vgl. Abb. 10c). Die Fotos zeigen, dass das Kontrolltier wesentlich stärker gerötete, verkrustete und geschwollene Ohren im Vergleich zum mit Sotrastaurin behandelten Tier aufwies (vgl. Abb. 10d und g). Im H&E-gefärbten Präparat ist in der Kontrollgruppe zwar keine Spaltbildung, aber eine saumartige Infiltration von Lymphozyten entlang der DEJ zu erkennen. Die Epidermis erscheint im Vergleich zur Interventionsgruppe stark verdickt (vgl. Abb. 10e und h). Mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz konnten in allen Gruppen amCOL7C (grün) und C3 Komplement (rot) entlang der DEJ detektiert werden (vgl. Abb. 10f und i).

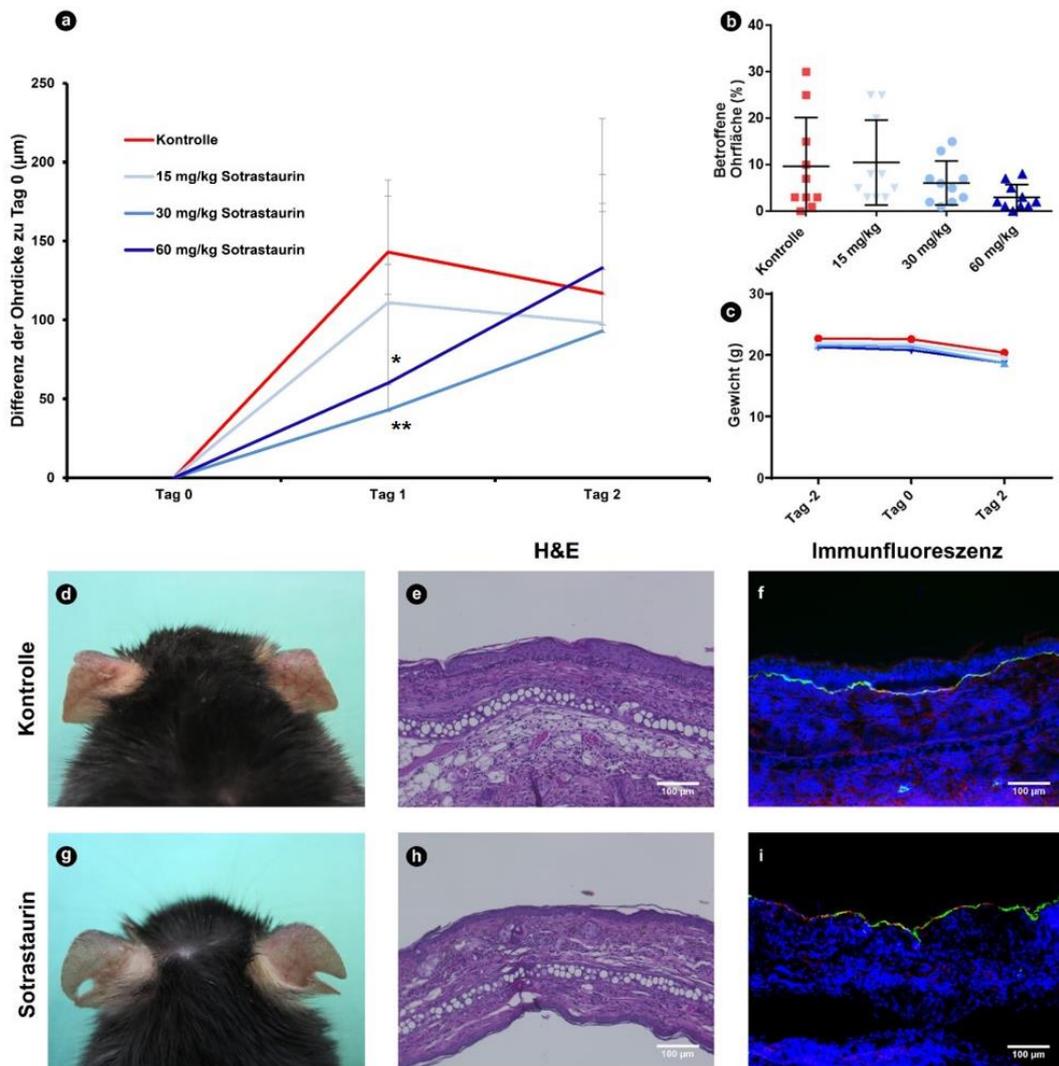


Abb. 10 Die orale Gabe von Sotrastaurin verbessert die klinische Symptomatik der lokalen EBA. In C57BL/6J Tieren wurde durch Injektion von $30 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren eine lokale EBA induziert. (a) Die zusätzliche orale Gabe von 30 mg/kg KG bzw. 60 mg/kg KG verringerte den Anstieg der Ohrdicke signifikant an Tag 1. (b) Es zeigte sich kein Unterschied im prozentualen Anteil der betroffenen Ohrfläche an Tag 2 nach Injektion von amCOL7C. (c) Gewichtsverlauf der Tiere nach Gabe von amCOL7C und Sotrastaurin. (d) Klinisches Bild (d und g), H&E-Färbung (e und h) und Immunfärbung (f und i) an Tag 2 nach amCOL7C Injektion in die Ohrbasis und nach Behandlung mit 2 % DMSO *ad* Maisöl (obere Zeile) oder 60 mg/kg KG Sotrastaurin (untere Zeile). Die Immunfärbung erfolgte mit einem anti-Kaninchen IgG (grün) und einem anti-Maus C3 Antikörper (rot). $n=5$, signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Kruskal Wallis Test ermittelt und als Stern dargestellt. Der Gewichtsverlust im Experiment in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe wurde mit einem Two-way Anova ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Maßstabsbalken = $100 \mu\text{m}$

3.1.4 Die Injektion von PHA-665752 verringert im lokalen Modell der EBA die klinische Symptomatik, führt jedoch zu erheblichem Gewichtsverlust

PHA-665752 wurde vom Hersteller in einer Konzentration von 0,5 mg in 100 µL aus 8 % DMSO, 5 % Tween80, 50 % PEG 300 *ad* ddH₂O gelöst. Pro Tag wurden einmalig 15 mg/kg KG, 30 mg/kg KG, 60 mg/kg KG oder die entsprechende Menge des Lösungsmittels i.p. injiziert. An Tag 2 konnte ein signifikanter Unterschied der von Krusten und Rötung betroffenen Ohrfläche zwischen der Gruppe, welche die höchste Konzentration von PHA-665752 erhielt und der Kontrollgruppe festgestellt werden (** p=0,0069) (vgl. Abb. 11b). Alle vier Gruppen verloren im Verlauf des Versuches stark an Gewicht (* p=0,0152), wobei der Gewichtsverlust nicht abhängig von der Konzentration der Substanz war (vgl. Abb. 11c). In der Gruppe, die 60 mg/kg KG PHA-665752 erhielt, musste eine Maus vorzeitig getötet werden, da sie im Versuchsverlauf stark an Gewicht verloren hatte und sich auffallend lethargisch verhielt. Auf dem Foto der Maus, die zur Kontrollgruppe gehörte, ist ein stark gerötetes rechtes Ohr zu sehen. Im Vergleich dazu erscheinen die Ohren der Maus, die mit der Substanz behandelt wurde, weniger von den Symptomen der lokalen EBA betroffen (vgl. Abb. 11d und g). Im H&E-gefärbten Präparat der Kontrollgruppe ist die typische Spaltbildung entlang der DEJ zu sehen. Sowohl in der Interventions- als auch in der Kontrollgruppe ist eine Verdickung der Epidermis zu erkennen (vgl. Abb. 11e und h). Die grün bzw. rot fluoreszierenden Ablagerungen entlang der DEJ zeigen sowohl die Bindung des injizierten Antikörpers gegen mCOL7C wie auch die anschließende Aktivierung des Komplementsystems durch die immobilisierten Immunkomplexe aus mCOL7C und amCOL7C (vgl. Abb. 11 f und i).

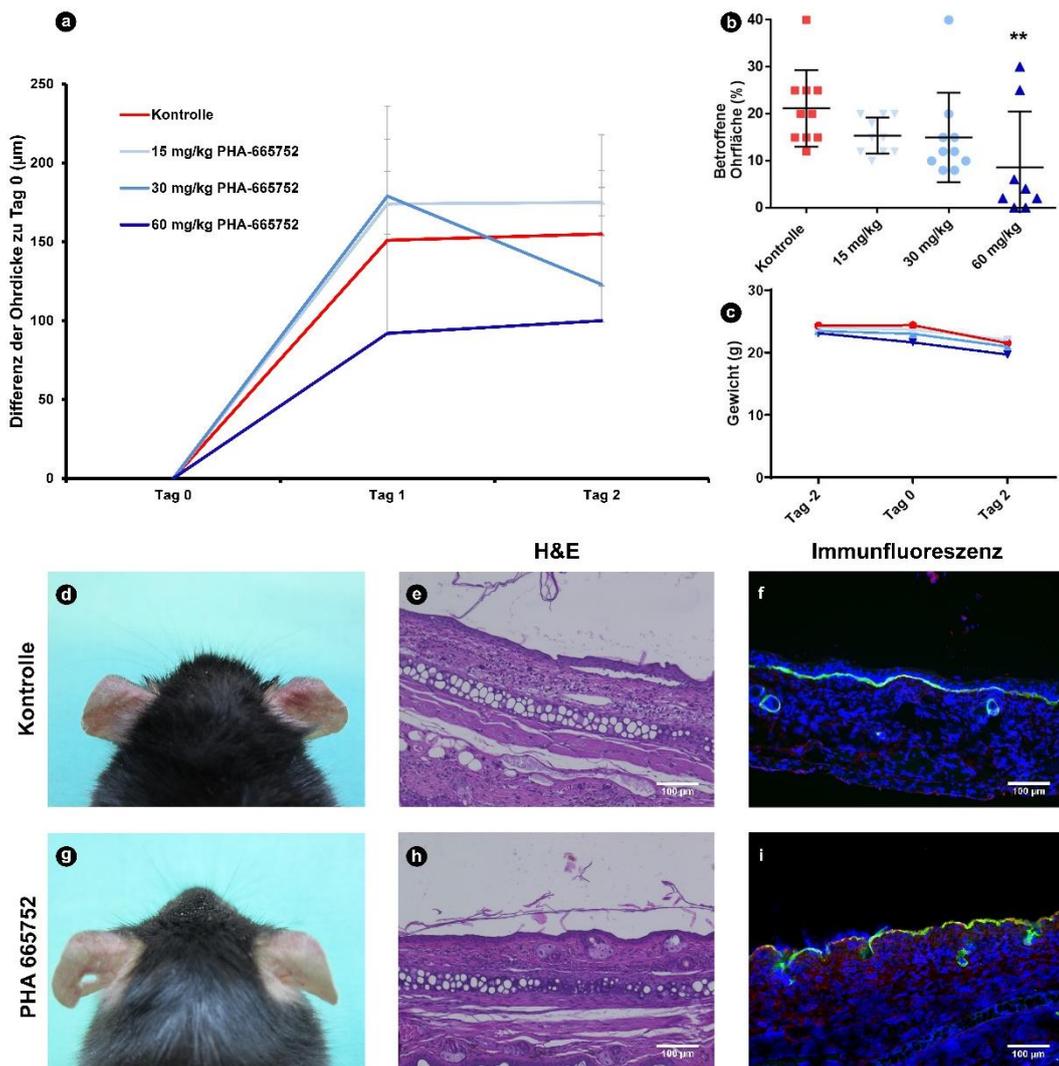


Abb. 11 Systemische Gabe von PHA-665752 verbessert den klinischen Verlauf einer lokalen EBA. Durch Injektion von $30 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren wurden in C57BL/6J Tieren eine lokale EBA induziert. (a) Eine zusätzliche Gabe von 15 mg/kg KG, 30 mg/kg KG, 60 mg/kg KG PHA-665752 hatte keinen Einfluss auf den Anstieg der Ohrdicke. (b) Die betroffene Ohrfläche wurde an Tag 2 nach Gabe von amCOL7C analysiert und zeigte ein verbessertes klinisches Bild für die Gabe von 60 mg/kg KG PHA-665752. (c) Gewichtsverlauf der Tiere nach Gabe von amCOL7C und PHA-665752. (d) Klinisches Bild (d und g), H&E Färbung (e und h) und Immunfärbung (f und i) an Tag 2 nach amCOL7C Injektion in die Ohrbasis und nach Behandlung mit 8 % DMSO, 5 % Tween80, 50 % PEG 300 *ad* ddH₂O (obere Zeile) oder PHA-665752 (untere Zeile). Die Immunfärbung erfolgte mit einem anti-Kaninchen IgG (grün) und einem anti-Maus C3 Antikörper (rot). $n=5$, in der Gruppe, die 60 mg/kg KG erhielt $n=4$, signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Kruskal Wallis Test ermittelt und als Stern dargestellt. Der Gewichtsverlust im Experiment in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe wurde mit einem Two-way Anova ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. $** p < 0,01$. Maßstabsbalken = $100 \mu\text{m}$

3.1.5 NU 7441 hemmt in beiden getesteten Konzentrationen die Entzündung im lokalen Modell der EBA

An Tag 0 wurde die experimentelle EBA durch Injektion von amCOL7C in die Ohrbasis der Mäuse injiziert. NU7441 (KU-57788) wurde 0,1 mg in 100 µL aus 4 % DMSO, 5 % Tween80, 30 % PEG 300 *ad* ddH₂O vom Anbieter gelöst. Den Mäusen wurden je nach Gruppenzugehörigkeit prophylaktisch an Tag -2 und Tag 1 entweder 5 mg/kg KG, 2,5 mg/kg KG oder die dem Körpergewicht entsprechende Menge des Lösungsmittels zweimal täglich i.p. injiziert. Die prozentual mit klinischen Symptomen betroffene Ohroberfläche unterschied sich an Tag 2 in beiden Behandlungsgruppen signifikant zur Kontrollgruppe (***p*=0,0001, *****p* < 0,00001) (vgl. Abb. 12b). In keiner der drei Gruppen zeigte sich ein signifikanter Gewichtsverlust (vgl. Abb. 12c). Auf dem Foto einer Kontrollmaus ist auf dem linken Ohr eine Läsion zu sehen (vgl. Abb. 12d). Im histologischen Schnitt ist in der Kontrollgruppe eine Infiltration von Lymphozyten zu erkennen (vgl. Abb. 12e). Die Dicke der Epidermis unterscheidet sich auf den beiden abgebildeten Präparaten nicht voneinander (vgl. Abb. 12e und h). Mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz und der simultanen Färbung von amCOL7C (grün) und C3 Komplement (rot) konnte sowohl die Bindung des injizierten Antikörpers gegen mCOL7C wie auch die anschließende Aktivierung des Komplementsystems nachgewiesen werden (vgl. Abb. 12f und i).

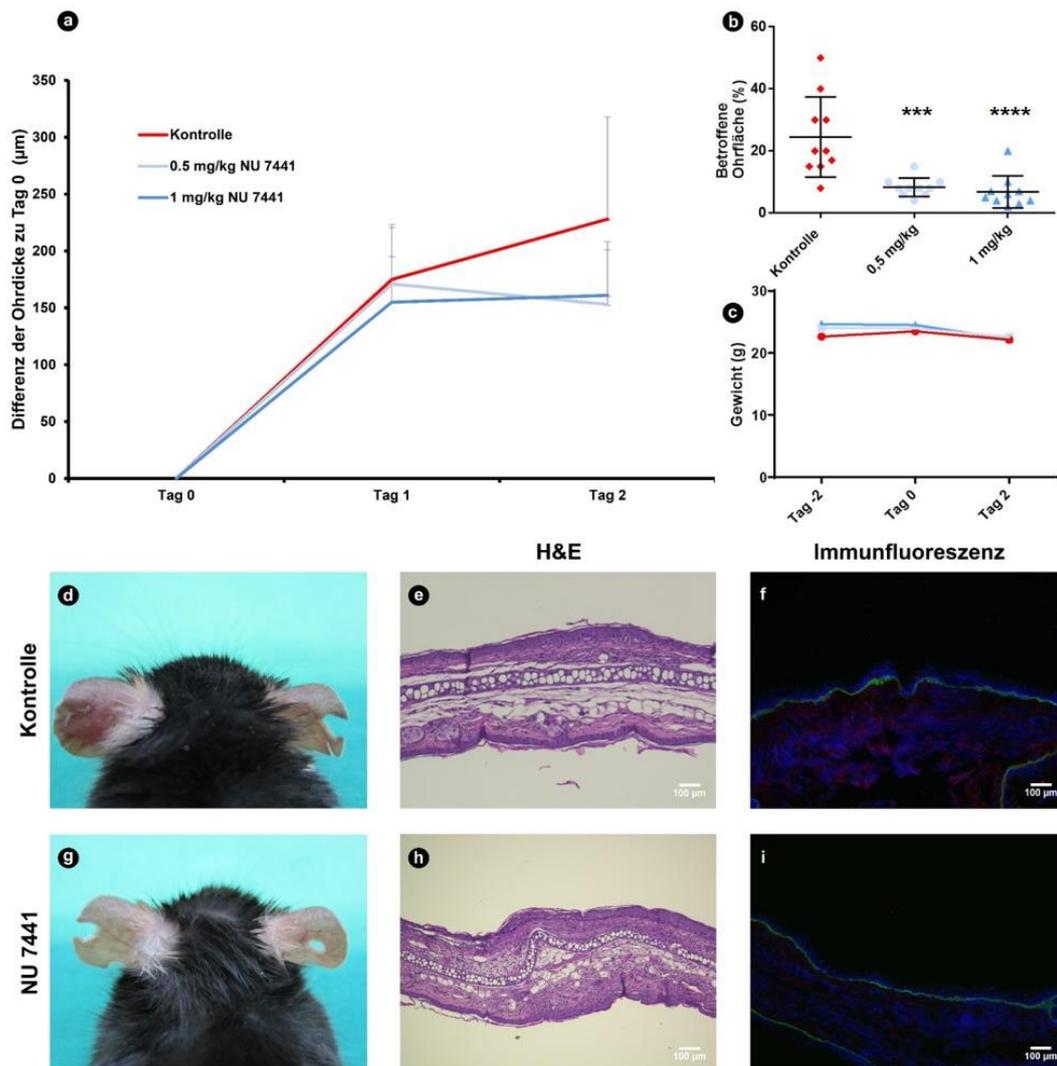


Abb. 12 Der klinische Verlauf einer lokalen EBA wird durch systemische Gabe von NU 7441 verbessert. In C57BL/6J Tieren wurde durch Injektion von 30 µg/50 µL amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren eine lokale EBA induziert. (a) Eine zusätzliche Gabe von 5 mg/kg KG, 2,5 mg/kg KG NU 7441 hatte keinen Einfluss auf den Anstieg der Ohrdicke. (b) Die betroffene Ohrfläche wurde an Tag 2 nach Gabe von amCOL7C analysiert und zeigte ein verbessertes klinisches Bild für beide getesteten Konzentrationen. (c) Gewichtsverlauf der Tiere nach Gabe von amCOL7C und NU 7441. (d) Klinisches Bild (d und g), H&E-Färbung (e und h) und Immunfärbung (f und i) an Tag 2 nach amCOL7C Injektion in die Ohrbasis und nach Behandlung mit 4 % DMSO, 5 % Tween80, 30 % PEG 300 *ad* ddH₂O (obere Zeile) oder 5 mg/kg KG NU 7441 (untere Zeile). Die Immunfärbung erfolgte mit einem anti-Kaninchen IgG (grün) und einem anti-Maus C3 Antikörper (rot). n=5, signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Kruskal Wallis Test ermittelt und als Stern dargestellt. Der Gewichtsverlust im Experiment in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe wurde mit einem Two-way Anova ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. *** p < 0,001; **** p < 0,00001. Maßstabsbalken = 100 µm

3.2 Experimentelle EBA – topische Applikation der Inhibitoren

Die Tiere wurden zunächst prophylaktisch mit der in DAC Basiscreme gelösten Substanz behandelt. Durch Injektion von 30 µg/50 µL amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren wurde eine lokale EBA induziert (vgl. 2.7.1), um an Tag 3 nach der Injektion den klinischen *Score* zu erheben und Proben für histologische Analysen zu entnehmen.

