



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED)
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

„Die Rolle von regulatorischen T Zellen in der Effektorphase der *Epidermolysis bullosa acquisita*“

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Natalie Groß

aus Bad Aibling, Deutschland

Lübeck 2023

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: PD Dr. Katja Bieber

2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. Lars Redecke

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2023

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 10.10.2023

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
Tabellenverzeichnis.....	XVI
1 Einleitung.....	17
1.1 Überblick über das Immunsystem.....	17
1.1.1 <i>Das angeborene Immunsystem</i>	17
1.1.2 <i>Das adaptive Immunsystem</i>	18
1.1.2.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex.....	18
1.1.2.2 T Zellen.....	18
1.1.2.3 B Zellen.....	19
1.1.3 <i>Autoimmunität</i>	20
1.1.3.1 Auslösende Faktoren von Autoimmunerkrankungen.....	20
1.1.3.2 Schwierigkeit bei Behandlung von Autoimmunerkrankungen.....	21
1.2 Regulatorische T Zellen.....	22
1.2.1 <i>Entdeckung der Tregs</i>	22
1.2.2 <i>Natürliche und periphere Tregs</i>	22
1.2.3 <i>Bedeutung von IL-2 für Tregs</i>	24
1.2.4 <i>Mechanismen der immunregulierenden Funktion von Tregs</i>	25
1.2.5 <i>Tregs in Autoimmunerkrankungen</i>	26
1.2.6 <i>Therapiemöglichkeiten mit Tregs</i>	27
1.2.6.1 Therapie mit niedrig-dosiertem IL-2.....	27
1.2.6.2 Therapie mittels adoptiven Transfer von Tregs.....	28
1.2.6.3 Weitere Therapie-Möglichkeiten.....	28
1.3 Die Haut.....	30
1.3.1 <i>Aufbau der Haut</i>	30
1.3.2 <i>Die Haut als Immunorgan</i>	32
1.3.3 <i>Tregs in der Haut</i>	32
1.3.4 <i>Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)</i>	33
1.3.4.1 EBA als blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut.....	33
1.3.4.2 Formen der EBA.....	34
1.3.4.3 Pathogenese der EBA.....	34
1.3.4.4 Diagnose und Behandlung der EBA.....	35
1.3.4.5 Prognose der EBA.....	36

1.3.4.6	Mausmodelle der EBA.....	36
1.3.5	<i>Tregs in PD</i>	38
2	Zielsetzung der Arbeit	39
3	Material und Methoden	40
3.1	Mäuse	40
3.2	Materialien	41
3.2.1	<i>Laborgeräte</i>	41
3.2.2	<i>Laborwaren und Verbrauchsmaterialien</i>	42
3.2.3	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	43
3.2.4	<i>Kits</i>	45
3.2.5	<i>Antikörper</i>	46
3.2.6	<i>Puffer und Medien</i>	49
3.2.7	<i>Software</i>	50
3.3	Methoden.....	51
3.3.1	<i>in vivo Versuche</i>	51
3.3.1.1	Induktion des immunisierungs-induzierten EBA-Mausmodells	51
3.3.1.2	Induktion des Ak-EBA-Mausmodells	52
3.3.1.3	Narkosebehandlung der Mäuse	54
3.3.1.4	Belastungsbewertung der Mäuse in den verwendeten EBA-Mausmodellen	55
3.3.1.5	Präventive Behandlung mit einem IL-2-Antikörperkomplex oder niedrigdosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell.....	56
3.3.1.6	Präventiver adoptiver Transfer polyklonaler Tregs im Ak-EBA-Mausmodell	58
3.3.1.7	Tötung und Probenentnahme.....	59
3.3.2	<i>in vitro Versuche</i>	61
3.3.2.1	Blutbildanalyse am scil Vet abc Plus+	61
3.3.2.2	Herstellung von Einzell-Suspensionen	61
3.3.2.3	Zellisolationen von Neutrophilen, T-Effektorzellen und Tregs mittels MACS	63
3.3.2.4	Co-Kultivierung von Tregs mit T Effektorzellen bzw. Neutrophilen.....	66
3.3.2.5	Durchflusszytometrie	68
3.3.2.6	Plasma	72
3.3.2.7	Enzyme-linked immunosorbent Assay	73
3.3.2.8	LEGENDplex™ Bead-basierender Immuntest	73
3.3.3	<i>Histologische Färbungen</i>	74
3.3.3.1	Hämatoxylin und Eosin Färbung	74
3.3.3.2	Direkte Immunfluoreszenz-Mikroskopie von IgG und C3	75
3.3.3.3	Weitere Immunfluoreszenz und -histochemischer Färbungen von Immunzellen	76

