

Aus der Klinik für Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie (Hautklinik)  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens

---

In der Pathogenese der Epidermolysis  
bullosa acquisita im passiven Mausmodell ist  
die Myeloperoxidase Aktivität essentiell

Inauguraldissertation zur  
Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck  
– Aus der Sektion Medizin –  
vorgelegt von Lasse Kröger  
aus Wetzlar

Lübeck 2021

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Professor Dr. med. Christian Sadik

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. medic. Lisa Marshall

Tag der mündlichen Prüfung: **23.6.2022**

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den **23.6.2022**

Promotionskommission der Sektion Medizin

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Die humane epidermolysis bullosa acquisita und die Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Murines EBA-Modell</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Pathophysiologie der EBA</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Neutrophile Granulozyten und Myeloperoxidase</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Netose</b>	<b>15</b>
<b>1.7. Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>2. Methoden und Materialien.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Das passive EBA-Modell in Wildtyp- und <i>MPO</i><sup>-/-</sup>-Mäusen</b>	<b>20</b>
2.1.1. Versuchstiere .....	20
2.1.2. Induktion des EBA-Modells.....	21
2.1.3. Evaluation der Erkrankung.....	22
2.1.4. Tierversuchsende und Probengewinnung .....	24
2.1.5. Generierung und Aufreinigung von Kollagen VII Antikörpern .....	25
<b>2.2. Untersuchungen mit Material der <i>In-vivo</i>-Versuche</b>	<b>27</b>
2.2.1. Durchflusszytometrie.....	27
2.2.2. Immunhistochemie .....	31
<b>2.3. <i>In vitro</i> Versuche</b>	<b>35</b>
2.3.1. Reaktive Sauerstoffspezies - Freisetzung <i>assay</i> .....	35
2.3.2. Leukotrien B <sub>4</sub> - ELISA.....	38
2.3.3. Durchflusszytometrie.....	39
2.3.4. <i>Sytox green assay</i> .....	43
2.3.5. Toxizitätsanalyse .....	46
2.3.6. Migration neutrophiler Granulozyten.....	47
<b>2.4. Statistik und Auswertung</b>	<b>48</b>
<b>2.5. Liste der verwendeten Materialien</b>	<b>49</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Ergebnisse des Tierversuchs</b>	<b>53</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.1. Bei MPO defizienten Mäusen kommt es im EBA-Mausmodell nicht zur Ausbildung des klinischen Krankheitsbildes.....	53
3.1.2. Im Blutbild der Versuchstiere im EBA-Modell zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. ....	56
3.1.3. Immunhistochemisch ließen sich Kaninchen-Antikörper und C3-Ablagerungen bei beiden Studienpopulationen nachweisen .....	60
3.1.4. In der konventionellen Durchlicht-Mikroskopie von HE gefärbten Hautproben der Versuchstiere zeigten sich pathologische Veränderungen nur in der Gruppe der Wildtyp-Mäuse .....	61
3.1.5. Immunhistochemisch ließen sich signifikant weniger Ly-6G <sup>+</sup> Zellen in den Hautproben der <i>MPO</i> <sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber den Proben der WT-Mäuse feststellen.....	62
<b>3.2 In vitro Ergebnisse</b>	<b>64</b>
3.2.1. Die eingesetzten <i>MPO</i> <sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im naiven Zustand keinen Unterschied im Blutbild zu den zugehörigen WT-Mäusen.....	64
3.2.2. Nach Aktivierung mit PMA zeigten MPO defiziente Neutrophile keinen Unterschied im CD62L- <i>Shedding</i> zu den Neutrophilen von Wildtyp-Mäusen .....	66
3.2.3. MPO defiziente neutrophile Granulozyten unterscheiden sich in der Durchflusszytometrie im Hinblick auf den C5a-Rezeptor und den Fcγ-Rezeptor 4 nicht von Zellen entsprechender Wildtyp-Mäuse .....	68
3.2.4. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung keine mit Luminol nachweisbare ROS-Freisetzung.....	70
3.2.5 Durch eine Inkubation von WT-Neutrophilen mit dem MPO-Inhibitor AZD 5904 ließ sich eine deutliche Reduktion der mit Luminol nachweisbaren radikalen Sauerstoffspezies erzielen .....	71
3.2.6. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung eine mit Lucigenin nachweisbare ROS-Freisetzung ohne signifikanten Unterschied zu WT Neutrophilen .....	72
3.2.7. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung eine signifikant niedrigere Freisetzung von Leukotrien B <sub>4</sub> im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp Neutrophilen.....	73
3.2.8. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung eine signifikant schwächere Steigerung der mit <i>Sytox green</i> gemessenen Fluoreszenz über 5 Stunden als WT Neutrophile. ....	75
3.2.9. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Calcium-Ionophore Stimulierung keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf den Anstieg der <i>Sytox green</i> Fluoreszenz über 5 Stunden im Vergleich mit WT-Neutrophilen.....	77
3.2.10. Der MPO-Inhibitor AZD5904 führt nach 15 Minuten Inkubation bei WT-Neutrophilen zu keiner Zunahme Annexin oder PI positiver Zellen in der Durchflusszytometrie .....	79

# Inhaltsverzeichnis

---

3.2.11. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf ihr Migrationsverhalten gegenüber WT-Neutrophilen bei Stimulierung mit C5a und LTB <sub>4</sub> .....	80
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>4.1. Einordnung der Ergebnisse</b>	<b>82</b>
<b>4.2. Synopsis der Versuche und Ausblick</b>	<b>92</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>105</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Die humane epidermolysis bullosa acquisita und die Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen

Die Epidermolysis bullosa acquisita ist eine seltene blasenbildende Hauterkrankung mit einer Inzidenz von durchschnittlich 0,2 Fällen je eine Millionen Einwohner und Jahr (1).

Ursächlich für die Erkrankung ist die Bildung von Antikörpern gegen Kollagen VII, einem Bestandteil der dermoepidermalen Junktionszone. Sie gehört damit zur Gruppe der bullösen Autoimmundermatosen und zur Untergruppe der Pemphigoide.

Die Autoantigene bei den Pemphigoiden sind Bestandteile der Verbindung zwischen Epidermis und Dermis. Es bilden sich daher Immunkomplexe durch die Verbindung von Antikörper und Antigen in diesem anatomischen Bereich und es kommt in der Folge zu einem entzündlichen Prozess. Dieser geht mit einem lokalen Gewebeschaden mit konsekutiver Spaltbildung einher. Klinisch führt das im Verlauf der Erkrankung zu prallen Blasen, die in der Folge Erosionen hinterlassen. Im Gegensatz hierzu bilden sich bei den Erkrankungen der Pemphigus-Gruppe die Immunkomplexe innerhalb der Epidermis und führen zu schlaffen, leicht platzenden Blasen. Der Ort der pathophysiologischen Abläufe entscheidet über die Dicke des Blasendaches, damit über deren Reißfestigkeit, dadurch über das klinische Bild und wird somit schließlich zusammen mit seinen Folgen als ein zentrales Kriterium zur Einteilung in die Subtypen verwendet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten autoimmunen blasenbildenden Hauterkrankungen und ihre Subtypenzugehörigkeit (2).

Der klinisch wichtigste Vertreter der Pemphigoide ist das bullöse Pemphigoid. Es kommt von allen blasenbildenden autoimmunen Erkrankungen am häufigsten vor und hat eine rechnerische Prävalenz von ca. 259 Patienten pro Millionen Einwohner in Deutschland (3). Auf Grund der großen Ähnlichkeiten der EBA und des BP in der Pathophysiologie gelten Forschungsergebnisse einer der Erkrankungen als wegweisend für das Verständnis der ganzen Gruppe der Pemphigoid-Erkrankungen. Bei den Pemphigoiden werden fälschlich Bestandteile der dermoepidermalen Junktionszone als fremd erkannt und daraufhin Antikörper gegen diese gebildet. Wie bereits erwähnt, ist dies bei der EBA Kollagen VII und

## 1. Einleitung

---

beim BP ist es das Kollagen XVII, das zumeist als BP 180 bezeichnet wird. Man nimmt an, dass die immunologischen Geschehnisse, nachdem Antikörper in einer bestimmten anatomischen Region an strukturell und funktionell eng verwandte Autoantigene binden und sich dadurch Immunkomplexe bilden, bis zu einem gewissen Grad analog verlaufen. Ein besseres Verständnis dieser Abläufe kann die Weiterentwicklung und Optimierung von Therapien befördern. Hiervon könnten viele Patienten profitieren, denn blasenbildende Erkrankungen gehen oft mit einem hohen Leidensdruck einher und stellen oft auch eine wiederkehrende Lebensqualitätseinschränkung dar (4).

**Tabelle 1: Zielantigene und ausgewählte diagnostische Kriterien bullöser Autoimmundermatosen.**

Entität	Zielautoantigen(e)	DIF-Befund	IIF-Befund
<b>Intraepidermaler Adhäsionsverlust (Pemphigusgruppe)</b>			
Pemphigus vulgaris	Dsg 1, Dsg 3	IgG und C3 interzellulär	IgG interzellulär
Pemphigus foliaceus	Dsg 1	IgG und C3 interzellulär	IgG interzellulär
Paraneoplastischer Pemphigus	Dsg 1, Dsg 3, Plakine	IgG und C3 interzellulär und dermo-epidermal	IgG interzellulär
IgA-Pemphigus	Dsc 1, Dsg 3	IgG und C3 interzellulär	IgG interzellulär
<b>Subepidermaler Adhäsionsverlust (Pemphigoidgruppe)</b>			
Bullöses Pemphigoid	BP180 (Kollagen XVII), BP 230	IgG und C3 linear dermo-epidermal	IgG epidermal
Epidermolysis bullosa acquisita	Kollagen VII	IgG und C3, serrated pattern	IgG dermal
Pemphigoid gestationis	BP180, BP 230	C3 linear dermo-epidermal	Komplementfixierende IgG epidermal
Schleimhaut-pemphigoid	BP180, Laminin 5, $\alpha_6\beta_4$ -Integrin	IgG/IgA/C3 linear dermo-epidermal	IgG/IgA epidermal/dermal
Lineare IgA-Dermatose	LAD 1	IgA und C3 linear dermo-epidermal	IgA epidermal/dermal

**Legende:** (DIF) Direkte Immunfluoreszenz, (IIF) Indirekte Immunfluoreszenz, (Dsg) Desmoglein, (Dsc) Desmocollin, (LAD 1) linear IgA bullous dermatosis-Antigen 1; angepasst nach (5)

# 1. Einleitung

---

## 1.2. Murines EBA-Modell

Mausmodelle ermöglichen durch die Nachbildung der Krankheitsprozesse humaner Erkrankungen die Möglichkeit unter kontrollierten Bedingungen und guter Reproduzierbarkeit den Einfluss verschiedenster Faktoren auf die klinischen und molekularen Abläufe der Erkrankungen zu untersuchen. Insbesondere bei seltenen Erkrankungen erleichtern sie es erheblich relevante Mengen an Untersuchungsmaterial von betroffenen Geweben zu erhalten. Im Hinblick auf die EBA gibt es aktive Modelle bei denen Mäuse immunisiert werden, um die krankheitsauslösenden Antikörper selbst zu produzieren und es gibt passive Modelle bei denen den Mäusen die entsprechenden Antikörper injiziert werden (4).

Aktive Modelle sind aufwendiger und bilden künstlich die Krankheitsentstehung in der Maus mit ab. Passive Modelle bilden in erster Linie die Effektor-Phase ab. Im Hinblick auf mögliche therapeutische Anwendungen sind passive Modelle und damit die Prozesse nach Ausbruch der Erkrankung oft ein sinnvollerer Modell.

Wie einleitend erwähnt, bestehen große Ähnlichkeiten in der Effektor-Phase von BP und EBA. Die gewonnenen Erkenntnisse aus EBA-Modellversuchen können somit wegweisend für ein besseres Verständnis des bullösen Pemphigoids und der blasenbildenden Autoimmundermatosen im Allgemeinen sein.

Das passive murine Epidermolysis bullosa acquisita Modell, wie erstmals von Sitaru et al 2005 verwendet (6), ist ein am Forschungsstandort Lübeck von mehreren Arbeitsgruppen aus verschiedenen Kliniken und Instituten des UKSH oft angewandtes, gut etabliertes Modell. Das Schema zur Induktion und zum Scoring dieses Modells ist vielfach erprobt und hat zu einer Vielzahl von Publikationen geführt, die das Verständnis der autoimmunen Dermatosen stetig verbessert hat. Auf einige Erkenntnisse, die durch das Modell ermöglicht wurden, wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen. Es besteht grundsätzlich aus folgenden Schritten: Kollagen 7 wird rekombinant in E-coli Bakterien hergestellt. Mit diesem Kollagen 7 werden Kaninchen vom Typ weißer Neuseeländer immunisiert. Aus dem Serum der Kaninchen werden die im Zuge der Immunisierung gebildeten Antikörper gegen Kollagen 7 gewonnen und in der Folge Black-6 Mäusen (*mus musculus domesticus*, Black 6) verabreicht.

### 1.3. Pathophysiologie der EBA

Die EBA ist eine Autoimmunerkrankung, deren Symptome als Folge der Bindung von Antikörpern an das Antigen Kollagen VII auftreten. Die Bindung der Antikörper an ihr Antigen wird als Antigen-Antikörper-Reaktion bezeichnet und geht mit der Bildung eines Immunkomplexes einher. Insgesamt kommt es direkt oder indirekt zur Aktivierung und Freisetzung von verschiedenen pro-inflammatorischen, aber auch anti-inflammatorischen Zytokinen und Mediatoren, sowie zur Einwanderung von Immunzellen. Eine schematische Darstellung mit Beschreibung der wichtigsten bekannten Komponenten des Geschehens nach Bildung von Immunkomplexen an der DEJ findet sich in *Abbildung 1 (7)*.

Wie wichtig diese einzelnen Immunmechanismen für das Krankheitsbild sind und inwiefern sie sich gegenseitig verstärken oder abschwächen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine Reihe von Erkenntnissen der jüngeren Vergangenheit wurden mit dem passiven EBA-Modell nach Sitaru gewonnen, so zum Beispiel, dass unter den Mediatoren und Rezeptoren Leukotrien B<sub>4</sub> (8), TNF $\alpha$  (9) und der ROR $\alpha$  (10) eine herausragende Wichtigkeit für das Auftreten der Hautläsionen und damit der Ausbildung des Phänotyps der Erkrankung haben. Weiterhin wurde entdeckt, dass Mäuse, die defizient im Hinblick auf den C5a-Rezeptor sind, signifikant schwächer erkranken. Das unterstreicht die Rolle, die die Aktivierung der Komplement-Kaskade für die Ausbildung der EBA spielt (11).

Eine weitere Erkenntnis, die sich mit dem murinen EBA-Modell gewinnen ließ, bezieht sich auf die Einwanderung von Entzündungszellen. Die Infiltration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe ist ein bei vielen entzündlichen Erkrankungen beobachteter Prozess, der auch bei den blasenbildenden Erkrankungen regelmäßig auftritt. Das EBA-Mausmodell ermöglicht es, den klinischen Verlauf der EBA und die Untersuchung vielfältiger Proben bei Mäusen, wenn eine der benannten Zellpopulationen durch Antikörper depletiert worden ist. Mit solchen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der eosinophilen Granulozyten verzichtbar zu sein scheint und das Krankheitsgeschehen nur unwesentlich durch ihre Abwesenheit beeinflusst wird. Die Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten hingegen das Krankheitsbild mit signifikanter Deutlichkeit abschwächt (8).

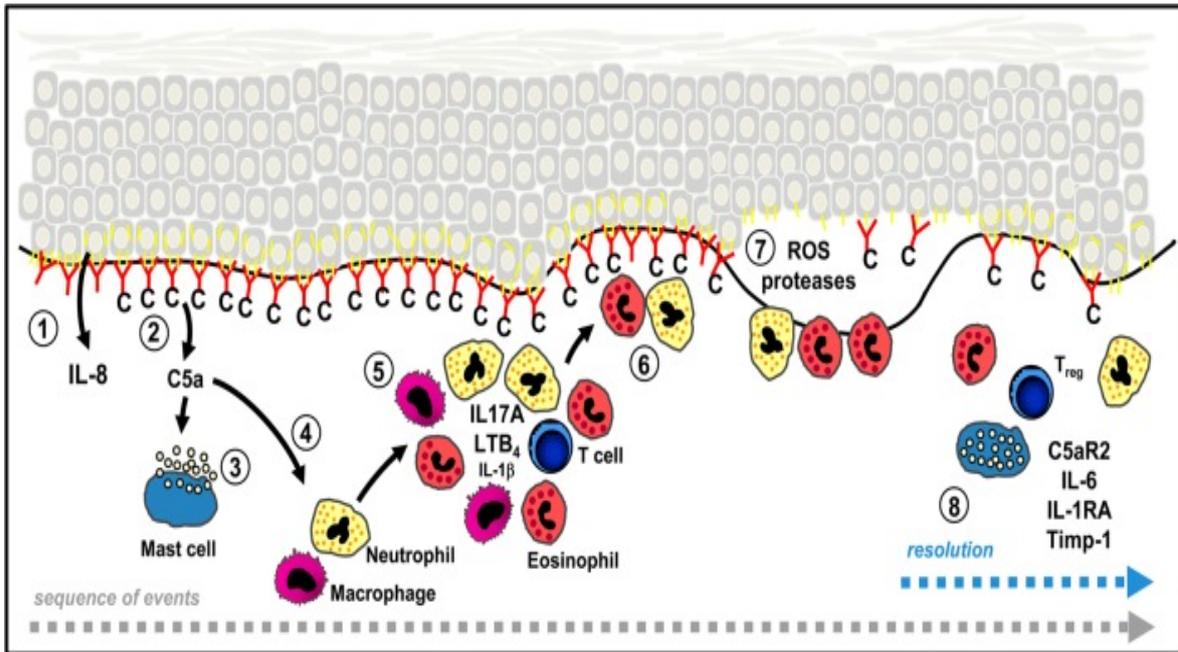
## 1. Einleitung

---

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass neutrophile Granulozyten auf dem Weg von der Antikörper-Bindung bis hin zum Phänotyp der EBA eine entscheidende Rolle spielen. Sie sind nicht nur Effektor-Zellen, die angelockt werden und für den Gewebsschaden mit Spaltbildung mitverantwortlich sind. Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre lassen es immer deutlicher werden, dass sie bei Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen und so auch bei der EBA eine zentrale Rolle spielen (12).

Beispielhaft sei in diesem Kontext erwähnt, dass es vornehmlich die Neutrophilen sind, die Leukotrien B<sub>4</sub> eine der potentesten chemotaktischen Substanzen ausschütten und sie somit selbst in relevantem Maße für ihre Präsenz in entzündetem Gewebe sorgen (13).

# 1. Einleitung



**Abbildung 1: Schematische Darstellung bekannter Mechanismen nach Bildung von Immunkomplexen im Bereich der dermoepidermalen Junctionalzone**

Antikörper (rot) haben an ein Antigen der DEJ wie Kollagen 7 oder 17 (gelb) gebunden.

1: Benachbarte Keratinozyten geben Zytokine ab (u.a. IL-8).

2: Im Zuge der Komplementkaskade kommt es zu relevanten Mengen von C5a.

3: Mastzellen werden durch Antikörper oder das Komplementsystem aktiviert.

4: C5a führt unter anderem chemotaktisch zur Rekrutierung weiterer Immunzellen.

5,6: Immunzellen geben als Reaktion auf das örtliche Geschehen IL-17A, LTB<sub>4</sub> und weitere Entzündungsmediatoren ab. Im Zuge dessen kommt es auch zur verstärkten Einwanderung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten.

7: Neutrophile setzen u.a. reaktive Sauerstoffspezies frei und erzeugen somit durch oxidative Prozesse Schäden am Gewebe. Es kommt zur Spaltbildung.

8: Anti-inflammatorische Mechanismen bremsen schließlich das Geschehen ab (regulatorische T-Zellen, C5aR2 und IL6).

Abbildung übernommen, Beschriftung modifiziert aus (7)

### 1.4. Neutrophile Granulozyten und Myeloperoxidase

Die neutrophilen Granulozyten, die nicht nur den größten Anteil unter den Granulozyten, sondern im Menschen gar den größten Anteil unter den im Blut zirkulierenden Leukozyten ausmachen, sind wichtige Abwehrzellen des Menschen und werden zum angeborenen Teil des Immunsystems gerechnet. Hierbei spielen sie nicht nur bei der Abwehr von Krankheitserregern eine Rolle. Auch bei Autoimmunerkrankungen sind sie wichtiger Bestandteil des Geschehens. Im EBA-Modell sind sie zur Ausbildung der Erkrankung notwendig (8).

Bei einer Vielzahl von entzündlichen Prozessen unabhängig ob mikrobiell oder autoimmun bedingt, kommt es zur Gewebsinfiltration durch Neutrophile. Eine wichtige Rolle hierbei spielen Selectine, diese sind daran beteiligt, dass Neutrophile in hochendothelialen Venulen den Blutstrom verlassen können und sich in entzündetes Gewebe oder Lymphknoten bewegen. Neutrophile, die kein L-Selectin (CD62L) exprimieren, sind in ihrer Fähigkeit an Entzündungsorte zu gelangen deutlich eingeschränkt (14, 15). Mit dem sogenannten *Shedding*, also der Abscheidung des extrazellulären Anteils des CD62L unter Verbleiben des cytoplasmatischen Anteils geht eine Aktivierung der Zelle einher. Der Nachweis des *Shedding* auf einen Stimulus gilt daher als klassisches Anzeichen für die Aktivierbarkeit der entsprechenden Zelle (16, 17).

Am Entzündungsort angelangt befeuern und begünstigen aktivierte Neutrophile die inflammatorischen Prozesse durch Sezernation einer Vielzahl von antimikrobiellen, chemotaktischen sowie gewebsdestruierenden Substanzen weiter. Neben dem bereits erwähnten chemotaktischen LTB<sub>4</sub>, kommt es beispielsweise auch zur Ausschüttung von neutrophiler Elastase und Gelatinase B. Für beide Stoffe wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen eine Beteiligung an der Pathophysiologie von blasenbildenden Erkrankungen und auch am EBA-Modell gezeigt (18, 19, 20).

Die Erforschung von Aktivierung und Funktion der Neutrophilen ist ein weites Feld und die Wichtigkeit der einzelnen Substanzgruppen und deren Wechselwirkungen in verschiedenen biochemischen und anatomischen Gegebenheiten, ist Gegenstand aktueller Forschung (21).

## 1. Einleitung

---

Diese Arbeit beschränkt sich auf die Betrachtung ausgewählter Stoffe und dazugehöriger Reaktionen. Eine der wichtigsten Stoffklassen der Neutrophilenphysiologie, die eine hohe Bedeutung im Kontext dieser Arbeit besitzen, sind die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Im Zuge eines Prozesses der *respiratory burst* genannt wird, produzieren aktivierte Neutrophile eine große Mengen dieser hochreaktiven Substanzen. Als Folge des *respiratory burst* können Mikroorganismen abgetötet werden und es kann zu einem lokalen Gewebsschaden kommen. Der *respiratory burst* lässt sich vereinfacht in einige zentrale Schritte unterteilen. Ein von entzündlicher Aktivität angelockter neutrophiler Granulozyt wird am Ort des Geschehens aktiviert durch die Bindung an einen Immunkomplex. In Folge der Aktivierung wird durch NADPH-Oxidase aus Sauerstoff Superoxid gebildet. Superoxid gilt bereits selbst als ein schwaches Mitglied der ROS-Substanzgruppe, ist aber im Zusammenwirken mit weiteren Stoffen um ein vielfaches wirkungsvoller. Insbesondere das Enzym Myeloperoxidase nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein. Es hat mit einem Trockenmassenanteil von bis zu 5% bei Neutrophilen einen mengenmäßig großen Anteil an den neutrophilen Granulozyten und wird in Granula gespeichert. Dadurch trägt es zum charakteristischen und namensgebenden Erscheinungsbild der Granulozyten unter dem Mikroskop bei. Die zentrale Funktion der MPO liegt darin, die Reaktion von Superoxid und dem daraus spontan entstehenden Wasserstoffperoxid mit halogeniden Ionen, insbesondere dem Chlorid-Anion hin zu Hypochlorsäure zu katalysieren. Die so gebildeten Substanzen haben unter den ROS die höchste oxidative Potenz und sorgen für ein antimikrobielles Milieu, das das Voranschreiten von Infektionen eindämmt und einen regionalen Gewebsschaden mit sich bringt. Erwähnenswert ist, dass es auch ohne MPO zur Bildung von hochreaktiven Substanzen kommen kann. In entzündeten Geweben liegen oftmals erhöhte Stickstoffmonoxid Konzentrationen vor. Superoxid reagiert spontan mit Stickstoffmonooxid und bildet dadurch Peroxinitrit, dieses wiederum hat eine hohe oxidative Potenz. Man spricht in dem Zusammenhang auch von reaktiven Stickstoffspezies (21).

2 klinische Syndrome, die im engen Zusammenhang mit den genannten Immunmechanismen stehen, sollen zur besseren Einordnung genannt werden. Bei der Erbkrankheit chronische Granulomatose, auch septische Granulomatose genannt, ist die

## 1. Einleitung

---

Funktion der NADPH-Oxidase beeinträchtigt und in der Folge ist die Produktion von ROS und somit auch die Abwehr pathogener Mikroorganismen drastisch gestört. Schon von frühestem Kindesalter an, kommt es zu schwerwiegenden Infektionen mehrerer Organsysteme. Zwar können durch extensiven Einsatz von Antibiotika und Antimykotika die oft schwerwiegenden Infektionen für eine Zeit lang eingedämmt werden, doch ist dies kein gleichwertiger Ersatz für eine funktionierende NADPH-Oxidase in Neutrophilen und die sich anschließende ROS-Produktion. In den 1970er war die Erkrankung meist noch vor dem 10. Lebensjahr tödlich. Durch den Einsatz moderner Antimykotika in den 1980ern ließ sich die Lebenserwartung bis ins Erwachsenenleben verlängern und heute lassen sich durch engmaschiges Monitoring, frühzeitigen Einsatz von Reserveantibiotika-Regimes, Knochenmarkstransplantationen und Gen-Therapien noch längere Lebenszeiten erreichen. 2012 lag das mediane Sterbealter bei 28,12 Jahren (22).

Anders liegt der Fall bei einem genetisch bedingten Myeloperoxidase-Mangel. Trotz der zentralen Rolle der MPO in der Produktion hochreaktiver Oxidationsmittel, führt ein Mangel nicht zu relevanter Immunschwäche. Einige Quellen postulieren eine erhöhte Anfälligkeit für Candida Infektionen und für Mäuse konnte diese Anfälligkeit unter kontrollierten Bedingungen gezeigt werden (23).

Doch stark lebensverkürzende bakterielle Infektionen schon im Kindesalter treten nicht auf. Im Allgemeinen sind Patienten mit MPO-Mangel asymptomatisch (24).

Dies lässt darauf hoffen, dass auch bei einer weitgehenden therapeutischen Hemmung der enzymatischen Aktivität der Myeloperoxidase nicht mit einer ausgeprägten Immunsuppression zu rechnen ist. Eine Behandlung mit einem Hemmstoff für die Myeloperoxidase hätte damit gegenüber vielen der momentanen Therapien einen großen Vorteil und könnte bei verschiedensten Erkrankungen sinnvoll zum Einsatz kommen. Die Myeloperoxidase wird unter anderem mit großem Interesse im Hinblick auf ihre Rolle in Sepsis und Atherosklerose erforscht. Zwar ist der Stellenwert der MPO bei diesen Erkrankungen noch nicht vollkommen absehbar, doch die bereits gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf eine Beteiligung an Mechanismen, die zu endothelialer Dysfunktion führen, lassen eine weitere Erforschung lohnenswert erscheinen (25, 26).

### 1.6. Netose

Die Netose ist ein grundlegender Abwehrmechanismus von Neutrophilen. Der jedoch erst in jüngster Zeit intensiv beforscht wird. Oft wird die Publikation von Takei von 1996 (30) als erste Beschreibung der Netose genannt. Es wurde in den ersten Jahren nach seiner Entdeckung als weitere Art des geregelten Zelltodes klassifiziert. In diesem Zusammenhang kam es auch zur Endung -ose, in Anlehnung an Nekrose und Apoptose den beiden bekanntesten Varianten des Zelltodes (27).

Das NET in Netose steht für „neutrophil extracellular trap“. Heute weiß man, dass es auch eine vitale Netose gibt, bei der nach Ausschleusung von NET's eine metabolische aktive Zelle verbleibt (28).

Im Zuge der Netose wird auf geregelte Art und Weise die DNA des Neutrophilen dekondensiert und derart ausgestoßen, dass eine netzartige Struktur außerhalb der Zelle gebildet wird. NET ist daher nicht nur Akronym, sondern auch englischsprachige Beschreibung dessen, was gebildet wird. Diese netzartige Struktur wird im Zuge dieser Ausschleusung mit einer Reihe Substanzen unter anderem MPO und neutrophiler Elastase bestückt und stellt dann ein nicht nur physikalisches, sondern auch chemisches Hindernis für eindringende Mikroorganismen dar (29).