3.2.1 Topisch appliziertes Propranolol verringert in allen getesteten Konzentrationen die lokale EBA

Von der Apotheke des UKSH Lübeck wurde Propranolol in Konzentrationen von 1 %, 2 % und 5 % in DAC Basiscreme gelöst und mir zur Verfügung gestellt. Die Kontrollgruppe wurde mit DAC Basiscreme ohne den Wirkstoff Propranolol behandelt. An Tag 0 wurde in allen Versuchstieren durch Injektion von amCOL7C in die Ohrbasis die experimentelle EBA induziert. Abb. 13a ist zu entnehmen, dass im Vergleich zu Tag 0 die Graphen zur Zunahme der Ohrdicke aller drei Behandlungsgruppen deutlich unter dem Niveau der Kontrollgruppe verlaufen. An Tag 2 unterschieden sich die Gruppen, die mit 2 % bzw. mit 5 % Propranolol behandelt wurden, signifikant von der Kontrollgruppe (* p=0,0144; * p=0,0177). Am letzten Tag des Experimentes ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe, die 2 % erhielt und der Kontrollgruppe (** p=0,0035) sowie zwischen der mit Propranolol 1 % behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe (* p=0,0163) vorhanden. Die mit Propranolol 5 % behandelte Gruppe unterschied sich an Tag 3 nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 13a). An Tag 2 waren, den klinischen Ausprägungsgrad der experimentellen EBA betreffend, signifikante Unterschiede zwischen allen drei Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen (vgl. Abb. 13b) (1 % ** p=0,0054, 2 % ** p=0,0070, 5 % * p=0,0470). Auch an Tag 3 war zwischen der Gruppe, die 2 % erhielt, und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied vorhanden (vgl. Abb. 13c) (**p=0,0089). Das Gewicht der Mäuse blieb im Verlauf des Experimentes in allen vier Gruppen nahezu konstant (vgl. Abb. 13d). Beim Vergleich der Fotos ist deutlich zu erkennen, dass die Maus der Kontrollgruppe (Abb. 13e) gegenüber den Mäusen der Behandlungsgruppen (Abb. 13f-g) stärker gerötete Ohren hatte. Darüber hinaus erscheinen die Ohren der Kontrollmaus auf dem Foto etwas dicker.

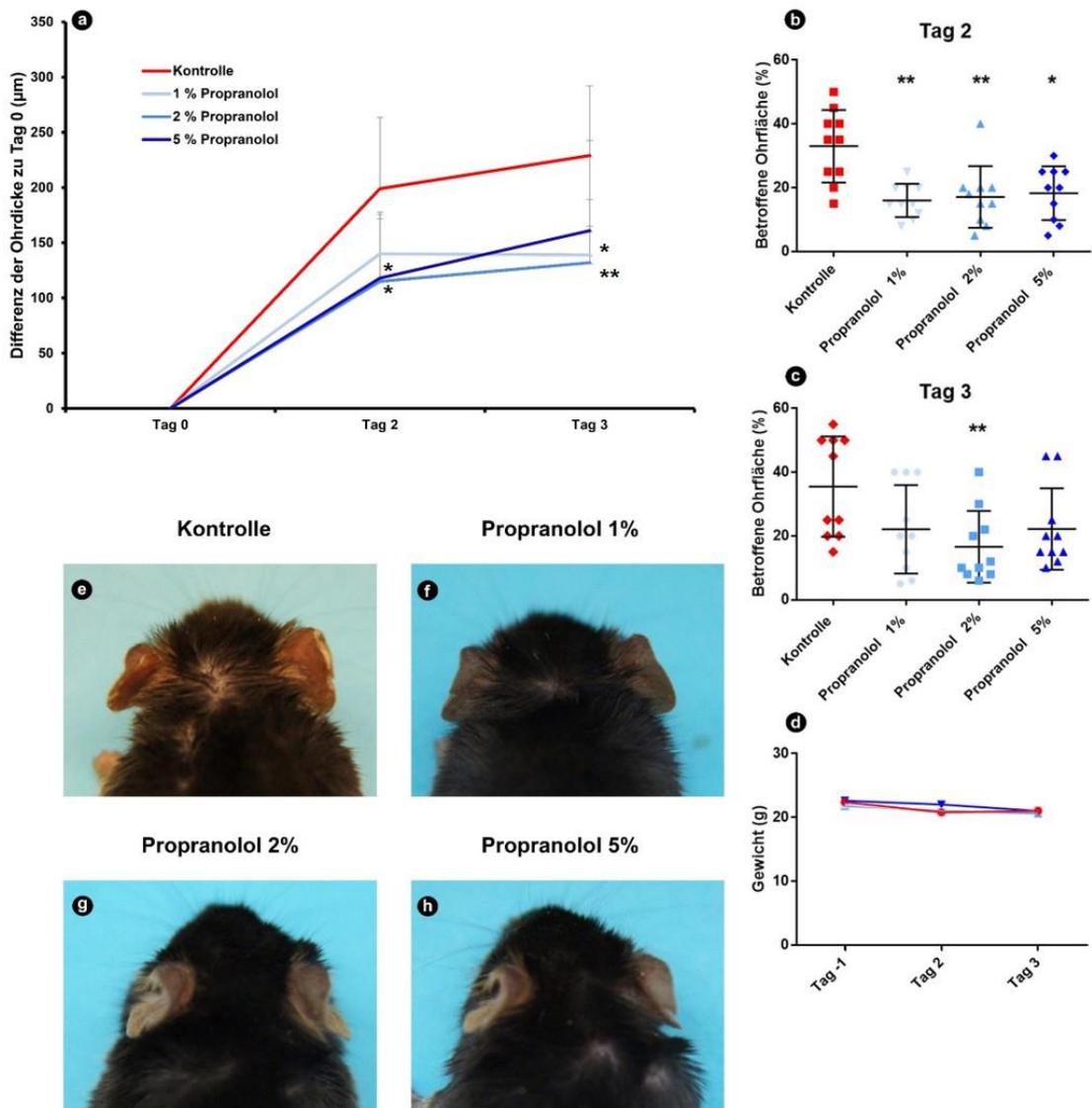


Abb. 13 Die klinische Symptomatik der lokalen EBA wird durch topisch appliziertes Propranolol verbessert. Durch Injektion von 30 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren wurden in C57BL/6J Tieren eine lokale EBA induziert. (a) Propranolol in DAC Basiscreme konnte die Zunahme der Ohrdicke signifikant verringern. (b) Die betroffene Ohrfläche wurde an Tag 2 nach Gabe von amCOL7C erhoben und zeigte ein verbessertes klinisches Bild für alle drei getesteten Konzentrationen von Propranolol. (c) An Tag 3 zeigte sich für Propranolol 2 % eine Reduktion der klinischen Symptomatik. (d) Gewichtsverlauf der Tiere nach Gabe von amCOL7C und topischer Behandlung mit Propranolol bzw. DAC Basiscreme. (e) Klinisches Bild an Tag 3 nach amCOL7C-Injektion in die Ohrbasis und nach Behandlung mit DAC Basiscreme (e) und Propranolol (f-h). $n=5$, signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Kruskal Wallis Test ermittelt und als Stern dargestellt. Der Gewichtsverlust im Experiment in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe wurde mit einem Two-way Anova ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.2 Topisch appliziertes PHA-665752 reduziert die klinische Symptomatik der lokalen EBA

Je nach Gruppe wurden den Mäusen zweimal täglich pro Ohr jeweils 10-20 mg von BX-795 5 %, Sotrastaurin 4,35 %, PHA-665752 6,4 % oder die Trägersubstanz (DAC Basiscreme und DMSO) topisch appliziert. An Tag 0 wurde amCOL7C in die Ohrbasis injiziert, um eine experimentelle EBA zu induzieren. Sowohl Sotrastaurin als auch PHA-665752 sind stark färbende Substanzen, welche die klinische Untersuchung der Mäuse und insbesondere die Beurteilung der mit Rötungen betroffenen Ohrfläche erschwerten. Signifikante Ergebnisse bezüglich der Differenz der Ohrdicke im Vergleich zu Tag 0 und der Beurteilung der Ohrfläche, waren nur für die Substanz PHA-665752 zu verzeichnen. Sowohl die Ohrdicke als auch die von Symptomen der experimentellen EBA betroffene Ohrfläche unterschied sich an Tag 3 signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ohrdicke * $p=0,0499$; Ohrfläche ** $p=0,0023$) (vgl. Abb. 14a und c). Der Gewichtsverlauf war in allen vier Gruppen im Verlauf des Experimentes nahezu konstant und unterschied sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Gruppen (vgl. Abb. 14d). Auf den Fotos ist zu sehen, dass Sotrastaurin die Ohren orange (Abb. 14g) und PHA-665752 (Abb. 14h) sie leicht gelb färbte. Mäuse, die mit der farblosen Substanz BX-795 bzw. der Trägersubstanz DAC Basiscreme behandelt wurden, hatten keine gefärbten Ohren (vgl. Abb. 14 e und f).

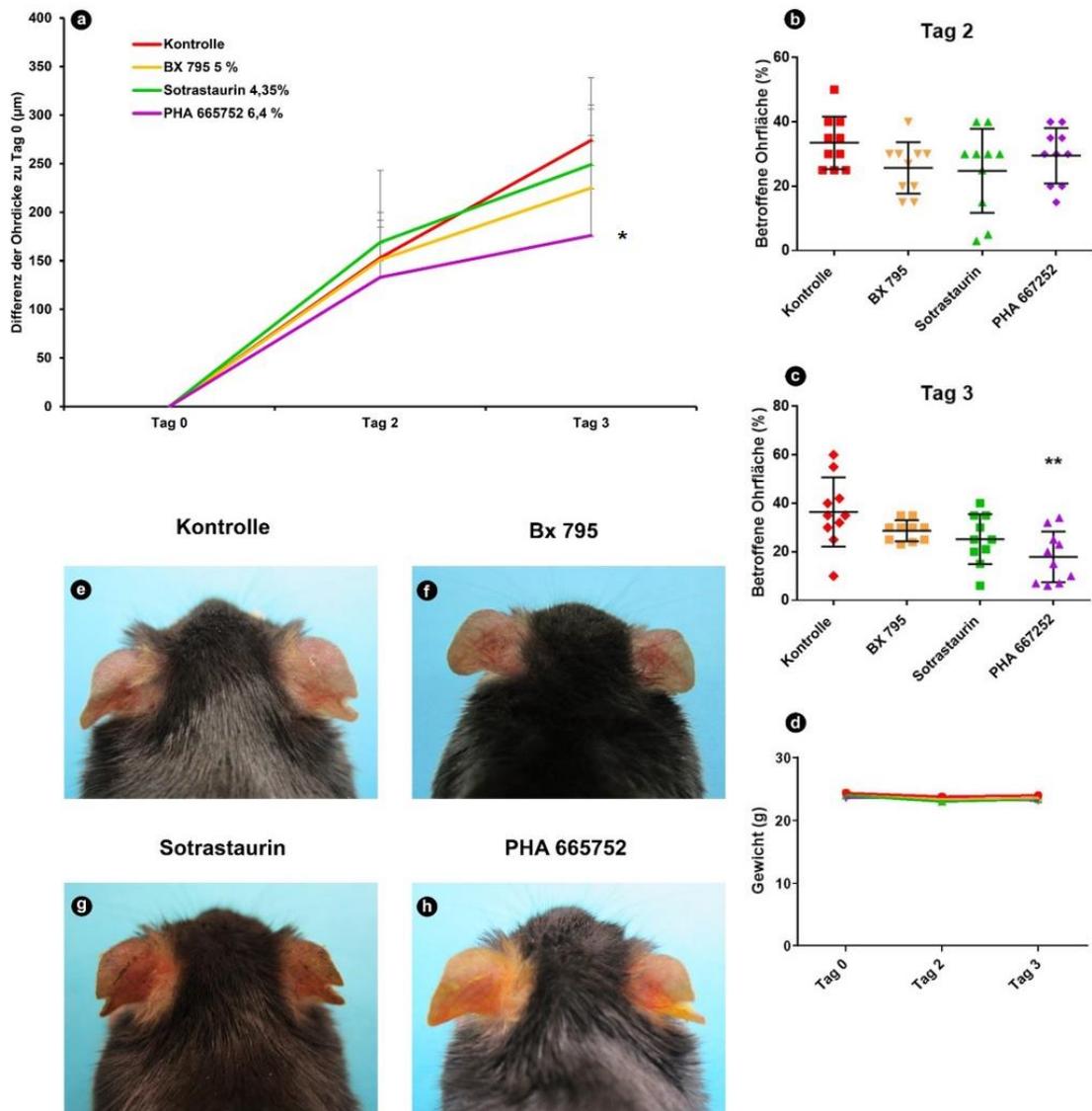


Abb. 14 PHA-665752 6,4 % verringert die klinische Symptomatik der lokalen EBA. In C57BL/6J Tieren wurde durch Injektion von 30 µg/50 µL amCOL7C in die Ohrbasis beider Ohren eine lokale EBA induziert. (a) PHA-665752 6,4 % in DAC Basiscreme und DMSO konnte die Zunahme der Ohrdicke signifikant verringern. (b) An Tag 2 nach Gabe von amCOL7C wurde die betroffene Ohrfläche erhoben. Es zeigte sich kein verbessertes klinisches Bild für alle drei getesteten Substanzen. (c) An Tag 3 zeigte sich für PHA-665752 6,4 % eine Reduktion der klinischen Symptomatik (d) Gewichtsverlauf der Tiere nach Gabe von amCOL7C und topischer Behandlung mit BX-795 5 %, Sotrastaurin 4,35 % oder PHA-665752 6,4% bzw. DAC Basiscreme und DMSO. (e) Klinisches Bild an Tag 3 nach amCOL7C Injektion in die Ohrbasis und nach Behandlung mit DAC Basiscreme und DMSO (e), BX-795 5 % (f), Sotrastaurin 4,35 % (g) oder PHA-665752 6,4% (h). n=5, signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt mithilfe des Kruskal Wallis Test ermittelt und als Stern dargestellt. Der Gewichtsverlust im Experiment in Abhängigkeit zur Versuchsgruppe wurde mit einem Two-way Anova ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.3 Genexpressionsanalyse des Effekts von Propranolol auf IC-stimulierte neutrophile Granulozyten

Propranolol konnte sowohl systemisch wie auch topisch appliziert die lokale EBA reduzieren. Zum Verständnis des Wirkmechanismus in der blasenbildenden Autoimmunerkrankung sollte daher eine tiefere Analyse erfolgen, indem die Haupteffektorzellen der EBA, neutrophile Granulozyten, mit ICs stimuliert und anschließend für 4 h mit Propranolol inkubiert wurden, um anschließend mittels *RNA Sequencing* die Genexpression zu untersuchen. Zuvor konnte in der Arbeit von Katharina Schulze Dieckhoff bereits gezeigt werden, dass Propranolol *in vitro* einen hemmenden Effekt auf IC-aktivierte neutrophile Granulozyten hat und die Freisetzung von ROS hemmt. Um die im *RNA Sequencing* zu testenden Zellen gesunder Spender*innen auf ihre Viabilität und Aktivierung zu kontrollieren, wurden daher der *ROS Release Assay* und FACS-Analysen durchgeführt, bevor ihre RNA zur Analyse der Genexpression extrahiert wurde.

3.3.1 Kontrolle der Effekte von Propranolol – neutrophile Granulozyten werden durch Immunkomplexe aktiviert und die ROS-Freisetzung durch Propranolol gehemmt

Die hemmende Wirkung von Propranolol auf die Freisetzung von ROS in Neutrophilen war bereits bekannt (vgl. 1.2.7), weshalb der *ROS Release Assay* im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich dazu diente, die für das *RNA-Sequencing* isolierten neutrophilen Granulozyten auf ihre Aktivierung durch Immunkomplexe zu überprüfen. Um die Aktivität der stimulierten Neutrophilen zu bestimmen, wurde im *ROS Release Assay in vitro* die relative Menge der freigesetzten ROS bestimmt. Hierzu wurden die wie in 2.2 beschrieben isolierten neutrophilen Granulozyten von drei verschiedenen, gesunden Blutspender*innen mit ICs aus humanem Typ VII Kollagen (hCOL7) und anti-humanem-Typ-VII-Kollagen-IgG (anti-hCOL7) stimuliert. Als Negativkontrollen dienten ausschließlich mit Antigen, bzw. mit Antikörpern inkubierte neutrophile Granulozyten. Um eine Positivkontrolle zu erhalten, wurden neutrophile Granulozyten mit Immunkomplexen ohne Propranolol und nur mit dem Lösungsmittel PBS inkubiert. Erwartungsgemäß hemmte Propranolol in einer Konzentration von 10 μ M die Freisetzung von ROS signifikant (* $p=0,0178$).

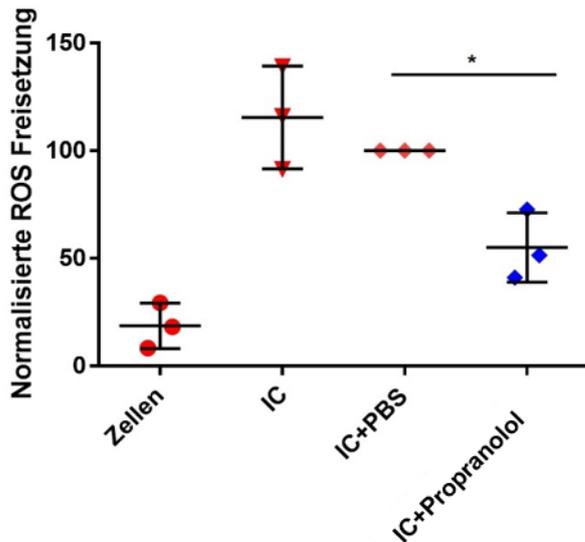


Abb. 15 Propranolol 10 μ M hemmt die ROS-Freisetzung stimulierter neutrophiler Granulozyten. Neutrophile Granulozyten wurden mittels *MACSexpress® Neutrophil Isolation Kit human* von Miltenyi Biotec aus antikoaguliertem Vollblut gesunder Spender*innen isoliert mit ICs aus humanem Typ VII Kollagen (hCOL7) und anti-humanem-Typ-VII-Kollagen-IgG (anti-hCOL7) der Subklassen IgG4 (Ansatz 1) und IgG1 (Ansätze 2 und 3) stimuliert und mit oder ohne Propranolol inkubiert (vgl. 2.2). Im *ROS Release Assay* wurden die Zellen auf die detektierte Menge freigesetzter ROS hin untersucht. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte bei 37 °C für etwa 120 min. Die Freisetzung von ROS wurde durch Berechnung der *area under the curve* (AUC) quantifiziert und die Normalisierung erfolgte anhand des Ansatzes, in dem sich ICs und PBS befanden. Zu sehen sind die prozentualen Anteile detektierter ROS aus IC-stimulierten neutrophilen Granulozyten, die mit 10 μ M Propranolol inkubiert wurden, im Verhältnis zur Positivkontrolle (IC+PBS). Die Einzelpunkt-darstellung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des One-way Anova und dem Dunnet's Post-Test (* = $p < 0,05$). $n=3$

3.3.2 Propranolol hat keinen Effekt auf die Zellvitalität und die Zellaktivierung von neutrophilen Granulozyten

Um auszuschließen, dass die verringerte ROS-Produktion (vgl. 3.3) von mit Propranolol inkubierten neutrophilen Granulozyten auf einen zytotoxischen Effekt der Substanz zurückzuführen ist, wurden die Zellen nach der in 2.3.1 beschriebenen Färbung mit FITC Annexin (apoptotische Zellen) und Zombie NIR (nekrotische Zellen) durch Durchflusszytometrie detektiert. In Abb. 16a (Zellvitalität) ist der prozentuale Anteil der lebenden Zellen (FITC Annexin- und Zombie NIR-negative Zellen) an der gesamten gemessenen Zellpopulation zu sehen. Es war kein signifikanter Unterschied der Zellvitalität zwischen den Zellen, die für 4 h mit Propranolol inkubiert wurden (IC+Propranolol), und der Positivkontrolle (IC+PBS) festzustellen.