3.3.4 Trizol-basierende RNA-Aufreinigung aus muriner Haut	80
3.3.5 Analyse Dateien sequenzierter Einzel- bzw. totaler mRNA	82
3.3.6 Statistik	82
4 Ergebnisse	83
4.1 Der Anteil an Tregs steigt in läSIONALER Haut im Ak-EBA-Mausmodell	83
4.1.1 Der Anteil an Tregs ist im Ak-EBA-Mausmodell unverändert in lymphatischen Organen, weist jedoch einen Anstieg in läSIONALER Haut auf	83
4.1.2 Der Anteil an Tregs ist signifikant höher in läSIONALER Haut als in nicht-läSIONALER Haut in Mäusen der Ak-EBA	84
4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell	86
4.2.1 Die präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 bewirkt keine klinische Verbesserung der EBA im Ak-EBA-Mausmodell	86
4.2.2 Eine präventive Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk bewirkt eine längere Zirkulation des injiziertem Kaninchen IgGs im Plasma des Ak-EBA-Modells	92
4.2.3 Die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma wird nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell signifikant erhöht	92
4.2.4 Der Anteil spezifischer Immunzellpopulationen steigt in der Milz nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell	94
4.2.5 Präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Anzahl der Zellen verschiedener Immunzellpopulationen in läSIONALER Haut im Ak-EBA-Mausmodell	96
4.3 Adoptiver Treg Transfer hat einen hemmenden Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell	106
4.3.1 Adoptiver Treg Transfer verringert signifikant der betroffenen Körperoberfläche im Ak-EBA-Mausmodell	106
4.3.2 Anzahl an Eosinophile und Blutplättchen werden nach adoptiven Treg Transfer signifikant im Vollblut reduziert	112
4.3.3 Der IgG Titer der injizierten Kaninchenantikörper wird durch einen adoptiven Treg Transfer nicht beeinflusst	114
4.3.4 Adoptiver Treg Transfer verringert die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma im Ak-EBA-Mausmodell	114
4.3.5 Adoptiv transferierte Tregs können in läSIONALER Haut im Ak-EBA-Mausmodell nachgewiesen werden	116
4.3.6 Die Anzahl an Neutrophilen und T Zellen verändert sich in läSIONALER Haut signifikant nach adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell	118
4.4 Tregs aus EBA-induzierten Mäusen weisen eine geringere Suppressionsfähigkeit <i>in vitro</i> auf	128
4.4.1 Tregs aus EBA-induzierten Mäusen weisen eine geringere Suppressionsfähigkeit auf die Proliferationsrate von T Effektorzellen <i>in vitro</i> auf	128
4.4.2 Tregs aus EBA-induzierten Mäusen weisen eine geringere Suppressionsfähigkeit auf die CD18 Expression in Neutrophilen auf	132

4.5 Die Genexpression von 429 Genen wir in läSIONaler Haut des Ak-EBA-Mausmodells nach einem adoptiven Treg Transfer signifikant verändert.....	135
5 Diskussion	138
5.1 Eine IL-2 Behandlung hat keinen therapeutischen Effekt im AK-EBA-Mausmodell.....	138
5.2 Präventiver adoptiver Transfer polyklonaler Tregs hemmt erfolgreich die Effektorphase im Ak-EBA-Mausmodell	144
5.3 Tregs erleiden einen Funktionsverlust im Ak-EBA-Mausmodell	150
5.4 Adoptiver Treg Transfer bewirkt Veränderungen in zellulären Signalwegen unter anderem betreffend der Zellproliferation und Wundheilung in läSIONaler Haut	156
6 Schlussfolgerung und Ausblick	159
Danksagung	161
Literaturverzeichnis.....	162
Anhang	180

Zusammenfassung

Pemphigoid-Erkrankungen (PD) stellen eine Gruppe schwerer, blasenbildender Autoimmundermatosen dar. Die meist älteren Patienten leiden an chronischen Entzündungen der Haut und/oder Schleimhäute. Eine Form der PD ist die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), die durch Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII (Col7) gekennzeichnet ist. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass Neutrophile zu den wichtigsten Effektorzellen der Gewebeerstörung gehören. Interessanterweise lenken unter anderem regulatorische T Zellen (Tregs) die Rekrutierung und Aktivierung dieser Zellen. Ungeachtet der Tatsache, dass gezeigt werden konnte, dass Treg-Populationen in PDs verändert sind, ist der Beitrag der Tregs während der PD-Effektorphase bisher nur unbefriedigend untersucht worden. Infolgedessen benötigt es noch weitere vertiefende Untersuchungen, um die Rolle der Tregs im Einzelnen besser zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die molekularen Mechanismen aufzuklären, mit denen Tregs der Effektorphase von PDs, am Beispiel der EBA, entgegenwirken. Mittels *in vitro* Versuchen wurde die Funktionsfähigkeit der Tregs aus gesunden, sowie EBA-induzierten Mäusen auf T Effektorzellen und Neutrophile untersucht. Zusätzlich wurden zwei Therapieoptionen *in vivo* im Ak-induzierten EBA-Mausmodell als mögliche Behandlungsoption getestet: eine Expansion der endogenen Tregs mittels niedrig-dosiertem IL-2 oder einem IL-2-Antikörperkomplexes bzw. ein präventiver adoptiver Transfer von polyklonalen Tregs.