Seit die Netose um die Jahrtausendwende erstmals beschrieben wurde (30), mussten viele Ansichten über das Phänomen immer wieder revidiert werden. Die Entdeckung der vitalen Netose ist dabei nur ein Aspekt. Trotz großem Aufwand bleibt vieles über die Netose weiterhin unklar. Eines der größten Probleme bei der Erforschung der Netose ist ihre Quantifizierung, sowie die Abgrenzung zu Apoptose und Nekrose. Denn ein zentrales Konzept zur Untersuchung der Netose ist der Nachweis extrazellulärer DNA. Doch Färbungen mit Substanzen wie Propidium-Iodid, mit denen durch Färbung extrazelluläre DNA dargestellt werden, finden auch seit vielen Jahren Verwendung um einen Zelltod durch Nekrose festzustellen (31).

Um das unregelmäßige gewaltsame Austreten von DNA aus Zellen bei Nekrose vom geregelten strukturierten Ausschleusen bei Netose zu unterscheiden, kann man zusätzlich zu einer photometrischen Quantifizierung der extrazellulären DNA mikroskopisch nach typischen Netose-Figuren prüfen. Bei isolierten Zellen treten dabei eine Reihe von

## 1. Einleitung

---

Schwierigkeiten auf und in Gewebe-Proben ist dieses Vorgehen noch schwieriger umsetzbar. Eine exakte Messung wie viel des gemessenen Signals tatsächlich auf Netose und wie viel auf eine eventuell auch ablaufende Nekrose zurückzuführen ist, ist somit nicht möglich (32).

Eine weitere sinnvolle Untersuchung im Zusammenhang mit *in vitro* Experimenten sind Untersuchungen zur Toxizität der verwendeten Substanzen in einem parallelen Versuchsaufbau. Dadurch lassen sich Messwerte, die extrazelluläre DNA anzeigen, mit höherer Wahrscheinlichkeit auf Netose-Vorgänge zurückführen.

Neben dem Nachweisen der Netose, stellt sich weiterhin die Frage, welche Stoffe sie zu stimulieren vermögen, welchen Signalwegen diese Aktivierungen folgen und welche Marker neben dem Nachweis von extrazellulärer DNA bei den verschiedenen Aktivierungswegen die bestmögliche Quantifizierung ermöglichen. Neben dem Nachweis ausgeschleuster DNA werden NET'S typischerweise auch durch an diese gebundene Substanzen nachgewiesen. Genannt sei in diesem Kontext insbesondere citrulliniertes Histon 3, MPO und die neutrophile Elastase (33).

*Abbildung 2* zeigt die beiden wichtigsten bekannten Signalwege und deren Komponenten. Es werden aktuell 2 grundlegende molekulare Abläufe, die zur Bildung von NET's führen unterschieden. Der NADPH-Oxidase abhängige Weg und der NADPH-Oxidase unabhängige Weg. Zur *in vitro* Stimulierung des NADPH-Oxidase abhängigen Weg wird in vielen Publikationen Phorbol-12-myristat-13-acetat, kurz PMA eingesetzt. PMA ist auch der Netose Induktor, der im Zuge der Entdeckung der Netose zum Einsatz kam. Es ist jedoch ein physiologisch nicht auftretender Stoff. PMA führt zu einer Aktivierung von Neutrophilen, die die Bildung von ROS induziert und in der Folge zur Netose führt. Als wichtiger Beleg hierfür gilt, dass Neutrophile von Patienten mit chronischer Granulomatose und mit MPO Defizienz keine PMA-induzierte Netose durchlaufen können (34).

Dies macht auch deutlich, warum die MPO als zentrales Enzym für die Bildung hochreaktiver ROS im Hinblick auf die Erforschung der Netose interessant ist. Physiologisch auftretende und wichtige Induktoren der Netose über den NADPH-Oxidase abhängigen Weg sind außerdem IgG Immunkomplexe. Die Bindung dieser an Fc $\gamma$ -Rezeptoren führt zu

## 1. Einleitung

---

einer robusten Netose-Bildung, der eine hohe Bedeutung beim systemischen Lupus erythematodes und der rheumatoiden Arthritis zugesprochen wird (35).

Die NADPH unabhängige und damit ROS-unabhängige Netose hingegen ist die Folge eines Einstromes von Calcium in die Zelle. Verschiedene Calciumionophore werden hierfür im *in vitro* Setting eingesetzt. Ein Aspekt, der für die NADPH-Oxidase unabhängige Netose eine große Rolle spielt, ist die Reaktion von Calcium mit dem im Zytosol vorliegenden Enzym PAD4. Diese Reaktion führt zu einer Citrullinierung von Histon 3 wodurch der Netose-Vorgang erleichtert wird (36, 37).

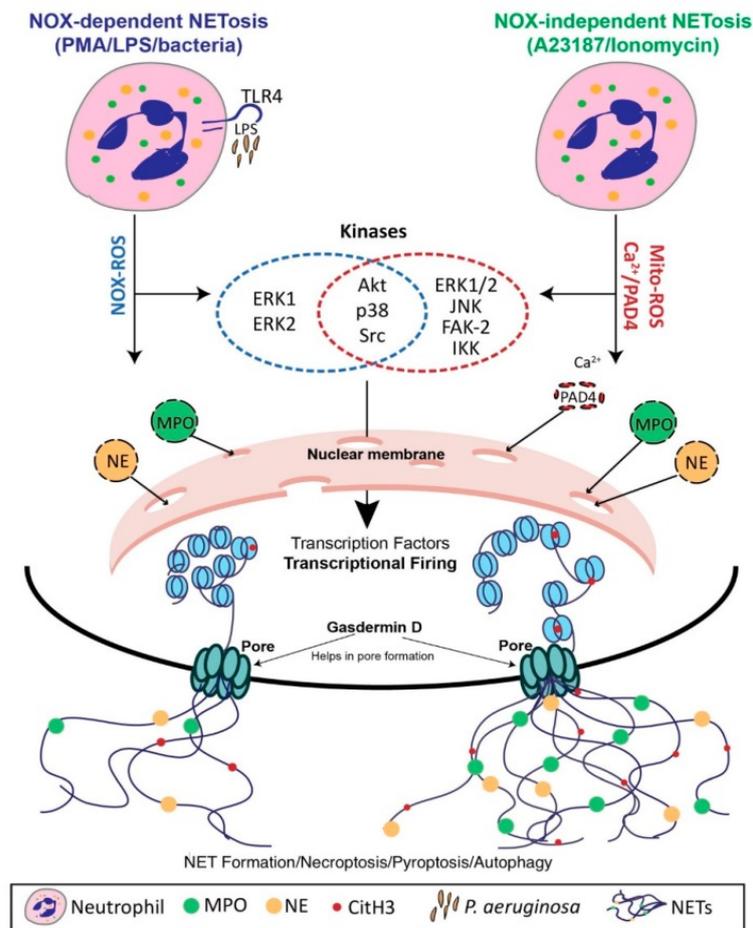
Über die Rolle der Netose für blasenbildende Erkrankungen ist nicht viel bekannt, doch wurde gezeigt, dass NET's sich in Hautproben von Patienten mit aktivem bullösem Pemphigoid nachweisen lassen. Es lässt sich Stand der Forschung von einem assoziierten Phänomen sprechen (38).

Weiterhin wird intensiv der Frage nachgegangen, welche Rolle die Netose für Autoimmunerkrankungen spielt, bei denen Antikörper gegen Substanzen gebildet werden, die für gewöhnlich intrazellulär oder intranukleär (z.b. ANA und ANCA) vorliegen, jedoch durch die Netose nach extrazellulär gelangen. Exemplarisch seien hier der schon erwähnte Lupus erythematodes (z.b. anti-DsDNA, Anti-Histon) und die Vaskulitiden (z.b. MPO-ANCA) genannt. Es konnte für den Lupus erythematodes gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen ein Zusammenhang zwischen der Funktionsfähigkeit der DNase I und der Ausbildung des Krankheitsbildes besteht. Es wird angenommen, dass die DNase I eine wichtige Rolle für den Abbau von NET's spielt. DNase I defiziente Mäuse zeigen Lupus erythematodes ähnliche Symptome und Seren von Lupus erythematodes Patienten zeigen eine verringerte Fähigkeit zum Abbau von NET's. Diesem Forschungsansatz nach, wäre die Produktion der krankheitsbestimmenden Antikörper eine Folge des unphysiologischen Verbleibens von NET's im Gewebe (39).

Es wurde auch gezeigt, dass NET'S in Geweben sterile Entzündungen befördern können (40).

Dies wirft die Frage auf, welche Rolle der Netose bei Auto-Immunerkrankungen mit Beteiligung von Neutrophilen zukommt.

# 1. Einleitung



**Abbildung 2: Gegenüberstellung des NADPH-Oxidase abhängigen und unabhängigen Weges der Netose**

Stimuli wie PMA, LPS oder Bakterien auf der einen und ein Calcium-Einstrom (z.B. durch einen Calciumionophore) auf der anderen Seite führen zur Bildung von ROS oder zu einer Aktivierung von PAD4. Hierdurch werden eine Reihe von Kinasen aktiviert und beim NOX-unabhängigen Signalweg wird durch PAD4 Histon 3 citrulliniert und die Netose-Formation erleichtert. Gasdermin D unterstützt die Bildung von Membranporen. NE und MPO dekorieren die abgegebene DNA. Übernommen aus (27)

### 1.7. Fragestellung

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, wie sich eine Defizienz für neutrophile Myeloperoxidase auf den Krankheitsverlauf im murinen passiven Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita auswirkt. Weiterhin sollten in einem 2. Schritt *in vitro* Funktionsuntersuchungen an *MPO*<sup>-/-</sup> Neutrophilen helfen den Unterschied zum Krankheitsverlauf bei Wildtyp-Mäusen zu verstehen und somit den Wissenstand zur Pathogenese bei blasenbildenden Autoimmunkrankheiten zu verbessern. Die MPO wird in der Fachliteratur als beteiligt an zentralen Funktionen der neutrophilen Granulozyten wie der ROS-Freisetzung und der Netose genannt (21, 37). Der Fokus der *in vitro* Untersuchungen lag daher auf der Untersuchung dieser Mechanismen bei Myeloperoxidase Defizienz.

## 2. Methoden und Materialien

### 2.1. Das passive EBA-Modell in Wildtyp- und *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen

#### 2.1.1. Versuchstiere

Für den Vergleich von Wildtyp- und *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen im passiven EBA-Modell wurden Wildtypmäuse und *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet. Hierdurch sollte ein Einfluss interindividueller Unterschiede verringert werden, damit Untersuchungsergebnisse mit höherer Wahrscheinlichkeit dem untersuchten Kriterium, in diesem Fall der Funktion der MPO, zuzuordnen sind. Für diesen Versuch wurden die Tiere von Janvier bezogen, dort werden sie unter der Bezeichnung C57BL/6J geführt oder sie stammten aus eigener Zucht, basierend auf entsprechenden Janvier Mäusen.

Der Versuch wurde über 2 verschiedene Zeitpunkte verteilt durchgeführt. Diese beiden Versuchsabschnitte werden von hier an mit Tierversuchsteil 1 (TV1) und Tierversuchsteil 2 (TV2) benannt.

Die 20 für TV1 vorgesehenen Tiere sind zwischen dem 10.11.2019 und 13.11.2019 geboren worden und waren daher an Tag 0 des Versuches, am 05.02.2020 etwa 12 Wochen alt. Die Gruppe von 20 Tieren setzte sich aus 10 Wild-Typ und 10 *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen zusammen. Es waren 16 Weibchen und 4 Männchen. Um Käfigeffekte zu minimieren wurde bei der Verteilung der Versuchstiere auf Käfige darauf geachtet, dass sich möglichst immer Mäuse aus beiden Gruppen in einem Käfig befanden. Wasser und Standardfutter konnten die Mäuse *ad libitum* beziehen, der Hell-Dunkel-Zyklus betrug jeweils 12 Stunden.

Die Tierhaltung erfolgte während der Experimentierphase unter pathogenfreien Bedingungen in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck.

Vor den Injektionen zur Induktion der passiven EBA konnten sich alle Tiere mindestens fünf Tage akklimatisieren. Für alle Versuche lagen Genehmigungen der zuständigen Landesbehörde und des Tierschutzbeauftragten der Universität zu Lübeck vor (s.a. Anhang). Durch seine Betreuer und im Zuge des Tierschutzkurses der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck wurden dem Promovenden alle relevanten Techniken im Umgang mit Versuchstieren vermittelt.

## 2. Methoden und Materialien

---

Die 12 für TV2 vorgesehenen Tiere sind entweder am 28.12.2019 (*MPO<sup>-/-</sup>*) oder am 01.01.2020 (WT) geboren worden und waren daher an Tag 0 des Versuches am 23.03.2020 ebenfalls etwa 12 Wochen alt. Die Gruppe setzte sich aus 6 Wild-Typ- und 6 *MPO<sup>-/-</sup>*-Mäusen zusammen. Es waren ausschließlich Männchen. Anders als beim ersten Versuchsteil, wurden im 2. Versuchsteil die Tiere der beiden Genotypen nicht umverteilt. Es gab daher reine *MPO<sup>-/-</sup>* und reine Wildtyp-Käfige. Eine Umverteilung von Männchen auf Käfige in neuen Konstellationen kann zu aggressivem Verhalten führen, dies sollte vermieden werden. Eventuell dadurch verursachte Verletzungen hätten die Einschätzungen der Erkrankungsschwere verfälschen können. Alle weiteren Umstände waren, wie für TV1 beschrieben.

Für beide Tierversuche zusammen waren somit insgesamt 32 nach Alter, Geschlecht und genetischem Hintergrund aufeinander abgestimmte Tiere vorgesehen.

### 2.1.2. Induktion des EBA-Modells

Zur Induktion der EBA wurden an den Versuchstagen 0, 2 und 4 allen Mäusen Kaninchen-anti-Maus Typ VII Kollagen IgG subkutan injiziert. Die Injektionen an den Tagen 0 und 2 erfolgten hierbei nicht in Narkose um die Belastung für die Tiere zu begrenzen. Die 3. Injektion an Tag 4 fiel mit dem 1. Tag der Evaluation der Krankheitsschwere zusammen und erfolgte daher in Narkose.

Die Lokalisationen der Injektionen waren an Tag 0 die Nackenfalte, an Tag 2 die rechte Axilla und an Tag 4 im Bereich der Ansatzstelle des linken Hinterlaufes.

Pro Injektion wurde eine Dosis von 50 Mikrogramm Anti-Kollagen 7 gelöst in 100 µl PBS-Lösung (1x) verwendet. Die Herkunft und Aufreinigung der Antikörper wird in Kapitel 2.1.5 beschrieben.

## 2. Methoden und Materialien

---

### 2.1.3. Evaluation der Erkrankung

Durch den Promovenden erfolgten bei beiden Tierversuchen Einschätzungen der Krankheitsschwere (*Scoring*). Bei TV1 wurden die *Scorings* noch doppelt und ohne Kenntnisse der Ergebnisse des jeweils anderen von einer im *Scoring* erfahrenen Person und dem Promovenden durchgeführt. Dies geschah um sicherzustellen, dass die *Scoring*-Methode vom Promovenden angewendet werden konnte und valide Daten lieferte, die interpersonell keinen zu großen Schwankungen unterlag.

Die *Scorings* erfolgten an den Tagen 4, 6, 8, 10, 12 und 14 jedes Versuches. Die Tiere wurden hierfür durch intraperitoneale Injektion anästhesiert (75mg/kg KG Ketamin + 9 mg/kg KG Xylazin in einem Injektionsvolumen von 140-160 µl). Entsprechend Tabelle 2 wurden jeweils anatomische Regionen nacheinander danach beurteilt wie schwer sie durch die krankheitstypischen Veränderungen (Erytheme, Erosionen, Krusten) betroffen waren. Die Mundschleimhaut ist üblicherweise beim EBA-Modell nicht befallen und um sie adäquat beurteilen zu können, ist eine Endoskopie nötig. Darauf wurde in diesen Versuchen verzichtet.

Die Beurteilungen wurden schriftlich dokumentiert und in der Folge entsprechend dem jeweiligen Anteil an der Körperoberfläche bei Mäusen gewichtet (vgl. Tabelle 2). Die entsprechende Datenverarbeitung erfolgte mit Excel 2013.

Im Zuge der *Scorings* wurden die Mäuse gewogen. Außerdem wurden Photographien angefertigt.

Als Abbruchkriterien wurden im Zusammenhang mit der Tierversuchsantragsstellung eine Dermatitis von mehr als 24% der Körperoberfläche oder ein Gewichtsverlust von mehr als 20% des Ausgangsgewichtes definiert. An jedem *Scoring*-Tag wurde darauf geachtet, ob diese Werte erreicht wurden.

Nach Abschluss des *Scorings* wurde für die restliche Zeit der Narkose eine kleine adäquate Menge Bepanthen Augen und Nasensalbe auf die Corneae der Mäuse aufgetragen. Bis die Mäuse wieder deutliche Bewegungen zeigten, wurden ihre Käfige unter einer Wärmelampe positioniert, um eine Unterkühlung zu verhindern.

## 2. Methoden und Materialien

---

**Tabelle 2: Gewichtungsfaktoren (Prozent der Hautfläche) zur Evaluation der Erkrankungsschwere durch Bestimmung der ABSA (affected body surface area)**

Körperpartie	Gewichtungsfaktor
Ohr (links)	2,5
Ohr (rechts)	2,5
Auge (rechts)	0,5
Auge (links)	0,5
Schnauze	2,5
Mundschleimhaut	2,5
Kopf und Nacken	9
Vorderbein (links)	5
Vorderbein (rechts)	5
Hinterbein (links)	10
Hinterbein (rechts)	10
Schwanz	10
Torso	40

Ein Tier mit einem totalen Befall des rechten äußeren Ohres (50 %) und der Hälfte der Fläche des linken inneren Ohres (25 %) sowie einer großflächigen Hautablösung an der rechten hinteren Pfote (20 %) hat nach dieser Bewertung einen kumulativen *Score*-Wert von  $50\% \times 2,5\% + 25\% \times 2,5\% + 20\% \times 10\% = 3,875\%$  (Anteil am gesamten Integument).

## 2. Methoden und Materialien

---

### 2.1.4. Tierversuchsende und Probengewinnung

Am Tag 14 der Versuche erfolgte die finale Gewinnung von Probenmaterial. Die Versuchstiere wurden anästhesiert durch intraperitoneale Injektion in gleicher Weise wie an den vorangegangenen Scoring-Tagen. Hierbei wurde das 1,5-fache der Standarddosis verabreicht. Nach Erreichen einer kompletten, tiefen Narkose und damit einhergehendem Erlöschen der Reflexe, getestet durch den Pfoten-Kneif Test, erfolgte eine terminale Herzblutentnahme und darauffolgend eine rasche zervikale Dislokation zur Euthanasie. Das gewonnene Blut wurde auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Für die Serumproben enthielten diese Reaktionsgefäße keine Zusätze. Für Proben zur Durchflusszytometrie enthielten sie 30 µl 50 mM EDTA-Lösung und zur automatisierten Untersuchung mit dem Hemavet Analysator wurden EDTA beschichtete Röhrchen verwendet.

Serumproben wurden direkt im Anschluss an die Probengewinnung bei 400 G für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20° gelagert.

Des Weiteren wurden mithilfe einer Präparationsschere Hautproben aus der Nackenregion der Versuchstiere gewonnen. Bei allen Tieren bei denen sich Hautveränderungen zeigten, wurden die Schnitte so geführt, dass auch läsionale Haut in den Proben enthalten war. Es wurden pro Versuchstier 3 Hautproben gewonnen. Alle diese Proben wurden in Reaktionsgefäße überführt. 2 Reaktionsgefäße pro Maus wurden in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zur Verwendung bei -80° gelagert. Eine Hautprobe pro Maus wurde in ein Reaktionsgefäß mit ausreichend 4% Histofix® Lösung gegeben.

## 2. Methoden und Materialien

---

### 2.1.5. Generierung und Aufreinigung von Kollagen VII Antikörpern

Kaninchen wurden schon einige Jahre vor Beginn des Versuches mit murinem Kollagen VII immunisiert, das rekombinant in Escherichia Coli Bakterien hergestellt worden war (6).

Von diesen Kaninchen gewonnenes Serum wurde bei -20 Grad gelagert, bis es für diesen Versuch bereitgestellt wurde.

Um eine Lösung zu erhalten, die nach Möglichkeit nur noch IgG gegen Kollagen VII enthielt, wurde eine IgG-Aufreinigung per Protein G Affinitätschromatographie in 2 Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte eine Gewinnung des Gesamt-IgG des Kaninchenserums und im 2. Schritt die Isolierung des spezifischen IgG gegen murines Kollagen 7. Beide Chromatographien lassen sich unterteilen in die folgenden Schritte: Vorbereitung der Säule, Inkubation der Säule um das Zielprotein zu binden, Eluation der Säule um das Zielprotein zu gewinnen und schließlich Regeneration der Säule um sie wiederzuverwenden.

Insgesamt wurden daher 2 Chromatographie Säulen benötigt, eine zur Gewinnung von IgG aus Serum und eine Säule zur Gewinnung des spezifischen IgG gegen Kollagen VII. Die Säulen sind wiederverwendbar und werden zwischen den Verwendungen gefüllt mit 20% Ethanol bei 4°C gelagert. Vor Verwendung der Säulen wird das Ethanol verworfen. Und in der Folge lässt man bei der Gesamt- IgG Chromatographie folgende Lösungen durch die Säule laufen 2 Mal PBS-Lösung (1X) gefolgt von 0,1 M Glycin Puffer, 1 M NaCl Puffer und erneut 2 Mal einfach konzentrierte PBS-Lösung. Die Säule für das spezifische IgG wurde ausschließlich mit PBS-Lösung (1X) gewaschen. Sind die Säulen vorbereitet, werden die Säulen mit den Startlösungen (Kaninchen-Serum, Gesamt-IgG Eluat) auf einem Rollenmischer bei 4°C inkubiert, die Total IgG Säule wurde für 1 Stunde inkubiert, die Säule für das spezifische IgG für 20 Minuten. Bei der Total-IgG Chromatographie kann nach diesem Schritt das Serum verworfen werden und das Gesamt- IgG sollte in der Säule gebunden haben. Im Falle der spezifischen IgG Chromatographie gewinnt man das Flüssigkeitsvolumen wieder um die Chromatographie zu wiederholen und somit die Ausbeute zu erhöhen. Die Säulen werden dann mit PBS-Lösung (1X) gewaschen bis sich photometrisch bei 280 nm nur noch eine rechnerische Proteinkonzentration von 0,05

## 2. Methoden und Materialien

---

mg/ml (total IgG) und 0,01 mg/ml (spezifisches IgG) in der Waschlösung messen lässt und somit ungebundenes Protein aus der Säule gespült worden ist. Im Fall der Kollagen 7 IgG Chromatographie erfolgt nach der ersten Waschung mit PBS noch ein Durchlauf mit PBS-Lösung, die zusätzlich 850 mM NaCl und 1% Triton X enthält. Sobald die photometrisch bestimmte Proteinkonzentration im Wasch PBS die festgelegten genannten Grenzen unterschreitet, geht man zur Eluation des Gesamt-IgG, respektive spezifischen IgG über. Man gibt in die entsprechenden Auffangbehälter bereits vorab 5 ml 1 M Tris-aminomethan mit pH 9. Für die eigentliche Eluation gibt man 0,1 M Glycin Puffer in die Säulen und gewinnt das Eluat bis ein rechnerischer Wert durch Photometrie bei 280 nM von unter 0,1 mg/ml in der aus der Säule tropfenden Lösung angezeigt wird und sich somit keine relevante weitere Menge IgG mehr gewinnen lässt. Der Glycin-Puffer ermöglicht das in der Säule gebundene IgG wieder zu lösen. Anschließend gibt man 1 M Tris Puffer zum Eluat hinzu, bis der pH auf 7,2 gebracht ist.

Indem man das Gesamt-IgG Eluat über Nacht in einen semi-permeable Schlauch gibt und diesen in eine mit PEG gefüllte Wanne gibt, lässt sich das IgG konzentrieren, Wasser diffundiert durch die Membran hin zum PEG und die Konzentration des IgG im verbliebenen Volumen steigt.

Die Säule zur Gewinnung des Gesamt-IgG wird folgendermaßen regeneriert, man lässt weiterhin Glycin-Puffer 0,1 M hindurchlaufen, das nun verworfen wird, bis der rechnerische Wert durch Photometrie bei 280 nM unter 0,01 mg/ml fällt. Dann lässt man eine Säulenfüllung 1M NaCl-Lösung durchlaufen und schließlich noch einmal PBS. Die Säule zur Gewinnung des spezifischen IgG wird regeneriert in dem man sie zur Gänze mit 20 mM Tris-aminomethan-Lösung füllt, sie dann leert und denselben Schritt wiederholt mit einer Lösung mit 20 mM Tris-aminomethan und 0,5 M NaCl. Abschließend werden die Säulen wieder mit 20% Ethanol gefüllt und bei 4°C gelagert.

### 2.2. Untersuchungen mit Material der *In-vivo*-Versuche

#### 2.2.1. Durchflusszytometrie

##### Prinzip

Das Prinzip bei diesen Versuchen war die Quantifizierung der Subpopulationen der Immunzellen im Blut der Versuchstiere zum Zeitpunkt des Versuchsendes durch immunologische Markierung von spezifischen Oberflächenmarkern durch Fluoreszenzfarbstoffe und die anschließende Zählung mit einem automatisierten Zytometer. Hierbei wird jede Zelle einzeln an Lasern verschiedener Wellenlänge entlang geführt, die die Farbstoffe anregen. Die dabei resultierende Fluoreszenz wird gemessen. Für weitere technische Details sei auf die Angaben des Herstellers des verwendeten Durchflusszytometers verwiesen, sowie auf aktuelle Veröffentlichungen zur Methode (41). Allgemeine Angaben in diesem Kapitel (*Gating*) gelten auch für Kapitel 2.3.3. in dem Durchflusszytometrie-Experimente an Proben naiver Mäuse beschrieben sind.

##### Durchführung

Für die Durchflusszytometrie wurde EDTA-Blut verwendet. Die Proben wurden direkt im Anschluss an die Probengewinnung verwendet. Es wurde pro Maus 1 Reaktionsgefäß verwendet, sowie 9 Reaktionsgefäße als Kontrollen mit EDTA-Blut, das von mehreren Mäusen zusammengeführt wurde (1 Probe, die mit allen Farbstoffen gefärbt wurde, eine Negativ-Kontrolle, die ohne jeglichen Farbstoff verblieb und je Farbstoff eine FMO-Kontrolle). Weitere Erklärungen zu Prinzip und zur Auswertung mit FMO Proben als Kontrollen finden sich im Abschnitt *Gating*.

Im ersten Schritt wurden alle Proben mit 400G für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 45 µl MACS-Puffer mit 5 µl FcR-Block resuspendiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 µl eines sogenannten Viability fixable Farbstoffes zu den Proben gegeben. Dieser Farbstoff gehört zu einer Gruppe speziell entwickelter kommerziell erhältlicher Farbstoffe, die bei Kontakt mit bestimmten intrazellulären Proteinen fluoreszenzoptisch aktiv werden und somit die Identifizierung von Zellen mit kompromittierter Zellmembran erlauben und somit eine

## 2. Methoden und Materialien

---

Bestimmung des Lebendzellanteils. Hierauf folgten 15 Minuten Inkubation bei 4°C geschützt vor Licht.

Im nächsten Schritt wurden die Proben mit vorbereiteten Färbelösungen im Verhältnis 1:1 versetzt und für weitere 15 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die eingesetzten Farbstoffe und die genutzten Verdünnungen.

Es folgten 2 Waschschrte mit Macs-Puffer und dann eine Fixierung mit 4% Histofix® Lösung über 5 min lichtgeschützt bei RT und daraufhin 2 weitere Waschschrte mit Macs-Puffer und schließlich die Resuspendierung jeder Probe in 500 µl Macs-Puffer.

Am selben Tag und/oder dem darauffolgenden, wurden die Proben unter Verwendung eines Durchflusszytometers untersucht. Zur besseren Differenzierung wurde eine automatisierte Multi-Compensation unter Verwendung von MACS Compensation beads nach Herstellerangabe und unter Verwendung der für die Proben genutzten Färbungen durchgeführt. Die Färbung mit Zielantigen CD3 wurde nur bei TV 2 durchgeführt.

**Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Färbungen für die Bestimmung von Zellsubpopulationen aus EDTA-Blut.**

Zielantigen	Konjugierter Farbstoff	Hersteller u. Bestellnummer	Zielkonzentration
Viability 405/452 Fixable Dye	n/a	Miltenyi biotech, 130-109-816	1:50
Ly-6G	PercpVio 700	Miltenyi Biotech, 130-103-791	1:10
F4/80	APC	Invitrogen, MF48005	1:100
CD11b	APC-vio 700	Miltenyi Biotech, 130-113-232	1:40
CD3	PE Vio770	Miltenyi Biotech, 130-116-434	1:50
CD45	FITC	BD bioscience, 553080	1:75
Siglec F	PE	BD bioscience, 552126	1:50

## 2. Methoden und Materialien

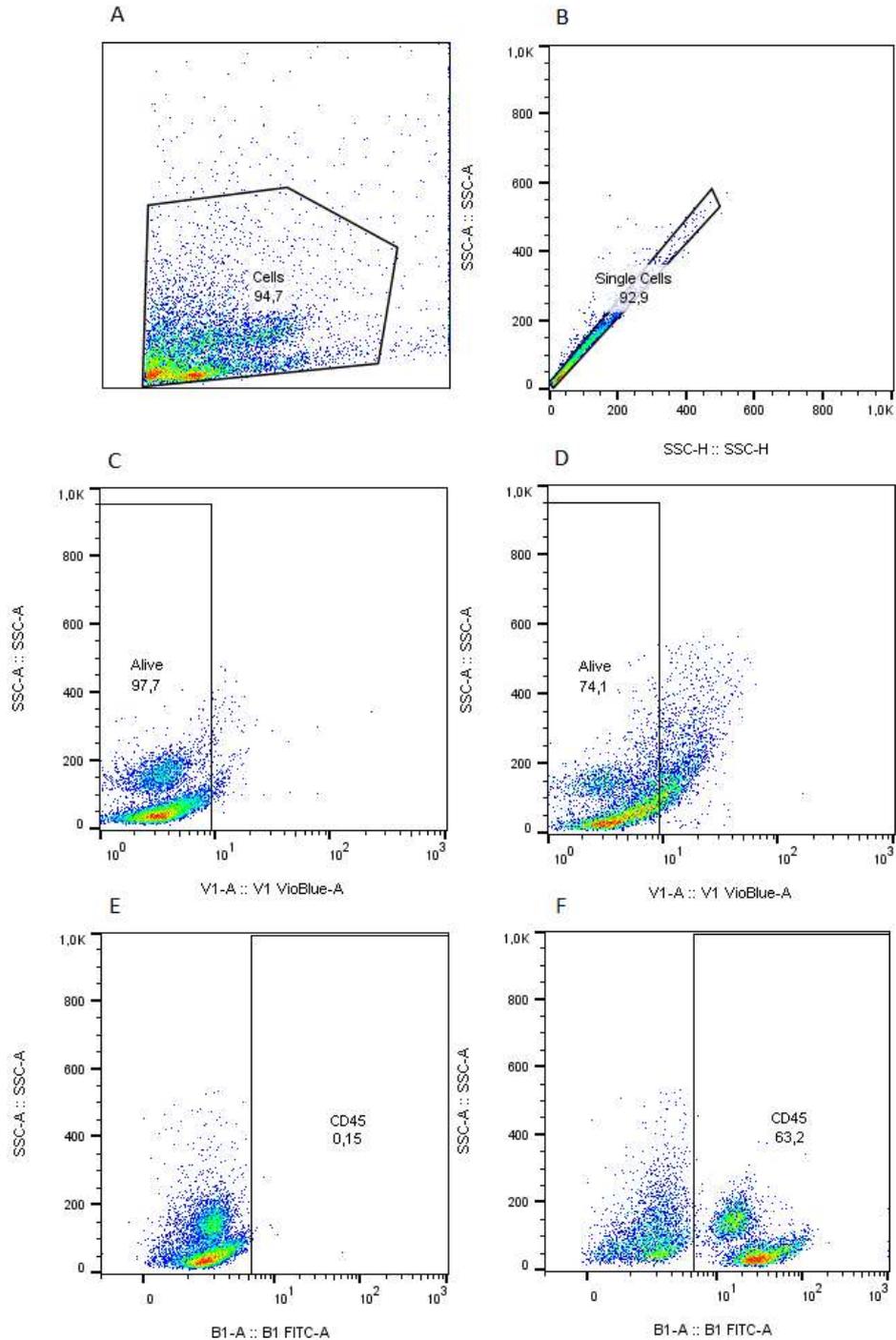
---

### **Gating**

Nach folgendem Vorgehen erfolgte für alle Proben das *Gating* zur Definition der Zellpopulationen. In einem ersten Schritt wurden die registrierten Zellen in einem Punktediagramm mit einer Auftragung von SSC-Fläche gegenüber FSC-Fläche aufgetragen und ein Polygon-Tor (Gate) gewählt, das 85% bis 95% über alle Proben gesehen erfasste, um Zellen mit extremen Werten für FSC und SSC auszuschließen. Im nächsten Schritt wurde in einer Auftragung aus SSC-Fläche gegenüber SSC-Höhe ein Gate definiert, das Zellen einschloss bei denen das Verhältnis aus SSC-Fläche zu SSC-Höhe nahe bei 1 lag, um Zellkonglomerate auszuschließen. Davon abweichende Werte treten beispielsweise auf, wenn 2 oder mehr Zellen aneinander adhärierend vom Laser registriert worden sind. In einem 3. Schritt wurde in der FMO-Probe für den Viabilitäts-Farbstoff ein Tor gewählt, das die gemessenen Populationen einschloß, um die Grundsignalstärke ohne Farbstoff zu berücksichtigen. Alle Zellen in den Proben, die den entsprechenden Farbstoff enthielten und bei zum Farbstoff passender Anregung nach Datenblatt ein stärkeres Signal zeigen, sind als nicht vital zu betrachten. (s.a. Darstellungen C „Gate-Erstellung Viability-FMO“ und D „beispielhafte Anwendung des Viability-Gates“ in Abb. 3.)

Das *Gating* bei der Viabilitäts-FMO Probe ist das Einzige bei dem das Gate die Population ohne relevante Signalstärke einschließt. Bei allen anderen FMO-Proben wurde ein Gate gewählt, in dem möglichst wenig Zellen enthalten sind, somit sollte erreicht werden, dass gemessene Signalstärken, die ohne Farbstoff zu Stande kommen, nicht als Zugehörigkeit zur entsprechenden Zellpopulationen gezählt wurden. Darstellung E in Abb. 3. zeigt, wie ein Gate in einer FMO-Probe erstellt wird. Es ist eine Probe, die entsprechend der FMO-Definition mit allen Färbungen außer der für CD45-FITC angefärbt wurde. Die X-Achse gibt die gemessene Signalstärke im Kanal wieder, der hinsichtlich Anregung und abgegebenem Licht zum Farbstoff FITC passt. Darstellung F in Abb. 3 gibt hierzu passend an, wie sich die Anwendung des so erzeugten Gates bei einer Probe, die mit CD45-FITC gefärbt wurde, auswirkt. In diesem Beispiel zeigen somit 63,2 % der Zellen eine Signalstärke wie sie von Zellen ohne Farbstoff nicht erreicht wird, diese Zellen wurden somit als CD45<sup>+</sup> gezählt.

## 2. Methoden und Materialien



**Abbildung 3: Repräsentative Darstellung zur Erstellung und Anwendung von Gates mit FMO-Proben**

**A** Gating nach Größe (FSC) und Granularität (SSC), **B** Ausschluß Zellkonglomerate **C** Gate-Erstellung *Viability-FMO* **D** beispielhafte Anwendung des Viability-Gates **E** Beispiel zum Gating mit FMO-Proben **F** Beispiel zur Anwendung des Gates aus **E**

## 2. Methoden und Materialien

---

### 2.2.2. Immunhistochemie

Es wurden nach allgemein üblicher Art und Weise Paraffin-Schnitte (5 µm) und Kryoschnitte (6 µm) durch technische Assistenten des Labors mit einem Mikrotom angefertigt. Im Zuge dessen wurden auch nach HE gefärbte Schnitte bereitgestellt.

Folgende Färbungen an den Paraffin- und Kryostat-Schnitten wurden vom Promovenden angefertigt.

#### **Kaninchen-IgG und C3:**

Es wurden Gefrierschnitte verwendet, um in den Hautproben der Versuchstiere aus TV1 und TV2 Kaninchen-IgG und C3-Ablagerungen nachzuweisen. Diese wurden nach der Herstellung bis zur Färbung bei -20 Grad gelagert. Im ersten Schritt wurden die Objektträger mit den zu färbenden Proben für 10 Minuten der Raumtemperatur ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben in 5 Grad kaltes Aceton getaucht und für 10 Minuten bei -20 Grad inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte über 5 Minuten mit PBS-Lösung. Alle weiteren Waschschrte erfolgten auf gleiche Art und Weise. Es wurden je Objektträger 3 Proben ausgewählt und parallel gefärbt. Um ein Vermischen der Substanzen der verschieden gefärbten Objektträger-Dritteln zu verhindern, wurden Kreise mit einem Dako-Pen um die Proben gezogen. Die Funktionsweise des Dako-Pens besteht darin, einen hydrophoben Film auf dem Objektträger zu erzeugen, der ein Verlaufen aufgetropfter Substanzen verhindert.

Proben, die als Isotypen-Kontrollen dienten und Proben für die Färbung mit Zielantigen C3 wurden für 30 Minuten mit 5% Ziegen-Serum inkubiert. Folgende Antikörper kamen in einem ersten Bindungsschritt zum Einsatz und wurden über 1 Stunde mit den Proben inkubiert.

Für die Darstellung von Kaninchen-IgG: Ziegenantikörper gegen die leichte und schwere Kette von Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch 111-545-144) in einer 1:500 Verdünnung in PBS-Lösung. Dieser Antikörper ist ein Konjugat-Antikörper, der an Alexa Fluor 488 gekoppelt ist.

## 2. Methoden und Materialien

---

Isotyp-Kontrolle: Polyklonales Ratten IgG (emfret Analytics C301) in einer 1:200 Verdünnung in PBS-Lösung (1X) mit 5% Ziegen Serum.

C3: Ratten IgG gegen Maus C3 (CL7503AP) in einer 1:200 Verdünnung in PBS-Lösung (1X) mit 5% Ziegen Serum.

Es erfolgte anschließend ein Waschschriff, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und darauffolgend im 2. Bindungsschriff die Markierung der gebundenen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen über 1 Stunde bei Raumtemperatur. Es kamen folgende sekundäre Antikörper zum Einsatz.

Kaninchen-IgG: Es wurde PBS-Lösung (1X) auf den Proben belassen, da das Zielantigen per direkter Methode mit einem gekoppelten Antikörper schon im ersten Schriff gefärbt worden war.

Isotyp-Kontrolle und C3: Ziegen Anti-Ratten IgG gekoppelt an Alexa Fluor® 594 in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-Lösung. Es erfolgte danach ein weiterer Waschschriff, um nicht gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper an einer unspezifischen Bindung zu hindern und abschließend eine Gegenfärbung des Kerns mit DAPI-Fluoromount.

### **Ly-6G:**

Um in den Hautproben der Versuchstiere aus TV1 und TV2 Neutrophilen-Infiltrate darzustellen und zu quantifizieren wurden Gewebeschnitte verwendet, die nach Fixierung mit Histofix in Paraffin eingebettet worden waren. In einem ersten Schriff wurden die Gewebeproben entparaffinisiert. Hierfür wurden die Objektträger in Glaskästen mit folgenden Lösungen über je 3 Minuten inkubiert. 2 Wannen mit Xylene, 2 Wannen mit 96% Ethanol, 1 Wanne mit 70% Ethanol, 1 Wanne mit 50% Ethanol und 2 Wannen mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Gewebeproben auf dem Objektträger mit einem Dako-Pen umkreist. Um die Antigene für eine Färbung zugänglich zu machen wurden alle Proben mit einer gebrauchsfertigen kommerziell erhältlichen Pepsin-Lösung über 10

## 2. Methoden und Materialien

---

Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Darauf folgten 3 Waschschriffe über 5 Minuten mit TBS-Lösung.

Im Blockschrift wurden die Proben über 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Ziegen Serum in TBS inkubiert. Ohne Waschschrift und nach lediglichem Austausch des aufgetrachten Volumens wurden direkt im Anschluss an das Blocken die Gewebeschnitte mit dem primären Antikörper zur Darstellung von Ly-6G über Nacht bei 4°C inkubiert. (Biolegend 127602, 1:100 in 5 % Ziegen Serum in TBS). Um nachzuweisen, dass die Färbung spezifisch für Ly-6G ablief, wurden Proben als Isotyp-Kontrolle mit normalen Ratten IgG in gleicher Konzentration inkubiert. (emfret analytics C301, 1:100 in 5 % Ziegen Serum in TBS). Darauf folgten 3 Waschschriffe über 5 Minuten mit TBS-Lösung und schließlich eine Inkubation über 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Ziegen Anti-Ratten Antikörper gekoppelt an Alexa Fluor® 594 in einer 1:500 Verdünnung in TBS. Es erfolgte danach ein weiterer Waschschrift, um nicht gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper an einer unspezifischen Bindung zu hindern und abschließend eine Gegenfärbung des Kerns mit DAPI-Fluoromount.

### **MPO/Ly-6G Doppelfärbung**

Um in den Hautproben von Versuchstieren aus TV1 und TV2 die Kolokalisierung von MPO und Ly-6G in Neutrophilen darzustellen wurden Gewebeschnitte verwendet, die nach Fixierung mit Histofix in Paraffin eingebettet worden waren. In einem ersten Schritt wurden die Gewebeproben entparaffinisiert (s.a. Beschreibung Ly-6G-Färbung) und Probenfelder mit dem Dako-Pen definiert.

Zur Antigen-Freilegung wurden die Proben in einem Druckkochtöpf für 5 Minuten in Tris-EDTA-Puffer gekocht. Außerdem wurden die Proben über 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2% Triton X in TBS-T inkubiert, um jegliche Membran zu permeabilisieren. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurde über 2 Stunden mit 5 % Ziegen Serum in TBS inkubiert. Ohne Waschschrift und nach lediglichem Austausch des aufgetrachten Volumens, wurde direkt im Anschluss an das Blocken über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern gegen Ly-6G und MPO inkubiert. Zur Anfärbung von Ly-6G wurde derselbe

## 2. Methoden und Materialien

---

Antikörper verwendet, der auch schon bei der alleinigen Ly-6G-Färbung zum Einsatz kam. Für die Anfärbung von MPO wurde ein Kaninchen Anti-MPO Antikörper (Dako, A0398) verwendet in einer Verdünnung von 1:150, als dazugehöriger Iso-Typen-Antikörper wurde Kaninchen IgG (BioXcell, BE0095) in der gleichen Konzentration verwendet. Darauf folgten 3 Waschschritte über 5 Minuten mit TBS-Lösung und schließlich eine Inkubation über 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Esel Anti-Kaninchen Antikörper gekoppelt an Alexa Fluor® 594 in einer 1:400 Verdünnung in TBS, sowie einem Ziegen Anti-Ratten Antikörper gekoppelt an Alexa Fluor® 488, ebenfalls in einer 1:400 Verdünnung. Es erfolgte danach ein weiterer Waschschritt, um nicht gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper an einer unspezifischen Bindung zu hindern und abschließend eine Gegenfärbung des Kerns mit DAPI-Fluoromount.

### **Auswertung der Färbungen**

Alle gefärbten Gewebeschnitten wurden an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Keyence mit zugehöriger Software untersucht und repräsentative Bilder wurden aufgenommen. Bei den Färbungen gegen Ly-6G erfolgten eine teilautomatisierte Zählungen mit dem zum Mikroskop zugehörigen Programm. Das Prinzip hierbei besteht darin, dass man nach Erstellung der Bilder diese in eine Liste lädt und sie sich dann vom Programm nacheinander zeigen lässt und für jedes Bild prüft, ob die automatisch bestimmte Schwelle, ab der eine Zelle als positiv gezählt wird, gut gewählt ist. Weiterhin achtet man darauf, dass es nicht im Übermaß zu verringerter Zählung von Zellen kommt, da diese zu nah beieinander liegen und dadurch vom System nicht unterschieden werden. Ausserdem verhindert man manuell durch das Markieren von Artefakten, dass diese die Messung behindern.

### 2.3. *In vitro* Versuche

In diesem Kapitel wird die Methodik der Versuche erläutert, die in der Folge der *In-vivo* Versuche unter Verwendung von Geweben von gesunden naiven WT und *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt worden sind. Diese Mäuse waren gleicher Herkunft, wie die Tiere, in denen das EBA-Model induziert wurde. Sie wurden unter gleichen Bedingungen ebenfalls in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten.

#### 2.3.1. Reaktive Sauerstoffspezies - Freisetzung *assay*

Um die ROS-Freisetzung der Neutrophilen von *MPO*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Neutrophilen von Kontroll-WT Mäusen näher zu untersuchen wurde folgender experimenteller Aufbau verwendet. Das Experiment bestand aus folgenden Schritten:

1. Eine 96 Loch-Mikrotiterplatte wurde mit immobilisierten Immunkomplexen versehen.
2. Das Knochenmark der Mäuse wurde gewonnen und daraus die Neutrophilen isoliert.
3. Die Neutrophilen wurden zusammen mit einer chemolumineszierenden Substanz in Kontakt mit den Immunkomplexen gebracht und die Lichtemission gemessen.

Am Tag vor dem ROS-Freisetzung *assay* wurde eine 96 Loch-Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität aus Polystyrene an einem Rein-Arbeitsplatz mit immobilisierten Immunkomplexen versehen. Hierfür wurden 100 µl einer Lösung mit 20 µg/ml humanem Serum Albumin in Beschichtungs-Puffer(Carbonat-/Bicarbonat-Puffer) pro Vertiefung pipettiert und für 3h bei 37°C inkubiert. Hierdurch sollte ein Binden des Humanalbumins an die Platte erreicht werden.

Anschließend wurden die Vertiefungen 3 Mal mit PBS-Lösung (1X) gewaschen und dann für 1 Stunde mit 10% hitze-inaktiviertem FBS in PBS-Lösung (1X) geblockt bei Raumtemperatur. Dadurch sollte die Bindungskapazität der Platte gesättigt werden. Hiernach wurde wieder 3 Mal mit PBS-Lösung (1X) gewaschen und schließlich wurden 100 µl einer 8,75 µg/ml Anti-HSA-Lösung in jede hierfür vorgesehene Vertiefung gegeben und bis zur Verwendung am nächsten Tag bei 4°C inkubiert. Die Anti-HSA Antikörper sollten nun mit den an die Platte gebundenen HSA reagieren um immobilisierte Immunkomplexe zu bilden.

## 2. Methoden und Materialien

---

Kontrollvertiefungen wurden, um als Negativ-Kontrolle zu dienen, nicht mit Anti-HSA inkubiert.

Am eigentlichen Versuchstag wurden Femura und Tibiae einer WT und einer *MPO*<sup>-/-</sup> Maus nach Narkotisierung (analog zur präfinalen Narkosen bei TV1 und TV2) und zervikaler Dislokation durch Präparation mit Schere, Skalpell und Pinzette gewonnen und von anliegender Muskulatur befreit. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet die Knochen nicht zu eröffnen. Auf Eis und umgeben von MACS-Puffer wurden die Knochen transportiert zu einem Rein-Arbeitsplatz mit Abzug. An diesem erfolgten alle weiteren Schritte außer der CL-Messung. Die Gefahr für eine vorzeitige Aktivierung der Neutrophilen durch mikrobielle Kontamination, die einen gravierenden Störfaktor für das Experiment darstellen würde, wurde somit reduziert. Die Knochen wurden auf beiden Seiten eröffnet und mit MACS-Puffer durchgespült. Die Spülflüssigkeit wurde aufgefangen und durch einen 40 Mikrometer Zellfilter gegeben, um eine Zellsuspension des Knochenmarks zu erhalten. Die Gesamtzellzahl in dieser Lösung wurde durch mikroskopische Zählung unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Mithilfe eines Neutrophilen Isolation Kits wurde den Herstellerangaben folgend vorgegangen und somit durch magnetische Negativ-Selektion eine Lösung erhalten, die nahezu nur noch Neutrophile enthielt. Die Methode des Kits basiert darauf Zellen, die keine neutrophilen Granulozyten sind, an Microbeads zu binden und diese beim Durchströmen einer Säule in einem Magnetfeld am Durchfluss zu hindern. Nach Verwendung des Kits erfolgte eine erneute Zählung der Zellen analog zur Zählung der Gesamtzellzahl, um die Gesamtzahl an Neutrophilen zu erhalten.

Die am Vortag vorbereitete Platte wurde vor Verwendung erneut 3 Mal mit PBS Lösung gewaschen. Die Zellen, die mit den Zielkonzentrationen (30  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 3  $\mu$ M) des MPO-Inhibitors 475944-1GM inkubiert werden sollten, wurden hierfür für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einen Inkubationsschrank gestellt. Zellen, die mit dem MPO-Inhibitor AZD 5904 mit den Zielkonzentrationen (10  $\mu$ M und 1  $\mu$ M) inkubiert werden sollten, wurden hierfür für 15 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einen Inkubationsschrank gestellt. Beide Substanzen waren in ihrer unverdünnten Konzentration in DMSO gelöst. Um einem evtl. Einfluss des DMSO gerecht zu werden, wurden in jedem Experiment Neutrophile in der

## 2. Methoden und Materialien

---

höchsten verwendeten DMSO-Konzentration ohne Inhibitor für den gleichen Zeitraum inkubiert und im Versuch als Kontrollen eingeschlossen. Alle nicht mit Substanzen inkubierten Zellen wurden in der Zwischenzeit auf Eis gelagert, um eine vorzeitige Aktivierung zu verhindern.

Anschließend wurden 200.000 Neutrophile in 200 µl Chemolumineszenz Medium mit 0,1 mg Luminol pro Vertiefung in einen Infinite M200 PRO ELISA - Photometer gegeben. Luminol gilt als empfindliche Substanz zum Nachweis oxidativer Substanzen (42).

Um zu ermöglichen, dass sich das mit einer Feinwaage bemessene Luminol im CL-Medium löste, wurden pro 2 mg Luminol 8 µl 2 Molarer Natriumhydroxid Lösung hinzugegeben.

Das gleiche Vorgehen, jedoch ohne Zugabe von Natriumhydroxid, erfolgte mit weiteren Proben, bei denen anstatt von Luminol, Lucigenin in der gleichen Konzentration zum Einsatz kam. Lucigenin ist als Nachweisreagenz zum Nachweis von Superoxid gebräuchlich (43).

Alle Bedingungen wurden in Duplikaten untersucht, um den Einfluss einer Einzelnen durch Störfaktoren beeinträchtigten Plattenvertiefung zu reduzieren.

Über 2 Stunden wurde die Chemolumineszenz jeder Kondition photometrisch gemessen. Im Anschluss wurde mit GraphPad Prism das Integral der so entstandenen Kurven (X-Achse: Zeit in Minuten, Y-Achse: Chemolumineszenz in relative light unit) berechnet.

Nach Abschluss der Chemolumineszenz-Messung wurden die Volumina aus ihren entsprechenden Vertiefungen pipettiert und in Reaktionsgefäße überführt. Die Duplikate wurden hierfür zusammengegeben, sodass pro Testkondition nur ein Reaktionsgefäß benötigt wurde. Anschließend wurden diese bei 400G für 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße transferiert, die bis zur weiteren Verwendung bei -20° gelagert wurden.

### 2.3.2. Leukotrien B<sub>4</sub> - ELISA

Für die quantitative Bestimmung der Freisetzung von Leukotrien B<sub>4</sub> durch Neutrophile in ihr Milieu nach Immunkomplexstimulierung wurden die Konzentrationen in den nach Abschluss des ROS-Freisetzung *assay* gewonnenen Überständen mit einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt. Hierbei handelte es sich um einen sogenannten kompetitiven ELISA, bei dem das LTB<sub>4</sub> in der Probe mit zugegebenem an Meerrettich-Peroxidase gebundenen LTB<sub>4</sub> des Kits um Bindungsstellen an einem an die Platte gekoppelten Antikörper konkurriert und schließlich enzymatisch die Menge, die an die Platte gebundenen Meerrettich-Peroxidase über eine Farbreaktion quantifiziert wird. Enthält die zu testende Probe wenig LTB<sub>4</sub> ist eine hohe optische Dichte der Farbreaktion zu messen, auch mit bloßem Auge als deutliche Verfärbung der Probe zu erkennen. Ist hingegen sehr viel LTB<sub>4</sub> in der Probe enthalten, bindet dieses in hohem Maße an die Platte, sodass der Großteil des zugegebenen an Meerrettich-Peroxidase gebundenen LTB<sub>4</sub> in den Waschschrritten hinweggespült wird.

Hierbei wurde im Versuchsablauf nach Herstellerangaben des Kits vorgegangen. Die anschließende Messung der Farbreaktion erfolgte mit dem Infinite M200 PRO ELISA-Reader.

Die Berechnung der LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen in den Proben auf Grundlage der gemessenen optischen Dichten erfolgte mit GraphPad Prism 7.0. Die Erstellung einer Standardreihe durch Verdünnung einer im Kit enthaltenen LTB<sub>4</sub> Probe ermöglichte, da bei diesen Proben LTB<sub>4</sub> Konzentration und optische Dichte bekannt waren, die Erstellung einer entsprechenden Standardkurve. Es wurde eine 4-Parameter sigmoidale Standardkurve erstellt, um die Konzentrationen aus den gemessenen optischen Dichten zu interpolieren.

### 2.3.3. Durchflusszytometrie

#### CD62-L

Um das CD62L-*Shedding* der *MPO*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den zugehörigen WT Mäusen näher zu untersuchen, wurde folgender experimenteller Aufbau verwendet.

Die Ergebnisse des Versuches gaben zusätzlich auch Auskunft über Reinheit und Lebendzellanteil der Neutrophilen-Lösung bei Anwendung des Neutrophilen-Isolationskits von Miltenyi.

Diese Versuche fanden teilweise an Tagen statt an denen ein ROS-Freisetzung *assay* durchgeführt wurde. Es waren an manchen Versuchstagen ausreichend Neutrophile von WT- und *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen vorhanden zur Durchführung mehrerer verschiedener Experimente. Während Versuchsteilen, die nicht parallel erfolgen konnten, wurden die Neutrophilen gelöst in MACS-Puffer auf Eis gelagert, um die Gefahr einer vorzeitigen Aktivierung zu reduzieren.

Es wurden 2 Reaktionsgefäße mit je 1 Millionen WT Neutrophilen (Kontrolle und Probe), 2 weitere Reaktionsgefäße mit je 1 Millionen *MPO*<sup>-/-</sup> Neutrophilen (Kontrolle und Probe) und 6 Reaktionsgefäße mit einem Gemisch aus Neutrophilen beider Maustypen, um als weitere Kontrollen zu dienen, befüllt (1 FMO pro Farbstoff, eine Probe, die mit allen Farbstoffen gefärbt wurde und eine Negativ-Kontrolle, die ohne jeglichen Farbstoff verblieb).

Reaktionsgefäße wurden bei 400G für 5 Minuten und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und bis auf die beiden Proben-Reaktionsgefäße wurden die Zellen in allen Reaktionsgefäßen in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Kontrollen für das *Gating* wurden auf Eis gelegt.

Die Proben wurden in 300 µl einer PMA-Lösung (100 ng/ml) resuspendiert und zusammen mit ihren jeweiligen Kontrollen für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach Abschluss der 2 Stunden wurden alle Reaktionsgefäße bei 400G für 5 Minuten zentrifugiert, die Überstände wurden verworfen und die Zellen wurden in 45 µl MACS-Puffer mit 5 µl FcR-Block resuspendiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 µl Viobility 405/452 Fixable zu den Proben gegeben. Gefolgt von 15 Minuten Inkubation bei 4°C geschützt vor Licht.

## 2. Methoden und Materialien

---

Im nächsten Schritt wurden die Proben mit vorbereiteten Färbelösungen im Verhältnis 1:1 versetzt und für weitere 15 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die eingesetzten Farbstoffe und die genutzten Verdünnungen. Es folgten 2 Waschschrte mit Macs-Puffer und eine Fixierung mit 4% Histofix® über 5 min lichtgeschützt bei RT. Daraufhin 2 weitere Waschschrte mit MACS-Puffer und schließlich die Resuspendierung jeder Probe in 500 µl MACS-Puffer.

Am selben Tag wurden die Proben unter Verwendung eines Durchflusszytometers untersucht. Zur besseren Differenzierung wurde eine automatisierte Multi-Compensation unter Verwendung von MACS Compensation beads nach Herstellerangabe und unter Verwendung der für die Proben genutzten Färbungen durchgeführt.

**Tabelle 4: Überblick über die verwendeten Färbungen im CD62L-Versuch**

Zielantigen	Konjugierter Farbstoff	Hersteller u. Bestellnummer	Zielkonzentration
Viability 405/452 Fixable Dye	vioblue	Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach, 130-109-816	1:50
Ly-6G	PercpVio 700	Miltenyi Biotech 130-103-791	1:10
CD45	FITC	BD bioscience 553080	1:75
CD62L	PEVio	Miltenyi Biotech 130-119-124	1:50

## 2. Methoden und Materialien

---

### Neutrophilenquantifizierung

Analog zur Untersuchung von Blutproben aus den Tierversuchen, wurden auch Voll-Blutproben von nicht erkrankten *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen zur Untersuchung mit dem Hemavet-Analysator, sowie zur Durchflusszytometrie gewonnen und direkt nach Entnahme in Probengefäße gegeben, die EDTA enthielten. Da die neutrophile Myeloperoxidase bei Wildtyp-Mäusen mehrere Prozent der Trockenmasse der Neutrophilen ausmacht und in den namensgebenden Granula der Zellen enthalten ist, galt es eine Unterschätzung der Neutrophilenzahl bei den *MPO*<sup>-/-</sup> Mäusen durch eine Nichterfassung mit einem Verfahren, das Zellen nach Größe und Granularität misst zu vermeiden. Ziel war daher, die Blutbild-Ergebnisse mit einem 2. Verfahren zu bestätigen bei dem die Neutrophilen auch über spezifische Oberflächenmarker gezählt wurden.