Um einen Effekt von Propranolol auf die Zellaktivierung durch ICs auszuschließen, wurden die neutrophilen Granulozyten mit anti-humanen CD62L- und CD66b-Antikörpern gefärbt

(vgl. 2.3.2). Aktivierte Zellen stellten sich CD62L-negativ und CD66b-positiv dar. Abb. 16b (Zellaktivität) zeigt den prozentualen Anteil aktivierter Zellen an allen detektierten Zellen. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Propranolol inkubierten Zellen und der Positivkontrolle vor. Da die neutrophilen Granulozyten durch ICs aktiviert wurden, unterschied sich die Aktivität der unbehandelte Zellen erwartungsgemäß signifikant von allen Gruppen, die mit ICs stimuliert wurden (Zellen vs. IC ** $p=0,0079$; Zellen vs. IC+PBS ** $p=0,0042$; Zellen vs. IC+Propranolol ** $p=0,0042$).

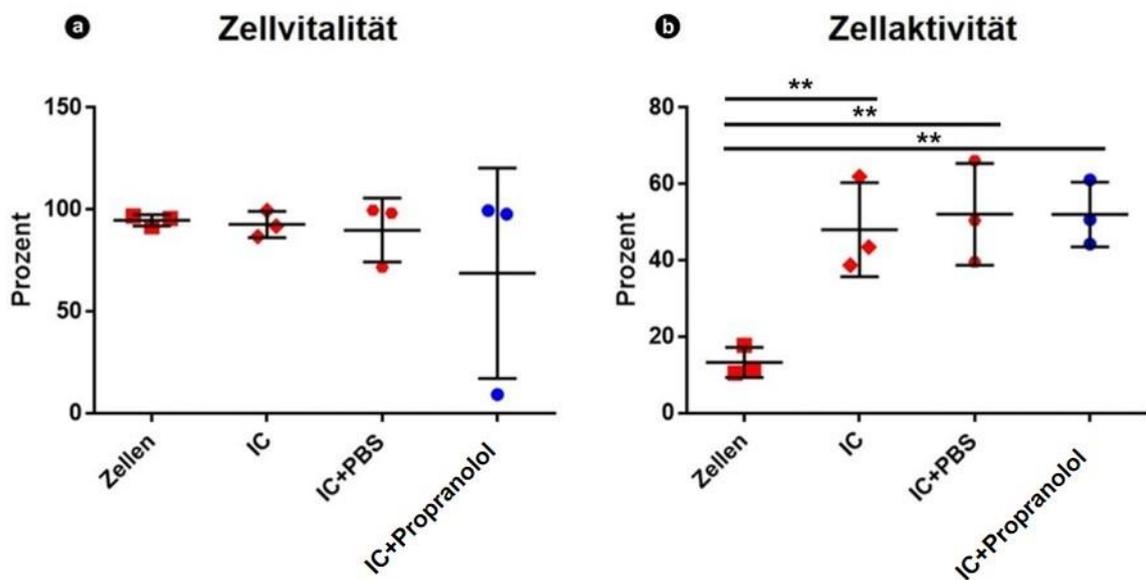


Abb. 16 Propranolol zeigt keinen signifikanten Einfluss auf Zellvitalität und Zellaktivität IC-stimulierter neutrophiler Granulozyten. Neutrophile Granulozyten wurden aus humanem Vollblut gesunder Spender*innen isoliert, mit ICs aus humanem Typ VII Kollagen (hCOL7) und anti-humanem-Typ-VII-Kollagen-IgG (anti-hCOL7) der Subklassen IgG4 (Ansatz 1) und IgG1 (Ansätze 2 und 3), für 4 h mit Propranolol 10 μ M inkubiert und anschließend gefärbt, um mittels Durchflusszytometrie Aufschlüsse über die (a) Zellvitalität (Anteil FITC Annexin- und Zombie NIR-negative Zellen) und die (b) Zellaktivität (Anteil CD62L-negativer und CD66b-positiver Zellen) zu erhalten. Die Einzelpunktdarstellungen zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des One-way Anova und dem Dunnet's Post-Test und im Falle nicht normal verteilter Daten mit dem Kruskal Wallis Test in Sigma Plot. (** $p < 0,01$). $n=3$

3.3.3 Genexpressionsanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Propranolol auf IC-stimulierte neutrophile Granulozyten

Propranolol hemmt die ROS-Freisetzung IC-aktiverter neutrophiler Granulozyten der oben beschriebenen Spender*innen (vgl. 3.3.1). Diese Zellen wurden für 4 h mit Propranolol 10 μ M oder PBS (Positivkontrolle) inkubiert. Die Negativkontrolle bestand aus nicht stimulierten neutrophilen Granulozyten der gleichen Spender*innen. Die Gesamt-RNA aller drei Ansätze wurde isoliert und die Qualität und Quantität der RNA durch Spektrometrie

geprüft. Sowohl quantitativ als auch qualitativ genügte die isolierte RNA in allen Proben den Anforderungen der weiteren Verarbeitung: Die Konzentration der RNA betrug in allen Proben $> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Die Sequenzierung wurde vom Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie in Plön von Dr. Sven Künzel durchgeführt und die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der Hilfe von Yask Gupta (LIED), Universität zu Lübeck.

Die Genexpressionsmuster der mit Propranolol inkubierten Zellen wurden mit der Positivkontrolle verglichen, um Informationen über den molekularen Wirkmechanismus von Propranolol auf IC-stimulierte neutrophile Granulozyten zu erhalten. Beim Vergleich mit dem Genexpressionsmuster stimulierter, aber nicht mit Propranolol behandelter Zellen konnten 168 Gene identifiziert werden, die stark invers exprimiert waren. Diese 168 invers exprimierten Gene sind der Tabelle A1 im Anhang zu entnehmen. Mit Hilfe des webbasierten Programms Enrichr (Kuleshov et al. 2016) und auf Basis der KEGG Datenbank (Ogata et al. 1999) und der Jensen DISEASES Datenbank (Pletscher-Frankild et al. 2015) konnten Grafiken erstellt werden, die *pathways* (Abb. 17a) bzw. Krankheiten (Abb. 17b) zeigen, in welchen Gene der 168 invers exprimierten Genen angereichert sind. Zudem wurden von den invers exprimierten Genen mit adjustiertem p-Wert $< 0,01$ und $\log_2\text{Foldchange} > 1,25$ eine *heatmap* (Abb. 18) erstellt.

Die invers regulierten Gene der mit Propranolol inkubierten humanen neutrophilen Granulozyten wurden mit dem Genexpressionsprofil von Mäusen mit experimenteller EBA (Samavedam et al. 2018) verglichen (Abb. 19). Die gemeinsame Schnittmenge enthält 16 Gene (vgl. Abb. 19), von denen 8 Gene (BASP1, FCER1G, NFKBIE, GADD45B, AOA1, RALGDS, NFE2L2, XBP1) im Genexpressionsprofil der Mäuse mit experimenteller EBA hochreguliert waren, während sie in den mit Propranolol inkubierten neutrophilen Granulozyten herunterreguliert waren.

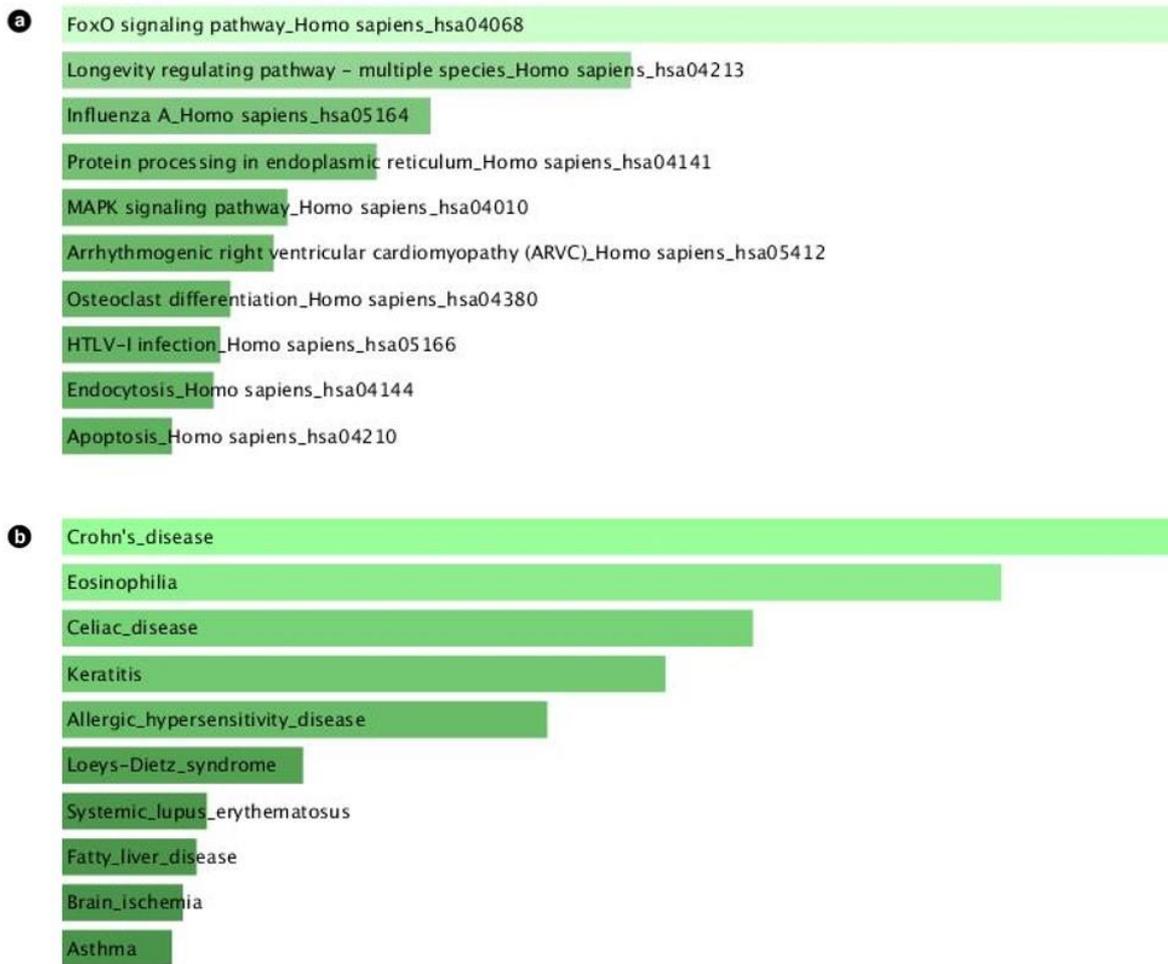


Abb. 17 Die invers exprimierte Gene sind in verschiedenen pathways (a) und Krankheiten (b) angereichert. Neutrophile Granulozyten wurden mittels MACSxpress® *Neutrophil Isolation Kit human* von Miltenyi Biotec aus humanem Vollblut gesunder Spender*innen isoliert, mit ICs aus hCOL7 und anti-hCOL7 stimuliert und für 4 h mit Propranolol 10 µM inkubiert (vgl. 2.2). Die RNA wurde sequenziert und die Analyse der Rohdaten erfolgte wie in 2.5.3 beschrieben. (a) *Pathways* der KEGG Datenbank (Ogata et al. 1999), in denen die Gene der 168 invers exprimierten Genen angereichert sind. (b) Krankheiten auf der Basis der Jensen DISEASES Datenbank (Pletscher-Frankild et al. 2015), in denen die Gene der 168 invers exprimierten Genen angereichert sind.

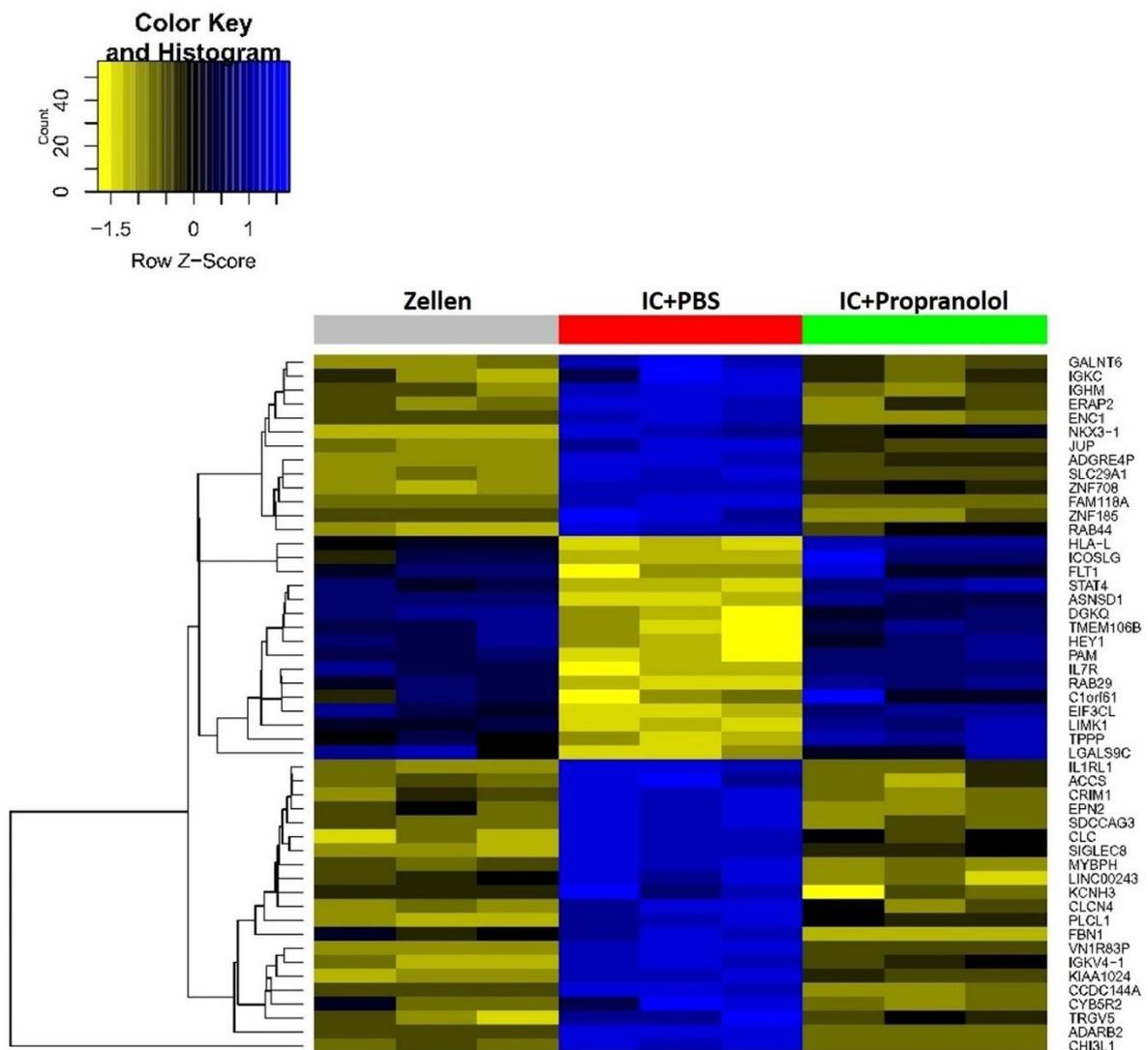


Abb. 18 Heatmap mit den am stärksten invers exprimierten Genen IC stimulierter und mit bzw. ohne Propranolol behandelter neutrophiler Granulozyten. Neutrophile Granulozyten wurden mittels MACSxpress® *Neutrophil Isolation Kit human* von Miltenyi Biotec aus humanem Vollblut gesunder Spender*innen isoliert, mit ICs aus hCOL7 und anti-hCOL7 der Subklassen IgG4 oder IgG1 stimuliert und für 4 h mit Propranolol 10 μ M inkubiert (vgl. 2.2). Die RNA wurde sequenziert und die Analyse der Rohdaten erfolgte wie in 2.5.3 beschrieben. $n=3$ \log_2 Foldchange > 1,25 und adjustierter p-Wertp < 0,01. Zur Verfügung gestellt von Yask Gupta (LIED), Universität zu Lübeck.

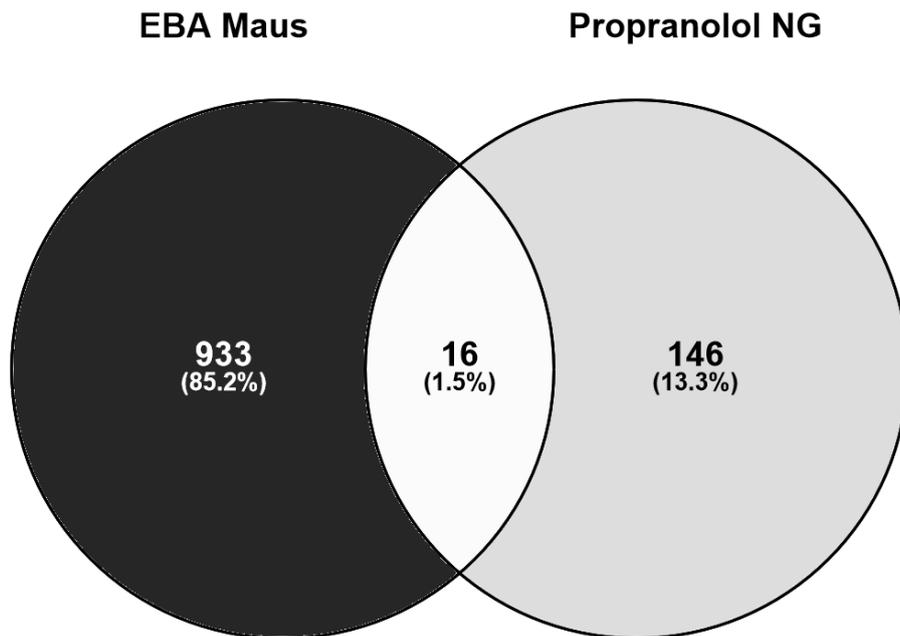


Abb. 19 Venn-Diagramm zur Darstellung der Schnittmenge der invers regulierten Gene von mit Propranolol inkubierten humanen neutrophilen Granulozyten mit dem Genexpressionsprofil von Mäusen mit experimenteller EBA. Neutrophile Granulozyten wurden mittels MACSxpress® *Neutrophil Isolation Kit human* von Miltenyi Biotec aus humanem Vollblut gesunder Spender*innen isoliert, mit ICs aus hCOL7 und anti-hCOL7 der Subklassen IgG1 oder IgG4 stimuliert und für 4 h mit Propranolol 10 µM inkubiert (vgl. 2.2). Die RNA wurde sequenziert und die Analyse der Rohdaten erfolgte wie in 2.5.3 beschrieben. EBA Maus: Genexpressionsprofil von Mäusen mit experimenteller EBA; Propranolol NG: invers regulierte Gene IC-stimulierter und mit Propranolol behandelter humaner neutrophiler Granulozyten.

4. Diskussion

Meiner Arbeit liegt eine Reihe von bereits validierten Substanzen zugrunde, die neutrophile Granulozyten hemmen. Diese Substanzen sollten in einem Modell getestet werden, das mit Sicherheit neutrophilenabhängig ist. Hierzu eignete sich das passive und lokale Modell der EBA besonders gut, da die Krankheitsinduktion in den Tieren durch die Injektion zuvor hergestellter Antikörper erfolgen konnte, welche über die Bindung an murines Typ VII Kollagen und die darauffolgende Aktivierung neutrophiler Granulozyten eine experimentelle EBA an der Injektionsstelle hervorrief.

Alle fünf der von mir getesteten Substanzen fielen zuvor im Screening der *Target Selective Inhibitor Library* von Selleckchem® oder der *Prestwick Chemical Library*® auf, da sie die Freisetzung von ROS in neutrophilen Granulozyten hemmten, ohne zytotoxisch zu sein. Katharina Schulze Dieckhoff konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass diese Substanzen auch *in vivo* systemisch appliziert den klinischen Ausprägungsgrad der experimentellen EBA im lokalen und passiven Mausmodell der EBA gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringerten.