Es zeigte sich, dass Tregs in der EBA einen Funktionsverlust hinsichtlich ihrer Suppressionsfähigkeit von Effektorzellen erleiden. So hemmten isolierte Tregs aus EBA-induzierten Mäusen *in vitro* die Proliferationsrate von T Effektorzellen und die CD18 Expression auf Neutrophile signifikant weniger als Tregs aus gesunden Mäusen. In Bezug auf die Therapieoptionen zeigte sich, dass die auf IL-2 basierende Behandlung keinen positiven Effekt auf den klinischen Phänotyp der EBA hatte, da im Rahmen dieser Arbeit kein optimales Behandlungsschema gefunden werden konnte. Der adoptive Treg Transfer hingegen bewirkte eine signifikante Verbesserung des klinischen Phänotyps. Weitere Versuche ergaben, dass die injizierten Tregs bevorzugt in die Haut einwanderten. Den größten Effekt der transferierten Tregs zeigte sich vor allem auf die Neutrophilen: behandelte Mäuse wiesen signifikant weniger Neutrophile in läsionaler Haut auf als die positive Kontrollgruppe, was im Einklang mit den *in vitro* Daten stand. Ebenso konnte mittels RNA-Sequenzierung ein signifikanter Rückgang der CXCL12 Expression in der Haut nachgewiesen werden, ein Chemokin, das mitverantwortlich für den Rückhalt der Neutrophilen im entzündeten Gewebe ist. Zusätzlich wurden ebenfalls MAPK-Signaltransduktionswege, welche die Chemotaxis der Neutrophile positiv regulieren, in der mit Treg behandelten Gruppe in läsionaler Haut herunterreguliert. Die Effektorphase der Ak-induzierten EBA wurde also durch die Störung der Migration der Neutrophilen in die Haut dank des adoptiven Treg Transfers erfolgreich inhibiert. Ob diese Therapieoption jedoch auch bei einer schon ausgeprägten EBA funktionieren würde, ist noch offen. Insgesamt stellt der adoptive Treg Transfer jedoch eine interessante und vielversprechende Option zur Behandlung der EBA und insgesamt der PDs dar.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ag-EBA	immunisierungs-induzierte <i>Epidermolysis bullosa acquisita</i>
AIBD	Blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut (<i>autoimmune skin blistering disease</i>)
AIRE	Autoimmune-Regulatorgen
Ak	Antikörper
Ak-EBA	Antikörpertransfer-induzierte <i>Epidermolysis bullosa acquisita</i>
ALZ	angeborene lymphoide Zelle
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APC	Antigen-präsentierenden Zelle (<i>Antigen presenting cell</i>)
APS	polyendokrine Autoimmun-Syndrom
BP	bullöse Pemphigoid
BPDAI	<i>Bullous Pemphigoid Disease Area Index</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BV	<i>Brilliant Violet</i>
C3	Komplementkomponente 3 (<i>Complement component 3</i>)
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCR10	C-C Chemokinrezeptor Typ 10
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD8+ TRMZ	CD8+ gewebebewohnende T Gedächtniszellen (<i>CD8+ tissue resident memory cells</i>)
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
cm	<i>Centimeter</i>
CMP	Knorpelmatrixprotein (<i>cartilage matrix protein</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col7	Kollagen Typ VII

CTLA-4	Zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen-4 (<i>cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4</i>)
CXCL	C-X-C Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
Cy7	Cyanin 7
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonuclein acid</i>)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DEG	Unterschiedlich exprimierte Gene (<i>Differential Expressed Genes</i>)
DEJ	Dermal-epidermalen Grenzfläche (<i>dermal epidermal junction</i>)
DETZ	Dendritische epidermale T Zelle
DIF	Direkte Immunofluoreszenz
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	<i>Dulbecco's Balanced Salt Solution</i>
Dsc	Desmocolin
Dsg	Desmoglein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBA	<i>Epidermolysis bullosa acquisita</i>
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylendiamintetraacetat</i>)
EGR2	<i>Early Growth Response Protein 2</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
Fc	Fragment-kristallisierbare Region (fragment crystalline)
FC	<i>log₂fold change</i>
FCS	Fötale Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)