Es wurde dasselbe Schema wie beim *CD62L-Shedding* verwendet, bloß unter Verwendung von Blutproben, Unterbleiben einer Inkubation mit PMA-Lösung und anstelle einer Lösung mit Anti-CD62L-PEVio wurde mit einem an PE gekoppelten Antikörper gegen Ly-6C bei einer Zielkonzentration von 1:10 gefärbt.

### C5a-Rezeptor und Fcγ-Rezeptor 4 Expression

Um die Expression des C5a-Rezeptors und des Fcγ-Rezeptor 4 der *MPO*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den zugehörigen WT Mäusen näher zu untersuchen, wurde folgender experimenteller Aufbau verwendet.

Nach üblicher Neutrophilen-Isolation wie beschrieben, wurden Zellen beider Studienpopulationen mit Immunkomplexen analog zu den Versuchen zur ROS Freisetzung stimuliert (s.a. Kapitel 2.3.1), zusätzlich wurden unstimulierte Zellen verwendet, die während der Inkubation gekühlt verblieben und Zellen, die mit 100ng/ml C5a stimuliert worden sind. Die Färbung für die durchflusszytometrische Messung erfolgte auch für diesen Versuch nach demselben Schema wie für das *CD62L-Shedding*. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die eingesetzten Farbstoffe und die genutzten Verdünnungen.

## 2. Methoden und Materialien

---

**Tabelle 5: Überblick über die verwendeten Färbungen im Versuch zum C5a-Rezeptor und Fcγ-Rezeptor 4**

Zielantigen	Konjugierter Farbstoff	Hersteller u. Bestellnummer	Zielkonzentration
Viobility 405/452 Fixable Dye	vioblue	Miltenyi biotech, 130-109-816	1:50
Ly-6G	APC-vio770	Miltenyi Biotech 130-118-949	1:50
CD11b	Brilliant violette 605	BioLegend 101237	1:100
C5aR	PerCP-vio700	Miltenyi biotech, 130-123-194	1:50
FcγRIV	PE	BioLegend, 149503	1:100

## 2. Methoden und Materialien

---

### 2.3.4. Sytox green assay

Zur Quantifizierung der Netose nach Immunkomplexstimulierung von *MPO*<sup>-/-</sup> Maus Neutrophilen im Vergleich zu Neutrophilen von entsprechenden WT Mäusen wurde folgender experimenteller Aufbau verwendet, der sich in folgende Schritte unterteilen lässt:

1. Eine 96 Loch-Mikrotiterplatte wurde mit immobilisierten Immunkomplexen versehen.
2. Das Knochenmark der Mäuse wurde gewonnen und daraus die Neutrophilen isoliert.
3. Die Neutrophilen wurden zusammen in Kontakt mit den Immunkomplexen oder Calcium-Ionophore gebracht und die Lichtemission gemessen, die durch zugegebenes *Sytox green* zustande kam. *Sytox green* ist eine Substanz die in Kontakt mit extrazellulärer DNA oder bei Kompromittierung der Zellmembran mit intrazellulärer DNA fluoresziert. (44)

Vorab, mindestens am Vortag, wurde eine 96 Loch-Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität in den entsprechenden Vertiefungen mit immobilisierten Immunkomplexen versehen. Hierfür wurden 100 µl einer Lösung von 100 µg/ml humanem Serum Albumin in carbonate/bicarbonate Puffer (50mM, pH 9,6) pro Vertiefung pipettiert und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Hierdurch sollte ein Binden des Humanalbumins an die Platte erreicht werden.

Anschließend wurden die Vertiefungen 3 Mal mit PBS-Lösung (1X) gewaschen um nicht gebundenes Albumin zu entfernen und dann wurde für 1 Stunde mit 10% hitze-inaktiviertem FBS in PBS Lösung geblockt bei Raumtemperatur. Dadurch sollte die Bindungskapazität der Platte gesättigt werden. Hiernach wurde wieder 3 Mal mit einfach konzentrierter PBS Lösung gewaschen und schließlich 100 µl einer 40 µg/ml Anti-HSA-Lösung in 100 µl PBS Lösung in jede Vertiefung gegeben und bis zur Verwendung am nächsten Tag bei 4°C inkubiert. Die Anti-HSA Antikörper sollten nun mit den an die Platte gebundenen HSA reagieren um immobilisierte Immunkomplexe zu bilden. Bestimmte Vertiefungen wurden nicht mit Anti-HSA inkubiert, um als Negativ-Kontrolle zu dienen. Weitere Vertiefungen blieben gänzlich unbehandelt und dienten dazu Netose durch einen

## 2. Methoden und Materialien

---

Calciumionophore an Stelle von Immunkomplexen auszulösen. Als Calcium-Ionophore kam A23187 in einer finalen Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  zum Einsatz.

Am eigentlichen Versuchstag wurden Neutrophile von *WT* und *MPO<sup>-/-</sup>* Mäusen gewonnen, wie im Abschnitt ROS-Freisetzung *assay* beschrieben.

Für das *Sytox green assay* wurden die Neutrophilen nach der Zählung zentrifugiert bei 400G für 5 Minuten und der Überstand verworfen, sie wurden dann in HBSS (1X) resuspendiert, das Volumen wurde hierbei so gewählt, dass eine doppelt so hohe Konzentration an Zellen erreicht wurde, wie die, die schlussendlich während des Versuches vorliegen sollte. Hierdurch sollte erreicht werden, dass Lösungen mit *Sytox green*, Testsubstanzen und Calcium-Ionophore noch hinzugegeben werden konnten und trotzdem für alle Wells das gleiche Volumen und die gleiche Zellzahl zu Stande kamen.

Pro well wurden 100.000 Neutrophile in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  mit HBSS als Medium pipettiert. Alle Wells enthielten weiterhin *Sytox green* in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ . Alle Konditionen wurden analog zum ROS-Freisetzung *assay* pro Experiment in 2 Wells gemessen. Als zusätzliche Kontrollen wurden immer auch Wells gemessen in denen sich HBSS mit *Sytox green* ohne Zellen befand und Wells in die 100.000 Neutrophile, die bei 95°C über 15 Minuten gekocht worden waren.

Die am Vortag vorbereitete Platte wurde vor Verwendung erneut 3 Mal mit PBS Lösung gewaschen. Anschließend wurden 50  $\mu\text{l}$  einer Calcium-Ionophore HBSS Lösung in doppelter Zielkonzentration in die vorgesehenen Wells gegeben.

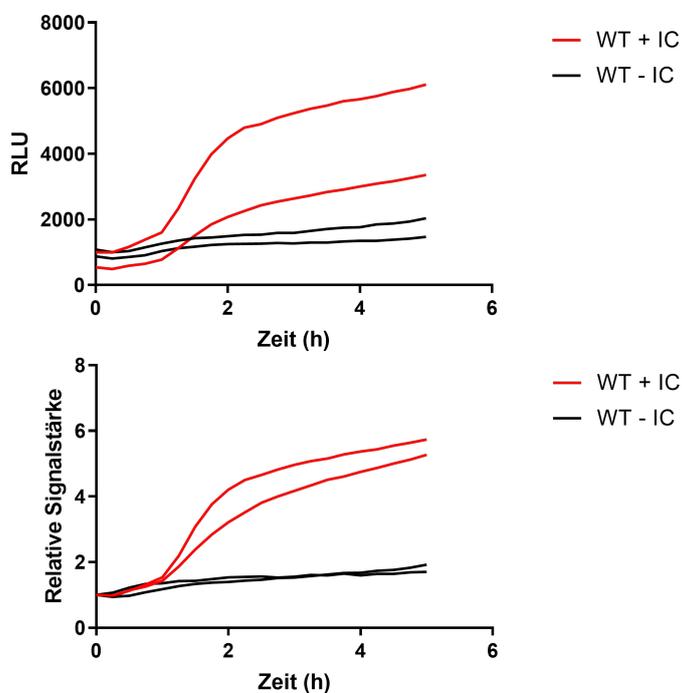
Schließlich wurden die Zellen zügig in die entsprechend vorgesehenen Wells pipettiert.

Unmittelbar danach wurde die Platte in einen Infinite M200 PRO ELISA gegeben und über 5 Stunden wurde alle 15 Minuten die Fluoreszenz von *Sytox green* im Wellenlängenbereich von 530 bis 570 nm nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm gemessen.

Alle gemessenen Werte wurden in Excel durch ihren Start-Wert dividiert, um damit die Information über die Fluoreszenz Zunahme und damit der relativen Zunahme an extrazellulärer DNA pro Well über die Zeit zu erhalten. Im Anschluss wurde mit GraphPad Prism das Integral der so entstandenen Kurven (X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Relative Zunahme der Fluoreszenz) berechnet.

## 2. Methoden und Materialien

Das Teilen des Startwertes durch seinen Ausgangs-Wert, war insbesondere im Hinblick auf die Vergleichbarkeit von Experimenten an verschiedenen Tagen wichtig. War beispielsweise an einem Tag der Startwert eines Wells 500 und der Wert stieg über 5 Stunden bis auf 3000 an, stellte dies eine Versechsfachung des Lichtsignals dar und damit der Menge an extrazellulärer DNA, die in Kontakt mit Sytox green gekommen ist. Wenn bei einem anderen Experiment gleichen Aufbaus, im entsprechenden Well ein Startwert von 1000 vorlag und das Signal über 5 Stunden bis auf 6000 anstieg. War dies ebenfalls eine Versechsfachung des Signals. *Abbildung 4* verdeutlicht dies mit den Werten aus 2 Experimenten.



**Abbildung 4: Illustration zur Auswertung von Sytox-Green-assay Ergebnissen**

Vergleich von Rohwerten (oben) und der durch ihren Ausgangswert dividierten Messwerte (unten) zweier Sytox green assays mit unterschiedlichen Ausgangswerten. In beiden Fällen eine näherungsweise Versechsfachung der Menge an photometrisch gemessener extrazellulärer DNA. Die Rohwerte zeigen dies nicht adäquat an. Die Einheit der Y-Achse (oben) ist RLU (relative light unit) unter gleichen Messbedingungen.

## 2. Methoden und Materialien

---

### 2.3.5. Toxizitätsanalyse

Um die Toxizität der verwendeten MPO-Inhibitoren zu bestimmen, wurden WT Neutrophile verwendet, die im Zuge von *in vitro* Experimenten gewonnen worden waren. Diese wurden mit den in den Versuchen verwendeten Inhibitoren in den gleichen Konzentrationen, sowie unter gleichen Bedingungen und für dieselbe Zeitdauer inkubiert. Anschließend wurden sie unter Beachtung der Herstellerangaben mit dem Annexin-V-FITC Messkit von Promocell gefärbt. Das Prinzip hierbei ist, dass der Zellmarker Annexin V bei apoptotischen und nekrotischen Zellen einer Färbung mit einem Antikörper an den FITC gekoppelt wurde zugänglich ist und dann mit einem Durchflusszytometer gemessen werden kann. Zusätzlich bietet das Kit die Möglichkeit mit Propidium-Iodid gezielt den Anteil nekrotischer Zellen zu bestimmen. Dies wurde ebenfalls durchgeführt.

Das *Gating* erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben unter Verwendung von FMO-Proben. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurden für die FMO-Proben Positivkontrollen verwendet die über 15 Minuten bei 89° C auf einer Schüttelplattform gekocht worden waren.

### 2.3.6. Migration neutrophiler Granulozyten

Um einen möglichen Einfluss einer MPO Defizienz auf das Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde folgender experimenteller Aufbau angewandt (modifiziertes *Transwell migration assay*). Neutrophile Granulozyten wurden wie bereits beschrieben (s. Kapitel 2.3.1) aus dem Knochenmark von Mäusen beider Studienpopulationen isoliert. Eine 24 Loch-Mikrotiterplatte wurde mit 6,5 mm durchmessenden Einsätzen mit 3  $\mu$ M Poren versehen. Die Vertiefungen wurden mit 700 $\mu$ l CL-Medium befüllt und die Einsätze mit 100 $\mu$ l CL-Medium. Anschließend wurde die Platte für 1 Stunde bei 37° inkubiert und daran anschließend wurde das CL-Medium verworfen.

Für den eigentlichen Versuch wurden 200.000 Neutrophile in 200  $\mu$ l CL-Medium je Kondition in die Einsätze gegeben. Die Vertiefungen wurden erneut mit 700 $\mu$ l CL-Medium befüllt. Pro Studienpopulation wurden folgende Konditionen untersucht:

Zur Untersuchung der Chemokinese der Zellen wurde jeweils LTB<sub>4</sub> und C5a in Einsätze und Vertiefungen gegeben. Jeweils so viel, dass gleiche Zielkonzentrationen in beiden Volumina erreicht wurden. Zur Untersuchung der Chemotaxis wurden die Stimuli ausschließlich in die Vertiefungen gegeben, um über einen Konzentrationsgradienten eine Migration in die Vertiefung auszulösen. Die Zielkonzentration für C5a betrug 100ng/ml und für LTB<sub>4</sub> 10 nM.

In den Kontrollen wurden keine Stimuli hinzugegeben.

Nach 2 Stunden Inkubation wurden die Volumina der Vertiefungen gewonnen und die Anzahl der enthaltenen Zellen per Durchflusszytometrie gemessen. Der Anteil der Zellen, der von den Einsätzen aus durch die 3  $\mu$ M Poren gewandert ist, wurde als Quotient aus der Zahl, der in die Einsätze gegebenen Zellen und der in den Vertiefungen gezählten Zellen bestimmt.

### 2.4. Statistik und Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung von Graphpad Prism durchgeführt. Bei der Verwendung der statistischen Methoden erfolgte die Auswahl unter Berücksichtigung des *Graphpad prism statistic guides* der verwendeten Prism Version. Ausserdem im Einklang mit der Auswahl der Verfahren für vorangegangene vergleichbare Experimente der Arbeitsgruppe.

Für stichprobenartig erhobene Werte aus 2 Populationen wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet.

Bei *in vitro* Experimenten bei denen davon ausgegangen wurde, dass die Behandlung der Zellen (z.B. Stimulation/Nicht-Stimulation/Inkubation mit Inhibitor) als eine Gruppenvariable und der Genotyp der Zellen (Studienpopulation WT oder Studienpopulation *MPO<sup>-/-</sup>*) als 2. Gruppenvariable für das Resultat verantwortlich war, wurde eine zweifache Varianzanalyse (twoway-ANOVA) angewandt.

Bei allen Berechnungen wurde ein Konfidenzintervall von 95% gewählt.

Die in den Abbildungen verwendeten Symbole zur Angabe des Signifikanzniveaus sind in Tabelle 6 angegeben.

**Tabelle 6: Legende zu den in den Abbildungen verwendeten Signifikanzniveaus**

Symbol	p-Wert
****	< 0.0001
***	0.0001 bis 0.001
**	0.001 bis 0.01
*	0.01 bis 0.05

### 2.5. Liste der verwendeten Materialien

#### Kommerziell erhältliche Reagenzien

PBS (1X) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Ketamin (medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg)

Xylazin (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg)

Bepanthen Augen und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen)

Roti-4% Histofix (Carl Schlenk AG, Roth)

FcR-Block (Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach, Order Nr. 130-092-575)

EDTA ( Titriplex, Merck KGaA, Darmstadt)

Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Dako-Pen (DAKO GmbH, Jena X0907)

DAPI-Fluoromount (southern biotech, Birmingham USA).

Xylene (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Ethanol 96% (Carl Schlenk AG, Roth)

Ethanol 70% (Carl Schlenk AG, Roth)

Pepsin Solution Digest-All 3 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Aceton (Carl Schlenk AG, Roth)

Ziegen-Serum (DAKO GmbH, Jena X0907)

Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Humanes Serum Albumin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Anti-HSA-Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Luminol (Cayman Chemical Company ,Ann Arbor, USA)

Lucigenin ALX-620-061-M050, Enzo Lifesciences inc. (Farmingdale, NY, USA)

Calcium-Ionophore A23187 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

MPO-Inhibitoren 475944-1GM (Merck KGaA, Darmstadt)

MPO-Inhibitor AZD 5904 (MedChemExpress of Hycultec, Beutelsbach)

HBSS (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Fetales Kälberserum (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Sytox green (#S7020, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

## 2. Methoden und Materialien

---

Recombinant Mouse Complement Component C5a Protein (2150-C5-025, R & D Systems a biotechnie brand, Minneapolis, USA)

Leukotriene B4 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)

RPMI w/o phenol red (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Dimethylsulfoxid (Carl Schlenk AG, Roth)

Polyethylenglykol (Carl Schlenk AG, Roth)

MACSQuant® Calibration Beads (Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach, 130-093-607)

MACS Comp Beads-anti rat Igk 5mL (Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach, 130-107-755)

### Angesetzte Lösungen

20X TBS-Lösung:

193,6 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) + 640 g NaCl + 3,2 l DDW + X ml HCl bis pH = 7,6 + X ml DDW um 4 l Gesamtvolumen zu erreichen.

Tris-EDTA-Puffer: 1,21 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) + 0,37 g EDTA (Titriplex, Merck KGaA, Darmstadt) + 1 l DDW + 500 µl Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Eingestellt auf pH=9

Macs-Puffer:

475 ml autoMACS Rinsing Solution (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach) + 25 ml MACS BSA Stock Solution (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach)

Coating-Puffer:

Carbonate/Bicarbonate Puffer (50 mM, pH 9.6) Natriumhydrogencarbonat und Natriumcarbonat (Merck KGaA, Darmstadt)

CL-Medium:

RPMI w/o phenol red (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

1% fetales Kälberserum (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), 1g/l Glukose (Sigma Aldrich, Hamburg), 25 mM HEPES (Sigma Aldrich, Hamburg)

PMA-Lösung:

PMA (Cayman-Chemicals, Ann Arbor) 1:100000 in RPMI w/o phenol red (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

## 2. Methoden und Materialien

---

### **Kommerziell erhältliche Antikörper**

Viobility 405/452 Fixable Dye (Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach, 130-109-816)

Ly-6G-PercpVio 700 - 130-103-791 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

F4/80 APC - MF48005 (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

CD11b APC-vio 700 - 130-113-232 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

CD3 PE Vio770 - 130-116-434 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

CD45 FITC – 553080 (BD bioscience, East Rutherford)

Siglec F PE – 552126 (BD bioscience, East Rutherford)

Ly-6G APC-vio770 130-118-949 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

CD11b Brilliant violet 605 – 101237 (Biolegend, San Diego, USA)

C5aR PerCP-vio700 - 130-123-194 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

FcyRIV PE 149503 (Biolegend, San Diego, USA)

Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG 111-545-144 (Jackson Immunoresearch, West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA)

Polyklonales Ratten IgG - C301 (emfret Analytics, Würzburg)

Ratten IgG gegen Maus C3 (CL7503AP, Cedarlane, Burlington, Kanada)

Ziegen Anti-Ratten IgG gekoppelt an Alexa Fluor® 594 (112-585-167, Jackson Immunoresearch, West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA)

Ratten IgG gegen Maus Ly-6G - 127602 (Biolegend, San Diego, USA)

Normales polyklonales Ratten IgG C301 (emfret analytics, Würzburg)

Kaninchen Anti-MPO Antikörper A0398 (Dako, GmbH, Jena )

Normales Kaninchen IgG - BE0095 ( BioXcell, Lebanon, USA)

Esel Anti-Kaninchen Antikörper gekoppelt an Alexa Fluor® 594 (711-585-152, Jackson Immunoresearch West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA)

Ziegen Anti-Ratten Antikörper gekoppelt an Alexa Fluor® 488 (112-545-003 Jackson Immunoresearch, West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA)

### **Verbrauchsmaterial**

Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

EDTA beschichtete Röhrchen Microvette K3E (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

## 2. Methoden und Materialien

---

Microplate 96 well, Flachboden, high binding, sterile (Greiner Bio-one, Frickenhausen)

Cell culture plate, 6 well, surface: Suspension, flat base (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

Zellsieb 40 µm (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

MS columns (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach)

LS columns (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach)

TC-Insert, für 24 Well Platte, PET, transluzent, Porengröße: 3 µm (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

### **Kits**

Neutrophil isolation kit (130-097-658 Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach)

LTB<sub>4</sub> Elisa Kit (Katalog Nummer KGE006B, R & D Systems a biotechne brand, Minneapolis, USA)

Annexin-V-FITC detection Kit (PK-CA577-K101-100, PromoCell, Heidelberg)

### **Geräte**

Hemavet Analysator abc plus (Drew Scientific, USA)

Microstar 17 R Zentrifuge (VWR, Radnor, USA)

MACS Quant Analyzer (Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach)

Keyence Mikroskop BZ-9000E Serie (Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Germany)

Infinite M200 PRO ELISA reader (Tecan, Männedorf, Schweiz)

Rollenmischer CAT RM 5 (Caterpillar, Peoria, USA)

Biophotometer D 30 (Eppendorf, Hamburg)

QuadroMACS™ Separator (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach)

OctoMACS Separator (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach)

HI 208 Ph-Meter (Hanna Instruments GmbH, Graz)

### **Programme**

BZ II Analyzer (Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Germany)

Excel 2013 (Microsoft, Redmond, USA)

GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA)

Flowjo V. 10 (BD Bioscience, Missisauga, USA)

CytExpert V. 2.4.0.28 (Beckman Coulter Inc., Pasadena, USA)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse des Tierversuchs

##### 3.1.1. Bei MPO defizienten Mäusen kommt es im EBA-Mausmodell nicht zur Ausbildung des klinischen Krankheitsbildes

Insgesamt wurden über TV1 und TV2 hinweg 26 Tiere über die geplante Beobachtungszeit klinisch beurteilt und nach Abschluss des Versuches der Gewinnung von Probenmaterial zugeführt. Davon waren 14 Tiere weiblich und 12 Tiere männlich. Die männlichen Mäuse gehörten je zur Hälfte einer der beiden Studienpopulationen an, bei den Weibchen gehörten 6 Mäuse zur Gruppe der *MPO*<sup>-/-</sup>-Population und 8 Mäuse zur Gruppe der Wildtyp-Population.

In der zweifachen Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) zeigte sich mit einer Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art von 5% und einem Konfidenzintervall von 95% ein signifikanter Unterschied zwischen den AUC-Werten der Studienpopulationen. (p-Wert <0,0001, F-Wert (1,168)=288,2 mit 1 Freiheitsgrad)

Im angeschlossenen multiplen Vergleichs-Test mit Sidak-Korrektur für den Unterschied an den einzelnen Scoring-Tagen zeigte sich ab dem ersten klinischen Scoring ein signifikanter Unterschied. Für die Unterschiede ergab sich vom ersten Scoring abgesehen bei allen weiteren Scorings bis zum Ende der Beobachtungszeit ein adjustierter p-Wert von unter 0,0001. Eine detaillierte Auflistung der signifikanten Ergebnisse findet sich in Tabelle 7.

Die WT-Mäuse sind signifikant stärker erkrankt. In *Abbildung 5* sind die Ergebnisse graphisch wiedergegeben. *Abbildung 6* enthält repräsentative Photographien von beiden Studienpopulationen, die das jeweilige Erkrankungsmaß gegenüberstellen.



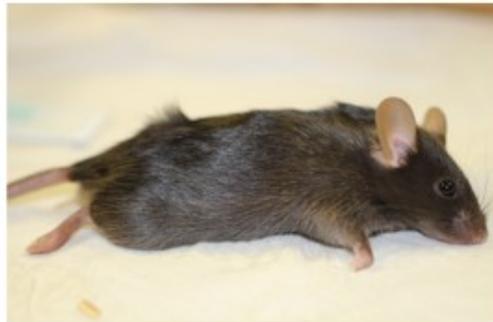
### 3. Ergebnisse

**Tabelle 7: Ergebnis der zweifachen Varianzanalyse der klinischen Scoringergebnisse**

Tag	Mittelwert Differenz	95,00% Konfidenzintervall der Differenz	Signifikanz	Adjustierter p-Wert	Freiheitsgrade
0	0	-2,085 <-> 2,085	Nein	>0,9999	168
4	2,132	0,04686 <-> 4,217	Ja	0,042	168
6	4,526	2,441 <-> 6,611	Ja	<0,0001	168
8	7,99	5,905 <-> 10,08	Ja	<0,0001	168
10	9,084	6,999 <-> 11,17	Ja	<0,0001	168
12	6,283	4,198 <-> 8,368	Ja	<0,0001	168
14	4,464	2,379 <-> 6,549	Ja	<0,0001	168

**WT-Maus**

**MPO<sup>-/-</sup>-Maus**



**Abbildung 6: Repräsentative Fotos der Scoring-Tage 4 und 12**

*Obere Reihe: Tag 4, Untere Reihe: Tag 12*

*Linke Spalte: WT-Maus, die im Zeitraum zwischen Tag 4 und Tag 12 Haarverlust, Krusten und Erosionen an der vorderen rechten Extremität, dem angrenzendem Stamm, dem Kopf, den Augenlidern, sowie am rechten Ohr entwickelt hat. Teilweise bereits in Abheilung befindlich.*

*Rechte Spalte: MPO<sup>-/-</sup>-Maus mit gesunder Haut an beiden Scoring-Tagen.*

### **3.1.2. Im Blutbild der Versuchstiere im EBA-Modell zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.**

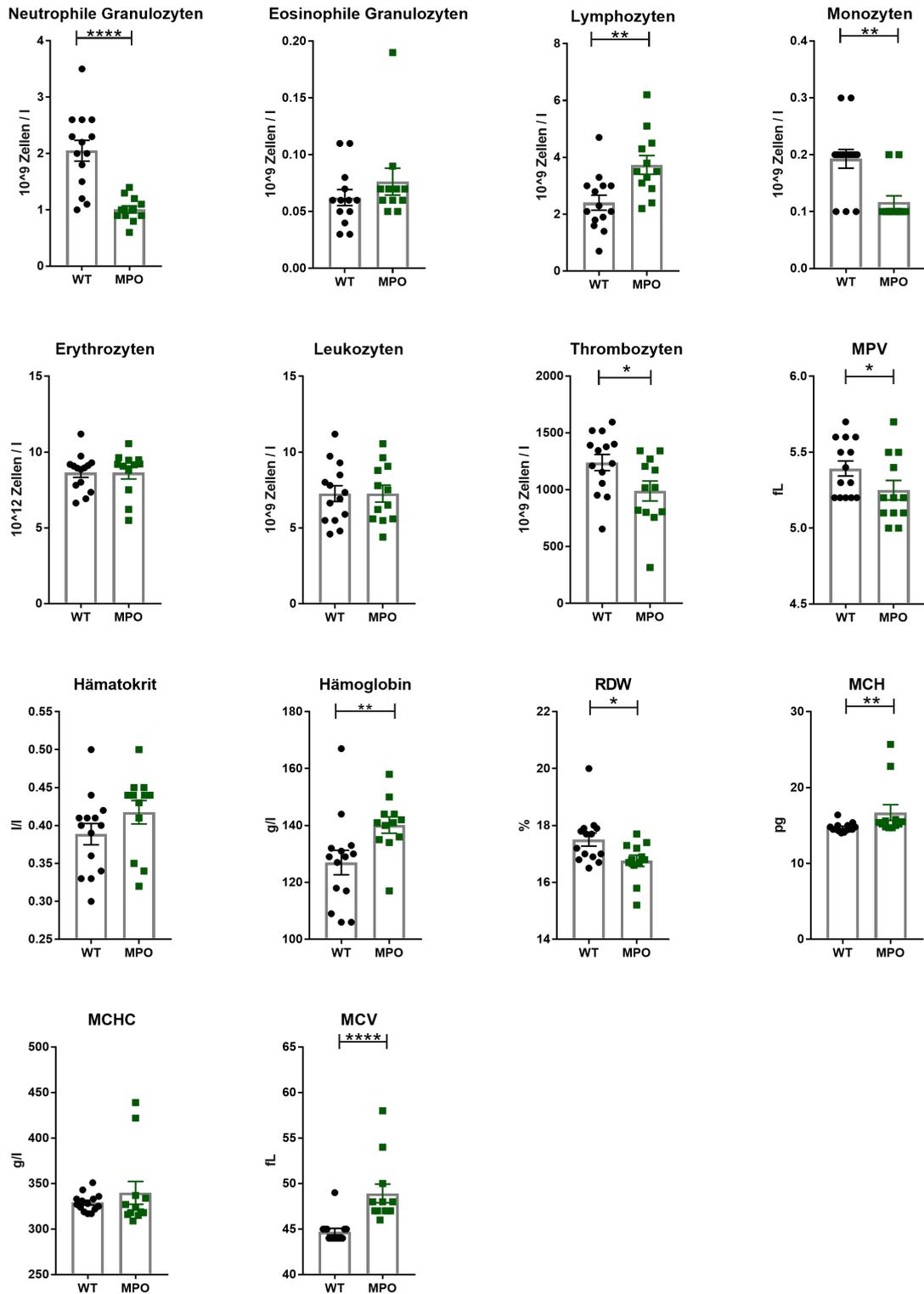
Um den Einfluss der EBA auf das Blutbild der Versuchstiere zu untersuchen, wurden Blutproben der Versuchstiere durch die Unterstützung der Klinik für Rheumatologie des UKSH unter Prof. Riemekasten mit einem ABC-Plus Hemavet Gerät von Drew-Analytic untersucht. Bei dieser Untersuchung wird ohne Färbung und damit rein unter Berücksichtigung von SSC und FSC eine durchflusszytometrische Zählung der verschiedenen Zellpopulationen des Blutes vorgenommen. Weitere Laborparameter werden auf Grundlage der Messergebnisse vom Gerät errechnet.