In meiner Arbeit untersuchte ich zunächst die Dosisabhängigkeit der fünf wirksamsten Substanzen, indem ich Mäusen verschiedene Konzentrationen der Substanzen systemisch verabreichte. Ein von der Dosis abhängiger Effekt konnte dahingehend beobachtet werden, dass die Substanzen nur in der höchsten getesteten Konzentration die experimentelle EBA signifikant reduzierten. Auf der Suche nach einer möglichst nebenwirkungsarmen Therapie einer dermatologischen Erkrankung lag nahe, erfolgsversprechende Substanzen auch topisch zu testen. Die lokale Applikation verspricht eine hohe Wirksamkeit bei geringeren systemischen Nebenwirkungen durch Umgehung der Metabolisierung der Substanzen durch beispielsweise die Leber oder die Niere.

Mittels direkter Immunfluoreszenz und simultaner Färbung von amCOL7C und C3 Komplement wurde die Induktion der lokalen EBA in allen Versuchsgruppen verifiziert. Da die Substanzen bereits prophylaktisch vor Injektion der amCOL7C verabreicht wurden, wurde mit dem Nachweis von amCOL7C und C3 Komplement an der DEJ ausgeschlossen,

dass die hemmenden Effekte der jeweiligen Substanzen auf eine Verhinderung der Induktion der experimentellen EBA zurückzuführen sind.

Eine der von mir getesteten Substanzen war besonders vielversprechend, sodass im Rahmen dieser Arbeit eine Genexpressionsanalyse von neutrophilen Granulozyten durchgeführt wurde, die mit dieser Substanz inkubiert und IC-stimuliert wurden, um etwas über den bisher unbekanntem molekularen Wirkmechanismus der Substanz auf neutrophile Granulozyten zu erfahren. Im Folgenden werde ich auf alle von mir getesteten Substanzen einzeln eingehen.

Propranolol HCl (Zielmolekül: β -receptor) ist die bekannteste und am besten erforschte Substanz unter denen im Rahmen dieser Arbeit getesteten. Es konnte *in vivo*, sowohl einmal täglich systemisch i.p. verabreicht wie auch topisch auf die Ohren appliziert, die klinische Ausprägung der EBA signifikant verringern. Im durchgeführten *ROS Release Assay* konnte die bereits bekannte (vgl. 1.2.7) hemmende Funktion von Propranolol auf die Freisetzung von ROS in IC-stimulierten neutrophilen Granulozyten bestätigt werden (Anderson et al. 1996).

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten gegenüber der Positivkontrolle keine Beeinflussung der Zellvitalität und der Zellaktivität nach vierstündiger Inkubation mit Propranolol. Der auffallend geringere Anteil lebender Zellen in einer Probe (vgl. Abb. 16) ist sehr wahrscheinlich auf das während des Versuches unbemerkte Austrocknen des Wells beim Färbevorgang für die FACS-Analyse vor der Fixierung mit *Fixation Buffer* (vgl. 2.3.1) zurückzuführen und nicht auf eine mutmaßliche Zytotoxizität von Propranolol.

In der Literatur wurden bereits antioxidative Effekte von Propranolol auf PMN (polymorphnukleäre Neutrophile) beschrieben (Anderson und van Rensburg 1979). Allerdings beruhen diese wahrscheinlich auf der membranstabilisierenden Wirkung von Propranolol und nicht auf der Inhibition von β -Adrenozeptoren, da das Stereoisomer Dexpropranolol im Gegensatz zu Propranolol kaum β -Adrenozeptor blockierende Eigenschaften aufweist und trotzdem ähnlich antioxidativ wirkt (Anderson et al. 1996). Eine intakte Zellmembran ist für die Aktivität der NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten essentiell, was darauf zurückzuführen ist, dass das Enzym aus verschiedenen in der

Zellmembran verankerten Untereinheiten besteht und Substanzen, welche die Fluidität der Zellmembran erhöhen, zu einer verstärkten Aktivität der NADPH-Oxidase führen, wohingegen Substanzen, die wie Propranolol membranstabilisierend wirken, die Aktivität hemmen (Anderson et al. 1996; Kusner et al. 1991). Ferner spricht für einen β -Adrenozeptor-unabhängigen Effekt, dass andere β -Blocker wie Timolol, Atenolol oder Metoprolol die Freisetzung von ROS durch PMN *in vitro* nicht hemmen konnten (Anderson et al. 1996).

Zudem ist beschrieben, dass Propranolol in höheren Konzentrationen (IC₅₀ 150 μ M) in PMN auch die PKC hemmt, deren Aktivität unter anderem mit der der NADPH-Oxidase korreliert, da die PKC deren Untereinheit NCF1 phosphoryliert (Sozzani et al. 1992; El Benna et al. 1996; Nixon und McPhail 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden die neutrophilen Granulozyten *in vitro* jedoch mit einer weitaus niedrigeren Konzentration (10 μ M) Propranolol inkubiert (vgl. 2.2), weshalb die Hemmung der PKC nicht als Erklärungsansatz für die hier beobachtete antioxidative und antiinflammatorische Wirkung von Propranolol dienen kann. Da jedoch auch AKT dazu in der Lage ist, NCF1 zu phosphorylieren (Chen et al. 2003), ist denkbar, dass der Effekt von Propranolol *in vivo* nicht auf einen PKC-abhängigen, sondern auf einen AKT-abhängigen Mechanismus zurückzuführen ist.

In dieser Arbeit wurden 8 Gene identifiziert (BASP1, FCER1G, NFKBIE, GADD45B, AOA, RALGDS, NFE2L2, XBP1), die im Genexpressionsprofil von Mäusen mit experimenteller EBA hochreguliert und gleichzeitig in mit Propranolol inkubierten neutrophilen Granulozyten herunterreguliert waren (vgl. 3.3.3). Das Gen RALGDS führt über zwei verschiedene Mechanismen zu einer Aktivierung von AKT, da es durch die Expression von RALGDS zu einer Phosphorylierung von Serin473 kommt und darüber hinaus RALGDS die Phosphorylierung von AKT durch die PDK1 unterstützt (Hao et al. 2008). Die verminderte Expression von RALGDS in mit Propranolol inkubierten neutrophilen Granulozyten ist somit mit der Annahme einer geringeren Aktivität von AKT und einer damit einhergehenden verminderten Freisetzung von ROS vereinbar. Außerdem konnte eine Assoziation des Gens NFKBIE mit dem Vorliegen einer weiteren Autoimmunerkrankung (rheumatoide Arthritis) in der japanischen Population gezeigt werden (Okada et al. 2012).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse bestätigen die Annahme, dass Propranolol einen Einfluss auf die Expression verschiedener proinflammatorischer Moleküle hat. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Positivkontrolle in den mit Propranolol inkubierten Zellen TNF (Tumornekrosefaktor) vermindert exprimiert wird (log₂Foldchange: -1,16) (vgl. Tabelle A1). Namensgebend für das Zytokin war die ursprüngliche Entdeckung, dass es die Nekrose von Tumorzellen induzieren konnte (Carswell et al. 1975). Später wurde beschrieben, dass TNF in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen von Bedeutung ist und im Falle der rheumatoiden Arthritis erhöhte Serumspiegel von TNF mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (Robak et al. 1998). Die pharmakologische Blockade von TNF durch Biologika wie Adalimumab, Etanercept, Golimumab, Infliximab, und Certolizumab Pegol ist mittlerweile fester Bestandteil der Therapie verschiedener chronisch-entzündlicher Erkrankungen (Monaco et al. 2015). Kürzlich konnte auch für die experimentelle EBA eine Verbesserung des klinischen Ausprägungsgrades durch die Blockade von TNF mittels Etanercept gezeigt werden (Hirose et al. 2016). Die verminderte Expression von TNF von mit Propranolol inkubierten Zellen untermauert die Annahme, dass TNF auch in der Pathogenese der EBA eine Rolle spielt und Propranolol unter anderem über die Herunterregulierung von TNF antiinflammatorische Wirkungen erzielt.

Um zu verifizieren, dass sich die durch Propranolol veränderte Genexpression in neutrophilen Granulozyten auch in der experimentellen EBA *in vivo* wiederfindet, sollte eine RT-PCR aus den Ohren von Mäusen erfolgen, die topisch bzw. systemisch mit Propranolol behandelt wurden. Mit Hilfe der RT-PCR können Genprodukte der invers exprimierten Gene gezielt im Gewebe der Mäuse nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser humanen Gene im murinen Gewebe würde gleichzeitig die Übertragbarkeit der tierexperimentell gewonnen Erkenntnisse auf den Menschen unterstützen und bekräftigen, dass das Mausmodell der EBA ein geeignetes Mittel zur Erforschung blasenbildender Autoimmunerkrankungen ist.

Trotz alledem sollte Propranolol in einem nächsten Schritt auch im aktiven Mausmodell der EBA getestet werden, um die Effekte der Substanz zu validieren, wenn sie nicht prophylaktisch, sondern nach der Induktion der experimentellen EBA appliziert wird (vgl.

1.2.5). In einem nächsten tierexperimentellen Schritt sollten die Gene, die in der Genexpressionsanalyse durch Propranolol verändert exprimiert wurden, ausgeschaltet werden (*knock-out* Mäuse), um die in der Genexpressionsanalyse durch Propranolol veränderten Signalwege im Hinblick auf die Entwicklung bzw. Unterdrückung der experimentellen EBA zu verifizieren.

Propranolol entstammt der *Prestwick Chemical Library*[®] und ist somit als einzige der fünf Substanzen ein bereits zugelassenes Arzneimittel. Zwar liegen sowohl zur systemischen wie auch zur topischen Wirksamkeit der Substanz Daten bezüglich der Behandlungen von Hämangiomen vor (Kunzi-Rapp 2012; Xu et al. 2012), die topische Therapie von Hämangiomen mit Propranolol erfolgt jedoch nach wie vor als individueller Heilversuch. In der Heilbronner Kinderklinik hat sich die Anwendung eines Gels bestehend aus Propranolol HCl (1 %), Hyaluronsäure (3 %) und konserviertem Wasser (96 %) bewährt. Das Gel wurde im Abstand von 10-12 h auf die betroffenen Stellen 1-2 mm dick aufgetragen und mit einem handelsüblichen Pflaster abgedeckt (Schneider et al. 2014). In Anbetracht der guten Verträglichkeit von Propranolol 1 % b.i.d. und der bekannten Nebenwirkungen topischer Kortikosteroide (Oetjen und Gierschik 2017, S. 606) ist denkbar, in lokal begrenzten Fällen der EBA einen individuellen Heilversuch mit 1 % Propranolol b.i.d. zu starten. Darüber hinaus kann auch erwogen werden, 1 % Propranolol b.i.d. an Patient*innen zu testen, die an der EBA ähnlichen Autoimmundermatosen wie dem bullösen Pemphigoid leiden.

BX-795 (Zielmolekül: PDK1) reduzierte systemisch verabreicht in der höchsten getesteten Konzentration sowohl die Zunahme der Ohrdicke als auch die Rötung und Krustenbildung der Ohren signifikant. Topisch appliziert konnte jedoch kein derartiger Effekt verzeichnet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Wirkstoff zwar aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften systemisch verabreicht eine hohe Bioverfügbarkeit erreichte, die Resorption über die Haut jedoch nicht in ausreichendem Maße erfolgte, um die gleichen antiinflammatorischen Wirkungen zu erzielen. Um eine Aussage über die Resorptionsfähigkeit einer Substanz zu treffen, kann ihre intrinsische Lipophilie über den Partitionskoeffizienten LogP bestimmt und als Indikator verwendet werden (Kwon und Younggil 2004, S. 44). Durch den Vergleich mit strukturell ähnlichen Substanzen, deren LogP-Werte bekannt sind, kann der XLogP3-Wert eines Moleküls berechnet werden (Cheng

et al. 2007). Je höher dieser ist, desto lipophiler ist die Substanz. Allerdings sollte der XLogP3-Wert nur als Anhaltspunkt zum Vergleich der Lipophilie verschiedener chemischer Strukturen dienen und nicht als absoluter Wert betrachtet werden, da die Lipophilie einer Substanz stark von der pH-abhängigen Protonierung ihrer funktionellen Gruppen beeinflusst wird (Klebe 2009, S. 288–290). Daher muss bedacht werden, dass auch die Lösung der Substanzen in DAC Basiscreme und die mehrtägige Lagerung bei RT möglicherweise einen Effekt auf die Polarität und damit die Lipophilie und die Stabilität der Substanz hatten.

Mit einem XLogP3-Wert von 4,6 ist BX-795 verglichen mit den anderen getesteten Substanzen mäßig bis stark lipophil und müsste daher von der Haut gut resorbiert werden (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10077147#section=InChI>).

Der dennoch ausbleibende therapeutische Effekt von topisch appliziertem BX-795 kann darauf zurückzuführen sein, dass die Substanz auf der Haut lokale Irritationen verursachte, die in der Auswertung nicht von den Symptomen der experimentellen EBA zu unterscheiden waren.

Als PDK1-Inhibitor hemmt BX-795 die Signaltransduktion des *PDK1/AKT*-Signalwegs, da es durch die Hemmung der PDK1 nicht zur Phosphorylierung von Threonin308 und damit nicht zur Aktivierung von AKT kommt (Feldman et al. 2005). Ferner ist die PDK1 auch in der Lage, verschiedene Isoformen der PKC zu phosphorylieren (Toker 2003) und über die PKC-abhängige Phosphorylierung von NCF1 Einfluss auf die Aktivität der NADPH-Oxidase zu nehmen. Möglicherweise ist die simultane Hemmung der AKT- wie auch der PKC-abhängigen Phosphorylierung von NCF1 der Grund, weshalb BX-795 die Produktion von ROS durch die NADPH-Oxidase verringert.

Da die PDK1 in der Kanzerogenese verschiedener Tumorentitäten, wie beispielsweise in BRAF-mutierten Melanomen (Scortegagna et al. 2015) oder Pankreaskarzinomen (Eser et al. 2013) eine wichtige Rolle spielt (Gagliardi et al. 2018), ist die Erforschung des PDK1-Inhibitors BX-795 auch im Hinblick auf die Entwicklung potenzieller neuer Krebstherapeutika interessant. Angesichts der guten systemischen Wirksamkeit der Substanz im lokalen Modell der EBA wäre es sinnvoll, die Aufnahme von BX-795 in die Haut zu kontrollieren und gegebenenfalls andere Lösungsmittel zu testen. Beispielsweise könnte

auf die Einarbeitung von in DMSO-gelösten BX-795 in DAC-Basiscreme verzichtet werden und reines in DMSO gelöstes BX-795 auf die Ohren der Mäuse aufgetragen werden, um eine höhere Konzentration von BX-795 zu erhalten.

Sotrastaurin hemmt simultan verschiedene Isoformen der PKC. Auch die PKC β , die zur Aktivierung der NADPH-Oxidase über den Fc γ -Rezeptor neutrophiler Granulozyten von Bedeutung ist (Dekker et al. 2000), wird durch Sotrastaurin mit einer Ki von 0,64 nM gehemmt. Aufgrund der guten Bioverfügbarkeit von Sotrastaurin (Weckbecker et al. 2010), war zu erwarten, dass die Behandlung der Mäuse mit dem PKC-Inhibitor Sotrastaurin die experimentelle EBA verringert. Auch wenn die Ergebnisse der Mausexperimente an Tag 2 keine signifikante Reduktion der experimentellen EBA zeigten, war die Krustenbildung und Rötung der Ohren der mit Sotrastaurin behandelten Tiere tendenziell geringer ausgeprägt. Die topische Applikation von Sotrastaurin scheint hingegen weniger erfolgsversprechend zu sein. Sotrastaurin ist mit einem XLogP3-Wert von 2,6 verglichen mit den anderen getesteten Substanzen weniger lipophil (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10296883#section=Computed-properties>), was möglicherweise zu einer schlechteren Resorption und damit geringeren Wirkung bei topischer Applikation führte. Da nachgewiesen wurde, dass insbesondere die Isoform PKC β für die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Aktivierung der NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist und Sotrastaurin unselektiv verschiedene Isoformen der PKC hemmt, kann es möglicherweise in der Anwendung zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen, die auf eine fehlende Spezifität von Sotrastaurin zurückzuführen sind. Daher wäre es sinnvoll, einen selektiven Inhibitor der PKC β im *ROS Release Assay* und auf Zytotoxizität testen. Allerdings scheinen noch weitere, PKC β -unabhängige Mechanismen zur Phosphorylierung von NCF1 und damit zur Aktivierung der NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten zu führen (Dekker et al. 2000). Diese Tatsache könnte die Effektivität von PKC-Inhibitoren wie Sotrastaurin im Hinblick auf die Unterdrückung der ROS-Freisetzung limitieren. Die gute orale Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit *in vivo* (Weckbecker et al. 2010) würden dennoch eine Testung von systemisch appliziertem Sotrastaurin im aktiven Mausmodell der EBA rechtfertigen.

PHA-665752 (Zielmolekül: c-Met) war neben Propranolol die einzige Substanz, die auch topisch appliziert signifikant die Zunahme der Ohrdicke reduzierte und die Entwicklung von Rötungen und Krusten im Vergleich zur Kontrollgruppe verringern konnte.

Ein Grund für die gegenüber Sotrastaurin und BX-795 bessere Wirksamkeit der topischen Applikation könnte die erhöhte Resorption von PHA-665762 aufgrund seiner höheren Lipophilie sein. Mit einem XLogP3-Wert von 5 ist PHA-665762 von den topisch getesteten Substanzen intrinsisch gesehen am stärksten lipophil (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10461815#section=Entrez-Crosslinks>). Da die Substanz stark färbend war, ließ sich der prozentual von Symptomen der EBA betroffene Anteil der Ohren nur schwer ermitteln, was bei der Beurteilung der Effektivität der Behandlung berücksichtigt werden muss. PHA-665752 hemmt die Rezeptortyrosinkinase c-Met mit IC50-Werten im nanomolaren Bereich und moduliert damit die Signaltransduktion via Erk, AKT und FAK (Christensen et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Erk und AKT mit Methylprednisolon eine Verringerung der Aktivierung von zuvor mit ICs stimulierten neutrophilen Granulozyten hervorrief (Hellberg et al. 2013). Unter der Annahme, dass PHA-665752 die Signaltransduktion via Erk und AKT in neutrophilen Granulozyten auf die gleiche Art und Weise hemmt wie in den von Christensen et al. getesteten Tumorzellen, ist die Verringerung der experimentellen EBA im lokalen Mausmodell möglicherweise auf diesen Wirkmechanismus zurückzuführen. Auch wenn systemisch verabreichtes PHA-665752 in der höchsten Konzentration gegenüber dem Lösungsmittel zu einer signifikanten Reduktion von Rötung und Krusten führte, sollte aufgrund des starken Gewichtsverlusts der Mäuse davon abgesehen werden, diese Konzentration erneut *in vivo* zu testen. Jedoch ist denkbar, die Substanz erneut einer Prüfung der topischen Wirksamkeit zu unterziehen und sie auch im aktiven Mausmodell der EBA zu testen.