FDR	Falscherkennungsrate (<i>false discovery rate</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3-Gen</i>
FSC-A	Vorwärtsstreuung-Fläche (<i>forward scatter-area</i>)
FSC-H	Vorwärtsstreuung-Höhe (<i>forward scatter-height</i>)
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GITR	glucocorticoid-induzierte TNF-Rezeptor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte monocyte/macrophage colony stimulating factor</i>)
GVHD	Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (<i>graft versus host disease</i>)
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HCT	Hämatokrit
HEPES	2-Ethansulfonsäure
HF	Haarfollikel
HGB	Hämoglobin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
i.p.	Intra-peritoneal
i.v.	Intra-venös
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPEX	Immunodysregulations-Polyendokrinopathie
IU	Internationale Einheit (<i>international unit</i>)
IVC	individuell belüfteten Käfigen (<i>individual ventilated cages</i>)

IVIG	intravenöses Immunglobulin
kDa	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
KZ	Keratinozyt
L	Liter
LAG-3	Lymphozyt-Aktivierungsgen-3 (<i>lymphocyte-activation gene-3</i>)
LAP	Leucin Aminopeptidase
LHZ	Langerhanszelle
LIED	Lübecker Institut der Experimentellen Dermatologie
Ly6C	Lymphozyt Antigen 6 Komplex Lokus C (<i>lymphocyte antigen complex 6 locus C</i>)
Ly6G	Lymphozyt Antigen 6 Komplex Lokus G (<i>lymphocyte antigen complex 6 locus G</i>)
M	Molar
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellseparation (<i>magnetic activated cell separation</i>)
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCH	Mittlere korpuskulare Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskulare Hämoglobin-Konzentration
mCol7	Murines Col7
MCV	Mittleres Zellvolumen der Erythrozyten (<i>mean cell volume</i>)
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure (<i>non-essential amino acid</i>)
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Schleimhautpemphigoid (<i>mucus membrane pemphigoid</i>)
MMR	Makrophagen-Mannose-rezeptor
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Multiple Sklerose
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (<i>mammalian target of rapamycin</i>)

MW	Mittelwert
MZ	Mastzelle
N	Teilchenzahl
n	Stichprobenanzahl
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nicht-kollagen (<i>non-collagenous</i>)
NK	Natürliche Killerzellen
NKT	Natürliche Killer-T Zelle
NR	Normales Kaninchen (<i>normal rabbit</i>)
Nrp-1	Neuropilin-1
nTregs	Natürliche Tregs
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert
Padj	Angepasster p-Wert (<i>adjusted p-value</i>)
PAMP	Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween20
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principle component analysis</i>)
PD	Pemphigoid-Erkrankungen
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumjodid
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>)

pTregs	Periphere Tregs
PV	Pemphigus Vulgaris
RA	Rheumatoide Arthritis
RBCL	<i>Erythrozyten-Lysis (red blood cell lysis)</i>
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite (<i>red cell width</i>)
rm-IL2	Rekombinantes murines IL-2
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
s.c.	Subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
SLE	Systemischer Lupus Erythematodus
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SSC	Seitwärtsstreuung (<i>side scatter</i>)
Str. b.	<i>Stratum basale</i>
Str. c.	<i>Stratum corneum</i>
Str. g.	<i>Stratum granulosum</i>
T1D	Typ-I-Diabetes
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TCR	T Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
Th Zelle	T Helferzellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	Regulatorische T Zelle
TSDR	Treg-spezifischen demethylierte Region
TZ	T Zelle

UV	Ultraviolett
vWFA2	von Willebrand-Faktor A2-ähnliche Domäne
WebGestalt	<i>WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit</i>
XLAAD	<i>X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Mechanismen der immunregulierenden Funktion von Tregs.	27
Abb. 2	Struktur und zelluläre Komponenten der murinen und humanen Haut.	32
Abb. 3	Schematische Darstellung der Autoantigene bei Pemphigus- und Pemphigoid-Erkrankungen.	34
Abb. 4	Schematische Darstellung des Typ-VII-Kollagens.	52
Abb. 5	Schematische Darstellung der mCOL7C ^{C-GST} bzw. normales Kaninchen IgG Injektion in den einzelnen Versuchsteilen im Ak-EBA-Mausmodell.	55
Abb. 6	Prozentualer Anteil der einzelnen Körperregionen einer Maus an ihrer Gesamtoberfläche.	57
Abb. 7	Schematischer Zeitplan für die präventive Behandlung mit einem IL-2/ anti-IL-2 Antikörperkomplex oder niedrigdosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell.	58
Abb. 8	Schematischer Zeitplan für die präventive Behandlung mittels adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell.	60
Abb. 9	Anteil der Tregs an CD4+ Zellen in verschiedenen Organen im Ak-EBA-Mausmodell im Vergleich zur Kontrollgruppe über die Zeit.	85
Abb. 10	Anteil an Tregs in läsionaler Haut im Vergleich zur nicht-läsionaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell.	86
Abb. 11	Die präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 bewirkt keine Verminderung der betroffenen Körperoberfläche im Ak-EBA-Mausmodell.	88
Abb. 12	Entzündung und Dicke der Epidermis im Ak-EBA-Mausmodell werden nach präventiver Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 nicht beeinflusst.	90
Abb. 13	C3 Ablagerung entlang der Basalmembran wird nicht signifikant durch eine präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell beeinflusst	91
Abb. 14	DIF von IgG zeigt keinen signifikanten Einfluss der präventiven Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 bezüglich der IgG Ablagerung entlang der Basalmembran im Ak-EBA-Mausmodell.	92
Abb. 15	Eine präventive Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk bewirkt eine längere Zirkulation des injiziertem Kaninchen IgGs im Plasma des Ak-EBA-Modells.	93
Abb. 16	Der Anteil spezifischer Immunzellpopulationen steigt in der Milz nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell.	96