*Abbildung 7* stellt die Ergebnisse der Untersuchung graphisch dar und gibt Aufschluss über die gefundenen signifikanten Unterschiede im Mann-Whitney-Test zwischen den beiden Mauspopulationen.

Mit Signifikanz fanden sich bei den Wildtyp-Mäusen im Blut gegenüber den *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchschnittlich:

- höhere Konzentrationen an neutrophilen Granulozyten
- höhere Konzentrationen an Monozyten
- höhere Konzentrationen an Thrombozyten
- größeres durchschnittliches Thrombozyten-Volumen
- größere Verteilungsbreites des Erythrozytenvolumens
- niedrigere Konzentration an Lymphozyten
- niedrigere Konzentration an Hämoglobin und an mittlerem Hämoglobin pro Erythrozyt
- niedrigeres mittleres Erythrozytenvolumen

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 7: Blutbild der Versuchstiere an Tag 14 des Versuchs**  
Mit Mittelwerten, SEM und Signifikanzniveau.

### 3. Ergebnisse

---

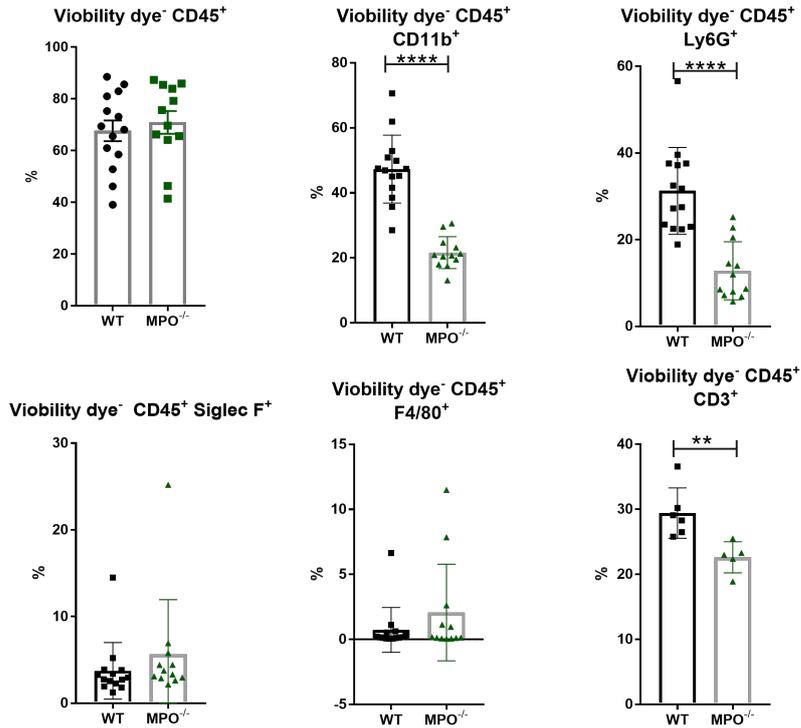
Wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, wurden weitere Blutproben der Versuchstiere mit Hilfe von Fluoreszenz-Farbstoffen gefärbt, die an Antikörper gegen zellspezifische Oberflächenmarker konjugiert sind. *Abbildung 8* stellt diese Ergebnisse dar.

Im Mann-Whitney Test mit zweiseitigem  $p$  zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit einem  $p$ -Wert von  $<0,0001$  bei den Zellpopulationen der  $CD45^+CD11b^+$  und bei den  $CD45^+Ly6-G^+$  positiven Zellen ( $n=26$ ).

Im selben Test zeigte sich ein ebenfalls signifikanter Unterschied zwischen den  $CD45^+CD3^+$  positiven Zellen. Die Färbung für CD3 erfolgte nur bei den 11 Versuchstieren aus dem TV2. Der  $p$ -Wert hierfür betrug 0,0043.

Bei den übrigen untersuchten Zellpopulationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3. Ergebnisse



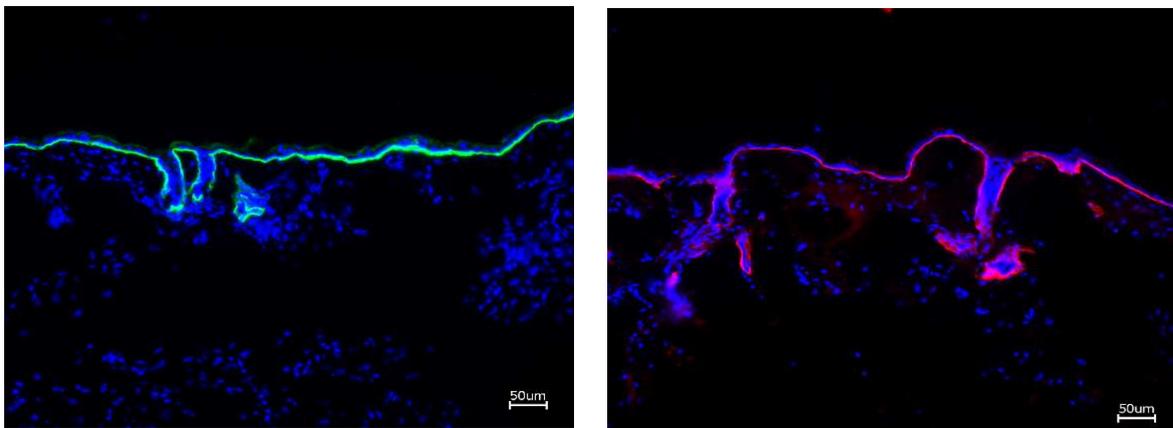
**Abbildung 8: Ergebnisse der Durchflusszytometrie von EDTA-Blut nach Immunfluoreszenzmarkierung von zellspezifischen Oberflächenmarkern an Tag 14 des Versuches**

Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der Zellen an der Gesamtzahl der ein entsprechendes Färbeverhalten gezeigt hat. Angegeben sind hierzu die Mittelwerte, SEM und das Signifikanz-Niveau im Mann-Whitney Test

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.3. Immunhistochemisch ließen sich Kaninchen-Antikörper und C3-Ablagerungen bei beiden Studienpopulationen nachweisen

Um sicherzustellen, dass die injizierten Antikörper in beiden Studienpopulationen an ihre Zielantigene gebunden haben und somit auszuschließen, dass ein Ausbleiben von Krankheitserscheinungen auf Probleme beim Induzieren des EBA-Modells zurückzuführen ist, wurden Gefrierschnitte beider Studienpopulationen für Kaninchen IgG und C3 gefärbt. Bei allen untersuchten Proben und somit bei allen Mäusen, bei denen Kaninchen-Antikörper gegen Kollagen VII injiziert wurden, ließ sich Kaninchen-IgG auch immunhistochemisch darstellen. *Abbildung 9* zeigt repräsentative Bilder, wie sie von den angefertigten Färbungen aufgenommen worden sind.



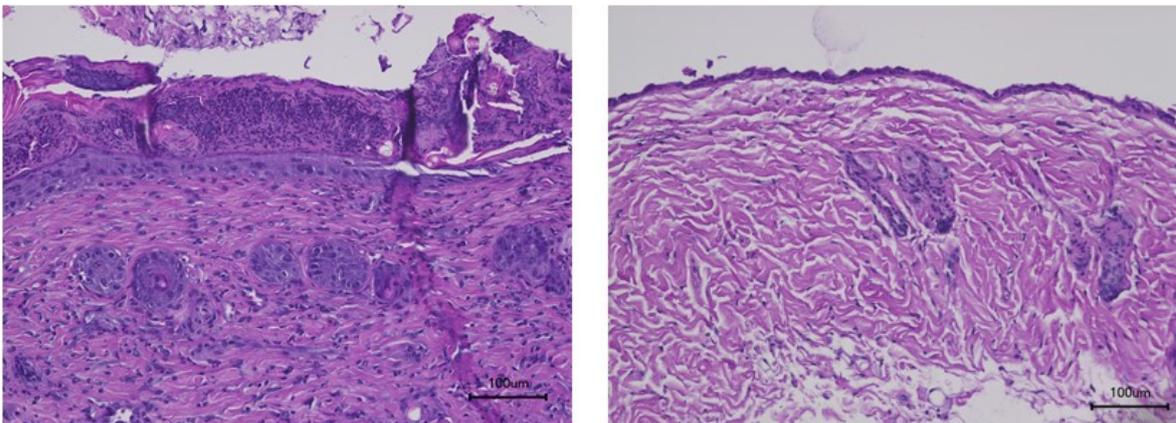
**Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen gegen Kaninchen IgG und murines C3**

*Falschfarbendarstellung immunhistochemischer Färbungen einer Hautprobe von einer MPO<sup>-/-</sup>-Maus, bei der das EBA-Modell induziert wurde. Links in grün zeigt das Signal die Anwesenheit von Kaninchen IgG an. Rechts wird für dieselbe Lokalisation mit roter Fluoreszenz die Anwesenheit von C3-Ablagerungen gezeigt. Kernfärbung mit Dapi in blau. 200-fache Vergrößerung.*

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.4. In der konventionellen Durchlicht-Mikroskopie von HE gefärbten Hautproben der Versuchstiere zeigten sich pathologische Veränderungen nur in der Gruppe der Wildtyp-Mäuse

Es wurden von den im Zuge von TV1 und TV2 gewonnenen Hautproben 6µm dünne Schnitte angefertigt und nach HE gefärbt. Alle diese Proben wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop begutachtet, dabei ergab sich durchweg eine Tendenz hin zu den repräsentativen Bildern, wie sie in *Abbildung 10* dargestellt sind. Bei den WT-Mäusen zeigten sich Verdickungen der Epidermis mit reichlichem leukozytärem Infiltrat, zum Teil Serokrusten und eine subepidermale Spaltbildung.



**Abbildung 10: Repräsentative Bilder von HE gefärbten Schnitten beider Studienpopulationen**

Dargestellt sind nach HE gefärbte 6µm Schnitt läSIONALER Nackenhaut einer WT-Maus (links) und ein Bild korrespondierend lokalisierter Haut einer  $MPO^{-/-}$  Maus (rechts). Beiden Mäusen wurde 14 Tage zuvor Anti-Kollagen VII injiziert. 200X-fache Vergrößerung.

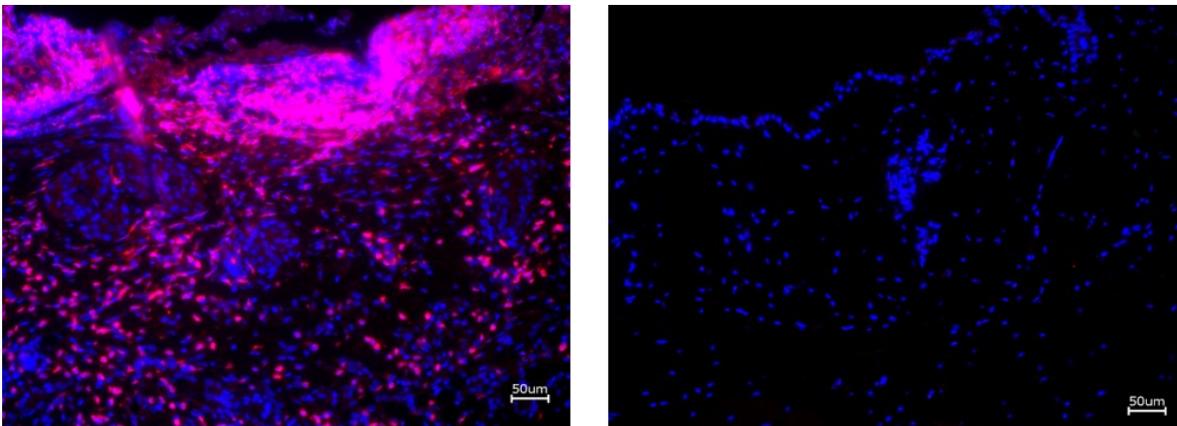
### 3. Ergebnisse

#### 3.1.5. Immunhistochemisch ließen sich signifikant weniger Ly-6G<sup>+</sup> Zellen in den Hautproben der *MPO*<sup>-/-</sup> - Mäuse gegenüber den Proben der WT-Mäuse feststellen

Um die aus TV1 und TV2 gewonnenen Hautproben im Hinblick auf Ly-6G positive Zellen zu untersuchen wurden von Hautproben jeder Maus Schnitte angefertigt und gefärbt. Das Ergebnis dieses Versuchsteils wird durch die repräsentativen Bilder in *Abbildung 11* festgehalten. Es zeigte sich eine klare Verteilung dahingehend, dass sich eine Vielzahl Ly-6G<sup>+</sup> Zellen in den Schnitten der WT-Mäuse fand und nur eine sehr geringe Anzahl entsprechender Zellen in den Schnitten der *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

*Abbildung 12* stellt das Ergebnis der semi-automatisierten Zählung der Ly-6G<sup>+</sup> Zellen dar. Im Mann-Whitney Test mit zweiseitigem p zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0017 zwischen den beiden Studienpopulationen im Hinblick auf die Zahl Ly-6G positiver Zellen.

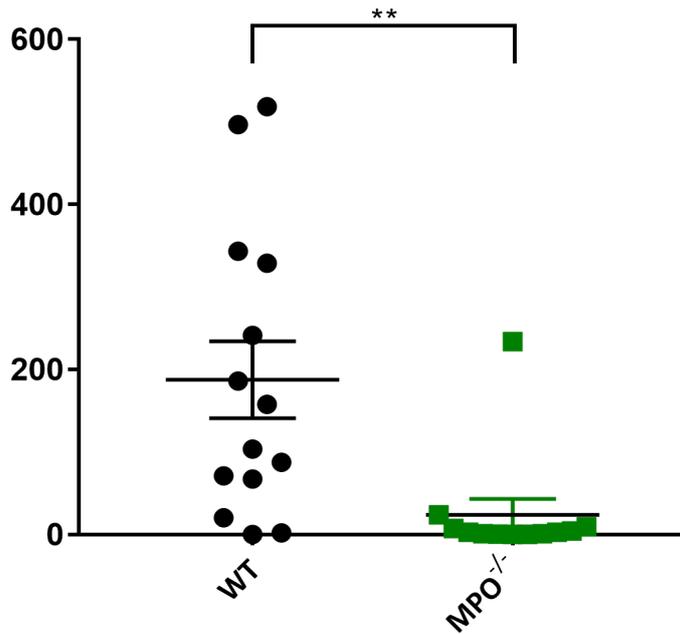
In der Doppelfärbung mit Ly-6G und MPO fand sich eine Kolokalisierung der beiden Zielstrukturen bei WT-Zellen. Diese ließ sich bei den *MPO*<sup>-/-</sup>-Proben nicht darstellen.



**Abbildung 11: Repräsentative Bilder von nach Ly-6G gefärbten Schnitten beider Studienpopulationen**

*Bilder in Falschfarbendarstellung zur Darstellung von Ly-6G<sup>+</sup> Zellen in 6µm Schnitten läsionaler Nackenhaut einer WT-Maus (links) und korrespondierender Haut gleicher Lokalisation einer *MPO*<sup>-/-</sup>Maus (rechts). Beiden Mäusen wurde 14 Tage zuvor Anti-Kollagen VII injiziert. Kernfärbung mit Dapi. Ly-6G (rot), Dapi (blau) 200X-fache Vergrößerung.*

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 12: Ergebnis einer semi-automatisierten Zählung der Ly-6G<sup>+</sup> Zellen in histologischen Hautschnitten**

Jedes Symbol gibt den Mittelwert des Zählergebnisses von 3 Bildern pro Maus bei 200-facher Vergrößerung an. Weiterhin ist der Mittelwert pro Studienpopulation mit SEM angegeben, sowie das Signifikanzniveau zwischen den beiden Gruppen.

### 3.2 *In vitro* Ergebnisse

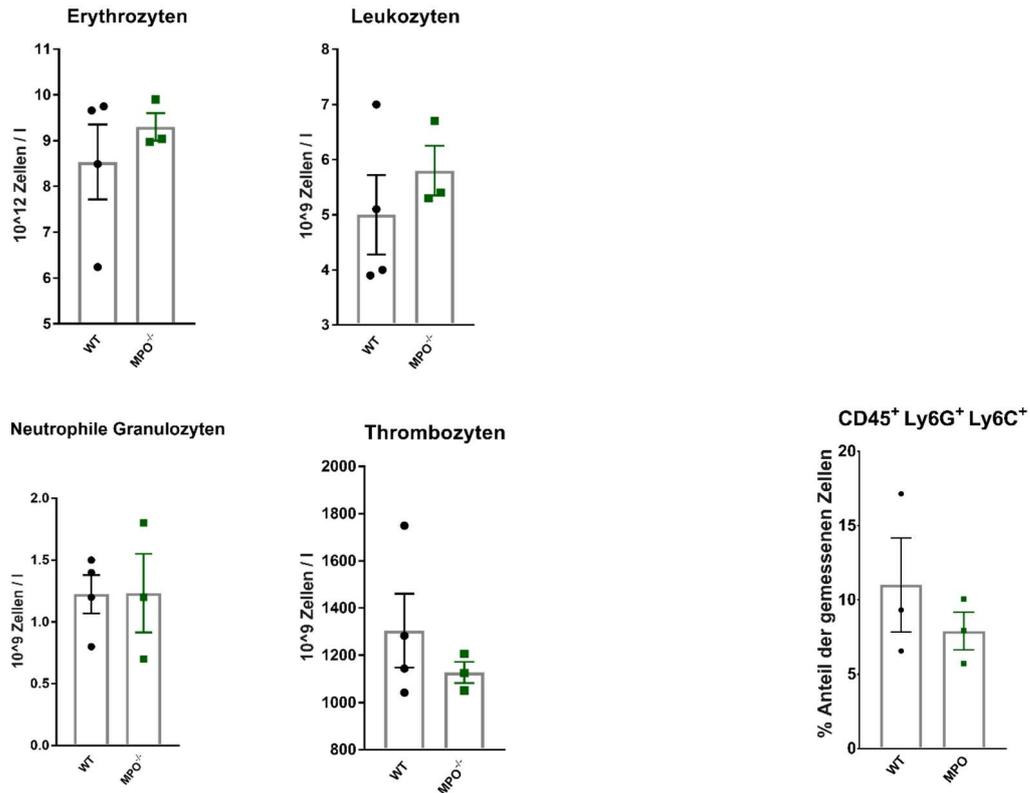
#### 3.2.1. Die eingesetzten *MPO*<sup>-/-</sup>- Mäuse zeigten im naiven Zustand keinen Unterschied im Blutbild zu den zugehörigen WT-Mäusen.

Es wurde EDTA-Blut von je 5 WT- und 5 *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dem Abc-plus Hemavet-Gerät von Drew-Analytic untersucht. Es wurden alle Blutparameter untersucht, die auch bei den Mäusen im Tierversuch untersucht worden sind. (vgl. Kapitel 3.1.2 )

Es wurden 3 Blutproben, die durch ein Gerinnen des Blutes vor der Analyse verfälscht worden waren (präanalytischer Fehler), von der Auswertung ausgeschlossen. Dies war mit bloßem Auge ersichtlich oder zeigte sich an sehr geringen gemessenen Thrombozyten-Zahlen. Somit verblieben die Proben von 4 WT und 3 *MPO*-Mäusen, die in die Auswertung eingegangen sind. Es fand sich mit dem Mann-Whitney-Test bei keinem der untersuchten Laborparameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Blutproben der beiden Studienpopulationen. Es lag insbesondere keine Neutropenie bei den *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen vor.

In der Durchflusszytometrie nach Färbung gegen CD45, Ly-6G und Ly-6C zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. In diese Auswertung gingen die Ergebnisse aller 3 durchgeführten Experimente ein und damit die Messwerte von 3 WT- und 3 *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt *Abbildung 13*.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 13: Zellpopulationen im Blut naiver Mäuse**

**Links: Auswahl von Laborparametern der Hemavet-Analyse von naiven Mäusen**  
Mit Mittelwert und SEM.

**Rechts: Ergebnis der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Neutrophilenzahl im Vollblut naiver Mäuse.**

Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen, die in der Durchflusszytometrie als positiv für CD45, Ly-6G und Ly-6C gewertet wurden an der Gesamtzahl der registrierten Zellen. Mit Mittelwert und SEM.

### 3. Ergebnisse

---

#### **3.2.2. Nach Aktivierung mit PMA zeigten MPO defiziente Neutrophile keinen Unterschied im CD62L-*Shedding* zu den Neutrophilen von Wildtyp-Mäusen**

Die Untersuchungen der beiden Studienpopulationen im Hinblick auf den prozentualen Anteil von CD45<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> Zellen zwischen den Neutrophilen der beiden Studienpopulationen, ergaben keinen signifikanten Unterschied in der zweifachen Varianzanalyse (*two-way-ANOVA*) bei einer Stichprobengröße von n=4 (Versuchen), mit einem Konfidenzintervall von 95% und einem F-Wert (3,9) = 30,58 . Weder in Bezug auf die Anzahl lebendiger CD45, Ly-6G, CD62L positiver Zellen ohne Stimulierung, noch bei den stimulierten Proben. Bei beiden Studienpopulationen ließ sich durch die Stimulierung mit PMA ein nahezu vollständiger Verlust der Nachweisbarkeit von CD62L an den Neutrophilen zeigen. Ein Unterschied, der sich in der zweifachen Varianzanalyse mit Tukey Korrektur signifikant zeigte. Siehe hierzu auch *Abbildung 14*.

bei 95% Konfidenzintervall :

WT zu WT Kontrolle

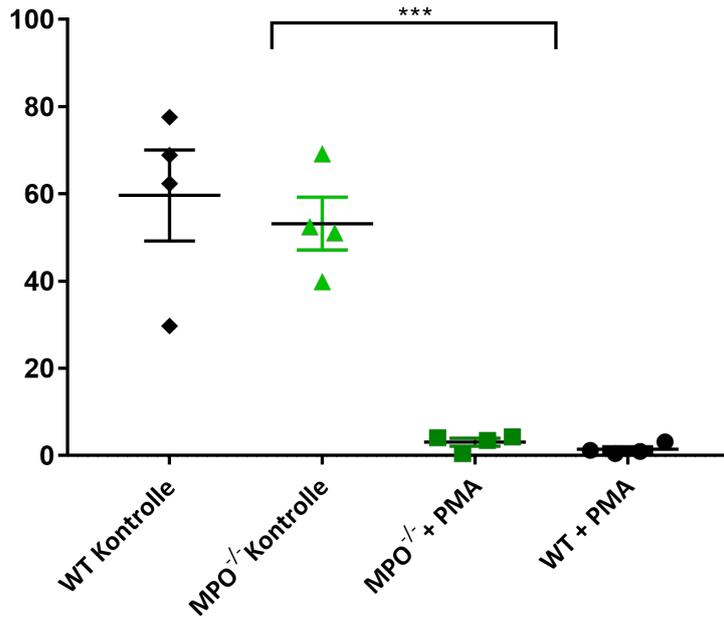
p-Wert = 0,0002 Freiheitsgrade= 9

*MPO*<sup>-/-</sup> zu *MPO*<sup>-/-</sup> Kontrolle

p-Wert = 0,0006 Freiheitsgrade= 9

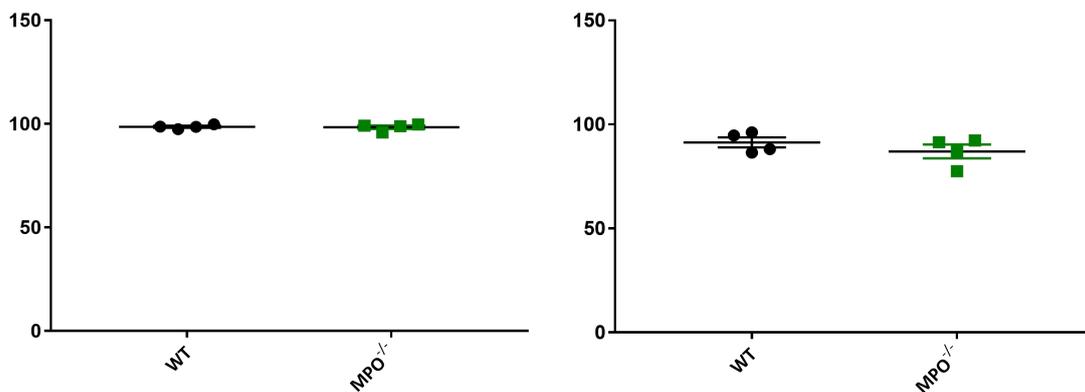
Im Zuge dieses Versuches wurden Neutrophilen-Isolate gegen CD45 und LyG6 gefärbt und der Lebendzellanteil bestimmt. Das Ergebnis der entsprechenden Auswertungen ist in *Abbildung 15* wiedergegeben und gibt Aufschluss über die Effektivität hinsichtlich der Viabilität und Reinheit der Neutrophilen-Isolationen, wie sie für eine Vielzahl von Experimenten des *in vitro* Abschnittes dieser Arbeit notwendig war. Sie ist daher an dieser Stelle aufgeführt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 14: Ergebnis der Durchflusszytometrie isolierter Neutrophilen-Lösungen beider Studienpopulationen nach Färbung gegen CD45, Ly-6G und CD62L versetzt mit Viobility Farbstoff**

Angegeben ist der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der registrierten lebendigen Zellen pro Probe eines Versuches mit Mittelwert und SEM.



**Abbildung 15: Zellviabilität und Reinheitsgrad nach magnetischer Negativ-Selektion von Neutrophilen**

(links) Prozentualer Anteil der Zellen, die sich negativ für den Viobility Farbstoff zeigten und (rechts) prozentualer Anteil lebendiger, CD45<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup> Zellen in den unstimulierten Kontrollen für die Versuche zur Untersuchung des CD62L-Sheddings.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.2.3. MPO defiziente neutrophile Granulozyten unterscheiden sich in der Durchflusszytometrie im Hinblick auf den C5a-Rezeptor und den Fcγ-Rezeptor 4 nicht von Zellen entsprechender Wildtyp-Mäuse

Die Untersuchungen der beiden Studienpopulationen im Hinblick auf den prozentualen Anteil von CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, C5aR<sup>+</sup> Zellen zwischen den Neutrophilen der beiden Studienpopulationen und auch CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, FcγR4<sup>+</sup> Zellen ergaben keinen signifikanten Unterschied in der zweifachen Varianzanalyse (*two-way-ANOVA*) bei einer Stichprobengröße von n=3 (Versuchen), mit einem Konfidenzintervall von 95%.

CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, C5aR<sup>+</sup>: p-Wert = 0,8020, F Wert (1,24) = 0,06482, Freiheitsgrad = 1

CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, FcγR4<sup>+</sup>: p-Wert = 0,0957, F Wert (1,24) = 3,007 Freiheitsgrad = 1

Bei beiden Studienpopulationen waren nahezu 100% der Zellen positiv für die beiden untersuchten Rezeptoren.

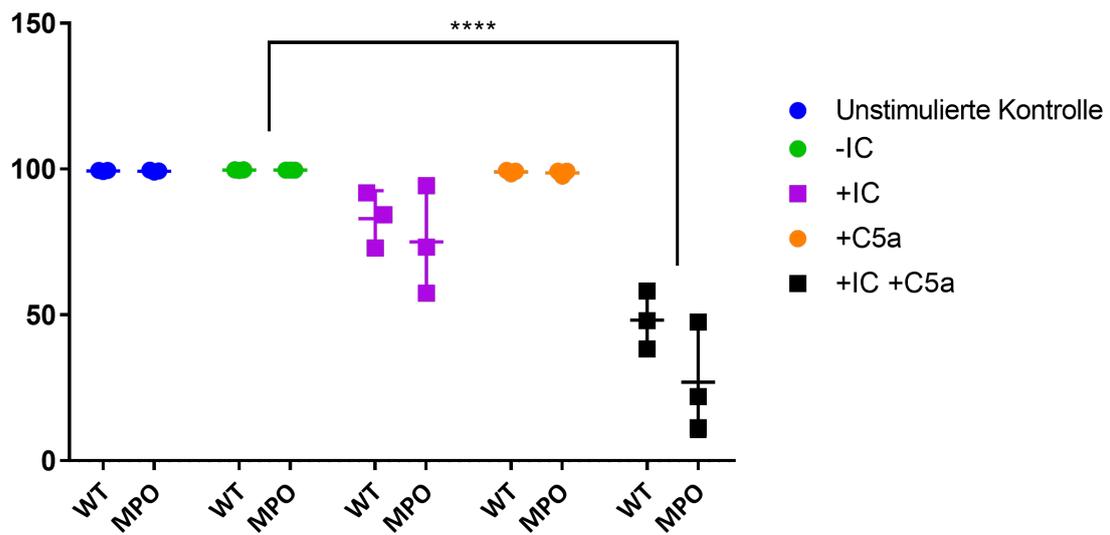
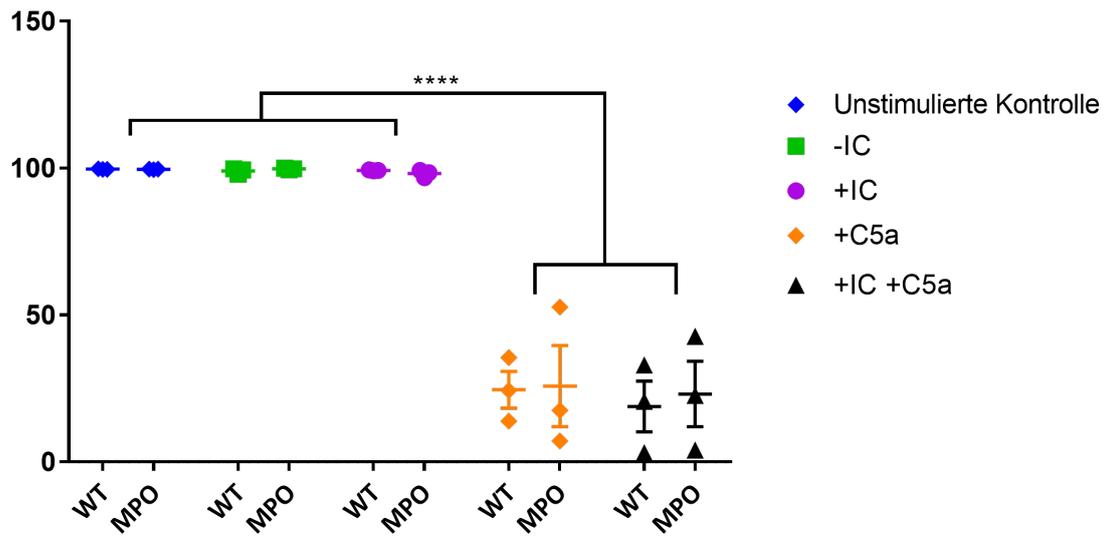
Durch Stimulierung mit 100 ng/ml C5a über 2 Stunden bei 37° nahm die Zahl der Zellen, die sich positiv für den C5a-Rezeptor zeigte bei beiden Studienpopulationen signifikant ab.

p-Wert <0,0001 F-Wert (5,24) = 86,55 Freiheitsgrade = 5

Dies war unabhängig davon, ob gleichzeitig eine Immunkomplexstimulierung erfolgte.