NU 7441 (Zielmolekül: DNA-PK) konnte *in vivo* die Rötung und Krustenbildung in der experimentellen EBA in den beiden getesteten Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringern. Da die Substanz NU7441 mit dem gleichen Lösungsmittel gelöst wurde wie PHA-665752 und der Gewichtsverlust der Tiere in der Testung von PHA-665752 möglicherweise auf eine schlechte Verträglichkeit des Lösungsmittels zurückzuführen ist, wurde in diesem Versuch auf die Verdopplung der

bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Katharina Schulze Dieckhoff (unveröffentlichte Daten) *in vivo* getesteten Konzentration (vgl. 1.2.7) verzichtet, sodass insgesamt drei Versuchsgruppen mit je n=5 Tieren vorlagen. Die schlechte Löslichkeit in DMSO machte das Herstellen einer NU 7441-haltigen Creme unmöglich, weshalb auf die topische Testung der Substanz verzichtet werden musste. Systemisch appliziert ist NU 7441 ein wirksames und gut verträgliches Mittel zur Behandlung der experimentellen EBA. Eine Einflussnahme auf die Hemmung der ROS-Freisetzung über die DNA-PK könnte zwar angenommen werden, da beschrieben wurde, dass die DNA-PK Serin473 phosphoryliert und damit zur Aktivierung von AKT beiträgt (Feng et al. 2004). Allerdings scheint die DNA-PK in reifen neutrophilen Granulozyten kaum exprimiert zu sein (Sallmyr et al. 2004), was dafür spricht, dass es einen weiteren Mechanismus geben muss, über den NU 7441 die ROS-Freisetzung in neutrophilen Granulozyten unterdrückt. Da NU 7441 in höheren Konzentrationen auch die Pi3K hemmt und in der Literatur beschrieben wurde, dass eine Hemmung der Pi3K β zur Reduktion der ROS-Freisetzung führt (Kulkarni et al. 2011), sind die beobachteten therapeutischen Effekte von NU 7441 möglicherweise auch auf diesen Mechanismus zurückzuführen. Die gute Verträglichkeit der Substanz und ihr starker Effekt auf die Minderung der experimentellen EBA sprechen dafür, NU 7441 näher zu untersuchen, obwohl möglicherweise ein *off-target* Effekt vorliegt. Es ist möglich, die geringere der beiden im Rahmen dieser Arbeit getesteten Dosen im aktiven Mausmodell der EBA zu validieren, da auch schon in dieser Dosis signifikante therapeutische Effekte auftraten. Darüber hinaus sollte *in vivo* untersucht werden, ob die Wirkung von NU 7441 in Bezug auf die experimentelle EBA auf die Hemmung der DNA-PK oder die Hemmung der Pi3K β zurückzuführen ist. Dazu wäre es sinnvoll, Substanzen zu testen, die selektiv die DNA-PK oder die Pi3K β inhibieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind durch kleine Gruppengrößen (n=5) in den Tierexperimenten limitiert. Die Kontrollgruppen erhielten die jeweiligen Lösungsmittel der Substanzen, weshalb weder Effekte der Lösungsmittel auf die experimentelle EBA noch Einflüsse der verschiedenen Applikationstechniken auf die Verträglichkeit der Substanzen ausgeschlossen werden konnten. Da sowohl die Behandlung der Mäuse als auch die Beurteilung des klinischen Ausprägungsgrades der EBA durch mich selbst stattfand, war

eine Verblindung bei der Messung der Ohrdicke und beim Erheben der von Krusten und Rötung betroffenen Haut nicht möglich.

Das verwendete lokale Krankheitsmodell der EBA ist nur eingeschränkt geeignet, um therapeutische Ansätze zur Behandlung der Krankheit zu testen, da es sich bei diesem Mausmodell um einen prophylaktischen Behandlungsansatz handelt, bei dem die potenziellen Medikamente bereits vor Induktion der experimentellen EBA verabreicht werden (vgl. 1.2.5). Zudem müssten zur Validierung des therapeutischen Potenzials die Substanzen über einen längeren Zeitraum gegeben werden, was bei dem auf fünf Tage beschränkten lokalen Mausmodell der EBA nicht möglich ist.

Die Mäuse der Versuchsgruppen zur systemischen Testung kamen aus der eigenen Zucht und saßen in der Gemeinsamen Tierhaltung in Lübeck, in der zur Zeit der Experimente das MPV (Maus Parvovirus) aufgetreten ist. Möglicherweise waren auch die Tiere der oben genannten Versuchsgruppen mit dem MPV infiziert. Alle Mäuse waren asymptomatisch, was für eine Infektion mit dem MPV allerdings typisch ist (Jacoby et al. 1995). C57BL/6 Mäuse sind gegenüber anderen Mausstämmen vergleichsweise weniger anfällig für die Infektion mit diesem Virus (Henderson et al. 2015), weshalb nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Mäuse überhaupt infiziert waren. Da das Virus *in vitro* vornehmlich T-Lymphozyten befällt (McKisic et al. 1993; Jacoby et al. 1995) und diese an der Induktion einer passiven, lokalen EBA im Mausmodell nicht maßgeblich beteiligt sind, ist davon auszugehen, dass eine Infektion der Tiere mit dem MPV keinen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt hätte. Daher wurde darauf verzichtet, die Tiere durch eine PCR des Kots auf eine Infektion mit dem MPV zu testen. Dennoch wurde von jedem Tier Kot gesammelt und bei -80 °C gelagert, um gegebenenfalls nachträglich eine PCR durchführen zu können. Alle topischen Applikationen fanden in der Barriere 1 der Gemeinsamen Tierhaltung an Mäusen statt, die direkt vom Anbieter Charles River bezogen wurden. Im Gegensatz zu den Mäusen aus der eigenen Zucht konnte in diesen Versuchsgruppen davon ausgegangen werden, dass die Mäuse nicht mit dem MPV infiziert waren. Auch angesichts der Tatsache, dass die Tiere in der Barriere 1 anderen Haltungsbedingungen, wie zum Beispiel dem zusätzlichen Licht und Lärm der Lüftung der Arbeitsbank, ausgesetzt waren, lassen sich die absoluten Ergebnisse der einzelnen Versuche nicht miteinander vergleichen.

Insgesamt wurde darauf geachtet, ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis zu wahren. Bei den aus der eigenen Zucht bezogenen Mäusen war dies jedoch nicht immer möglich, da teilweise nicht genug Tiere beider Geschlechter zur Verfügung standen und das gleiche Alter der Tiere einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis gegenüber priorisiert wurde.

Die Anzahl der Proben für die Genexpressionsanalyse von mit Propranolol inkubierten humanen neutrophilen Granulozyten ist mit $n=3$ sehr klein und erlaubt nur begrenzte Aussagen über die Veränderung der Genexpression durch Propranolol. Alle drei Proband*innen gaben an, sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme gesund zu fühlen, jedoch wurden sie nicht weiter auf entzündliche Erkrankungen untersucht, wodurch ein Vorliegen einer die Aktivität der neutrophilen Granulozyten beeinflussenden Erkrankung nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Im Rahmen der Arbeit habe ich die Wirksamkeit aller fünf getesteten Substanzen im lokalen Mausmodell validiert. Im angewandten passiven und lokalen Mausmodell wurden die Substanzen allerdings nur an fünf Tagen verabreicht. Da Autoimmunerkrankungen in der klinischen Praxis meist über einen erheblich längeren Zeitraum behandelt werden müssen, sollte der Langzeiteffekt der Substanzen auf den Krankheitsverlauf und den Organismus in einem nächsten Schritt geprüft werden. Dazu kann das aktive Mausmodell der EBA dienen, welches im Gegensatz zum passiven Mausmodell die Evaluation der Langzeiteffekte erlaubt (Sitaru et al. 2006).

Ein wichtiger Schritt, der in neutrophilen Granulozyten zur Freisetzung von ROS führt, ist die Phosphorylierung von p47phox (bzw. NCF1), einer Untereinheit der NADPH-Oxidase. Einige Mechanismen, die diese Phosphorylierung zur Folge haben, wie beispielsweise die Signaltransduktion via *Pi3/AKT/MAPK*-Signalweg oder die direkte Phosphorylierung durch die PKC, sind bekannt. Die Literatur und Kenntnisse über substanzspezifische Zielmoleküle bieten Erklärungsansätze für die therapeutische Wirkung der Substanzen auf den Pathomechanismus der EBA. Durch Einflussnahme auf die Signaltransduktion in neutrophilen Granulozyten sind einige der Substanzen in der Lage, die Freisetzung von ROS durch Verhinderung der Phosphorylierung von p47phox zu hemmen. Im Fall von Propranolol und NU 7551 kann die Hemmung der ROS-Freisetzung und die Verringerung der experimentellen EBA im passiven Mausmodell jedoch nicht auf die Inhibition der

beschriebenen Zielstrukturen zurückgeführt werden. Um mehr über den molekularen Wirkmechanismus von NU 7551 in neutrophilen Granulozyten zu erfahren, könnte wie mit Propranolol verfahren werden und ebenfalls eine Genexpressionsanalyse stimulierter, mit der Substanz inkubierter neutrophiler Granulozyten erfolgen.

Durch RT-PCR von murinem Gewebe und durch Ausschalten der entsprechenden Gene in *Knock-out*-Mäusen sollte die Relevanz der Gene für die Ausprägung des EBA-typischen Phänotyps im Mausmodell bestätigt werden. Eine Verhinderung des Ausbruchs der experimentellen EBA in den *Knock-out*-Mäusen würde die Relevanz des entsprechenden Gens für die Entwicklung des EBA-typischen Phänotyps untermauern. Auch die Zielstrukturen der vier weiteren Substanzen BX-795, Sotrastaurin, PHA-665752 und NU 7441 sollten in *Knock-out*-Mausmodellen überprüft werden.

Tiere, die systemisch mit Propranolol HCl der Konzentration 8 mg/kg KG, mit BX-795 30 mg/kg KG, mit PHA-665752 60 mg/kg KG oder mit NU 7441 0,5 mg/kg KG behandelt wurden, wiesen am Endpunkt des Experimentes gegenüber den anderen Gruppen signifikant dünnere Ohren und/oder weniger von Läsionen betroffene Ohrfläche auf. Mit Ausnahme von PHA-665752 waren alle Substanzen gut verträglich und sollten in den oben genannten Konzentrationen der Substanzen im aktiven Mausmodell validiert werden. Die meistversprechenden Ergebnisse erbrachte die Substanz Propranolol, da sie sowohl topisch als auch systemisch appliziert *in vivo* die experimentelle EBA signifikant reduzieren konnte. Da darüber hinaus die Sicherheit des Medikamentes für die Anwendung am Menschen bekannt ist, kann erwogen werden, Propranolol im Rahmen eines individuellen Heilversuchs zur Behandlung von EBA topisch am Menschen zu testen.

5. Zusammenfassung

Obwohl die Inzidenz von Autoimmunerkrankungen in der westlichen Welt in den vergangenen Jahrzehnten stark zugenommen hat, ist die Behandlung bisher meist auf Immunsuppression beschränkt. In Ermangelung kausaler Therapieansätze und zur Reduktion der Nebenwirkungen immunsuppressiver Therapien ist die Erforschung von Substanzen, die ihre Wirkung über krankheitsspezifische Zielstrukturen entfalten und damit proinflammatorische Signalkaskaden hemmen, besonders interessant. Der bei der EBA zur entzündlichen Blasenbildung führende Pathomechanismus ist bereits gut erforscht: Als Folge der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch Autoantikörper gegen Typ VII Kollagen kommt es über verschiedene in der Literatur beschriebene Signalkaskaden zur Produktion von ROS durch die NADPH-Oxidase.

Die in dieser Arbeit getesteten Substanzen fielen beim *Screening* der *Selective Inhibitor Library* von Selleckchem® und der *Prestwick Chemical Library*® auf, weil sie die Freisetzung von ROS in IC-stimulierten humanen neutrophilen Granulozyten hemmen konnten, ohne eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen zu entfalten.

Alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen konnten, systemisch appliziert, *in vivo* in mindestens einer der getesteten Konzentrationen die von experimenteller EBA betroffene Ohrfläche und/oder die Zunahme der Ohrdicke verringern. Bis auf PHA-665752 wurden die Substanzen und ihre Lösungsmittel von den Mäusen gut vertragen. NU 7551 konnte auch in der niedrigsten getesteten Konzentration eine signifikante Reduktion der experimentellen EBA erzielen. In der Genexpressionsanalyse von IC-stimulierten und mit Propranolol inkubierten Zellen konnten 168 Gene identifiziert werden, die im Vergleich zur Positivkontrolle invers exprimiert waren, was die Annahme bestätigt, dass Propranolol auf molekularer Ebene antiinflammatorische Eigenschaften aufweist.

Von den fünf getesteten Substanzen waren Propranolol und PHA-665752 auch topisch wirksam und stellen damit eine neue und vielversprechende Therapieoption der EBA dar. Die zunächst zu erwägende Therapie ist die topische Applikation der Substanzen, da sie in der Anwendung patientenfreundlich ist und ein geringeres Risiko für systemische Nebenwirkungen birgt.

6. Literaturverzeichnis

Ago, T.; Nunoi, H.; Ito, T.; Sumimoto, H. (1999): Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (47), S. 33644–33653.

Aktories, Klaus; Unger, C. (2017): Mittel zur Behandlung von Tumoren- Tumorchemotherapie. In: Klaus Aktories, Ulrich Förstermann, Franz Hofmann und Klaus Starke (Hg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage, S. 827–830.

Amagai, M.; Klaus-Kovtun, V.; Stanley, J. R. (1991): Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. In: *Cell* 67 (5), S. 869–877.

Anders, Simon; Pyl, Paul Theodor; Huber, Wolfgang (2015): HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (2), S. 166–169. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu638.

Anderson, R.; Ramafi, G.; Theron, A. J. (1996): Membrane stabilizing, anti-oxidative interactions of propranolol and dexpropranolol with neutrophils. In: *Biochemical pharmacology* 52 (2), S. 341–349.

Anderson, R.; van Rensburg, A. J. (1979): The in vitro effects of propranolol and atenolol on neutrophil motility and post-phagocytic metabolic activity. In: *Immunology* 37 (1), S. 15–24.

Andrews S. (2010): FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Online verfügbar unter www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/, zuletzt geprüft am 26.04.2018.

Bernard, P.; Prost, C.; Aucouturier, P.; Durepaire, N.; Denis, F.; Bonnetblanc, J. M. (1991): The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. In: *The Journal of investigative dermatology* 97 (2), S. 259–263.

Bieber, Katja; Koga, Hiroshi; Nishie, Wataru (2017a): In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases. In: *Experimental dermatology* 26 (12), S. 1163–1170. DOI: 10.1111/exd.13415.

Bieber, Katja; Sun, Shijie; Ishii, Norito; Kasperkiewicz, Michael; Schmidt, Enno; Hirose, Misa et al. (2010): Animal models for autoimmune bullous dermatoses. In: *Experimental dermatology* 19 (1), S. 2–11. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00948.x.

- Bieber, Katja; Sun, Shijie; Witte, Mareike; Kasprick, Anika; Beltsiou, Foteini; Behnen, Martina et al. (2017b): Regulatory T Cells Suppress Inflammation and Blistering in Pemphigoid Diseases. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1628. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01628.
- Bieber, Katja; Witte, Mareike; Sun, Shijie; Hundt, Jennifer E.; Kalies, Kathrin; Dräger, Sören et al. (2016): T cells mediate autoantibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita. In: *Scientific reports* 6, S. 38357. DOI: 10.1038/srep38357.
- Bolger, Anthony M.; Lohse, Marc; Usadel, Bjoern (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (15), S. 2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Budde, K.; Sommerer, C.; Becker, T.; Asderakis, A.; Pietruck, F.; Grinyo, J. M. et al. (2010): Sotrastaurin, a novel small molecule inhibiting protein kinase C. First clinical results in renal-transplant recipients. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10 (3), S. 571–581. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02980.x.
- Buijsrogge, J. J. A.; Diercks, G. F. H.; Pas, H. H.; Jonkman, M. F. (2011): The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy. In: *The British journal of dermatology* 165 (1), S. 92–98. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10346.x.
- Burgering, B. M.; Coffey, P. J. (1995): Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. In: *Nature* 376 (6541), S. 599–602. DOI: 10.1038/376599a0.
- Campos, M.; Silvente, C.; Lecona, Manuel; Suárez, R.; Lázaro, P. (2006): Epidermolysis bullosa acquisita. Diagnosis by fluorescence overlay antigen mapping and clinical response to high-dose intravenous immunoglobulin. In: *Clinical and experimental dermatology* 31 (1), S. 71–73. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2005.01989.x.
- Capsoni, F.; Ongari, A. M.; Reali, E.; Bosè, F.; Altomare, G. F. (2012): The protein kinase C inhibitor AEB071 (sotrastaurin) modulates migration and superoxide anion production by human neutrophils in vitro. In: *International journal of immunopathology and pharmacology* 25 (3), S. 617–626. DOI: 10.1177/039463201202500308.
- Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9), S. 3666–3670.

Chen, Jia; Tang, Haiyang; Hay, Nissim; Xu, Jingsong; Ye, Richard D. (2010): Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions. In: *Blood* 115 (21), S. 4237–4246. DOI: 10.1182/blood-2009-11-255323.

Chen, Mei; Doostan, Arvin; Bandyopadhyay, Pubali; Remington, Jennifer; Wang, Xinyi; Hou, Yingping et al. (2007): The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita. In: *The American journal of pathology* 170 (6), S. 2009–2018. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061212.

Chen, Qingdan; Powell, David W.; Rane, Madhavi J.; Singh, Saurabh; Butt, Waseem; Klein, Jon B.; McLeish, Kenneth R. (2003): Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (10), S. 5302–5308.

Cheng, Tiejun; Zhao, Yuan; Li, Xun; Lin, Fu; Xu, Yong; Zhang, Xinglong et al. (2007): Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. In: *Journal of chemical information and modeling* 47 (6), S. 2140–2148. DOI: 10.1021/ci700257y.

Choi, K.; Frommel, T. O.; Stern, R. K.; Perez, C. F.; Kriegler, M.; Tsuruo, T.; Roninson, I. B. (1991): Multidrug resistance after retroviral transfer of the human MDR1 gene correlates with P-glycoprotein density in the plasma membrane and is not affected by cytotoxic selection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16), S. 7386–7390.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

Christensen, James G.; Schreck, Randall; Burrows, Jon; Kuruganti, Poonam; Chan, Emily; Le, Phuong et al. (2003): A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. In: *Cancer research* 63 (21), S. 7345–7355.

Cunningham, B. B.; Kirchmann, T. T.; Woodley, D. (1996): Colchicine for epidermolysis bullosa acquisita. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 34 (5 Pt 1), S. 781–784.

Dangelmaier, C.; Manne, B. K.; Liverani, E.; Jin, J.; Bray, P.; Kunapuli, S. P. (2014): PDK1 selectively phosphorylates Thr(308) on Akt and contributes to human platelet functional responses. In: *Thrombosis and haemostasis* 111 (3), S. 508–517. DOI: 10.1160/TH13-06-0484.

Dekker, L. V.; Leitges, M.; Altschuler, G.; Mistry, N.; McDermott, A.; Roes, J.; Segal, A. W. (2000): Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. In: *The Biochemical journal* 347 Pt 1, S. 285–289.

Desjardins, Philippe; Conklin, Deborah (2010): NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. In: *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (45). DOI: 10.3791/2565.

Dobin, Alexander; Davis, Carrie A.; Schlesinger, Felix; Drenkow, Jorg; Zaleski, Chris; Jha, Sonali et al. (2013): STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (1), S. 15–21. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635.

El Benna, J.; Faust, R. P.; Johnson, J. L.; Babior, B. M. (1996): Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. Phosphorylation by protein kinase C, protein kinase A, and a mitogen-activated protein kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (11), S. 6374–6378.

Ellebrecht, Christoph T.; Srinivas, Girish; Bieber, Katja; Banczyk, David; Kalies, Kathrin; Künzel, Sven et al. (2016): Skin microbiota-associated inflammation precedes autoantibody induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita. In: *Journal of autoimmunity* 68, S. 14–22. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.08.007.

Engineer, L.; Ahmed, A. R. (2001): Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 44 (5), S. 818–828. DOI: 10.1067/mjd.2001.113693.

Eser, Stefan; Reiff, Nina; Messer, Marlena; Seidler, Barbara; Gottschalk, Kathleen; Dobler, Melanie et al. (2013): Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. In: *Cancer cell* 23 (3), S. 406–420. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.01.023.

Evenou, Jean-Pierre; Wagner, Jürgen; Zenke, Gerhard; Brinkmann, Volker; Wagner, Kathrin; Kovarik, Jiri et al. (2009): The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 330 (3), S. 792–801. DOI: 10.1124/jpet.109.153205.

Feldman, Richard I.; Wu, James M.; Polokoff, Mark A.; Kochanny, Monica J.; Dinter, Harald; Zhu, Daguang et al. (2005): Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (20), S. 19867–19874. DOI: 10.1074/jbc.M501367200.