Abb. 17	Präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 bewirkt keinen Unterschied bezüglich der Ki-67 Expression in läSIONaler Haut.	98
Abb. 18	Die Makrophagen-Population in läSIONaler Haut bleibt vergleichbar zur Positivkontrolle nach präventiver Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell.	100
Abb. 19	Präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 hat keine Auswirkungen auf die Neutrophilen-Population in läSIONaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell.	101
Abb. 20	In der Epidermis läSIONaler Haut befinden sich signifikant weniger CD3+ T Zellen nach präventiver Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 als in einer Positivkontrolle	103
Abb. 21	Präventive Behandlung mit einer hohen Konzentration an IL-2/anti-IL-2 mAk bzw. niedrig-dosiertem IL-2 führt zu signifikant mehr Tregs in läSIONaler Haut als mit einer geringen Konzentration an IL-2/anti-IL-2 mAk.	105
Abb. 22	Adoptiver Treg Transfer verringert signifikant die betroffenen Körperoberfläche im Ak-EBA-Mausmodell.	108
Abb. 23	Entzündung und Dicke der Epidermis im Ak-EBA-Mausmodell werden nach adoptiven Treg Transfer nicht beeinflusst.	110
Abb. 24	C3 Ablagerung entlang der Basalmembran wird nicht signifikant durch adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell beeinflusst.	111
Abb. 25	DIF von IgG zeigt keinen signifikanten Einfluss des adoptiven Treg Transfers bezüglich der IgG Ablagerung entlang der Basalmembran im Ak-EBA-Mausmodell.	112
Abb. 26	Der IgG Titer der injizierten Kaninchenantikörper wird durch einen adoptiven Treg Transfer nicht beeinflusst.	115
Abb. 27	Adoptiv transferierte Tregs können in läSIONaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell nachgewiesen werden.	118
Abb. 28	Adoptiver Treg Transfer bewirkt keinen Unterschied bezüglich der Ki-67 Expression in läSIONaler Haut.	120
Abb. 29	Die Makrophagen-Population in läSIONaler Haut bleibt vergleichbar zur Positivkontrolle nach adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell.	122
Abb. 30	Die Neutrophilen-Population ist signifikant in läSIONaler Haut nach adoptiven Treg Transfer im Vergleich zur Positivkontrolle reduziert.	124
Abb. 31	T Zellen sind nach adoptiven Treg Transfer signifikant in läSIONaler Haut im Vergleich zur Positivkontrolle erhöht.	125
Abb. 32	Adoptiver Treg Transfer bewirkt eine signifikante Erhöhung der Treg-Population in läSIONaler Haut.	127

Abb. 33	Isolierte Tregs aus Tieren der Ak-EBA hemmen die Proliferationsrate von T Effektorzellen signifikant weniger als Tregs unbehandelter Mäuse.	129
Abb. 34	Isolierte Tregs aus nicht erkrankten Mäusen aus dem Ag-EBA-Mausmodell hemmen die Proliferationsrate von T Effektorzellen stärker als aus erkrankten Ag-EBA Mäusen.	131
Abb. 35	Isolierte Tregs aus Tieren der Ak-EBA hemmen die CD18 Expression in Neutrophilen signifikant weniger als Tregs unbehandelter Mäuse.	133
Abb. 36	Isolierte Tregs aus Tieren der Ag-EBA hemmen die CD18 Expression in Neutrophilen signifikant weniger als Tregs unbehandelter Mäuse.	134
Abb. 37	Die Genexpression ist in 429 Genen nach adoptiven Treg Transfer in lässionaler Haut verändert.	136
Abb. 38	MAPK-Familie Signaltransduktions-Kaskade sind nach adoptiven Treg Transfer in lässionaler Haut herunterreguliert.	137