Nach Stimulierung mit Immunkomplexen zeigte sich nur eine moderate Verringerung der Anzahl an Zellen, die sich positiv für den FcγR4 zeigten. Bei gleichzeitiger Stimulierung mit 100 ng/ml C5a war diese Verringerung ebenfalls signifikant mit p-Wert <0,0001 und F-Wert (5,24) = 50,77.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 16: Ergebnis der Durchflusszytometrie isolierter Neutrophilen-Lösungen beider Studienpopulationen nach Färbung gegen CD11b, Ly-6G, C5aR (oben) und CD11b, Ly-6G, FcγR4 (unten)**

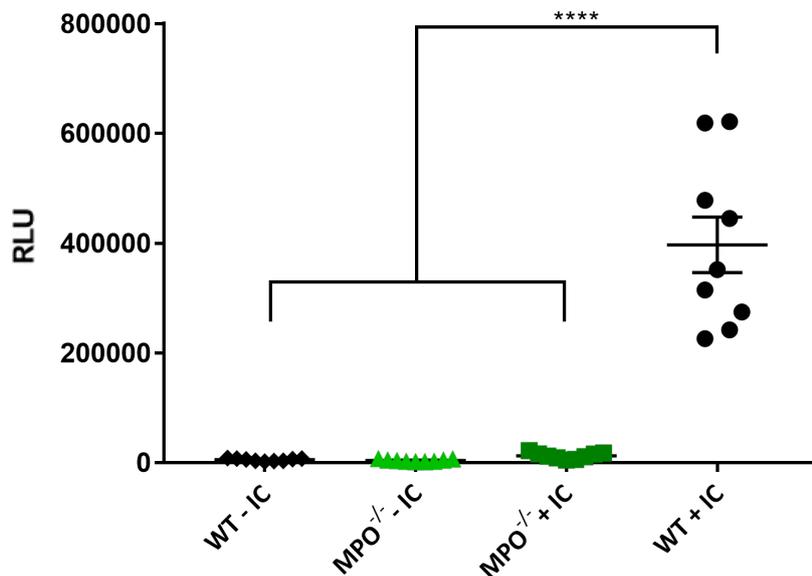
Angegeben ist der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl der registrierten lebendigen Zellen pro Probe eines Versuches mit Mittelwert und SEM.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.4. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung keine mit Luminol nachweisbare ROS-Freisetzung.

In insgesamt 9 wie beschrieben durchgeführten Versuchen zeigte sich in der zweifachen Varianzanalyse (twoway-ANOVA) mit einem p-Wert von  $<0,0001$  und einem F-Wert  $F(3, 24) = 60,01$  bei einem 95% Konfidenzintervall zwischen den untersuchten Gruppen ein signifikanter Unterschied. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten und nicht stimulierten  $MPO^{-/-}$ -Neutrophilen.

In der an die Varianzanalyse angeschlossenen multiplen Vergleichs-Berechnung ergab sich unter Verwendung der Methode nach Tukey, für die 3 signifikanten Unterschiede zwischen den stimulierten WT-Neutrophilen und den anderen Gruppen jeweils ein p-Wert von  $<0,0001$  bei 24 Freiheitsgraden.



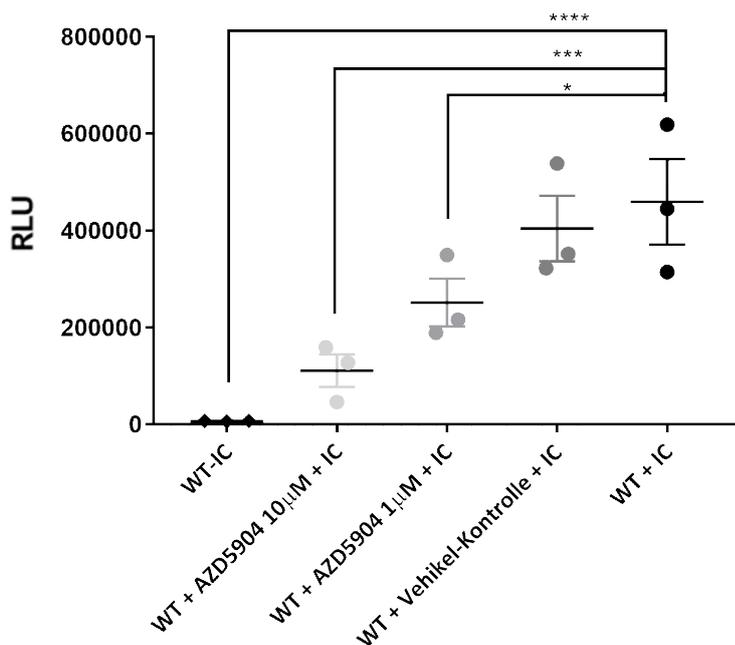
**Abbildung 17: Photometrische Messwerte nach Immunkomplex-Stimulierung von murinen Neutrophilen zweier Studienpopulationen unter Zugabe von Luminol**

Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer AUC-Bestimmung der Auftragung aus Lichtsignal gegenüber Zeit, gemittelt aus 2 Duplikaten. Dargestellt sind die Mittelwerte, SEM und das Signifikanzniveau. Die Einheit der Y-Achse ist RLU (relative light unit) unter gleichen Messbedingungen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.5 Durch eine Inkubation von WT-Neutrophilen mit dem MPO-Inhibitor AZD 5904 ließ sich eine deutliche Reduktion der mit Luminol nachweisbaren radikalen Sauerstoffspezies erzielen

Durch Zugabe des MPO-Inhibitors AZD5904 zu WT-Neutrophilen in den Konzentrationen 10 $\mu$ M und 1 $\mu$ M wie in Material und Methoden beschrieben, ließ sich eine Reduktion der ROS-Freisetzung unter Verwendung von Luminol in 3 Versuchen zeigen. Dieses Ergebnis zeigte sich in der einfachen Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) unter Annahme von Sphärizität signifikant ( $p$ -Wert  $<0,0001$  und  $F(5, 10) = 28,49$ ). Es kam auch bei der Kontrolle, daher 0,1% DMSO zu einer leichten Reduktion der messbaren ROS-Freisetzung, diese war jedoch nicht signifikant. Mit 10  $\mu$ M zeigte sich eine ROS-Freisetzung mit circa 25% AUC im Vergleich zu unbehandelten stimulierten Neutrophilen. Mit dem MPO-Inhibitor 475944-1GM war ein vergleichbares Ergebnis nicht zweifelsfrei erreichbar. (nicht dargestellt)



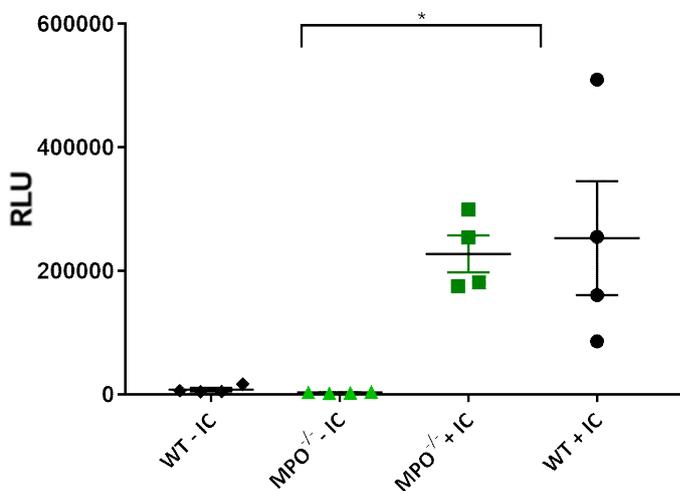
**Abbildung 18: Ergebnisse von 3 ROS Freisetzungsversuchen bei denen WT Neutrophile vorab 15 Minuten mit AZD 5904 oder der höchsten verwendeten DMSO-Konzentration inkubiert worden sind**

Jedes Symbol repräsentiert eine Kondition pro Experiment, dargestellt sind zusätzlich die Mittelwerte und SEM. Die Einheit der Y-Achse ist RLU (relative light unit) unter gleichen Messbedingungen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.6. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung eine mit Lucigenin nachweisbare ROS-Freisetzung ohne signifikanten Unterschied zu WT Neutrophilen

Es wurden 4 Versuche wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt um mit einer Lucigenin basierten Lumineszenz Messung die ROS Freisetzung isolierter neutrophiler Granulozyten zu bestimmen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der beiden Studienpopulationen. Zugleich zeigte sich innerhalb der Populationen jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen, die in Kontakt mit Immunkomplexen gebracht worden waren und den Kontrollen ohne Immunkomplexe. In der zweifach Varianzanalyse (*two-way-ANOVA*) mit 95% Konfidenzintervall fand sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,0047 und einem F-Wert  $F(3, 9) = 8,900$  zwischen den Gruppen und in der anschließenden multiplen Vergleichsberechnung nach Tukey mit demselben Konfidenzintervall fand sich für den signifikanten Unterschied zwischen den WT Gruppen ein p-Wert von 0,0181 und zwischen den *MPO*<sup>-/-</sup>-Gruppen ein p-Wert von 0,0292 mit jeweils 9 Freiheitsgraden.



**Abbildung 19: Photometrische Messwerte nach Immunkomplex-Stimulierung von murinen Neutrophilen zweier Studienpopulationen unter Zugabe von Lucigenin**

Jedes Symbol repräsentiert das Ergebnis einer AUC-Bestimmung der Auftragung aus Lichtsignal gegenüber Zeit, gemittelt aus 2 Duplikaten. Dargestellt sind die Mittelwerte, SEM und das Signifikanzniveau. Die Einheit der Y-Achse ist RLU (relative light unit) unter gleichen Messbedingungen.

### 3. Ergebnisse

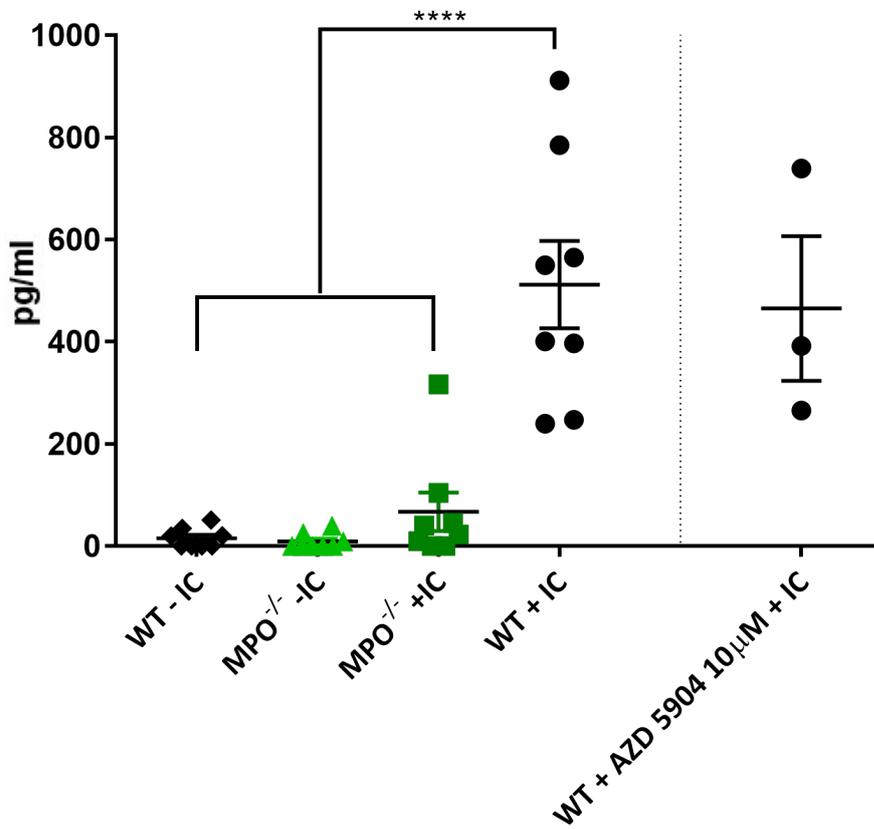
---

#### **3.2.7. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung eine signifikant niedrigere Freisetzung von Leukotrien B<sub>4</sub> im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp Neutrophilen**

Um die Freisetzung von LTB<sub>4</sub> durch Neutrophile nach Immunkomplex-Stimulierung zu quantifizieren, wurden wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben nach ROS-Freisetzungsversuchen die Überstände der Wells gewonnen und die LTB<sub>4</sub> Konzentrationen per ELISA bestimmt. Dies erfolgte in der beschriebenen Form 4 Mal, dabei wurden die Überständen von 9 verschiedenen ROS-Freisetzungs-Versuchen untersucht. Eine Probe musste auf Grund eines Fehlers in der Protokolldurchführung verworfen werden.

Hierbei zeigten sich in den verbliebenen Überständen aus 8 Versuchen LTB<sub>4</sub> Konzentrationen, die mit dem per Luminol nachgewiesenen ROS Freisetzungen korrelierten. In den Proben der Wildtyp Neutrophilen, die als einzige einen deutlichen mit Luminol nachweisbaren ROS-Freisetzung gezeigt hatten, fanden sich deutlich höhere LTB<sub>4</sub> Konzentrationen, als in den anderen Proben. Es fand sich im Durchschnitt 511,9 pg/ml LTB<sub>4</sub> in den Überständen von WT-Neutrophilen, die über 2 h mit Immunkomplexen stimuliert wurden. In den unstimulierten Kontrollen und bei den MPO-Neutrophilen mit und ohne Stimulierung fanden sich mehrfach LTB<sub>4</sub>-Konzentrationen an der unteren Nachweisgrenze des ELISA. Es zeigte sich bei einem Experiment bei *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen eine Konzentration von 316,7 pg/ml. In der zweifach Varianzanalyse (*two-way-ANOVA*) mit 95% Konfidenzintervall fand sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von <0,0001 und einem F-Wert (3, 21) = 33,50 zwischen den Gruppen und im anschließenden multiplen Vergleich mit Korrektur nach Tukey mit demselben Konfidenzintervall fand sich für den signifikanten Unterschied zwischen den WT Gruppen und den anderen Gruppen ebenfalls je ein p-Wert von <0,0001 (je 21 Freiheitsgrade). Es wurden auch Proben von WT-Neutrophilen untersucht, die vor Ablauf des ROS-Freisetzungsversuches mit dem MPO-Inhibitor AZD 5904 inkubiert worden waren. Hierbei zeigte sich keine signifikante Reduktion der Ausschüttung von LTB<sub>4</sub>. (in *Abbildung 20* enthalten, nicht eingeschlossen in die Varianzanalyse, Herkunft aus denselben Experimenten, wie die letzten 3 Datensätze der anderen Gruppen)

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 20: LTB<sub>4</sub> Konzentrationen in den Überständen nach ROS-Freisetzung assay**

Jedes Symbol repräsentiert eine Kondition pro Experiment und gibt die per LTB<sub>4</sub>-Elisa gemessenen Konzentrationen wieder. Dargestellt sind die Mittelwerte, SEM und das Signifikanzniveau.

### 3. Ergebnisse

---

#### **3.2.8. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Immunkomplex-Stimulierung eine signifikant schwächere Steigerung der mit Sytox green gemessenen Fluoreszenz über 5 Stunden als WT Neutrophile.**

Um den Einfluss der Myeloperoxidase auf die Ausbildung von Netose-Formationen bei Immunkomplex-Stimulierung zu untersuchen, wurde der in Material und Methoden beschriebene Versuchsaufbau verwendet und die Ergebnisse entsprechend ausgewertet.

*Abbildung 21* stellt das Ergebnis von 4 *Sytox-green-assays* dar. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der zweifach Varianzanalyse (*two-way-Anova*) zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von unter 0,0001 und einem F-Wert  $(3, 9) = 26,25$ . In der multiplen Vergleichsuntersuchung mit Tukey-Korrektur zwischen den WT Neutrophilen, die mit Immunkomplexen zusammengebracht worden waren und den Kontrollen ohne Immunkomplexe betrug der p-Wert=0,0001 bei einer Zahl von 9 Freiheitsgraden.

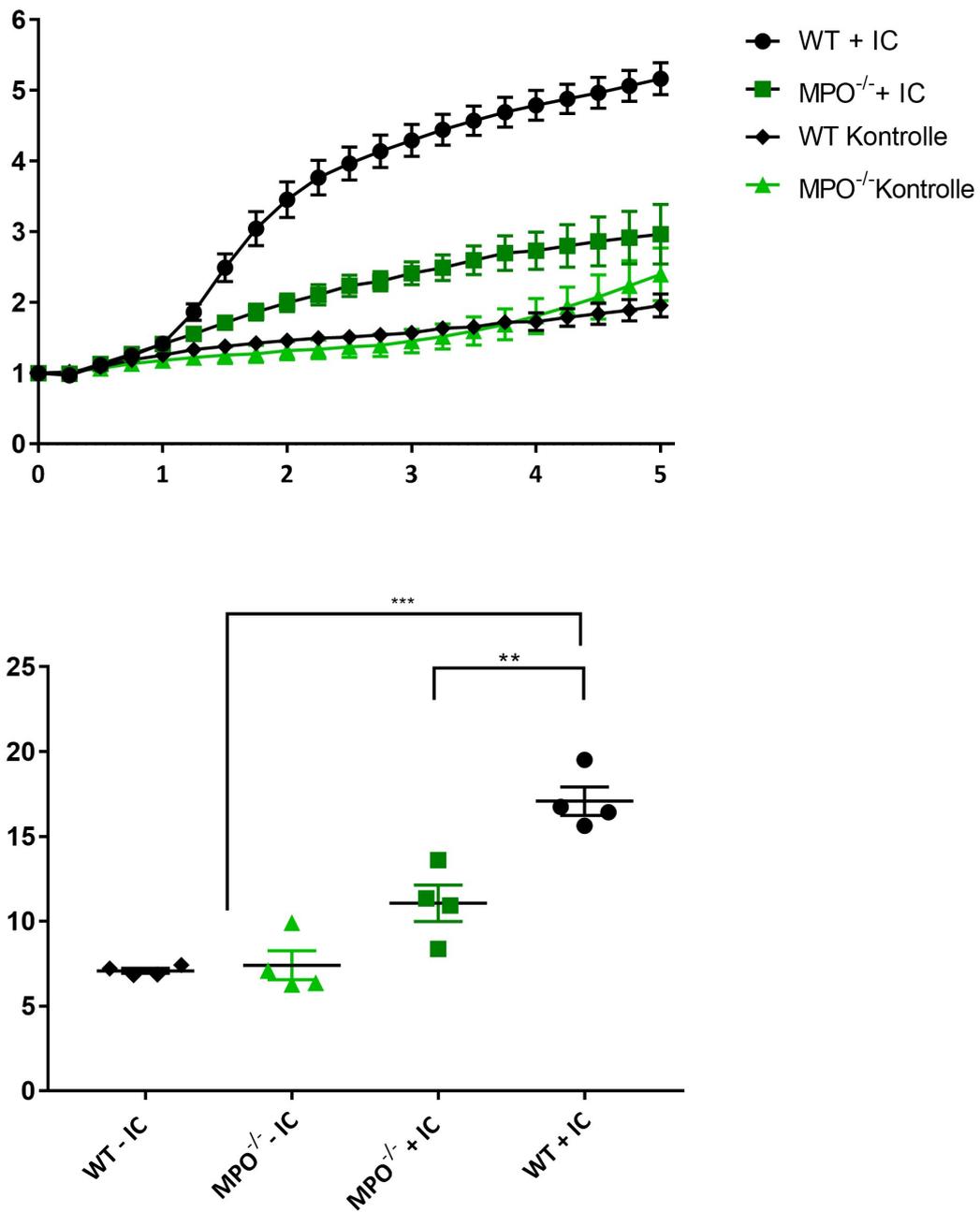
Weiterhin zeigte sich mit derselben statistischen Methode ein signifikanter Unterschied zwischen den WT-Neutrophilen und den MPO defizienten Neutrophilen. Die MPO defizienten Neutrophilen zeigten trotz Immunkomplex-Stimulierung niedrigere, sich nicht signifikant von den Kontrollen unterscheidende Messwerte.

Der p-Wert bei 95% Konfidenzintervall für den Unterschied zwischen den stimulierten WT Neutrophilen und den stimulierten MPO defizienten Neutrophilen lag bei 0,051, Freiheitsgerade = 9.

In der Medium-Kontrolle zeigten sich absolute Startmesswerte in einer Größenordnung von 5-10% im Vergleich zu Proben mit Zellen. Über die Beobachtungszeit blieben diese Werte etwa konstant oder nahmen minimal ab.

In der Kontrolle mit durch Hitze abgetöteten Zellen zeigten sich absolute Startmesswerte in einer Größenordnung von 500-1500% im Vergleich zu den anderen Proben. Über die Beobachtungszeit zeigten diese Werte teilweise Schwankungen um ihren Ausgangswert, im Mittel blieb die gemessene Signalstärke dabei konstant.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 21: Sytox green assay Ergebnisse bei Immunkomplexstimulierung über 5 Stunden**

**Oben:** Dargestellt ist die Fluoreszenzzunahme über 5 Stunden als Vielfaches des Ausgangswertes. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert pro Studienpopulation und Versuchsgruppe (WT = schwarz, MPO<sup>-/-</sup> = grün) aus 4 unabhängigen Experimenten mit SEM.

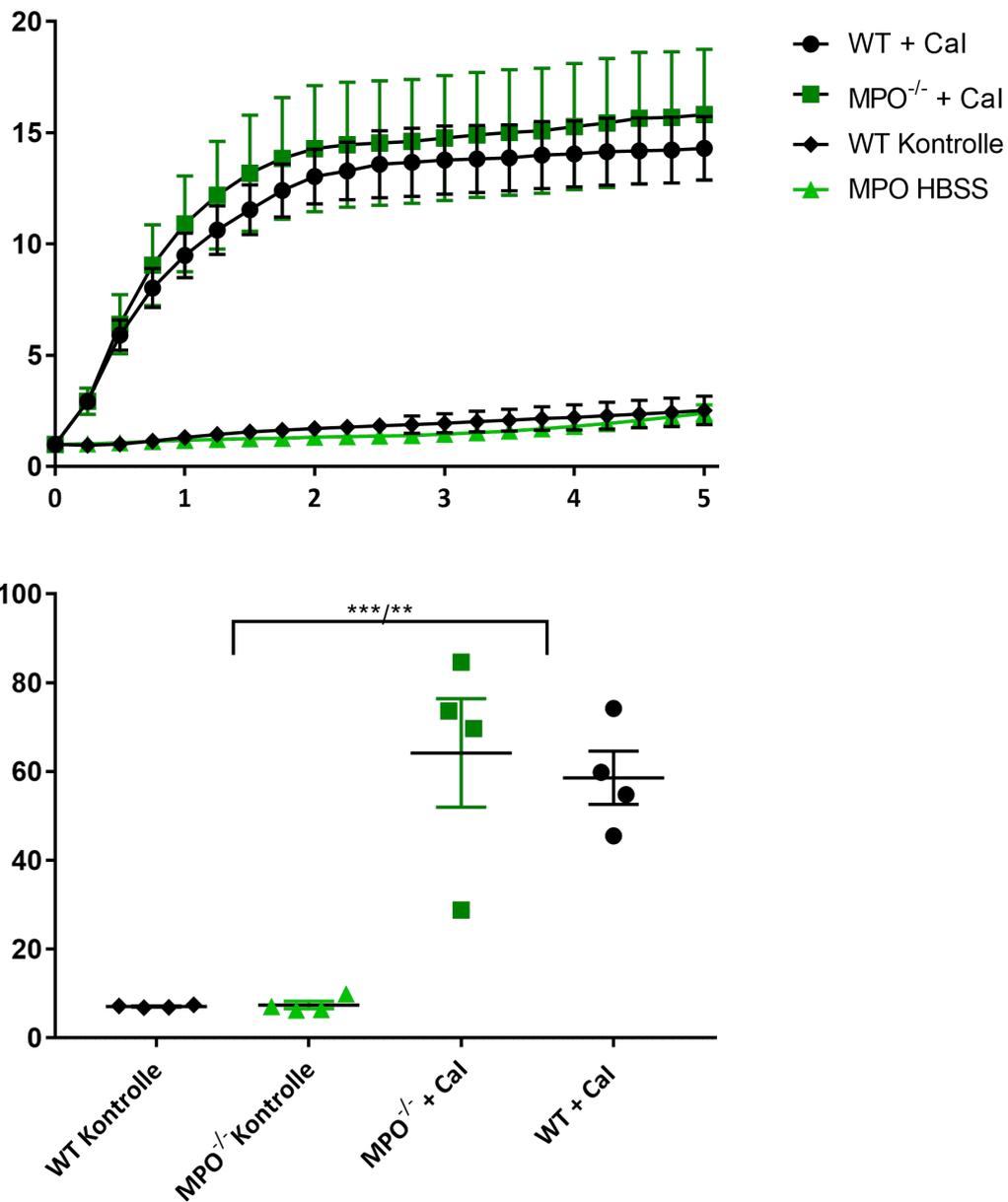
**Unten:** Dargestellt ist weiterhin das Integral der Messwerte aus den Versuchen. Hierbei stellt jedes Symbol das Ergebnis einer Versuchsgruppe aus einem Experiment dar. Mit Mittelwerten, SEM und Signifikanzniveau.

#### **3.2.9. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen nach Calcium-Ionophore Stimulierung keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf den Anstieg der Sytox green Fluoreszenz über 5 Stunden im Vergleich mit WT-Neutrophilen**

In den Experimenten in denen die Bildung von NETs als Reaktion auf Immunkomplex-Stimulierung untersucht wurde, erfolgten auch Messungen der resultierenden Sytox-Green-Fluoreszenz unter Einwirkung von Calcium-Ionophore auf Neutrophile. Hierbei zeigten sich insgesamt deutlich höhere Messwerte. Es fand sich ein signifikanter Unterschied in der zweifach Varianzanalyse (*two-way-Anova*) zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von unter 0,0001 und einem  $F(3, 9) = 25,37$ . In der angeschlossenen multiplen Vergleichsuntersuchung mit Tukey-Korrektur fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Studienpopulationen. Innerhalb der Studienpopulationen fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Stimulierten und Unstimulierten Proben. (p-Wert bei 95% Konfidenzintervall: WT zu WT Kontrolle = 0,0011 und  $MPO^{-/-}$  zu  $MPO^{-/-}$ -Kontrolle = 0,0006, Zahl der Freiheitsgrade jeweils 9 )

Die Ergebnisse sind in *Abbildung 22* dargestellt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 22: Sytox-green-assay Ergebnisse nach Zugabe von Calciumionophore über 5 Stunden**

**Oben:** Dargestellt ist die Fluoreszenzzunahme über 5 Stunden als Vielfaches des Ausgangswertes. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten mit SEM. (WT = schwarz, MPO<sup>-/-</sup> = grün)

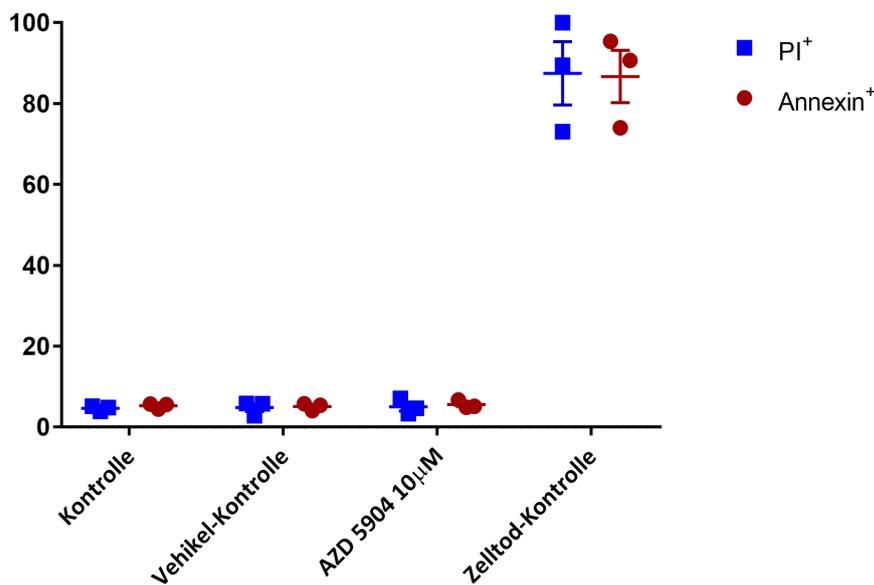
**Unten:** Dargestellt ist weiterhin das Integral der Messwerte aus den Versuchen. Jedes Symbol stellt das Ergebnis einer Versuchsgruppe aus einem Experiment dar. Weiterhin sind Mittelwerte, SEM und Signifikanzniveaus dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.10. Der MPO-Inhibitor AZD5904 führt nach 15 Minuten Inkubation bei WT-Neutrophilen zu keiner Zunahme Annexin oder PI positiver Zellen in der Durchflusszytometrie

Der MPO-Inhibitor AZD5904, der in den Versuchen verwendet worden ist, ist auf seine Toxizität getestet worden, hierzu wurden Zellen mit der Substanz in der höchsten verwendeten Konzentration inkubiert, anschließend wurden die Zellen auf ihre Anfärbbarkeit mit an Propidium-Iodid gekoppeltem PE und an Annexin gekoppeltem FITC getestet. (s.a. Kapitel 2.3.5.)