- Feng, Jianhua; Park, Jongsun; Cron, Peter; Hess, Daniel; Hemmings, Brian A. (2004): Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (39), S. 41189–41196. DOI: 10.1074/jbc.M406731200.
- Feuerstein, T. J.; Diener, H.-Ch. (2017): Pharmakologie des Serotonins- Pharmakotherapie primärer Kopfschmerzen. In: Klaus Aktories, Ulrich Förstermann, Franz Hofmann und Klaus Starke (Hg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage, S. 177.
- Fialkow, L.; Chan, C. K.; Downey, G. P. (1997): Inhibition of CD45 during neutrophil activation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158 (11), S. 5409–5417.
- Furge, K. A.; Zhang, Y. W.; Vande Woude, G. F. (2000): Met receptor tyrosine kinase. Enhanced signaling through adapter proteins. In: *Oncogene* 19 (49), S. 5582–5589. DOI: 10.1038/sj.onc.1203859.
- Gagliardi, Paolo Armando; Puliafito, Alberto; Primo, Luca (2018): PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways. In: *Seminars in cancer biology* 48, S. 27–35. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.04.014.
- Gammon, W. R.; Briggaman, R. A.; Inman, A. O.; Queen, L. L.; Wheeler, C. E. (1984): Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 82 (2), S. 139–144.
- Gammon, W. R.; Heise, E. R.; Burke, W. A.; Fine, J. D.; Woodley, D. T.; Briggaman, R. A. (1988): Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen. Evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. In: *The Journal of investigative dermatology* 91 (3), S. 228–232.
- Guo, Ren-Feng; Ward, Peter A. (2005): Role of C5a in inflammatory responses. In: *Annual review of immunology* 23, S. 821–852. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835.
- Gürcan, Hakan M.; Ahmed, A. Razzaque (2009): Efficacy of dapsone in the treatment of pemphigus and pemphigoid. Analysis of current data. In: *American journal of clinical dermatology* 10 (6), S. 383–396. DOI: 10.2165/11310740-000000000-00000.
- Gürcan, Hakan M.; Ahmed, A. Razzaque (2011): Current concepts in the treatment of epidermolysis bullosa acquisita. In: *Expert opinion on pharmacotherapy* 12 (8), S. 1259–1268. DOI: 10.1517/14656566.2011.549127.

Hammers, Christoph M.; Bieber, Katja; Kalies, Kathrin; Banczyk, David; Ellebrecht, Christoph T.; Ibrahim, Saleh M. et al. (2011): Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (10), S. 5043–5050. DOI: 10.4049/jimmunol.1100796.

Hao, Yansheng; Wong, Richard; Feig, Larry A. (2008): RalGDS couples growth factor signaling to Akt activation. In: *Molecular and cellular biology* 28 (9), S. 2851–2859. DOI: 10.1128/MCB.01917-07.

Hellberg, Lars; Samavedam, Unni K. S. R. L.; Holdorf, Karoline; Hänsel, Martin; Recke, Andreas; Beckmann, Tina et al. (2013): Methylprednisolone blocks autoantibody-induced tissue damage in experimental models of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita through inhibition of neutrophil activation. In: *The Journal of investigative dermatology* 133 (10), S. 2390–2399. DOI: 10.1038/jid.2013.91.

Henderson, Kenneth S.; Pritchett-Corning, Kathleen R.; Perkins, Cheryl L.; Banu, Laila A.; Jennings, Steven M.; Francis, Brian C.; Shek, William R. (2015): A Comparison of Mouse Parvovirus 1 Infection in BALB/c and C57BL/6 Mice: Susceptibility, Replication, Shedding, and Seroconversion. In: *Comparative Medicine* 65 (1), S. 5–14.

Hertl, Michael (2018): Dermatologische Grundlagen. In: Gerd Plewig, Thomas Ruzicka, Roland Kaufmann und Michael Hertl (Hg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Bd. 159. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 3–21.

Hirose, Misa; Kasprick, Anika; Beltsiou, Foteini; Dieckhoff Schulze, Katharina; Schulze, Franziska Sophine; Samavedam, Unni Kjsrl et al. (2016): Reduced skin blistering in experimental epidermolysis bullosa acquisita after anti-TNF treatment. In: *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 23. DOI: 10.2119/molmed.2015.00206.

Hirose, Misa; Tiburzy, Benjamin; Ishii, Norito; Pipi, Elena; Wende, Sabina; Rentz, Ellen et al. (2015): Effects of intravenous immunoglobulins on mice with experimental epidermolysis bullosa acquisita. In: *The Journal of investigative dermatology* 135 (3), S. 768–775. DOI: 10.1038/jid.2014.453.

Hirose M et al. (2013): The Allosteric CXCR1/2 Inhibitor DF2156A Improves Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. In: *J Genet Syndr Gene Ther* s3. DOI: 10.4172/2157-7412.S3-005.

<http://www.prestwickchemical.com/libraries-screening-lib-pcl.html>: Prestwick Library. Online verfügbar unter <http://www.prestwickchemical.com/libraries-screening-lib-pcl.html>, zuletzt geprüft am 15.11.2018.

<http://www.selleckchem.com/screening/selective-library.html>: Selleckchem target selective inhibitor library, zuletzt geprüft am 25.02.2018.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10077147#section=InChI>: BX 795. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10077147#section=InChI>, zuletzt geprüft am 27.02.2018.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10296883#section=Computed-Properties>: Sotrastaurin. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10296883#section=Computed-Properties>, zuletzt geprüft am 27.04.2018.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10461815#section=Entrez-Crosslinks>: PHA 665752. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10461815#section=Entrez-Crosslinks>, zuletzt geprüft am 27.04.2018.

https://viamedici.thieme.de/api/images/l/b/r/i/e/f/histo_011900_steckbrief.png: Aufbau der Haut, zuletzt geprüft am 30.03.2017.

<https://www.biolegend.com/en-us/products/fitc-annexin-v-5161>: FITC Annexin V, zuletzt geprüft am 01.03.2018.

<https://www.biolegend.com/en-us/products/zombie-nir-fixable-viability-kit-8657>: Zombie NIR, zuletzt geprüft am 01.03.2018.

<https://www.selleckchem.com/products/bx-795.html>: BX 795, zuletzt geprüft am 10.11.2018.

<https://www.selleckchem.com/products/nu7441.html>: NU 7441, zuletzt geprüft am 10.11.2018.

<https://www.selleckchem.com/products/PHA-665752.html>: PHA-665752, zuletzt geprüft am 10.11.2018.

Ishii, N.; Yoshida, M.; Hisamatsu, Y.; Ishida-Yamamoto, A.; Nakane, H.; Iizuka, H. et al. (2004): Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen. Study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. In: *The British journal of dermatology* 150 (5), S. 843–851. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2004.05933.x.

Ishii, N.; Yoshida, M.; Ishida-Yamamoto, A.; Fritsch, A.; Elfert, S.; Bruckner-Tuderman, L.; Hashimoto, T. (2009): Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy. In: *The British journal of dermatology* 160 (5), S. 1090–1093. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08952.x.

Ishii, Norito; Hamada, Takahiro; Dainichi, Teruki; Karashima, Tadashi; Nakama, Takekuni; Yasumoto, Shinichiro et al. (2010): Epidermolysis bullosa acquisita. What's new? In: *The Journal of dermatology* 37 (3), S. 220–230. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2009.00799.x.

Ishii, Norito; Recke, Andreas; Mihai, Sidonia; Hirose, Misa; Hashimoto, Takashi; Zillikens, Detlef; Ludwig, Ralf J. (2011): Autoantibody-induced intestinal inflammation and weight loss in experimental epidermolysis bullosa acquisita. In: *The Journal of pathology* 224 (2), S. 234–244. DOI: 10.1002/path.2857.

Iwata, Hiroaki; Vorobyev, Artem; Koga, Hiroshi; Recke, Andreas; Zillikens, Detlef; Prost-Squarcioni, Catherine et al. (2018): Meta-analysis of the clinical and immunopathological characteristics and treatment outcomes in epidermolysis bullosa acquisita patients. In: *Orphanet journal of rare diseases* 13 (1), S. 153. DOI: 10.1186/s13023-018-0896-1.

Jacoby, R. O.; Johnson, E. A.; Ball-Goodrich, L.; Smith, A. L.; McKisic, M. D. (1995): Characterization of mouse parvovirus infection by in situ hybridization. In: *Journal of virology* 69 (6), S. 3915–3919.

Jelkmann, W. (2011): Blut. In: Robert F. Schmidt, Florian Lang und Manfred Heckmann (Hg.): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. 31., überarbeitete und aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 477–502.

Kaplan, Mariana J. (2013): Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. In: *Arthritis research & therapy* 15 (5), S. 219. DOI: 10.1186/ar4325.

Kasama, T.; Strieter, R. M.; Standiford, T. J.; Burdick, M. D.; Kunkel, S. L. (1993): Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. In: *The Journal of experimental medicine* 178 (1), S. 63–72.

Kasperkiewicz, Michael; Müller, Ralf; Manz, Rudolf; Magens, Moritz; Hammers, Christoph M.; Somlai, Csaba et al. (2011): Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets. In: *Blood* 117 (23), S. 6135–6142. DOI: 10.1182/blood-2010-10-314609.

Kasperkiewicz, Michael; Nimmerjahn, Falk; Wende, Sabina; Hirose, Misa; Iwata, Hiroaki; Jonkman, Marcel F. et al. (2012): Genetic identification and functional validation of FcγRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. In: *The Journal of pathology* 228 (1), S. 8–19. DOI: 10.1002/path.4023.

Kasperkiewicz, Michael; Sadik, Christian D.; Bieber, Katja; Ibrahim, Saleh M.; Manz, Rudolf A.; Schmidt, Enno et al. (2016): Epidermolysis Bullosa Acquisita. From Pathophysiologie to Novel

Therapeutic Options. In: *The Journal of investigative dermatology* 136 (1), S. 24–33. DOI: 10.1038/JID.2015.356.

Kawakami, Yuko; Nishimoto, Hajime; Kitaura, Jiro; Maeda-Yamamoto, Mari; Kato, Roberta M.; Littman, Dan R. et al. (2004): Protein kinase C beta11 regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (46), S. 47720–47725. DOI: 10.1074/jbc.M408797200.

Kiefer, F.; Brumell, J.; Al-Alawi, N.; Latour, S.; Cheng, A.; Veillette, A. et al. (1998): The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signaling in macrophages and neutrophils. In: *Molecular and cellular biology* 18 (7), S. 4209–4220.

Kim, Donghyuk; Haynes, Christy L. (2013): On-chip evaluation of neutrophil activation and neutrophil-endothelial cell interaction during neutrophil chemotaxis. In: *Analytical chemistry* 85 (22), S. 10787–10796. DOI: 10.1021/ac4020098.

Kim, J. H.; Kim, Y. H.; Kim, S.; Noh, E. B.; Kim, S-E; Vorobyev, A. et al. (2013): Serum levels of anti-type VII collagen antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with epidermolysis bullosa acquisita are correlated with the severity of skin lesions. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 27 (2), e224-30. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2012.04617.x.

Kim, Jong Hoon; Kim, Yeon Hee; Kim, Soo-Chan (2011): Epidermolysis bullosa acquisita. A retrospective clinical analysis of 30 cases. In: *Acta dermato-venereologica* 91 (3), S. 307–312. DOI: 10.2340/00015555-1065.

Klebe, Gerhard (2009): 19.5 Absorptionsprofile von Säuren und Basen. In: Gerhard Klebe (Hg.): *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, S. 288–290.

Komorowski, Lars; Müller, Ralf; Vorobyev, Artem; Probst, Christian; Recke, Andreas; Jonkman, Marcel F. et al. (2013): Sensitive and specific assays for routine serological diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 68 (3), e89-95. DOI: 10.1016/j.jaad.2011.12.032.

Kovács, Miklós; Németh, Tamás; Jakus, Zoltán; Sitaru, Cassian; Simon, Edina; Futosi, Krisztina et al. (2014): The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. In: *The Journal of experimental medicine* 211 (10), S. 1993–2011. DOI: 10.1084/jem.20132496.

Kuleshov, Maxim V.; Jones, Matthew R.; Rouillard, Andrew D.; Fernandez, Nicolas F.; Duan, Qiaonan; Wang, Zichen et al. (2016): Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. In: *Nucleic acids research* 44 (W1), W90-7. DOI: 10.1093/nar/gkw377.

Kulkarni, Suhasini; Sitaru, Cassian; Jakus, Zoltan; Anderson, Karen E.; Damoulakis, George; Davidson, Keith et al. (2011): PI3K β plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. In: *Science signaling* 4 (168), ra23. DOI: 10.1126/scisignal.2001617.

Kunzi-Rapp, Karin (2012): Topical propranolol therapy for infantile hemangiomas. In: *Pediatric dermatology* 29 (2), S. 154–159. DOI: 10.1111/j.1525-1470.2011.01615.x.

Kushniruk, William (1973): The immunopathology of epidermolysis bullosa acquisita. In: *Canadian Medical Association Journal* 108 (9), S. 1143–1146.

Kusner, D. J.; Aucott, J. N.; Franceschi, D.; Sarasua, M. M.; Spagnuolo, P. J.; King, C. H. (1991): Protease priming of neutrophil superoxide production. Effects on membrane lipid order and lateral mobility. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (25), S. 16465–16471.

Kwon; Younggil (2004): 4.2.4. Partition and Distribution Coefficients. In: Kwon und Younggil (Hg.): *Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug metabolism for industrial scientists*. New York: Kluwer Academic, S. 44.

Lapiere, J. C.; Chen, J. D.; Iwasaki, T.; Hu, L.; Uitto, J.; Woodley, D. T. (1994): Type VII collagen specifically binds fibronectin via a unique subdomain within the collagenous triple helix. In: *The Journal of investigative dermatology* 103 (5), S. 637–641.

Lapiere, J. C.; Woodley, D. T.; Parente, M. G.; Iwasaki, T.; Wynn, K. C.; Christiano, A. M.; Uitto, J. (1993): Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. In: *J. Clin. Invest.* 92 (4), S. 1831–1839. DOI: 10.1172/JCI116774.

Léauté-Labrèze, Christine; Hoeger, Peter; Mazereeuw-Hautier, Juliette; Guibaud, Laurent; Baselga, Eulalia; Posiunas, Gintas et al. (2015): A randomized, controlled trial of oral propranolol in infantile hemangioma. In: *The New England journal of medicine* 372 (8), S. 735–746. DOI: 10.1056/NEJMoa1404710.

Li, Yikun; Wang, Xuerong; Yue, Ping; Tao, Hui; Ramalingam, Suresh S.; Owonikoko, Taofeek K. et al. (2013): Protein phosphatase 2A and DNA-dependent protein kinase are involved in mediating rapamycin-induced Akt phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (19), S. 13215–13224. DOI: 10.1074/jbc.M113.463679.

- Love, Michael I.; Huber, Wolfgang; Anders, Simon (2014): Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. In: *Genome biology* 15 (12), S. 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Ludwig, Ralf J. (2013): Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita. In: *ISRN dermatology* 2013, S. 812029. DOI: 10.1155/2013/812029.
- Ludwig, Ralf J. (2017): Signalling and targeted therapy of inflammatory cells in epidermolysis bullosa acquisita. In: *Experimental dermatology* 26 (12), S. 1179–1186. DOI: 10.1111/exd.13335.
- Ludwig, Ralf J.; Recke, Andreas; Bieber, Katja; Müller, Susen; Marques, Andreia de Castro; Banczyk, David et al. (2011): Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (1), S. 167–176. DOI: 10.1038/jid.2010.248.
- Lüllmann-Rauch, Renate (2015): 22.1 Hautdecke. In: Renate Lüllmann-Rauch und Esther Asan (Hg.): Taschenlehrbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme, 588–568.
- Luttmann, W.; Bratke, K.; Kupper, M. (2006a): 3.6 Analysis. In: W. Luttmann, K. Bratke, M. Kupper und D. Myrtek (Hg.): Immunology: Elsevier Science, S. 81–84.
- Luttmann, W.; Kupper, M.; Bratke, K. (2006b): 3.1 How Does That Work. In: W. Luttmann, K. Bratke, M. Kupper und D. Myrtek (Hg.): Immunology: Elsevier Science, S. 63–66.
- McKisic, M. D.; Lancki, D. W.; Otto, G.; Padrid, P.; Snook, S.; Cronin, D. C. et al. (1993): Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells. In: *The Journal of Immunology* 150 (2), S. 419–428.
- Mihai, Sidonia; Chiriac, Mircea T.; Takahashi, Kazue; Thurman, Joshua M.; Holers, V. Michael; Zillikens, Detlef et al. (2007): The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (10), S. 6514–6521.
- Monaco, Claudia; Nanchahal, Jagdeep; Taylor, Peter; Feldmann, Marc (2015): Anti-TNF therapy: past, present and future. In: *International immunology* 27 (1), S. 55–62. DOI: 10.1093/intimm/dxu102.
- Morris, N. P.; Keene, D. R.; Glanville, R. W.; Bentz, H.; Burgeson, R. E. (1986): The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (12), S. 5638–5644.
- Müller, Ralf; Dahler, Christiane; Möbs, Christian; Wenzel, Elke; Eming, Rüdiger; Messer, Gerald et al. (2010): T and B cells target identical regions of the non-collagenous domain 1 of type VII collagen

in epidermolysis bullosa acquisita. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 135 (1), S. 99–107. DOI: 10.1016/j.clim.2009.12.010.

Murphy, Kenneth; Weaver, Casey (2018a): Autoimmunität und Transplantation. In: Kenneth Murphy und Casey Weaver (Hg.): *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 835–911. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4_15.

Murphy, Kenneth; Weaver, Casey (2018b): Die induzierten Reaktionen der angeborenen Immunität. In: Kenneth Murphy und Casey Weaver (Hg.): *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 95–173.

Murphy, Kenneth; Weaver, Casey (2018c): Grundbegriffe der Immunologie. In: Kenneth Murphy und Casey Weaver (Hg.): *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 3–46. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4_1.

Oetjen, E. (2017): Schilddrüsentherapeutika. In: Klaus Aktories, Ulrich Förstermann, Franz Hofmann und Klaus Starke (Hg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage, S. 651.

Oetjen, E.; Gierschik, P. (2017): Nebennierenrindenhormone. In: Klaus Aktories, Ulrich Förstermann, Franz Hofmann und Klaus Starke (Hg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage, S. 606.

Ogata, H.; Goto, S.; Sato, K.; Fujibuchi, W.; Bono, H.; Kanehisa, M. (1999): KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. In: *Nucleic acids research* 27 (1), S. 29–34.

Okada, Yukinori; Terao, Chikashi; Ikari, Katsunori; Kochi, Yuta; Ohmura, Koichiro; Suzuki, Akari et al. (2012): Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. In: *Nature genetics* 44 (5), S. 511–516. DOI: 10.1038/ng.2231.

Oostingh, Gertie Janneke; Sitaru, Cassian; Zillikens, Detlef; Kromminga, Arno; Lührs, Hardi (2005): Subclass distribution of type VII collagen-specific autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. In: *Journal of dermatological science* 37 (3), S. 182–184. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2004.11.010.

Parente, M. G.; Chung, L. C.; Ryyanen, J.; Woodley, D. T.; Wynn, K. C.; Bauer, E. A. et al. (1991): Human type VII collagen. CDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16), S. 6931–6935.