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Liste der verwendeten Geräte.	42
Tab. 2	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	43
Tab. 3	Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.	44
Tab. 4	Liste der verwendeten Kits.	46
Tab. 5.1	Liste der in vivo verwendeten Antikörper.	47
Tab. 5.2	Liste der verwendeten Antikörper für Durchflusszytometrie.	48
Tab. 5.3	Liste der verwendeten Antikörper für immunhistochemische bzw. -fluoreszenz Färbungen.	49
Tab. 6	Liste der selbst angesetzten Puffer und Medien.	50
Tab. 7	Liste der verwendeten Software.	51
Tab. 8	Zusammensetzung der extra-zelluläre Antikörpermixe der Durchflusszytometrie-Panels.	70
Tab. 9	Zusammensetzung der Antikörpermixe der Durchflusszytometrie-Panels zur intra-zellulären bzw. intra-nukleären Färbung.	71
Tab. 10	Die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma wird nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell signifikant erhöht.	94
Tab. 11	Anzahl der Eosinophile und Blutplättchen sind in mit adoptiven Treg Transfer therapierten Mäusen im Vollblut signifikant im Vergleich zur Positivkontrolle reduziert.	114
Tab. 12	Adoptiver Treg Transfer verringert die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma im Ak-EBA-Mausmodell.	116
Tab. 13	Die Konzentration an IL-10 in CD4+ T Zellen ist nach adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell im Vergleich zur Positivkontrolle erhöht.	119

1 Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Geweben und Molekülen und ist für den Schutz des eigenen Körpers vor pathogenen Erregern, fremden Stoffen oder entarteten Zellen verantwortlich. Außerdem beseitigt das Immunsystem tote Zellen, ist mit am Wiederaufbau nach einer überstandenen Infektion verantwortlich und beteiligt sich an der Wundheilung. Vereinfacht wird das Immunsystem dabei in das angeborene und in das adaptive Immunsystem eingeteilt. Beide Bereiche sind eng miteinander verknüpft und Defekte in einer der beiden Systeme können Krankheiten, wie chronische Entzündungen, Immundefekte, Überempfindlichkeitsreaktionen oder Autoimmunerkrankungen auslösen [1].

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger dar und ist essenziell zur schnellen Verhinderung und Bekämpfung von Infektionen und der Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase [2]. Zusätzlich ist es mit an der Aktivierung und Regulation des adaptiven Immunsystems beteiligt [3], kann aber kein immunologisches Gedächtnis ausbilden [4].

Der allgemeine Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität beruht auf der Erkennung von hochkonservierten molekularen Strukturen von Mikroorganismen, den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) mit Hilfe von genetisch fest codierten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) auf den Zellen des angeborenen Immunsystems [1]. Es umfasst unter anderem anatomische Barrieren, wie Haut und Schleimhäute, sowie humorale Bestandteile, wie Zytokine und das Komplementsystem, als auch zelluläre Effektormechanismen [1,5]. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören zum einen die natürliche Killerzellen (NKs), Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs), Mastzellen, Basophile und Eosinophile [1]. Diese Zellen zerstören Krankheitserreger, sezernieren Zytokine und setzen lösliche Mediatoren wie Histamin und reaktive Sauerstoffspezies frei. Zusätzlich sind vorwiegend DCs und Makrophagen in der Lage verdaute Antigene an B oder T Zellen zu präsentieren und tragen somit zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort bei [1,6,7].

Obwohl sich das angeborene Immunsystem so entwickelt hat, dass es eine Vielzahl von Krankheitserregern schnell erkennen und eliminieren kann, ist die Bandbreite der gängigen PAMPs, die es erkennen kann, begrenzt. Die hohe Variabilität der Antigenstrukturen sowie die Fähigkeit der Erreger, zu mutieren, um die Erkennung durch den Wirt zu vermeiden, haben daher die Entwicklung des adaptiven Immunsystems evolutionär vorangetrieben [2].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die Hauptfunktionen des adaptiven Immunsystems sind die Erkennung spezifischer "körperfremder" Antigene und Unterscheidung von "körpereigenen" Antigenen, sowie die Selektion von pathogenspezifischen immunologischen Effektorzellen, die spezifische Krankheitserreger oder pathogeninfizierte Zellen eliminieren. Dabei wird die hohe Variabilität und Spezifität der adaptiven Immunantwort durch den Prozess der sogenannten somatischen Rekombination der Gensegmente der Rezeptoren erreicht [8]. Des Weiteren entwickelt das adaptive Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis, das bewirkt, dass spezifische Erreger bei einer wiederkehrenden Infektion schnell erkannt und eliminiert werden können [2].

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören die im Thymus heranreifenden T Lymphozyten (T Zellen), und die Antikörper produzierenden B Lymphozyten (B Zellen), welche sich im Knochenmark entwickeln. Lymphozyten weisen nach ihrer Reifung eine hohe Mobilität auf. Nachdem sie sich in ihren primären lymphatischen Organen entwickelt haben, wandern sie in die sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten und Milz, ein. Dort treffen sie entweder direkt auf zirkulierende Krankheitserreger oder auf durch Krankheitserreger aktivierte Antigen-präsentierende Zellen (*Antigen presenting cells*; APCs), die aus der Haut oder Schleimhaut zu den sekundären Lymphorganen gewandert sind. Anschließend sind Lymphozyten in der Lage in zahlreiche Stellen des Körpers zu migrieren, um ihre betreffende Effektorfunktion auszuüben [8].