Der Versuch wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der einfachen Varianzanalyse (*One-way Anova*) zwischen den Zellen, die mit der höchsten AZD5904 Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  inkubiert worden waren und den Kontrollen, bei denen die Zellen gleich behandelt worden sind, jedoch nicht in Kontakt mit AZD 5904 gekommen sind.



**Abbildung 23: Ergebnis der Toxizitätsmessungen von WT-Neutrophilen mit AZD5904**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen je Versuchskondition, der sich nach Färbung und Gating als positiv für PI oder Annexin ergab. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen mit Mittelwerten und SEM.

### 3. Ergebnisse

---

#### **3.2.11. MPO defiziente neutrophile Granulozyten zeigen keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf ihr Migrationsverhalten gegenüber WT-Neutrophilen bei Stimulierung mit C5a und LTB<sub>4</sub>**

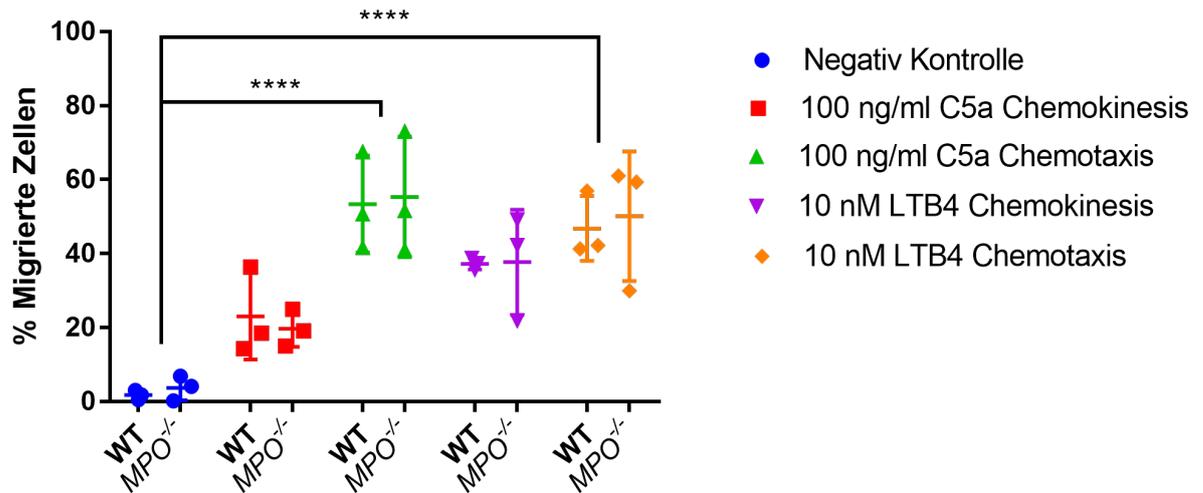
Um zu prüfen, ob eine MPO Defizienz das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten als Reaktion auf C5a und LTB<sub>4</sub> in Bezug auf 3 µm Poren beeinflusst, wurde insgesamt 3 Mal der in Kapitel 2.3.6. beschriebene Versuchsaufbau durchgeführt.

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im *two-way Anova* zwischen den Studienpopulationen (p-Wert = 0,8321 und F-Wert (1, 20) = 0,04613).

In der angeschlossenen multiplen Vergleichsuntersuchung mit Tukey-Korrektur zeigte sich, dass wenn C5a und LTB<sub>4</sub> lediglich zur Vertiefung gegeben wurden (Versuchsgruppen Chemokinesis) gegenüber den Kontrollen ohne Stimuli eine signifikante Anzahl Zellen der Zellen dem Konzentrationsgradienten folgend durch die 3 µm Poren migrierte. (p-Wert: <0,0001).

Eine Zugabe der Stimuli zu Zellen/Einsatz und Vertiefung (Versuchsgruppe Chemotaxis) führte ebenfalls zu einer Migration in die Vertiefungen, diese war jedoch geringer ausgeprägt. Die Ergebnisse sind *Abbildung 24* dargestellt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 24: Ergebnis des Versuches zum Migrationsverhalten gegenüber C5a und LTB<sub>4</sub>**  
Dargestellt ist der rechnerische Anteil der Zellen je Versuchskondition, der nach 2 Stunden durch 3  $\mu$ M Poren vom Einsatz in die Mikrotiterplatten Vertiefung gewandert ist. Die Symbole repräsentieren die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen mit Mittelwerten und SEM.

### 4. Diskussion

#### 4.1. Einordnung der Ergebnisse

Die blasenbildenden Autoimmundermatosen sind Erkrankungen mit hohem Leidensdruck, deren Behandlung oft eine Immunsuppression nötig macht (45). Es werden daher Forschungsanstrengungen unternommen, um ein tiefergehendes Verständnis der Pathophysiologie zu erreichen und dadurch eine Weiterentwicklung der Therapien zu ermöglichen. Es wäre ein klinisch relevanter Fortschritt fände sich eine Therapie ohne relevante Immunsuppression zur Unterbindung des auto-immunen Geschehens. Für diese Arbeit wurde mit dem EBA-Mausmodell und mit murinen Zellpopulationen gearbeitet. Die dadurch gewonnenen Ergebnisse sollen im folgenden Textabschnitt diskutiert und eingeordnet werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, waren als wichtige Mechanismen der Effektor-Phase der EBA unter anderem die Bildung von Immunkomplexen durch die Bindung von Anti-Kollagen VII an Kollagen VII, die Komplementaktivierung und insbesondere das Einwandern und Wirken von neutrophilen Granulozyten bekannt. Auch waren eine ganze Reihe von Substanzen als wichtig für das ungestörte Ablaufen des Krankheitsbildes entdeckt worden, insbesondere potente ROS, denen einen großer Anteil an der Spaltbildung zugesprochen wird und LTB<sub>4</sub>, das mitbeteiligt am Ausmaß der Neutrophileninfiltration ist (1, 5, 7, 45).

In der Literatur ist weiterhin beschrieben, dass die neutrophile Myeloperoxidase für die Produktion der potenten ROS, sowie schließlich für die Ausbildung von NET's wichtig ist. (21, 22, 29)

Aus Untersuchungen am Menschen ist weiterhin bekannt, dass ein Mangel an Myeloperoxidase nicht mit einer Lebenszeit oder Lebensqualität einschränkenden Immunsuppression einhergeht (24).

Diese Gesamtkonstellation aus Grundlagenforschungserkenntnissen und klinischen Erkenntnissen zur MPO führte zur Fragenstellung, wie sich eine MPO-Defizienz im EBA-Modell auswirkt.

## 4. Diskussion

---

Mit dem Tierversuch konnte gezeigt werden, dass sich bei *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen die EBA durch Injektion von Antikörpern gegen Kollagen VII nicht auslösen lässt. Es stellten sich bei den Tieren keine Hautveränderungen ein, weder makroskopisch im klinischen Scoring (s. Kapitel 3.1.1.) noch mikroskopisch in HE gefärbten Schnitten (s. Kapitel 3.1.4.), noch im Blutbild der Tiere, in dem sich weder Anämie noch Neutrophilie fanden (s. Kapitel 3.1.2.). Um sicherzustellen, dass die injizierte Antikörper-Lösung in der Lage war das EBA-Modell auszulösen, wurde sie auch Kontrolltieren verabreicht. Die Kontrolltiere hatten den gleichen genetischen Hintergrund wie die *MPO*-defizienten Mäuse und dasselbe Alter, auch waren in beiden Gruppen beide Geschlechter vertreten (s. Kapitel 3.1.1.). Alterseffekte und geschlechtsspezifische Effekte wurden somit egalisiert und die Gefahr, dass andere genetische Unterschiede als der gewünschte Unterschied der Allele für *MPO* eine Rolle spielten, minimiert. Gänzlich ausschließen lässt es sich jedoch nie, dass andere genetische Eigenschaften, als das untersuchte Kriterium für den Ausgang eines Experimentes verantwortlich sind.

Die Kontrolltiere erkrankten in einem vergleichbarem Maße (s. Kapitel 3.1.1), wie es dem Modell nach, zu erwarten war (6).

Weiterhin wurde durch immunhistochemische Färbungen gezeigt, dass bei den *MPO*-defizienten Tieren die Antikörper an ihre Antigene gebunden haben und es somit zur Bildung von Immunkomplexen gekommen ist. Nur die Bindung der Antikörper an ihr Antigen erklärt hinreichend, dass Kaninchen IgG an der dermo-epidermalen Junctionszone in der Maushaut nachgewiesen werden konnte. Die Injektionen waren somit bei allen Tieren erfolgreich und die Antikörper waren funktional. Eine Fehlinjektion, eine Degradation oder ein anderweitiger Funktionsverlust waren somit unwahrscheinlich. Ein weiterer Befund war, dass sich bei beiden Mauspopulationen Ablagerungen von C3 fanden. (s. Kapitel 3.1.3.) Ein Befund, der sehr deutlich dafür spricht, dass es in Folge der Bildung der Immunkomplexe zur Aktivierung des Komplementsystems gekommen ist. Komplementablagerungen sind ein typischer Untersuchungsbefund bei den autoimmunen bullösen Dermatosen und haben einen hohen Stellenwert in ihrer Diagnostik (2, 4).

## 4. Diskussion

---

Es findet sich in der Literatur, dass eine Störung der Aktivierung des Komplementsystems die Ausbildung des Krankheitsbildes abschwächen kann. Dies wurde beispielsweise gezeigt mit Mäusen, die für den C5a-Rezeptor defizient sind (46).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Komplementaktivierung in der Haut in Folge einer Bildung von Immunkomplexen nicht in der Lage ist bei *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäusen das Krankheitsbild der EBA auszulösen. Es sei auch auf das Ergebnis aus Kapitel 3.2.3 hingewiesen, demnach die Ausstattung der MPO defizienten Granulozyten mit dem C5a-Rezeptor sich nicht von den Wild-Typ Zellen unterscheidet und sich in Bezug auf seine Anfärbbarkeit nach C5a-Stimulierung ebenfalls nicht unterscheidet. *In-vitro* zeigte sich kein signifikant unterschiedliches Migrationsverhalten von MPO defizienten Neutrophilen gegenüber Wild-Typ Neutrophilen bei Stimulierung mit C5a (s. Kapitel 3.2.11.).

Bei einigen Auto-Immunerkrankungen spielt es eine Rolle, dass C5a aktivierend und chemotaktisch auf Neutrophile wirkt. Diese sind dann in der Folge für Gewebsschäden, die im Zuge der Erkrankungen auftreten, verantwortlich (47).

Dieser Mechanismus schien in den Experimenten dieser Arbeit nicht ausreichend zu sein, um zu einer Gewebsinfiltration mit Neutrophilen zu führen. Dies lässt darauf schließen, dass andere chemotaktische Signale in der EBA wichtiger oder zumindest zusätzlich notwendig sind, damit es zu einer Einwanderung relevanter Mengen an Neutrophilen kommt. Es ließen sich keine nennenswerten Zahlen Ly-6G positiver Zellen in der Haut der *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäuse nachweisen (s. Kapitel 3.1.5.). Ly-6G ist ein charakteristisches Oberflächenmerkmal von Neutrophilen und wird auch als Zielstruktur für die experimentelle gezielte Depletion der neutrophilen Granulozyten in Experimenten verwendet. Es lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass eine Zelle, bei der man Ly-6G nachweist ein neutrophiler Granulozyt ist (48, 49, 50).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass trotz Bildung von Immunkomplexen und Ablagerung von C3, was auf eine Komplementaktivierung hindeutet, keine Neutrophilen in die Haut der *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäuse eingewandert sind. Es schien vorab vorstellbar, dass eine MPO Defizienz, die Spaltbildung durch Mangel an hochreaktiven ROS beeinträchtigen könnte. Es

## 4. Diskussion

---

ist eine Erkenntnis, die sich aus dem Tierversuch ergeben hat, dass es bei MPO-Defizienz im EBA-Modell erst gar nicht zu einer Neutrophilen Infiltration kommt.

Da bei den untersuchten gendefizienten Mäusen ein Enzym betroffen ist, das in Neutrophilen in großer Menge vorliegt und für deren Funktion von zentraler Bedeutung ist, waren Untersuchungen zu Anzahl und Funktionalität der Neutrophilen ein wichtiger Bestandteil der Folge-Untersuchungen des Tierversuches. Sie dienten auch der Suche nach dem Mechanismus hinter den Ergebnissen im Tierversuch.

### **Blutbild**

Die Untersuchungen der Zellzahlen im Blut von naiven Mäusen der gleichen Art wie sie im Tierversuch verwendet wurden, erbrachten mit 2 verschiedenen durchflusszytometrischen Methoden den Nachweis, dass ein Ausbleiben der Infiltration der Haut durch Neutrophile nicht auf eine Neutropenie bei den Knock-out-Mäusen zurückzuführen war (s. Kapitel 3.2.1). Ein unerwarteter gravierender Mangel an Neutrophilen bei den naiven Mäusen, hätte die Ergebnisse hinreichend erklärt. Dies auszuschließen war daher für die Validität der Ergebnisse und weiteren Schlussfolgerungen ein wichtiger Befund.

Es fand sich kein signifikanter Unterschied bei den Zellzahlen zwischen den beiden Mauspopulationen im naiven Zustand. Hierbei sei darauf hingewiesen werden, dass sich angesichts der Stichprobengröße nur sehr große Unterschiede mit statistischer Signifikanz hätten offenbaren können. Womöglich besteht ein kleiner oder mittlerer Unterschied in der Zahl der Neutrophilen oder einer anderen Population der Zellen zwischen den *MPO*<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen. Ein solcher Unterschied würde jedoch im Gegensatz zu einer ausgeprägten Neutropenie nicht ausreichend das Ausbleiben von Neutrophileninfiltraten erklären.

### **CD62L**

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob die Neutrophilen der *MPO*<sup>-/-</sup>-Mäuse in gleichem Maße wie die WT-Neutrophilen CD62L an ihrer Zelloberfläche präsentierten und sich dieses auf physiologische Art und Weise durch eine Stimulation abscheiden ließ (s. Kapitel 3.2.2). Wie im Zuge der Einleitung beschrieben, ist CD62L ein für die Migration und folglich

## 4. Diskussion

---

Infiltration von Geweben durch Neutrophile wichtiges Oberflächenmerkmal. Ausserdem gilt seine Abscheidung in Folge einer Stimulation als Zeichen einer erfolgreichen Aktivierung (14, 15, 16).

Es fand sich kein Unterschied zwischen den beiden betrachteten Populationen. Weder in Bezug auf die Anwesenheit von CD62L an der Zelloberfläche im unstimulierten Zustand noch im Abscheide-Verhalten nach Stimulation mit PMA. Dies ist ein Beleg dafür, dass die allgemeine Befähigung der MPO<sup>-/-</sup>-defizienten Neutrophilen zur Gewebeeinfiltration erhalten blieb und generell auch eine Aktivierung der Zellen möglich ist.

In den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Migrationsfähigkeit der MPO defizienten neutrophilen Granulozyten zeigte sich kein Unterschied zu den Wildtyp-Zellen im Hinblick auf Chemotaxis und Chemokinesis als Reaktion auf C5a und LTB<sub>4</sub>.

Es ist zu erwähnen, dass das eigentliche Rollen, die Extravasation und das Migrieren im Gewebe nicht untersucht worden sind. Zwar wird die MPO selbst in aktuellen Veröffentlichungen zu diesen Prozesse im Allgemeinen nicht erwähnt (51, 52) und das auch nicht in aktuellen Reviews zu diesen Prozessen in Zeitschriften mit hohem impact-Faktor, (53) doch ist es keinesfalls auszuschließen, dass diese Prozesse bei den MPO<sup>-/-</sup>-defizienten Neutrophilen beeinträchtigt sein könnten. Ein Beleg für diese Vermutung findet sich in einer Veröffentlichung von Klinke et al., dort wurde die Hypothese aufgestellt, dass die MPO nicht-enzymatisch und ohne energieverbrauchende Schritte die Interaktion von Neutrophilen mit Endothelien begünstigt und dadurch eine Rolle als wirkungsvoller Rekrutierer von Neutrophilen ins Gewebe schon am Beginn von Entzündungsprozessen spielt. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass extrazelluläres MPO als Stimulus im Migrations-*assay* eine eindrucksvolle Leukotaxis bewirkt, die mit dem Effekt von Interleukin 8 vergleichbar ist (54). Eine verringerte Ausschüttung von MPO, könnte somit zu einer geringeren Leukotaxis in entzündetes Gewebe beitragen.

## 4. Diskussion

---

### Freisetzung von ROS

Dieses Experiment bestätigte mit dem in unserer Arbeitsgemeinschaft etablierten Verfahren, das hochreaktive oxidative Sauerstoffspezies bei MPO-Defizienz nicht in relevantem Maße ausgeschüttet werden (s. Kapitel 3.2.3). Für den Nachweis der hochreaktiven ROS wurde Luminol verwendet. Dieses gilt als empfindliche Substanz für den Nachweis intrazellulärer und extrazellulärer ROS verschiedenster Art (z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}\cdot$ ). Entscheidend um Luminol zur Chemilumineszenz anzuregen, ist die Anwesenheit einer Substanz mit ausreichender Oxidationsfähigkeit (42, 55).

Da auch intrazelluläre ROS nachgewiesen werden können und sich das gemessene Signal zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen nicht unterschied, lässt sich vermuten, dass mit Luminol registrierbare ROS nicht nur nicht ausgeschüttet, sondern gar nicht erst produziert worden sind. Ein Messergebnis, dass zur allgemein anerkannten Theorie zur Bildung entsprechender Sauerstoffspezies passt (21, 21, 24).

Die ordnungsgemäße Durchführung der Experimente wurde durch Kontrollen mit WT-Zellen bestätigt, diese produzierten wie erwartet in relevantem Maße mit Luminol nachweisbare ROS. Der Versuchsaufbau war somit funktional, sodass das Ausbleiben eines deutlichen Signals bei den  $\text{MPO}^{-/-}$ -Neutrophilen nicht auf die Immunkomplexe, das verwendete Luminol oder die Messgeräte zurückzuführen ist. Zu den Befunden mit den MPO defizienten Mäusen passend, ließ sich durch Inkubation von WT-Neutrophilen mit dem MPO-inhibitor AZD 5904 eine Reduktion der Produktion hochreaktiver ROS feststellen. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  reduzierte sich das gemessene Signal in den Experimenten im Vergleich zu den unbehandelten stimulierten Zellen auf etwa 25%. (s. Kapitel 3.2.4)

Ein weiteres deutliches Indiz für die Funktionalität des Versuchsaufbaues war das Ergebnis der Untersuchung auf ROS im Lucigenin-basierten Verfahren. Lucigenin ist eine Substanz, die als gut geeignet gilt, um die extrazelluläre Anwesenheit von Superoxid anzuzeigen. (43, 55)

## 4. Diskussion

---

Als Reaktion auf die Immunkomplex-Stimulierung ist somit bei den *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen eine mit den WT-Neutrophilen vergleichbare Ausschüttung von Superoxid zu vermuten (s. Kapitel 3.2.5). Diese Untersuchung trägt neben der Untersuchung auf CD62L dazu bei, die Funktionalität der MPO defizienten Neutrophilen zu bezeugen. Hierdurch wird es wahrscheinlich, dass der Signalweg von der Aktivierung durch eine Immunkomplex-Stimulierung bis hin zur Superoxid-Produktion durch die NADPH-Oxidase bei den untersuchten *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen intakt war. Auch dieses Ergebnis fügt sich im Hinblick auf bereits veröffentlichte Beschreibungen der zugehörigen Vorgänge gut ein (21). Ein weiteres relevantes Versuchsergebnis in diesem Zusammenhang ist, dass sich bei den MPO defizienten Neutrophilen in einem vergleichbaren Maße wie bei den Wildtyp-Neutrophilen in der Durchflusszytometrie eine Positivität bei Färbung gegen den Fcγ-Rezeptor 4 zeigte (vgl. Kapitel 3.2.11.).

### **Bildung und Ausschüttung von Leukotrien B<sub>4</sub>**

Erwartungsgemäß ließen sich in den zentrifugierten Überständen der Proben, in denen WT-Neutrophile mit Immunkomplexen stimuliert worden waren, erhöhte LTB<sub>4</sub>-Spiegel im kompetitiven ELISA messen (s. Kapitel 3.2.6.). Dies ist ein Ergebnis, dass im Einklang mit bereits veröffentlichten Erkenntnissen steht. Über die Ausschüttung von LTB<sub>4</sub> durch Neutrophile in Folge einer Stimulation mit Immunkomplexen, ist bereits berichtet worden (12).

Im Gegensatz hierzu fanden sich Werte nahe der unteren Nachweisgrenze in den Proben, in denen die *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen stimuliert worden waren. Ein Resultat demnach die Produktion hochreaktiver durch MPO erzeugter ROS und die Folgen des Vorliegens dieser Substanzen in den entsprechenden Neutrophilen für die Produktion und Ausschüttung von LTB<sub>4</sub> notwendig zu sein scheint.

Damit zeigte sich, dass bei den MPO defizienten Neutrophilen bei Immunkomplexstimulierung nicht nur die Produktion von hochreaktiven ROS ausbleibt, sondern auch die Ausschüttung der chemotaktischen Substanz LTB<sub>4</sub>. Diese zählt zu den

## 4. Diskussion

---

zentralen Mediatoren mit dessen Hilfe aktivierte Neutrophile für die Einwanderung weiterer Neutrophile an Entzündungsorte sorgen (56).

Chemotaktische Stimuli treten in mehreren Phasen oder Wellen auf, nachdem zuerst auftretende Stimuli in der Anfangsphase für das Einwandern einiger weniger Entzündungszellen sorgen, führen weitere in Wellen auftretende Phasen mit erhöhten Konzentrationen an chemotaktischen Stimuli zur Einwanderung von Entzündungszellen in größeren Zahlen. In den auf die erste Anfangsphase folgenden Wellen spielt LTB<sub>4</sub> eine besonders wichtige Rolle (57).

Mit diesen Ergebnissen fand sich daher *in vitro* ein Unterschied zwischen den WT und den *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen, der für das Ausbleiben einer Neutrophileninfiltration im *in-vivo* Versuch eine stimmige Erklärung darstellt.

Ein weiterer Hinweis auf die Art und Weise wie die Bildung von LTB<sub>4</sub> nach Immunkomplexstimulierung durch MPO ermöglicht wird, zeigte sich durch Untersuchung der Überstände der Proben, mit WT-Zellen deren MPO-Aktivität pharmakologisch gehemmt worden ist. In diesen Proben zeigten sich keine niedrigen Konzentrationen an LTB<sub>4</sub>. (s. Kapitel 3.2.6) Dies spricht dafür, dass die Prozesse, die nach Immunkomplex-Stimulierung zur Bildung von LTB<sub>4</sub> führen, womöglich schon durch geringe Mengen an hochpotenten ROS möglich und demnach nicht konzentrationsabhängig sind. Denkbar ist auch, dass die notwendigen Interaktionen der MPO mit anderen Molekülen nicht durch die Hemmung mit AZD5904 gestört werden, weil beispielsweise im Zuge dieser Prozesse nichtenzymatische Reaktionen ablaufen.

### **Befähigung zur Ausbildung von NET's**

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch die Befähigung zur Ausbildung von NET's untersucht. Hierzu wurde ein *Sytox-green-assay* angewandt, bei dem wie im Methoden-Teil beschrieben, die Zunahme an extrazellulärer DNA über 5 Stunden photometrisch bestimmt wurde.

Im Einklang mit den Ergebnissen aktueller Veröffentlichungen (33, 35, 37) zeigte sich hierbei, dass eine MPO-Defizienz die Befähigung zur Ausbildung von NET's nach

## 4. Diskussion

---

Immunkomplex-Stimulierung beeinträchtigt. Denn es zeigte sich eine deutliche geringere Zunahme der Fluoreszenz über 5 Stunden. Da die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit als Vielfaches des Ausgangswertes betrachtet wurde, konnte der Einfluss etwaiger Unterschiede innerhalb der Experimente zwischen den Studienpopulationen und Experiment übergreifend zwischen allen Neutrophilen-Isolationen reduziert werden. Es galt vor allem den Einfluss unterschiedlich effizienter Isolationen und etwaiger Zellzahlunterschiede durch Ungenauigkeiten beim Zählvorgang zu minimieren. Es erfolgte damit eine Betrachtung der Veränderung der Signalstärke über die Zeit, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit erreicht werden konnte. Ähnliche Vorgehensweisen sind auch in der Literatur beschrieben (58).

Bei Messung der Netose über die Anfärbung extrazellulärer DNA ist zu bedenken, dass andere Arten des Zelltodes das Messergebnis beeinflussen können (32, 44). Es ist eine Interpretation unter Berücksichtigung des Experimentaufbaus, dass die Fluoreszenzunahme im überwiegenden Maße auf die Ausbildung von NET's zurückzuführen ist. Ein solches Vorgehen ist bis zu einem gewissen Grade notwendig, da es nach aktuellem Stand der Forschung keinen Marker gibt, dessen Messung zweifelsfrei das Ausmaß in dem Netose stattfindet, anzeigen kann (32).

Alle Verfahren die unter Beteiligung von MPO dazu dienen, Netose zu quantifizieren, sind nicht geeignet, um die Netose-Fähigkeit von Neutrophilen, die MPO nicht exprimieren zu untersuchen. Eine Netose-Bildung würde dann nicht registriert werden, unabhängig davon ob sie abläuft. Das Netose prinzipiell ohne MPO ablaufen kann, ist im Hinblick auf veröffentlichte Ergebnisse zur NADPH-Oxidase unabhängig ausgelösten Netose wahrscheinlich (36). Die Auswahl der Methoden zur Messung der Netose waren somit eingeschränkt. Eingeschlossen in die Messungen wurden immer auch Proben von durch Hitze getöteten Neutrophilen und Proben ohne Zellen. In beiden Kontrollen zeigten sich keine deutlichen Veränderungen in der gemessenen Signalstärke über die Zeit, wobei tendenziell eine leichte Abnahme der Signalstärke um wenige Prozent bei der Medium-Kontrolle stattfand. Dies ist am ehesten auf einen schleichenden geringgradigen Funktionsverlust des *Sytox green's* über die Zeit zurückzuführen. Auch die Werte der

## 4. Diskussion

---

Zelltod-Kontrolle sind als plausibel zu betrachten. Ein in absoluten Zahlen kräftiges Signal, das über die Beobachtungszeit konstant bleibt, ist gut vereinbar mit der Vorstellung, nach der die gesamte DNA der Zellen durch das Erhitzen für das *Sytox green* zugänglich gemacht wird.

Einen leichten Anstieg im Lauf der Zeit zeigten die unstimulierten Kontrollen, inwiefern dieser Anstieg auf Netose, Nekrose oder eventuell Apoptose zurückzuführen ist, wurde nicht näher untersucht. Es ist jedoch als wahrscheinlich zu betrachten, dass einige der Zellen über die 5 Stunden einer der Zelltod-Arten erlegen sind, insbesondere da die Lebensspanne von Neutrophilen, vor allem unter ex-vivo Bedingungen als relativ kurz gilt. Es werden in der Literatur selbst für in den Kreislauf von Mäusen reperfundierte Neutrophile Halbwertszeiten von 9-18 Stunden genannt (59).

Unter unphysiologischen Bedingungen ist von noch kürzeren Halbwertszeiten auszugehen.