- Pletscher-Frankild, Sune; Pallejà, Albert; Tsafou, Kalliopi; Binder, Janos X.; Jensen, Lars Juhl (2015): DISEASES: text mining and data integration of disease-gene associations. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 74, S. 83–89. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.11.020.
- Plewig, Gerd; Braun-Falco, Otto (Hg.) (2015): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Mit 341 Tabellen. 6. überarb. u. erw. Aufl., 1. korr. Nachdruck. Berlin: Springer.
- Recke, Andreas; Sitaru, Cassian; Vidarsson, Gestur; Evensen, Mirja; Chiriac, Mircea T.; Ludwig, Ralf J.; Zillikens, Detlef (2010): Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen. Induction of dermal-epidermal separation. In: *Journal of autoimmunity* 34 (4), S. 435–444. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.11.003.
- Remington, Jennifer; Chen, Mei; Burnett, Julie; Woodley, David T. (2008): Autoimmunity to type VII collagen. Epidermolysis bullosa acquisita. In: *Current directions in autoimmunity* 10, S. 195–205. DOI: 10.1159/000131455.
- Richer, Barbara Christine; Seeger, Karsten (2014): The hinge region of type VII collagen is intrinsically disordered. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 36, S. 77–83. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.04.006.
- Robak, T.; Gladalska, A.; Stepień, H. (1998): The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. In: *European cytokine network* 9 (2), S. 145–154.
- Röcken, Martin; Biedermann, Tilo (2018): Immunologische Grundlagen. In: Gerd Plewig, Thomas Ruzicka, Roland Kaufmann und Michael Hertl (Hg.): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Bd. 110. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 23–34.
- Roenigk, H. H., JR; Ryan, J. G.; Bergfeld, W. F. (1971): Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. In: *Archives of dermatology* 103 (1), S. 1–10.
- Sadeghi, Hengameh; Lockmann, Anike; Hund, Anna-Carina; Samavedam, Unni K. S. R. L.; Pipi, Elena; Vafia, Katerina et al. (2015): Caspase-1-independent IL-1 release mediates blister formation in autoantibody-induced tissue injury through modulation of endothelial adhesion molecules. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (8), S. 3656–3663. DOI: 10.4049/jimmunol.1402688.
- Sadik, Christian; Zillikens, Detlef; Hertl, Michael (2018): Bullöse Autoimmundermatosen. In: Gerd Plewig, Thomas Ruzicka, Roland Kaufmann und Michael Hertl (Hg.): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Bd. 355. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 839–873.

- Sadler, E.; Schafleitner, B.; Lanschuetzer, C.; Laimer, M.; Pohla-Gubo, G.; Hametner, R. et al. (2007): Treatment-resistant classical epidermolysis bullosa acquisita responding to rituximab. In: *The British journal of dermatology* 157 (2), S. 417–419. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08048.x.
- Saleh, Marwah Adly; Ishii, Ken; Kim, Yool-Ja; Murakami, Akihiro; Ishii, Norito; Hashimoto, Takashi et al. (2011): Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. In: *Journal of dermatological science* 62 (3), S. 169–175. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.03.003.
- Sallmyr, Annahita; Miller, Anna; Gabdoulkhakova, Aida; Safronova, Valentina; Henriksson, Gunnel; Bredberg, Anders (2004): Expression of DNA-dependent protein kinase in human granulocytes. In: *Cell research* 14 (4), S. 331–340. DOI: 10.1038/sj.cr.7290233.
- Samavedam, Unni K.; Mitschker, Nina; Kasprick, Anika; Bieber, Katja; Schmidt, Enno; Laskay, Tamás et al. (2018): Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK As a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 249. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00249.
- Samavedam, Unni Krishna S. R. L.; Iwata, Hiroaki; Müller, Susen; Schulze, Franziska S.; Recke, Andreas; Schmidt, Enno et al. (2014): GM-CSF modulates autoantibody production and skin blistering in experimental epidermolysis bullosa acquisita. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (2), S. 559–571. DOI: 10.4049/jimmunol.1301556.
- Sami, Naveed (2015): Mycophenolate mofetil (MMF) in the treatment of epidermolysis bullosa acquisita (EBA) long-term follow-up. In: *JAAD case reports* 1 (5), S. 321–323. DOI: 10.1016/j.jdc.2015.07.007.
- Sarbassov, D. D.; Guertin, David A.; Ali, Siraj M.; Sabatini, David M. (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 307 (5712), S. 1098–1101. DOI: 10.1126/science.1106148.
- Schmidt, Enno; Benoit, Sandrine; Bröcker, Eva-Bettina; Zillikens, Detlef; Goebeler, Matthias (2006): Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab. In: *Archives of dermatology* 142 (2), S. 147–150. DOI: 10.1001/archderm.142.2.147.
- Schmidt, Enno; Zillikens, Detlef (2010): Immunoabsorption in dermatology. In: *Archives of dermatological research* 302 (4), S. 241–253. DOI: 10.1007/s00403-009-1024-9.

- Schmidt, Enno; Zillikens, Detlef (2013): Pemphigoid diseases. In: *Lancet (London, England)* 381 (9863), S. 320–332. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61140-4.
- Schneider, Markus; Reimer, Andreas; Cremer, Hansjoerg; Ruef, Peter (2014): Topical treatment with propranolol gel as a supplement to the existing treatment of hemangiomas. In: *World journal of pediatrics : WJP* 10 (4), S. 313–317. DOI: 10.1007/s12519-014-0509-6.
- Scortegagna, Marzia; Lau, Eric; Zhang, Tongwu; Feng, Yongmei; Sereduk, Chris; Yin, Hongwei et al. (2015): PDK1 and SGK3 Contribute to the Growth of BRAF-Mutant Melanomas and Are Potential Therapeutic Targets. In: *Cancer research* 75 (7), S. 1399–1412. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2785.
- Sezin, Tanya; Krajewski, Matthias; Wutkowski, Adam; Mousavi, Sadegh; Chakievska, Lenche; Bieber, Katja et al. (2017): The Leukotriene B4 and its Receptor BLT1 Act as Critical Drivers of Neutrophil Recruitment in Murine Bullous Pemphigoid-Like Epidermolysis Bullosa Acquisita. In: *The Journal of investigative dermatology* 137 (5), S. 1104–1113. DOI: 10.1016/j.jid.2016.12.021.
- Shen, H.; Schultz, M.; Kruh, G. D.; Tew, K. D. (1998): Increased expression of DNA-dependent protein kinase confers resistance to adriamycin. In: *Biochimica et biophysica acta* 1381 (2), S. 131–138.
- Shimanovich, Iakov; Mihai, Sidonia; Oostingh, Gertie J.; Ilenchuk, T. Toney; Bröcker, Eva-B; Opendakker, Ghislain et al. (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. In: *The Journal of pathology* 204 (5), S. 519–527. DOI: 10.1002/path.1674.
- Sitaru, Ana Gabriela; Sesarman, Alina; Mihai, Sidonia; Chiriac, Mircea T.; Zillikens, Detlef; Hultman, Per et al. (2010): T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (3), S. 1596–1603. DOI: 10.4049/jimmunol.0901412.
- Sitaru, C.; Chiriac, M. T.; Mihai, S.; Buning, J.; Gebert, A.; Ishiko, A.; Zillikens, D. (2006): Induction of Complement-Fixing Autoantibodies against Type VII Collagen Results in Subepidermal Blistering in Mice. In: *The Journal of Immunology* 177 (5), S. 3461–3468. DOI: 10.4049/jimmunol.177.5.3461.
- Sitaru, Cassian; Mihai, Sidonia; Otto, Christoph; Chiriac, Mircea T.; Hausser, Ingrid; Dotterweich, Barbara et al. (2005): Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. In: *J. Clin. Invest.* 115 (4), S. 870–878. DOI: 10.1172/JCI200521386.

- Skvara, Hans; Dawid, Markus; Kleyn, Elise; Wolff, Barbara; Meingassner, Josef G.; Knight, Hilary et al. (2008): The PKC inhibitor AEB071 may be a therapeutic option for psoriasis. In: *J. Clin. Invest.* 118 (9), S. 3151–3159. DOI: 10.1172/JCI35636.
- Srinivas, Girish; Möller, Steffen; Wang, Jun; Künzel, Sven; Zillikens, Detlef; Baines, John F.; Ibrahim, Saleh M. (2013): Genome-wide mapping of gene-microbiota interactions in susceptibility to autoimmune skin blistering. In: *Nature communications* 4, S. 2462. DOI: 10.1038/ncomms3462.
- Starke, Klaus (2017): Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme- Pharmakotherapie des Asthma bronchiale- Doping. In: Klaus Aktories, Ulrich Förstermann, Franz Hofmann und Klaus Starke (Hg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage, S. 158.
- Sunada, Shigeaki; Kanai, Hideki; Lee, Younhyun; Yasuda, Takeshi; Hiraakawa, Hirokazu; Liu, Cuihua et al. (2016): Nontoxic concentration of DNA-PK inhibitor NU7441 radio-sensitizes lung tumor cells with little effect on double strand break repair. In: *Cancer science* 107 (9), S. 1250–1255. DOI: 10.1111/cas.12998.
- Tanaka, H.; Ishida-Yamamoto, A.; Hashimoto, T.; Hiramoto, K.; Harada, T.; Kawachi, Y. et al. (1997): A novel variant of acquired epidermolysis bullosa with autoantibodies against the central triple-helical domain of type VII collagen. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 77 (6), S. 623–632.
- Toker, Alex (2003): PDK-1 and protein kinase C phosphorylation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 233, S. 171–189. DOI: 10.1385/1-59259-397-6:171.
- Uitto, J.; Chung-Honet, L. C.; Christiano, A. M. (1992): Molecular biology and pathology of type VII collagen. In: *Experimental dermatology* 1 (1), S. 2–11.
- Vodegel, R. M.; Jonkman, M. F.; Pas, H. H.; Jong, M. C. J. M. de (2004): U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. In: *The British journal of dermatology* 151 (1), S. 112–118. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2004.06006.x.
- Weckbecker, Gisbert; Pally, Charles; Beerli, Christian; Burkhart, Christoph; Wieczorek, Grazyna; Metzler, Barbara et al. (2010): Effects of the novel protein kinase C inhibitor AEB071 (Sotrastaurin) on rat cardiac allograft survival using single agent treatment or combination therapy with cyclosporine, everolimus or FTY720. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 23 (5), S. 543–552. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.01015.x.

- Wedepohl, Stefanie; Beceren-Braun, Figen; Riese, Sebastian; Buscher, Konrad; Enders, Sven; Bernhard, Gesche et al. (2012): L-selectin--a dynamic regulator of leukocyte migration. In: *European journal of cell biology* 91 (4), S. 257–264. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.02.007.
- Wegener, Henrik; Leineweber, Sarah; Seeger, Karsten (2013): The vWFA2 domain of type VII collagen is responsible for collagen binding. In: *Biochemical and biophysical research communications* 430 (2), S. 449–453. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.119.
- Wegener, Henrik; Paulsen, Hauke; Seeger, Karsten (2014): The cysteine-rich region of type VII collagen is a cystine knot with a new topology. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (8), S. 4861–4869. DOI: 10.1074/jbc.M113.531327.
- Woodley, D. T.; Briggaman, R. A.; O'Keefe, E. J.; Inman, A. O.; Queen, L. L.; Gammon, W. R. (1984): Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. In: *The New England journal of medicine* 310 (16), S. 1007–1013. DOI: 10.1056/NEJM198404193101602.
- Woodley, D. T.; Burgeson, R. E.; Lunstrum, G.; Bruckner-Tuderman, L.; Reese, M. J.; Briggaman, R. A. (1988): Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. In: *J. Clin. Invest.* 81 (3), S. 683–687. DOI: 10.1172/JCI113373.
- Wullink, Bart; Pas, Hendri H.; van der Worp, Roelofje J.; Kuijjer, Roel; Los, Leonoor I. (2015): Type VII Collagen Expression in the Human Vitreoretinal Interface, Corpora Amylacea and Inner Retinal Layers. In: *PLoS one* 10 (12), e0145502. DOI: 10.1371/journal.pone.0145502.
- Xu, Guangqi; Lv, Renrong; Zhao, Zhongfang; Huo, Ran (2012): Topical propranolol for treatment of superficial infantile hemangiomas. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 67 (6), S. 1210–1213. DOI: 10.1016/j.jaad.2012.03.009.
- Yang, Baoqi; Wang, Chong; Wang, Na; Pan, Futang; Chen, Shengli; Zhou, Guizhi et al. (2012): Childhood epidermolysis bullosa acquisita. Report of a Chinese case. In: *Pediatric dermatology* 29 (5), S. 614–617. DOI: 10.1111/j.1525-1470.2011.01509.x.
- Yaoita, H.; Briggaman, R. A.; Lawley, T. J.; Provost, T. T.; Katz, S. I. (1981): Epidermolysis bullosa acquisita. Ultrastructural and immunological studies. In: *The Journal of investigative dermatology* 76 (4), S. 288–292.
- Yokoyama, Tomoaki; Amagai, Masayuki (2010): Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice. In: *The Journal of dermatology* 37 (3), S. 205–213. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2009.00797.x.

Zumelzu, Coralie; Le Roux-Villet, Christelle; Loiseau, Pascale; Busson, Marc; Heller, Michel; Aucouturier, Françoise et al. (2011): Black patients of African descent and HLA-DRB1*15:03 frequency overrepresented in epidermolysis bullosa acquisita. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (12), S. 2386–2393. DOI: 10.1038/jid.2011.231.

7. Anhänge

Schleswig-Holstein
Der echte Norden



Schleswig-Holstein
Ministerium für Energie-
wende, Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Frau
Dr. Katja Bieber
Institut für Experimentelle Dermatologie
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Zeichen:
Ihr Antrag vom: 20.10.2015
Mein Zeichen: V 242 - 79228/2015 (108-8/15)
Meine Nachricht vom: /

Anja Hinz
Anja.Hinz@melur.landsh.de
Telefon: +49 431 988-7128
Fax: +49-431-988-6-157128

nachrichtlich:

Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

09. Dezember 2015

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Inhibition von intrazellulären Signalwegen bei Epidermolysis bullosa acquisita
zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 528 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Dezember 2018 befristet.
3. Ort der Durchführung:
Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung

Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |
poststelle@melur.landsh.de | www.melur.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch verschlüsselte
Dokumente.

4. Leiterin des Versuchsvorhabens:
Frau Dr. Katja Bieber
5. Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Ralf Ludwig
6. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihr Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
7. Verantwortlicher Tierarzt nach § 28 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125):
Herr Dr. B. Schmelting
8. Weitere Nebenbestimmungen:
Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf die Stufe 1. Anschließend ist ein Zwischenbericht vorzulegen.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

Die Bestimmungen des § 8 des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVObI. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten. Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 16 der Tierschutz-Versuchstierverordnung genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage bei dem Schleswig-Holsteinischen Verwaltungsgericht, Brockdorff-Rantau-Straße 13, 24837 Schleswig, schriftlich, in elektronischer Form oder zur Niederschrift der/des Urkundsbeamtin/Urkundsbeamten der Geschäftsstelle erhoben werden.

Hinweis:

Bei der Verwendung der elektronischen Form sind besondere Voraussetzungen zu beachten (vgl. die Landesverordnung über den elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften vom 12.12.2006 (GVObI. 2006, 361) in der z. Zt. geltenden Fassung. *Hiernach wird die elektronische Form insbesondere durch eine qualifiziert signierte Datei gewahrt, die nach den Maßgaben der genannten Landesverordnung übermittelt wird. Weitere Informationen zum elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften sind auf der Internetseite www.justizpoststelle.schleswig-holstein.de abrufbar.*

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Sekulla



Teilnahmebescheinigung

Frau Pia Stüssel,

hat vom 26.09. – 04.10.2016 an einem 40-stündigen Kurs der Universität zu Lübeck

„Einführung in die Versuchstierkunde“

erfolgreich teilgenommen (20h Theorie, 20 h Praxis mit abschließender schriftlicher Leistungskontrolle).

Folgende Kursinhalte wurden vermittelt (mit * gekennzeichnete Teile ebenfalls praktisch):

Einführung in die Versuchstierkunde /Tierschutz und Tierversuche

Ersatz- und Ergänzungsmethoden

Biologie der wichtigsten Versuchstierarten

(Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schwein, Schaf, Fische)

Biologie, Anatomie, Physiologie, Verhalten (Maus, Ratte)* / Umgang mit Versuchstieren (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Fische)* / Erkennen von Schmerzen, Leiden und Schäden / Nager: Ernährung und Fütterung / Nager: Zucht und Genetik

Pflege und Haltung

Tierhaltungsräume, Barriere*, Haltungseinheiten, Käfigsysteme*, Mindestraumbedarf / Fütterung

Hygiene in Versuchstierhaltungen

Reinigung, Desinfektion / Mikrobiologischer Status von Versuchstieren / Gesundheitsüberwachung des Tierbestandes, Verhinderung von Infektionen / Versuchstierkrankheiten (Erkennen, Behandeln, Schutzmaßnahmen / Einflüsse auf Versuchsergebnisse) / Arbeiten und Hygieneprinzip unter Umsetzstationen*

Ethische Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

Rechtliche Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

2010/63EU und Umsetzung durch das Tierschutzgesetz, Tierschutzversuchstierverordnung, Versuchstiermeldeverordnung / Tierschutzbeauftragter / §15 Kommission / Ersatz- und Ergänzungsmethoden

Durchführung und Planung von Tierversuchen

Versuchsplanung und Protokollführung* / Literaturrecherche / Biometrische Statistik / analoge und digitale Dokumentation* / Narkose*, Schmerzausschaltung / Abbruchkriterien zur Leidensbegrenzung / Sicheres handling von Nagern, Kaninchen und Schaf* / Methoden der Applikation Nager (i.p., s.c., i.v., p.o.)* und Kaninchen (s.c., i.m., i.v.)*, Probenentnahme Nager (retrobulbär, mandibulär, intrakardial)* / Tierschutzgerechte Tötung von Versuchstieren* / Sektion Maus* / 3R-Prinzip / Weiterbildungsmöglichkeiten

Lübeck, den 12.11.2016

Universität zu Lübeck
Tierschutzbeauftragter
Dr. med. vet. Barthel Schmelting, Ph.D.
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

IM FOCUS DAS LEBEN
WISSEN SCHÜTZT TIERE

Tabelle A.1: invers exprimierte Gene

ENSEMBLID	baseMean (ICvsPROP)	log2FoldChange (ICvsPROP)	pvalue (ICvsPROP)	padj (ICvsPROP)	GeneSymbol
ENSG00000133048	5.94E+03	2.39E+00	6.07E-23	8.45E-20	CHI3L1
ENSG00000182141	3.67E+02	1.91E+00	5.79E-13	2.02E-10	ZNF708
ENSG00000137801	1.47E+03	1.24E+00	2.16E-07	2.60E-05	THBS1
ENSG00000185736	7.49E+01	9.66E+00	7.36E-35	7.18E-31	ADARB2
ENSG00000167034	2.22E+02	1.63E+00	1.30E-07	1.62E-05	NKX3-1
ENSG00000255587	4.09E+02	1.42E+00	5.68E-07	5.95E-05	RAB44
ENSG00000100376	2.61E+02	2.46E+00	3.92E-17	2.25E-14	FAM118A
ENSG00000171617	2.34E+02	3.27E+00	1.90E-24	4.62E-21	ENC1
ENSG00000116991	5.65E+02	-1.15E+00	2.99E-06	2.53E-04	SIPA1L2
ENSG00000106683	2.02E+02	-4.56E+00	8.87E-33	4.32E-29	LIMK1
ENSG00000112759	2.57E+02	1.76E+00	2.13E-10	4.71E-08	SLC29A1
ENSG00000268758	3.04E+02	1.53E+00	5.93E-08	7.80E-06	ADGRE4P
ENSG00000115896	9.97E+01	1.99E+00	3.35E-07	3.79E-05	PLCL1
ENSG00000102755	3.83E+02	-1.88E+00	1.29E-05	8.27E-04	FLT1
ENSG00000132530	4.08E+02	1.22E+00	2.19E-06	1.94E-04	XAF1
ENSG00000133317	2.13E+02	1.17E+00	6.33E-05	2.79E-03	LGALS12
ENSG00000145730	1.02E+02	-3.47E+00	2.52E-18	1.64E-15	PAM
ENSG00000164308	1.65E+02	2.12E+00	1.52E-10	3.43E-08	ERAP2
ENSG00000131238	9.92E+02	-1.62E+00	3.09E-11	8.59E-09	PPT1
ENSG00000277117	2.19E+02	-2.71E+00	6.26E-14	3.05E-11	
ENSG00000147394	3.41E+02	1.96E+00	8.22E-11	1.94E-08	ZNF185
ENSG00000233791	2.11E+02	1.22E+00	1.30E-04	4.70E-03	LINC01136
ENSG00000120129	4.85E+03	7.86E-01	1.49E-03	2.74E-02	DUSP1
ENSG00000243753	4.18E+02	-2.46E+00	5.11E-19	3.56E-16	HLA-L
ENSG00000105366	9.49E+01	1.54E+00	8.52E-06	5.93E-04	SIGLEC8
ENSG00000183625	2.93E+02	-9.48E-01	3.89E-04	1.04E-02	CCR3
ENSG00000160223	3.72E+02	-2.38E+00	4.11E-12	1.33E-09	ICOSLG
ENSG00000173801	3.79E+02	2.90E+00	3.35E-14	1.72E-11	JUP
ENSG00000166949	1.25E+03	-2.40E+00	4.01E-18	2.44E-15	SMAD3
ENSG00000136003	4.41E+02	9.95E-01	1.99E-04	6.42E-03	ISCU
ENSG00000160271	3.78E+03	-1.17E+00	5.11E-05	2.37E-03	RALGDS
ENSG00000168685	1.67E+02	-2.09E+00	2.92E-11	8.37E-09	IL7R
ENSG00000138496	1.51E+03	7.48E-01	1.36E-03	2.57E-02	PARP9
ENSG00000133055	9.42E+01	2.70E+00	5.39E-12	1.70E-09	MYBPH
ENSG00000139629	1.54E+02	1.43E+00	3.84E-06	3.17E-04	GALNT6
ENSG00000105205	9.95E+01	1.29E+00	1.60E-04	5.45E-03	CLC
ENSG00000254789	4.64E+01	-2.10E+00	2.58E-06	2.23E-04	
ENSG00000254838	3.25E+02	1.78E+00	7.02E-11	1.75E-08	GVINP1
ENSG00000170160	3.28E+01	4.79E+00	2.05E-13	7.69E-11	CCDC144A
ENSG00000107736	3.30E+02	1.01E+00	1.36E-04	4.80E-03	CDH23
ENSG00000101307	3.42E+03	8.74E-01	1.20E-04	4.49E-03	SIRPB1
ENSG00000211899	1.21E+02	1.75E+00	8.34E-08	1.07E-05	IGHM
ENSG00000121691	8.91E+02	1.15E+00	1.85E-06	1.67E-04	CAT
ENSG00000197119	3.19E+02	1.22E+00	1.35E-05	8.43E-04	SLC25A29
ENSG00000136250	1.35E+03	-7.27E-01	1.99E-03	3.39E-02	AOAH
ENSG00000166147	8.17E+01	4.21E+00	4.98E-22	5.39E-19	FBN1
ENSG00000189337	3.93E+01	-1.73E+00	4.92E-04	1.25E-02	KAZN
ENSG00000159086	1.96E+02	1.25E+00	3.76E-05	1.89E-03	PAXBP1