1.1.2.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Alle körpereigenen Zellen exprimieren eine Gruppe von Proteinen, die als Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major histocompatibility complex*; MHC) bezeichnet werden. MHCs werden dabei in zwei Klassen eingeteilt: MHC der Klasse I befinden sich auf allen kernhaltigen körpereigenen Zellen, während MHC der Klasse II nur von APCs exprimiert sind. MHC-I präsentieren dabei endogene Peptide und MHC-II extrazelluläre Peptide auf der Zelloberfläche [2].

1.1.2.2 T Zellen

Es gibt verschiedene Populationen an T Zellen: zytotoxische T Zellen (CD8+ Zellen), T-Helfer (Th) Zellen (CD4+ Th Zellen), natürliche Killer-T Zellen (NKTs) und $\gamma\delta$ -T Zellen. Alle T Zellen exprimieren dabei eine Reihe einzigartiger antigenbindender Rezeptoren auf ihrer Membran, die als T Zellrezeptor (*T cell receptor*; TCR) bezeichnet werden [1].

CD8+ T Zellen sind in erster Linie an der Zerstörung von infizierten Zellen und an der Abtötung von Tumorzellen beteiligt. Sie werden durch die Interaktion ihres TCR mit einem an MHC-I gebundenen Peptid aktiviert. Nach Beendigung der Infektion sterben die meisten Effektorzellen ab und werden von Phagozyten beseitigt. Einige wenige dieser Zellen bleiben jedoch als Gedächtniszellen erhalten, die sich bei späteren Begegnungen mit demselben Antigen schnell in Effektorzellen differenzieren können [2,8].

CD4+ Th Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation der Immunantwort. Diese Zellen haben keine zytotoxische oder phagozytische Aktivität und können weder infizierte Zellen direkt abtöten

noch Krankheitserreger beseitigen. Sie regulieren jedoch die Immunreaktion, indem sie andere Zellen anweisen, diese Aufgaben zu übernehmen und dadurch die Art der sich entwickelnden Immunreaktion bestimmen. Th Zellen werden durch die Ausbildung einer immunologischen Synapse, bestehend aus einem MHC-II-Antigen-Komplex und zusätzlichen Signalen über CD3, CD28, CD80/86, CD4 und Integrine zwischen APC und Th Zelle, aktiviert. Dies führt zur Produktion von Interleukin-2 (IL-2) durch die T Zelle, und letztendlich zu einer klonalen Expansion und Differenzierung in verschiedene Th Subklassen, wobei Th1, Th2 und Th17 prozentual am häufigsten vorkommen [1,9]. Th1 Zellen produzieren dabei vor allem IL-2 und Interferon- γ (IFN- γ), die die zelluläre Immunität unterstützen, während Th2 Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren, die die humorale Immunität regulieren [10]. Th17 Zellen spielen hingegen vor allem eine Rolle in chronischen Infektionen und Erkrankungen [1]. In den letzten Jahren wurden noch weitere Th Subklassen, die die Immunantwort modulieren können, entdeckt, wie zum Beispiel regulatorische T Zellen (Tregs; siehe auch Kapitel 1.2), Th22 Zellen und folliculäre Th Zellen [11,12].

Die beiden letzten Subklassen der T Zellen, NKTs und $\gamma\delta$ -T Zellen, sind in der Lage, Lipide oder Glykolipid-Antigene erkennen, die z. B. über das MHC-ähnliche Molekül CD1 präsentiert werden [9]. Beide T Zellen-Untergruppen sind Teil der adaptiven Immunantwort, zeigen jedoch ebenso Merkmale einer angeborenen Immunreaktion. So benötigen zum Beispiel diese beide T Zell-Subklassen im Gegensatz zu den anderen T Subklassen keine APC für ihre Aktivierung [2].

1.1.2.3 B Zellen

Die Hauptfunktion der B Zellen ist die Produktion von Antikörpern gegen fremde Antigene [2]. Zusätzlich können unter bestimmten Umständen B Zellen auch als APCs fungieren [1]. Im Gegensatz zu T Zellen sind B Zellen durch ihre spezifischen auf der Zelloberfläche exprimierten Antikörper, den Immunglobulinen (Ig), ohne Beteiligung von APCs direkt in der Lage Antigene zu erkennen. Diese Igs werden ebenfalls mittels somatischer Rekombination analog zu den TCRs gebildet, was zu einer vergleichsweise hohen Rezeptorvielfalt führt [8].