Es erfolgte auch ein Vergleich der Netose-Befähigung bei Stimulierung mit Calcium-Ionophore, um den NADPH-Oxidase unabhängigen Weg zu prüfen. In den Experimenten dieser Arbeit ließ sich kein Unterschied zwischen den beobachteten Studienpopulationen feststellen. Dies ist als Indiz zu werten, dass MPO defiziente Neutrophile in vergleichbarem Maße wie WT Neutrophile zur NADPH unabhängigen Netose in der Lage sind. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass eine unbestimmte Menge der Zellen durch den pharmakologisch erzwungenen Calcium-Einstrom nicht aktiviert, sondern abgetötet worden sind. Es ist auch vorstellbar, dass die WT-Zellen NET's gebildet haben und die MPO-Zellen womöglich nicht dazu in der Lage waren, aber in Folge des Calcium-Einstromes nekrotisch geworden sind. Der hier angewandte experimentelle Aufbau kann zwischen den Gründen für die Nachweisbarkeit extrazellulärer DNA nicht unterscheiden Ein Argument, das dafür spricht, dass die MPO defizienten und die WT-Zellen auf gleiche Art und Weise reagiert haben, ist die vergleichbare zeitliche Dynamik der Fluoreszenzzunahmen. In *Abbildung 22* lässt sich ein analoger Kurvenverlauf der beiden Studienpopulationen erkennen. Zur Einordnung der Ergebnisse sollte erwähnt sein, dass die Rolle die Calcium für die Netose spielt, aktuell diskutiert wird. Die genauen Zusammenhänge und die aktuelle Datenlage werden beispielsweise im Review von Hann et al. als zum Teil unklar und unbekannt beschrieben.

### 4.2. Synopsis der Versuche und Ausblick

Der Tierversuch zeigte, dass bei einer MPO Defizienz trotz Ausbildung von Immunkomplexen und Ablagerung von Komplement an der DEJ eine Neutrophileninfiltration der Haut ausbleibt. Ohne diese Neutrophileninfiltration findet kein relevanter Entzündungsprozess statt und die Mäuse bleiben klinisch gesund. Hierauf folgten *in vitro* Untersuchungen um den Mechanismus hinter diesen Ergebnissen zu verstehen. Einige dieser Untersuchungen zeigten auf, dass physiologische Grundbedingungen vorlagen, die für die Validität der weiteren Ergebnisse wichtig sind. So finden sich *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophile im Knochenmark und Blut der entsprechenden Mäuse in physiologischer Größenordnung und reagieren auf eine Immunkomplex-Stimulierung mit der Bildung von Superoxid. Zugleich zeigte sich auch, dass sich die *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen in einigen Aspekten von WT Neutrophilen unterscheiden, die im Einklang mit dem Stand der Forschung zu sehen sind. Hierbei sei darauf verwiesen, dass sich die Bildung potenter ROS und NADPH-Oxidase abhängiger NET's bei MPO defizienten Neutrophilen reduziert zeigte. Im Zuge der Versuche zeigten sich auch bislang unbekannte Erkenntnisse zur Physiologie der Neutrophilen, denn die Ausschüttung von LTB<sub>4</sub> zeigte sich bei den *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen als Reaktion auf eine Immunkomplex-Stimulierung reduziert.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen wiesen somit auf mehrere mögliche Mechanismen, die für die Ergebnisse des Tierversuches verantwortlich sein könnten. Die Frage welcher Unterschied zwischen MPO defizienten Neutrophilen und WT Neutrophilen für den Schutz vor dem Ausbruch der Erkrankung verantwortlich ist, ließ sich mit Abschluss des Projektes nicht mit Sicherheit beurteilen. Es bleibt unklar, ob die fehlende LTB<sub>4</sub>-Ausschüttung oder die eingeschränkte NET-Bildung für das Ausbleiben der Neutrophilen-Infiltration verantwortlich ist. Denkbar ist auch, dass nicht das Fehlen von NET's an sich, sondern das Fehlen von mit MPO bestückten NET's die entscheidende Rolle gespielt hat und MPO auf diese Weise im Normalfall einen bedeutsamen chemotaktischen Effekt entfaltet hätte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die von Klinke et al. postulierte Bedeutung der MPO zur Extravasation eine Rolle spielte oder gar entscheidend war (54).

## 4. Diskussion

---

Es ist mit Abschluss des Projektes nicht zur Gänze untersucht, wie die MPO-Defizienz die Bildung und oder Ausschüttung von LTB<sub>4</sub> beeinflusste. Hier sind weitere Forschungsanstrengungen nötig, um zu verstehen, welchen Platz MPO im entsprechenden Signalweg einnimmt.

Jede dieser Fragen stellt einen Ansatz zur weiteren Grundlagenforschung dar und ihre Antworten können helfen, die Rolle der MPO in der Entzündungsforschung weiter zu klären. Dies wäre im Zusammenhang mit einer sehr großen Anzahl an pathologischen Prozessen relevant, denn Neutrophile und ihre MPO benötigten Funktionen spielen bei infektiösen (z.b. Sepsis), inflammatorischen (z.b. bullöse Autoimmundermatosen), degenerativen (z.b. Atherosklerose) und traumatischen (z.b. Wundheilung) Erkrankungen eine Rolle. Interessanterweise ist es denkbar, dass der therapeutische Effekt einer MPO-Inhibition bereits im klinischen Alltag genutzt wird. Denn das Therapeutikum Dapson (4,4'-diaminodiphenylsulfone), das ursprünglich als Medikament gegen Lepra eingesetzt wurde, findet seit den 50'er Jahren Anwendung in der Dermatologie gegen blasenbildende Erkrankungen. Dies erklärt man sich durch eine Reihe von Wirkmechanismen auf Neutrophile, darunter einer direkten Hemmung der enzymatischen Aktivität der MPO, aber auch durch eine direkte Störung der Effekte von Leukotrien B<sub>4</sub> und der CD11b/CD18 vermittelten chemotaktischen Migration (61, 62).

AZD5904, einer der im Zuge dieser Arbeit verwendeten MPO-Inhibitoren, wurde bereits erfolgreich in 5 Phase 1 Studien am Menschen getestet, um potenziell bei einer Vielzahl von Erkrankungen zum Einsatz zu kommen (63).

Die Substanz im EBA-Tiermodell anzuwenden und somit die Wirksamkeit zu prüfen, wäre ein logischer nächster Schritt in der Erforschung dieses Themenkomplexes. Womöglich ist mit spezifischen MPO-Inhibitoren wie AZD5904 eine mit der von Dapson vergleichbare Wirkung bei blasenbildenden Erkrankungen möglich. Dabei wäre denkbar, dass sich diese Behandlung als effektiver, nebenwirkungsärmer oder auch beides erweist.

### 5. Zusammenfassung

Die Experimente und Versuche dieser Arbeit beschäftigten sich mit der Rolle der neutrophilen Myeloperoxidase für die Ausbildung krankheitstypischer Veränderungen im EBA-Mausmodell. Nach aktuellem Stand der Forschung war bekannt, dass die neutrophilen Granulozyten und deren Freisetzung von ROS eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der EBA spielen und die MPO für die Produktion von ROS wichtig ist.

Die klinischen Versuche dieser Arbeit ergaben, dass MPO defiziente Mäuse trotz nachgewiesener Anwesenheit von Antikörpern gegen Kollagen 7 und Ablagerung von Komplement C3 die Erkrankung klinisch nicht ausbilden. Zugleich zeigte die Immunhistochemie, dass die physiologische Integrität und der regelrechte Aufbau der Haut erhalten blieben und es nicht zu einer Neutrophileninfiltration der Haut kam.

Dazu passende Beobachtungen fanden sich auch im Blutbild, während es bei den WT Mäusen zu einer bei Entzündungen üblichen Neutrophilie kam, fanden sich bei den *MPO*<sup>-/-</sup> - Mäusen keine solchen Veränderungen. Makroskopisch, mikroskopisch und in der Blutuntersuchung zeigten sich die *MPO*<sup>-/-</sup> Mäuse gesund.

Blutuntersuchungen an *MPO*<sup>-/-</sup> Mäusen, die nicht am Tierversuch teilgenommen hatten belegten, dass diese auch außerhalb des Tierversuches ein normales Blutbild aufweisen und isolierte KM-Neutrophile dieser Mäuse zeigten im Hinblick auf die Ausstattung mit CD62L und dessen Abscheidung bei Stimulierung mit PMA keinen Unterschied zu entsprechenden Zellen von WT-Mäusen.

Versuche zur Immunkomplex-Stimulierung mit isolierten KM-Neutrophilen ergaben, dass die *MPO*<sup>-/-</sup>-Neutrophilen zwar Superoxid produzierten, aber keine potenten ROS bildeten, kein LTB<sub>4</sub> ausschütteten und sich signifikant weniger extrazelluläre DNA zeigte. Dies lässt vermuten, dass weniger NET's gebildet worden sind. Bei einer Stimulierung mit einem Calciumionophore zeigte sich hingegen kein Unterschied im Hinblick auf die Nachweisbarkeit extrazellulärer DNA. Diese Ergebnisse zeigen an, dass die MPO notwendig ist, damit sich nach Ausbildung von Immunkomplexen eine Neutrophileninfiltration in der Haut mit Verlust der dermal-epidermalen Adhäsion einstellt und bestärken die Forschungen, die sich mit dem therapeutischen Potenzial der MPO-Inhibition beschäftigen.

# Abkürzungsverzeichnis

- ANA - Anti-nukleäre Antikörper
- ANCA - Anti neutrophile cytoplasmatische Antikörper
- ANOVA - analysis of variance
- BP - Bullöses Pemphigoid
- CL - Chemolumineszenz
- DDW - doppelt destilliertes Wasser
- DEJ - Dermo-epidermale Junktionszone
- EBA - Epidermolysis bullosa acquisita
- ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay
- FBS - Fetal bovines Serum
- FcR - fragment crystallisable receptor
- FMO- Fluorescence minus one (control)
- FSC - Forward scatter
- HBSS - Hanks balanced salt solution
- HSA - humanes Serum Albumin
- KM - Knochenmark
- KO - Knock-out
- LY-6G - Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
- MPO - Myeloperoxidase
- NET - Neutrophil extracellular traps
- PBS - Phosphate buffered saline
- ROR $\alpha$  - Retinoid-related orphan receptor
- SSC - Side scatter
- TNF $\alpha$  - Tumor Nekrose Faktor alpha
- UKSH - Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung bekannter Mechanismen nach Bildung von Immunkomplexen im Bereich der dermoepidermalen Junktionszone	11
<b>Abbildung 2:</b> Gegenüberstellung des NADPH-Oxidase abhängigen und unabhängigen Weges der Netosis	18
<b>Abbildung 3:</b> Repräsentative Darstellung zur Erstellung und Anwendung von Gates mit FMO-Proben	30
<b>Abbildung 4:</b> Illustration zur Auswertung von Sytox-Green-Assay Ergebnissen	45
<b>Abbildung 5:</b> Ergebnis des klinischen Scorings	54
<b>Abbildung 6:</b> Repräsentative Fotos der Scoring-Tage 4 und 12	55
<b>Abbildung 7:</b> Blutbild der Versuchstiere an Tag 14 des Versuchs	57
<b>Abbildung 8:</b> Ergebnisse der Durchflusszytometrie von EDTA-Blut nach Immunfluoreszenzmarkierung an Tag 14 des Versuches	59
<b>Abbildung 9:</b> Immunhistochemische Färbungen gegen Kaninchen IgG und murines C3	60
<b>Abbildung 10:</b> Repräsentative Bilder von HE gefärbten Schnitten beider Studienpopulationen	61
<b>Abbildung 11:</b> Repräsentative Bilder von nach Ly-6G gefärbten Schnitten beider Studienpopulationen	62
<b>Abbildung 12:</b> Ergebnis einer semi-automatisierten Zählung der Ly-6G <sup>+</sup> Zellen in histologischen Hautschnitten	63
<b>Abbildung 13:</b> Zellpopulationen im Blut naiver Mäuse	65
<b>Abbildung 14:</b> Ergebnis der Durchflusszytometrie isolierter Neutrophilen-Lösungen beider Studienpopulationen nach Färbung gegen CD45, Ly-6G und CD62L versetzt mit Viobility Farbstoff	67
<b>Abbildung 15:</b> Zellviabilität und Reinheitsgrad nach magnetischer Negativ-Selektion von Neutrophilen	67
<b>Abbildung 16:</b> Ergebnis der Durchflusszytometrie nach Färbung gegen CD11b, Ly-6G, C5aR und FcγR4	69
<b>Abbildung 17:</b> Photometrische Messwerte nach Immunkomplex-Stimulierung von murinen Neutrophilen zweier Studienpopulationen unter Zugabe von Luminol	70

---

<b>Abbildung 18:</b> Ergebnisse zur ROS Freisetzung nach Inkubation mit AZD 5904	71
<b>Abbildung 19:</b> Photometrische Messwerte nach Immunkomplex-Stimulierung von murinen Neutrophilen zweier Studienpopulationen unter Zugabe von Lucigenin	72
<b>Abbildung 20:</b> LTB <sub>4</sub> Konzentrationen in den Überständen von Neutrophilen nach IC-Stimulierung	74
<b>Abbildung 21:</b> Sytox green assay Ergebnisse bei Immunkomplexstimulierung von neutrophiler Granulozyten über 5 Stunden	76
<b>Abbildung 22:</b> Sytox-green-assay Ergebnisse mit Calciumionophore-Stimulierung neutrophiler Granulozyten über 5 Stunden	78
<b>Abbildung 23:</b> Ergebnis der Toxizitätsmessungen von WT-Neutrophilen mit AZD5904	79
<b>Abbildung 24:</b> Ergebnis des Versuches zum Migrationsverhalten gegenüber C5a und LTB <sub>4</sub>	81

### Literaturverzeichnis

1. Ludwig, Ralf J. „Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita“. *ISRN Dermatology* 2013 (2013): 1–25. <https://doi.org/10.1155/2013/812029>.
2. Beek, Nina van, Detlef Zillikens und Enno Schmidt. „Diagnosis of Autoimmune Bullous Diseases: Autoimmune Bullous Diseases“. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 16, Nr. 9 (September 2018): 1077–91. <https://doi.org/10.1111/ddg.13637>.
3. Hübner, Franziska, Andreas Recke, Detlef Zillikens, Roland Linder, und Enno Schmidt. „Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany“. *Journal of Investigative Dermatology* 136, Nr. 12 (Dezember 2016): 2495–98. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.013>.
4. Vorobyev, Artem, Ralf J. Ludwig, und Enno Schmidt. „Clinical Features and Diagnosis of Epidermolysis Bullosa Acquisita“. *Expert Review of Clinical Immunology* 13, Nr. 2 (Februar 2017): 157–69. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1221343>.
5. Mihai, Sidonia, und Cassian Sitaru. „Immunopathology and Molecular Diagnosis of Autoimmune Bullous Diseases“. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11, Nr. 3 (Mai 2007): 462–81. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00033.x>.
6. Sitaru, Cassian, Sidonia Mihai, Christoph Otto, Mircea T. Chiriac, Ingrid Hausser, Barbara Dotterweich, Hitoshi Saito, Christian Rose, Akira Ishiko, und Detlef Zillikens. „Induction of Dermal-Epidermal Separation in Mice by Passive Transfer of Antibodies Specific to Type VII Collagen“. *Journal of Clinical Investigation* 115, Nr. 4 (1. April 2005): 870–78. <https://doi.org/10.1172/JCI200521386>.
7. Sadik CD, Schmidt E. Resolution in bullous pemphigoid. *Semin Immunopathol.* 2019;41(6):645-654. doi:10.1007/s00281-019-00759-y
8. Sezin, Tanya, Matthias Krajewski, Adam Wutkowski, Sadegh Mousavi, Lenche Chakievska, Katja Bieber, Ralf J. Ludwig, u. a. „The Leukotriene B4 and Its Receptor BLT1 Act as Critical Drivers of Neutrophil Recruitment in Murine Bullous Pemphigoid-Like Epidermolysis Bullosa Acquisita“. *Journal of Investigative Dermatology* 137, Nr. 5 (Mai 2017): 1104–13. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.12.021>.

9. Hirose, Misa, Anika Kasprick, Foteini Beltsiou, Katharina Dieckhoff Schulze, Franziska Sophie Schulze, Unni Kjsrl Samavedam, Jennifer E. Hundt, u. a. „Reduced Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita after Anti-TNF Treatment“. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 22 (Februar 2017): 918–26. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00206>.
10. Sadeghi, Hengameh, Yask Gupta, Steffen Möller, Unni K. Samavedam, Martina Behnen, Anika Kasprick, Katja Bieber, u. a. „The Retinoid-Related Orphan Receptor Alpha Is Essential for the End-Stage Effector Phase of Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita“. *The Journal of Pathology* 237, Nr. 1 (September 2015): 111–22. <https://doi.org/10.1002/path.4556>.
11. Mihai S, Hirose M, Wang Y, Thurman JM, Holers VM, Morgan BP, Köhl J, Zillikens D, Ludwig RJ, Nimmerjahn F. Specific Inhibition of Complement Activation Significantly Ameliorates Autoimmune Blistering Disease in Mice. *Front Immunol.* 2018 Mar 16;9:535. doi: 10.3389/fimmu.2018.00535. PMID: 29616034; PMCID: PMC5865061.
12. Sadik CD, Kim ND, Iwakura Y, Luster AD. Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR and FcγR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Nov 13;109(46):E3177-85. doi: 10.1073/pnas.1213797109. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23112187; PMCID: PMC3503206.
13. Wan M, Tang X, Stsiapanava A, Haeggström JZ. Biosynthesis of leukotriene B<sub>4</sub>. *Semin Immunol.* 2017 Oct;33:3-15. doi: 10.1016/j.smim.2017.07.012. PMID: 29042025.
14. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med.* 1995;181(6):2259-2264. doi:10.1084/jem.181.6.2259
15. Arbonés ML, Ord DC, Ley K, et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity.* 1994;1(4):247-260. doi:10.1016/1074-7613(94)90076-0
16. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med.* 2005 Apr-Jun;9(2):255-66. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00354.x. PMID: 15963248; PMCID: PMC6740228.
17. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol.* 2019 May 14;10:1068. doi: 10.3389/fimmu.2019.01068. PMID: 31139190; PMCID: PMC6527602.

18. Liu Z, Shapiro SD, Zhou X, Twining SS, Senior RM, Giudice GJ, Fairley JA, Diaz LA. A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest*. 2000 Jan;105(1):113-23. doi: 10.1172/JCI3693. PMID: 10619867; PMCID: PMC382581.
19. Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, Senior RM. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med*. 1998 Aug 3;188(3):475-82. doi: 10.1084/jem.188.3.475. PMID: 9687525; PMCID: PMC2212482.
20. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker EB, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C. Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol*. 2004 Dec;204(5):519-27. doi: 10.1002/path.1674. PMID: 15538734.
21. Amulic, Boroko, Christel Cazalet, Garret L. Hayes, Kathleen D. Metzler, und Arturo Zychlinsky. „Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease“. *Annual Review of Immunology* 30, Nr. 1 (23. April 2012): 459–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>.
22. Chiriaco, Maria, Irene Salfa, Gigliola Di Matteo, Paolo Rossi, und Andrea Finocchi. „Chronic Granulomatous Disease: Clinical, Molecular, and Therapeutic Aspects“. *Pediatric Allergy and Immunology* 27, Nr. 3 (Mai 2016): 242–53. <https://doi.org/10.1111/pai.12527>.
23. Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun*. 1999 Apr;67(4):1828-36. PMID: 10085024; PMCID: PMC96534.
24. Pahwa, Roma, und Ishwarlal Jialal. „Myeloperoxidase Deficiency“. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470278/>.
25. Hartman, Celine L., und David A. Ford. „MPO (Myeloperoxidase) Caused Endothelial Dysfunction“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38, Nr. 8 (2018): 1676–77. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311427>.
26. Manchanda K, Kolarova H, Kerkenpaß C, Mollenhauer M, Vitecek J, Rudolph V, Kubala L, Baldus S, Adam M, Klinke A. MPO (Myeloperoxidase) Reduces Endothelial Glycocalyx Thickness Dependent on Its Cationic Charge. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Aug;38(8):1859-1867. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311143. PMID: 29903730.

27. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules*. 2019 Aug 14;9(8):365. doi: 10.3390/biom9080365. PMID: 31416173; PMCID: PMC6722781.
28. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013 Oct 17;122(16):2784-94. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24009232.
29. Berthelot JM, Le Goff B, Neel A, Maugars Y, Hamidou M. NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis. *Joint Bone Spine*. 2017 May;84(3):255-262. doi: 10.1016/j.jbspin.2016.05.013. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27426444.
30. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*. 1996;59(2):229-240.
31. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 Jul 1;2016(7). doi: 10.1101/pdb.prot087163. PMID: 27371595.
32. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*. 2016 Aug 1;459:89-93. doi: 10.1016/j.cca.2016.05.029. Epub 2016 May 31. PMID: 27259468.
33. Hoppenbrouwers, Tamara, Anouchska S. A. Autar, Andi R. Sultan, Tsion E. Abraham, Wiggert A. van Cappellen, Adriaan B. Houtsmuller, Willem J. B. van Wamel, Heleen M. M. van Beusekom, Johan W. van Neck, und Moniek P. M. de Maat. „In Vitro Induction of NETosis: Comprehensive Live Imaging Comparison and Systematic Review“. *PLoS One* 12, Nr. 5 (2017): e0176472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176472>.
34. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):953-9. doi: 10.1182/blood-2010-06-290171. Epub 2010 Oct 25. PMID: 20974672; PMCID: PMC3035083.
35. Granger V, Peyneau M, Chollet-Martin S, de Chaisemartin L. Neutrophil Extracellular Traps in Autoimmunity and Allergy: Immune Complexes at Work. *Front Immunol*. 2019 Dec 3;10:2824. doi: 10.3389/fimmu.2019.02824. PMID: 31849989; PMCID: PMC6901596.

36. Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 3;112(9):2817-22. doi: 10.1073/pnas.1414055112. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25730848; PMCID: PMC4352781.
37. Björnsdóttir, Halla, Amanda Welin, Erik Michaëlsson, Veronica Osla, Stefan Berg, Karin Christenson, Martina Sundqvist, Claes Dahlgren, Anna Karlsson, und Johan Bylund. „Neutrophil NET Formation Is Regulated from the inside by Myeloperoxidase-Processed Reactive Oxygen Species“. *Free Radical Biology and Medicine* 89 (Dezember 2015): 1024–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398>.
38. Giusti D, Bini E, Terryn C, et al. NET Formation in Bullous Pemphigoid Patients With Relapse Is Modulated by IL-17 and IL-23 Interplay. *Front Immunol*. 2019;10:701. Published 2019 Apr 4. doi:10.3389/fimmu.2019.00701
39. Pruchniak MP, Kotuła I, Manda-Handzlik A. Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(2):217-224. doi:10.5114/ceji.2015.52836
40. Tsourouktsoglou TD, Warnatsch A, Ioannou M, Hoving D, Wang Q, Papayannopoulos V. Histones, DNA, and Citrullination Promote Neutrophil Extracellular Trap Inflammation by Regulating the Localization and Activation of TLR4. *Cell Rep*. 2020 May 5;31(5):107602. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107602. PMID: 32375035.
41. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40. PMID: 29512141; PMCID: PMC5939936.
42. F. Boess und U. A. Boelsterli. Luminol as a probe to assess reactive oxygen species production from redox-cycling drugs in cultured hepatocytes. *Toxicology mechanisms and methods*, 12:79–94, 2002.
43. Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods*. 1987 Mar 12;97(2):209-13. doi: 10.1016/0022-1759(87)90461-3. PMID: 3029229.
44. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A*. 2017 Aug;91(8):822-829. doi: 10.1002/cyto.a.23169. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28715618; PMCID: PMC5601186.

## Literaturverzeichnis

---

45. Koga H, Prost-Squarcioni C, Iwata H, Jonkman MF, Ludwig RJ, Bieber K. Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update. *Front Med (Lausanne)*. 2019 Jan 10;5:362. doi: 10.3389/fmed.2018.00362. PMID: 30687710; PMCID: PMC6335340.
46. Mihai S, Chiriac T, Takahashi K, Thurman J, Holers V, Zillikens M, Botto M, Sitaru C. The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178:6514–6521, Mai 2007.
47. Miyabe Y, Miyabe C, Murooka T, Kim E, Newton G, Kim N, Haribabu B, Luscinskas F, Mempel T, Luster A. Complement c5a receptor is the key initiator of neutrophil adhesion igniting immune complex-induced arthritis. *Science immunology*, 2, Januar 2017.
48. Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol*. 2013 Oct;94(4):585-94. doi: 10.1189/jlb.0113014. Epub 2013 Mar 29. PMID: 23543767.
49. Pollenus E, Malengier-Devlies B, Vandermosten L, Pham TT, Mitera T, Possemiers H, Boon L, Opdenakker G, Matthys P, Van den Steen PE. Limitations of neutrophil depletion by anti-Ly6G antibodies in two heterogenic immunological models. *Immunol Lett*. 2019 Aug;212:30-36. doi: 10.1016/j.imlet.2019.06.006. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31226358.
50. Heng TS, Painter MW; Immunological Genome Project Consortium. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol*. 2008 Oct;9(10):1091-4. doi: 10.1038/ni1008-1091. PMID: 18800157.
51. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678-89. doi: 10.1038/nri2156. PMID: 17717539.
52. Akk A, Springer LE, Yang L, Hamilton-Burdess S, Lambris JD, Yan H, Hu Y, Wu X, Hourcade DE, Miller MJ, Pham CTN. Complement activation on neutrophils initiates endothelial adhesion and extravasation. *Mol Immunol*. 2019 Oct;114:629-642. doi: 10.1016/j.molimm.2019.09.011. Epub 2019 Sep 19. PMID: 31542608; PMCID: PMC6815348.
53. Filippi MD. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood*. 2019 May 16;133(20):2149-2158. doi: 10.1182/blood-2018-12-844605. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30898863; PMCID: PMC6524565.

## Literaturverzeichnis

---

54. Klink A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V, Paust HJ, Schröder C, Benten D, Lau D, Szocs K, Furtmüller PG, Heeringa P, Sydow K, Duchstein HJ, Ehmke H, Schumacher U, Meinertz T, Sperandio M, Baldus S. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1350-8. doi: 10.1182/blood-2010-05-284513. Epub 2010 Oct 27. PMID: 20980678.
55. McKinney KA, Lewis SE, Thompson W. Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probes. *Arch Androl*. 1996 Mar-Apr;36(2):119-25. doi: 10.3109/01485019608987087. PMID: 8907672.
56. Majumdar R, Tavakoli Tameh A, Parent CA. Exosomes Mediate LTB4 Release during Neutrophil Chemotaxis. *PLoS Biol*. 2016 Jan 7;14(1):e1002336. doi: 10.1371/journal.pbio.1002336. PMID: 26741884; PMCID: PMC4704783.
57. Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, McCann CP, Oliver CM, Aamer KA, Losert W, Cicerone MT, Parent CA. LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Dev Cell*. 2012 May 15;22(5):1079-91. doi: 10.1016/j.devcel.2012.02.003. Epub 2012 Apr 26. PMID: 22542839; PMCID: PMC4141281.
58. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Induction and Quantification of NETosis. *Curr Protoc Immunol*. 2016 Nov 1;115:14.41.1-14.41.14. doi: 10.1002/cpim.16. PMID: 27801512.
59. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol*. 2019 Jul;40(7):584-597. doi: 10.1016/j.it.2019.04.013. Epub 2019 May 29. PMID: 31153737.
60. Hann J, Bueb JL, Tolle F, Bréchar S. Calcium signaling and regulation of neutrophil functions: Still a long way to go. *J Leukoc Biol*. 2020 Feb;107(2):285-297. doi: 10.1002/JLB.3RU0719-241R. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31841231.
61. Zhu YI, Stiller MJ. Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45(3):420-434. doi:10.1067/mjd.2001.114733
62. Bozeman PM, Learn DB, Thomas EL. Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. *Biochem Pharmacol*. 1992 Aug 4;44(3):553-63. doi: 10.1016/0006-2952(92)90449-s. PMID: 1324677.
63. [https://ncats.nih.gov/files/AZD5904\\_0.pdf](https://ncats.nih.gov/files/AZD5904_0.pdf), Abrufdatum 05.11.2020

# Anhang

## Ethikvotum

Die hier durchgeführten Versuche an Wirbeltieren wurden im Schreiben vom 26.02.2019 vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung von Schleswig-Holstein unter dem Aktenzeichen V242 – 32/2019 (14-2/19) durch die Genehmigung des Versuchsabschnittes (1) vom Versuchsvorhaben „Pathophysiologische Rolle der Myeloperoxidase und Wirkung des Dapsons in der Epidermolysis bullosa acquisita“ genehmigt.

## Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens, der mir als Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck durch die Bereitstellung des Laboratoriums und der benötigten Materialien die Arbeit an meinen Versuchsreihen ermöglicht hat. Insbesondere meinem Doktorvater Prof Dr. med. Christian Sadik danke ich sehr für die Bereitstellung des Themas sowie für seine allzeit freundliche und motivierende Unterstützung. Auch bei meiner Betreuerin in Tierhaus und im Labor Dr. Sripriya Murthy möchte ich mich für die hilfsbereite Art und ihre wertvolle Unterstützung und Anleitung herzlich bedanken. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Laboratoriums für ihre Unterstützung sowie die umfassenden Einweisungen und Erklärungen im Laboralltag. Zudem möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir alles ermöglicht haben.