ENSG00000135953	6.00E+01	-1.25E+00	1.23E-03	2.44E-02	MFSD9
ENSG00000170581	2.25E+03	1.08E+00	4.24E-06	3.38E-04	STAT2
ENSG00000117226	2.59E+02	1.44E+00	3.78E-07	4.19E-05	GBP3
ENSG00000145214	7.66E+01	-1.48E+00	1.33E-04	4.74E-03	DGKQ
ENSG00000135679	2.78E+03	-9.90E-01	2.66E-04	8.06E-03	MDM2
ENSG00000106460	6.71E+01	-2.13E+00	6.01E-07	6.16E-05	TMEM106B
ENSG00000148200	6.76E+02	-1.10E+00	5.68E-06	4.39E-04	NR6A1
ENSG00000131042	7.98E+03	8.00E-01	4.40E-04	1.14E-02	LILRB2
ENSG00000059378	3.43E+02	8.70E-01	8.65E-04	1.87E-02	PARP12
ENSG00000001084	2.29E+02	1.05E+00	3.44E-03	4.88E-02	GCLC
ENSG00000171940	5.04E+03	6.72E-01	2.84E-03	4.28E-02	ZNF217
ENSG00000169330	3.60E+01	1.98E+00	4.62E-05	2.21E-03	KIAA1024
ENSG00000158882	1.21E+02	-1.09E+00	5.46E-04	1.33E-02	TOMM40L
ENSG00000140450	5.94E+02	1.11E+00	2.75E-04	8.20E-03	ARRDC4
ENSG00000255328	1.18E+02	1.26E+00	2.50E-04	7.64E-03	
ENSG00000022567	3.88E+03	8.36E-01	4.65E-04	1.20E-02	SLC45A4
ENSG00000125462	1.97E+02	-1.62E+00	1.55E-04	5.33E-03	C1orf61
ENSG00000115602	7.32E+01	1.48E+00	6.80E-05	2.97E-03	IL1RL1
ENSG00000165689	8.51E+01	1.62E+00	8.86E-06	6.05E-04	SDCCAG3
ENSG00000166394	4.04E+01	4.44E+00	4.04E-11	1.06E-08	CYB5R2
ENSG00000117280	1.64E+02	-1.68E+00	1.99E-08	2.85E-06	RAB29
ENSG00000147443	1.30E+02	9.28E-01	3.58E-03	4.96E-02	DOK2
ENSG00000171368	9.72E+01	-4.29E+00	4.70E-24	7.80E-21	TPPP
ENSG00000272578	6.44E+01	-1.61E+00	6.05E-04	1.44E-02	
ENSG00000211598	2.43E+01	2.26E+00	9.66E-05	3.86E-03	IGKV4-1
ENSG00000211592	1.45E+02	1.28E+00	2.50E-04	7.64E-03	IGKC
ENSG00000096717	4.60E+02	-1.31E+00	6.16E-07	6.25E-05	SIRT1
ENSG00000099860	2.85E+03	-9.87E-01	6.85E-04	1.56E-02	GADD45B
ENSG00000073464	5.48E+01	1.60E+00	3.47E-04	9.59E-03	CLCN4
ENSG00000143878	8.90E+02	8.43E-01	1.57E-03	2.86E-02	RHOB
ENSG00000164683	5.14E+01	-1.79E+00	7.41E-05	3.17E-03	HEY1
ENSG00000152117	1.47E+02	1.78E+00	3.57E-07	4.00E-05	
ENSG00000214894	6.35E+01	2.84E+00	1.45E-09	2.72E-07	LINC00243
ENSG00000127528	5.33E+02	1.28E+00	4.36E-05	2.11E-03	KLF2
ENSG00000198964	2.96E+02	-9.70E-01	7.13E-04	1.62E-02	SGMS1
ENSG00000274602	1.18E+02	1.53E+00	3.41E-06	2.87E-04	PI4KAP1
ENSG00000119862	2.22E+02	-1.09E+00	9.79E-05	3.88E-03	LGALS1
ENSG00000205609	1.23E+02	-1.54E+00	1.23E-06	1.17E-04	EIF3CL
ENSG00000211697	1.76E+01	2.67E+00	1.85E-04	6.11E-03	TRGV5
ENSG00000197930	1.84E+02	-9.58E-01	1.10E-03	2.26E-02	ERO1A
ENSG00000121064	2.20E+02	1.27E+00	7.62E-06	5.47E-04	SCPEP1
ENSG00000100219	3.35E+02	-1.49E+00	5.42E-04	1.33E-02	XBP1
ENSG00000124942	1.75E+03	-8.18E-01	1.07E-03	2.22E-02	AHNAK
ENSG00000204220	6.87E+01	1.27E+00	5.49E-04	1.33E-02	PFDN6
ENSG00000124256	4.25E+02	8.43E-01	3.17E-03	4.63E-02	ZBP1
ENSG00000184110	1.19E+02	-1.37E+00	1.83E-05	1.06E-03	EIF3C
ENSG00000116044	2.84E+03	-1.06E+00	5.03E-04	1.26E-02	NFE2L2
ENSG00000134755	1.78E+02	-1.07E+00	2.00E-04	6.42E-03	DSC2
ENSG00000168995	3.30E+02	8.75E-01	1.48E-03	2.74E-02	SIGLEC7
ENSG00000171916	1.82E+01	-2.76E+00	5.30E-05	2.42E-03	LGALS9C

ENSG00000138381	7.34E+01	-1.33E+00	2.82E-04	8.31E-03	ASNSD1
ENSG00000116679	2.55E+04	-1.09E+00	1.16E-03	2.35E-02	IVNS1ABP
ENSG00000183023	1.06E+02	-1.23E+00	1.63E-04	5.52E-03	SLC8A1
ENSG00000180104	1.30E+03	1.27E+00	1.50E-06	1.38E-04	EXOC3
ENSG00000268521	2.34E+01	2.02E+00	3.64E-04	9.86E-03	VN1R83P
ENSG00000092820	6.64E+02	-9.51E-01	1.45E-04	5.06E-03	EZR
ENSG00000090376	9.76E+03	-1.44E+00	1.11E-04	4.27E-03	IRAK3
ENSG00000188822	1.29E+02	1.16E+00	1.83E-04	6.06E-03	CNR2
ENSG00000232810	1.56E+03	-1.16E+00	6.39E-04	1.49E-02	TNF
ENSG00000131018	1.07E+03	1.16E+00	2.20E-05	1.23E-03	SYNE1
ENSG00000138378	8.16E+01	-1.67E+00	2.83E-06	2.42E-04	STAT4
ENSG00000150938	7.29E+01	1.47E+00	6.00E-05	2.69E-03	CRIM1
ENSG00000158869	4.11E+03	-1.47E+00	5.92E-09	9.78E-07	FCER1G
ENSG00000253981	1.84E+02	1.06E+00	2.86E-04	8.36E-03	ALG1L13P
ENSG00000110455	6.60E+01	1.45E+00	2.94E-04	8.52E-03	ACCS
ENSG00000197467	2.09E+02	-1.87E+00	7.85E-08	1.02E-05	COL13A1
ENSG00000141959	5.34E+02	-1.10E+00	2.57E-05	1.39E-03	PFKL
ENSG00000185022	1.04E+03	-1.10E+00	1.53E-03	2.81E-02	MAFF
ENSG00000151692	1.54E+02	1.18E+00	9.56E-05	3.85E-03	RNF144A
ENSG00000198734	9.86E+02	8.28E-01	4.83E-04	1.23E-02	F5
ENSG00000158825	5.62E+02	9.39E-01	1.96E-04	6.39E-03	CDA
ENSG00000211895	2.52E+02	8.84E-01	1.60E-03	2.89E-02	IGHA1
ENSG00000136048	1.96E+03	-1.73E+00	2.82E-05	1.47E-03	DRAM1
ENSG00000176788	8.38E+03	-8.72E-01	6.76E-04	1.55E-02	BASP1
ENSG00000072134	6.49E+01	1.72E+00	1.02E-05	6.84E-04	EPN2
ENSG00000182782	3.27E+03	-7.98E-01	2.22E-03	3.65E-02	HCAR2
ENSG00000135519	4.44E+01	2.22E+00	1.75E-05	1.02E-03	KCNH3
ENSG00000146232	2.52E+03	-9.40E-01	1.59E-03	2.88E-02	NFKBIE
ENSG00000162909	1.68E+02	-1.12E+00	4.19E-04	1.10E-02	CAPN2
ENSG00000133612	1.99E+02	-1.44E+00	5.86E-07	6.08E-05	AGAP3
ENSG00000108244	1.48E+03	-8.04E-01	2.67E-03	4.11E-02	KRT23
ENSG00000115594	1.04E+03	-7.22E-01	3.43E-03	4.86E-02	IL1R1
ENSG00000157693	1.82E+02	9.20E-01	1.20E-03	2.40E-02	TMEM268
ENSG00000106603	7.54E+02	1.10E+00	1.47E-04	5.07E-03	COA1
ENSG00000134954	4.09E+02	-9.46E-01	1.30E-03	2.51E-02	ETS1
ENSG00000197536	2.78E+02	1.06E+00	8.22E-04	1.80E-02	C5orf56
ENSG00000119139	1.02E+02	-1.13E+00	5.95E-04	1.42E-02	TJP2
ENSG00000142408	2.88E+01	2.19E+00	1.12E-04	4.28E-03	CACNG8
ENSG00000165914	3.08E+01	1.58E+00	2.42E-03	3.86E-02	TTC7B
ENSG00000141068	7.41E+02	1.15E+00	2.03E-05	1.15E-03	KSR1
ENSG00000049239	2.92E+02	1.57E+00	8.22E-09	1.27E-06	H6PD
ENSG00000270030	1.84E+01	2.64E+00	6.27E-05	2.79E-03	
ENSG00000139725	1.68E+03	-1.25E+00	1.86E-07	2.27E-05	RHOF
ENSG00000120949	2.49E+02	-8.95E-01	1.24E-03	2.45E-02	TNFRSF8
ENSG00000105767	1.16E+02	-1.02E+00	1.33E-03	2.54E-02	CADM4
ENSG00000198851	2.57E+01	-2.53E+00	9.81E-05	3.88E-03	CD3E
ENSG00000183762	1.19E+03	-1.58E+00	8.37E-11	1.94E-08	KREMEN1
ENSG00000196358	4.50E+02	1.30E+00	8.79E-06	6.05E-04	NTNG2
ENSG00000238113	5.65E+01	1.44E+00	2.59E-03	4.02E-02	LINC01410
ENSG00000122224	3.94E+01	1.92E+00	5.57E-05	2.51E-03	LY9

ENSG00000113368	2.13E+03	-1.45E+00	3.87E-06	3.17E-04	LMNB1
ENSG00000133112	3.49E+03	-9.42E-01	3.58E-04	9.72E-03	TPT1
ENSG00000185561	1.63E+01	-2.82E+00	5.00E-05	2.34E-03	TLCD2
ENSG00000204389	2.38E+03	-7.30E-01	1.40E-03	2.61E-02	HSPA1A
ENSG00000135929	4.49E+03	-1.15E+00	4.86E-06	3.85E-04	CYP27A1
ENSG00000175782	5.44E+02	-9.55E-01	1.30E-04	4.70E-03	SLC35E3
ENSG00000111885	5.74E+02	-1.23E+00	3.59E-06	2.99E-04	MAN1A1
ENSG00000158669	6.67E+02	-7.15E-01	3.02E-03	4.49E-02	GPAT4
ENSG00000247627	4.22E+01	3.16E+00	2.64E-10	5.73E-08	MTND4P12
ENSG00000273136	1.46E+03	9.67E-01	2.76E-04	8.20E-03	NBPF26
ENSG00000204388	1.07E+03	-7.09E-01	3.19E-03	4.65E-02	HSPA1B
ENSG00000254415	2.91E+03	-1.38E+00	7.43E-09	1.17E-06	SIGLEC14
ENSG00000090339	9.93E+03	-1.09E+00	1.85E-03	3.20E-02	ICAM1
ENSG00000161542	2.68E+02	-1.05E+00	6.36E-04	1.49E-02	PRPSAP1
ENSG00000090104	5.95E+01	1.56E+00	1.61E-04	5.45E-03	RGS1
ENSG00000159496	2.83E+02	-1.62E+00	2.30E-05	1.28E-03	RGL4
ENSG00000158161	3.21E+03	-2.02E+00	8.35E-11	1.94E-08	EYA3
ENSG00000150995	5.02E+02	9.52E-01	1.25E-04	4.64E-03	ITPR1
ENSG00000196743	3.28E+02	-1.18E+00	1.18E-03	2.36E-02	GM2A
ENSG00000050438	4.11E+01	1.57E+00	2.04E-03	3.44E-02	SLC4A8

Tabelle A1: Humane neutrophile Granulozyten wurden mit ICs aus Antigen (hCOL7) und Antikörper (Anti-Typ-VII-Kollagen-IgG1 oder -IgG4) stimuliert und anschließend für 4 h mit Propranolol oder dem Lösungsmittel PBS inkubiert. Beim Vergleich mit dem Genexpressionsmuster stimulierter, aber nicht mit Propranolol behandelte Zellen konnten 168 Gene identifiziert, die signifikant invers exprimiert waren.

8. Danksagung

Diese Arbeit konnte nur mit der Unterstützung vieler Menschen fertiggestellt werden, bei denen ich mich sehr herzlich bedanken möchte.

Ich danke dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) der Universität zu Lübeck, insbesondere dem Leiter der dermatologischen Klinik Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens sowie den Direktoren des LIEDs, Herrn Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim, Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt, für die Bereitstellung der Laborräume und sämtlicher Materialien.

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig für die Überlassung des Themas bedanken. Die Begeisterung für seine Arbeit und Forschungsgebiete hat sich auf mich übertragen und der Austausch im wöchentlichen Arbeitsgruppentreffen war stets eine Quelle der Motivation und Inspiration.

Ganz besonderer Dank für die überragende Betreuung gilt meiner Mentorin Frau Dr. rer. nat. Katja Bieber, die zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und diese immer mit Fachkunde, Pragmatismus und Humor beantworten konnte.

Ich danke allen Kolleg*innen aus Haus 10 für unzählige wertvolle Ratschläge und die Unterstützung bei meinen Experimenten. Besonders möchte ich Frau Dr. rer. nat. Maxi Hofrichter, Kerstin und Tim danken. Letztere beide haben mich bei meinen ersten Tierexperimenten geduldig und tatkräftig unterstützt. Auch möchte ich Katharina und Georg für die stets unglaublich schnelle Bereitstellung ihrer Erfahrungen und Daten danken.

Dem Graduiertenkolleg 1727 „Modulation von Autoimmunität“ (GRK1727) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Förderung meiner Arbeit. Das Graduiertenkolleg bot mir ein wissenschaftliches Umfeld, meine Ergebnisse zu präsentieren und mich mit anderen Stipendiat*innen auszutauschen. Auch der Studienstiftung des Deutschen Volkes möchte ich an dieser Stelle danken. Durch diese beiden Stipendien konnte ich mein Medizinstudium für ein Semester unterbrechen, um mich ganz meiner Dissertation zu widmen.

Für die technische Unterstützung danke ich Rebecca Cames, Astrid Fischer, Claudia Kauderer, Daniela Rieck und Diana Scheppan. Außerdem möchte ich mich auch bei den Blutspender*innen bedanken, die mir die Proben zur Durchführung meiner Experimente zur Verfügung gestellt haben.

Meinen Freund*innen danke ich dafür, dass sie sich sowohl für als auch beizeiten nicht für meine Arbeit interessiert haben! Besonderer Dank gilt Julian, mit dem ich unter anderem Franz Schuberts Vertonung des Gedichts „An die Musik“ musiziert habe und der sich als überragender Lektor erwiesen hat! Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich in all meinen Vorhaben unterstützt und mir immer zur Seite steht.

9. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, dass ich keine anderen als die angegebenen personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel verwendet habe und dass ich Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut und Sinn nach entnommen wurden, unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich niemals zuvor und auch nicht gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt habe. Ich habe mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 8. Oktober 2019

Pia Rebecca Stüssel

10. Lebenslauf

Name **Pia Rebecca Stüssel**
Geburtstag 23.07.1993
Geburtsort Dortmund
Staatsangehörigkeit deutsch



09/2016 - 09/2019 **Promotion** an der Universität zu Lübeck am Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie in Lübeck (LIED) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Ralf Ludwig (Experimente 09/2016 – 05/2017)
10/2012 - heute **Studium der Humanmedizin** an der Universität zu Lübeck
08/2003 - 07/2011 **Allgemeine Hochschulreife** an der Marienschule Münster

Stipendien

09/2016 - 03/2016 **MD Stipendium** und Mitglied des Graduiertenkollegs GRK 1727 "Modulation of Autoimmunity"
04/2015 - heute **Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes**

11. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikation

unter Revision

2019 Stüssel, Pia; Schulze Dieckhoff, Katharina; Künzel, Sven; Gupta, Yask; Kaiser, Georg; Veldkamp, Wendelien; Vidarsson, Gestur; Visser, Remco; Ghorbanalipour, Saeedeh; Matsumoto, Kazuko; Krause, Malin; Kalies, Kathrin; Ludwig, Ralf J; Bieber, Katja **Propranolol is an effective topical treatment for neutrophil-dependent skin disease** *Journal of Investigative Dermatology*

Poster

2017 **Inhibition of intracellular signaling cascades in experimental epidermolysis bullosa acquisita** beim IPPF-Meeting of the International Pemphigus & Pemphigoid Foundation