Plasmazellen sind in der Lage ihre Igs als Antikörper abzugeben. Die sezernierten Antikörper binden an Antigene auf der Oberfläche von Krankheitserregern und markieren sie für die Zerstörung über das Komplementsystem oder fördern über Bindung die Phagozytose und Eliminierung des Pathogens durch Immuneffektorzellen [8]. Je nach Ig-Klasse können unterschiedliche biologische Funktionen ausgeübt und spezifische Pathogene erkannt und neutralisiert werden [2].

Die Immunreaktion auf den ersten Kontakt mit einem Antigen wird als Primärreaktion bezeichnet. Sie verläuft über einige Wochen, bis sie sich vollständig entwickelt, und führt zur Produktion von überwiegend IgM-Antikörpern mit relativ geringer Affinität. Andere Isotypen wie IgG, IgA oder IgE treten erst zwei Wochen oder später auf und weisen eine höhere Affinität auf. Während der Primärreaktion werden T und B Gedächtniszellen gebildet. Bei einer späteren Exposition gegenüber denselben Antigenen bzw. Pathogenen werden diese Zellen im Vergleich zur Primärreaktion schneller

aktiviert, so dass die Produktion von IgG oder anderen Igs mit hoher Affinität schnell erfolgt. Dies wird als sekundäre Reaktion bezeichnet [8].

1.1.3 Autoimmunität

Die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ vom Immunsystem funktioniert nicht immer einwandfrei und unter bestimmten Umständen kann sich das Immunsystem gegen den eigenen Körper wenden. Dies wird dann als Autoimmunreaktion bezeichnet. Dabei kann die Auto-Reaktivität von einem niedrigen "physiologischen" Niveau der Selbst-Reaktivität, das für die Lymphozyten-Selektion und die Homöostase des Immunsystems unerlässlich ist, über ein mittleres Niveau der Autoimmunität, das sich als zirkulierende Autoantikörper und geringfügige Gewebsinfiltrate ohne klinische Folgen manifestiert, bis hin zu einer pathogenen Autoimmunität, die mit immunvermittelten Organschäden einhergeht, reichen [13,14].

Autoimmunerkrankungen haben heutzutage eine hohe Prävalenz von 7-9 % in der Bevölkerung und betreffen bevorzugt Frauen. Sie verursachen eine erhebliche Morbidität und Mortalität der Betroffenen. Je nach Umfang der betroffenen Gewebe werden diese Krankheiten in organspezifische, wie zum Beispiel Typ-I-Diabetes (T1D) oder Multiple Sklerose (MS), und systemische, wie systemischer Lupus erythematoses (SLE) oder rheumatoide Arthritis (RA), unterteilt. Der Start und Verlauf werden allgemein durch Autoantikörper oder zytotoxische T Zellen angetrieben, wobei in allen Fällen Th Zellen mitbeteiligt sind [13].

1.1.3.1 Auslösende Faktoren von Autoimmunerkrankungen

Es wird angenommen, dass Autoimmunerkrankungen durch eine Kombination von genetischen und umweltbedingten Faktoren, sowie einer Fehlregulation der Lymphozyten entstehen. Eine vereinfachte Hypothese besagt, dass Polymorphismen in verschiedenen Genen zu einer fehlerhaften Regulierung oder zu einer niedrigeren Schwellengrad für die Lymphozyten-Aktivierung führen. Zusätzlich sollen Umweltfaktoren die Aktivierung selbstreaktiver Lymphozyten, welche sich der Kontrolle entzogen haben und spezifisch gegen eigene Körperstrukturen sind, auslösen oder verstärken [15].

Man nimmt an, dass die Veranlagung zur Entwicklung der meisten menschlichen Autoimmunkrankheiten auf Polymorphismen mehrerer Gene zurückzuführen ist. Jedoch gibt es auch seltene Beispiele, in denen genetische Veränderungen in einem einzigen Gen zu einer schweren Autoimmunität führen. Die beiden vielleicht besten Beispiele für monogenetische Autoimmunkrankheiten sind das polyendokrine Autoimmun-Syndrom (APS) und das X-chromosomal vererbte Syndrom der Immunodysregulations-Polyendokrinopathie (IPEX). Diese Krankheiten sind direkt auf Mutationen im Autoimmune-Regulatorgen (AIRE) bzw. *Forkhead-Box-Protein P3*-Gen (FOXP3) zurückzuführen, die zu einer katastrophalen Störung der zentralen (bei APS) und peripheren (bei IPEX) Toleranz führen [16,17]. Zu möglichen verantwortlichen Umweltfaktoren gehören zum Beispiel Infektionen, Ernährung und Medikamente [14]. Es wird schon länger angenommen, dass Autoimmunreaktionen durch Epitop-Ausbreitung, Antigen-Ähnlichkeit und übermäßige Aktivierung

von PRRs und PAMPs ausgelöst werden können [18]. So wurde beispielsweise der Nachweis einer Epstein-Barr-Virus-(EBV) -Infektion mit MS, nicht aber mit anderen entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht [19]. Im Gegensatz dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass manche Infektionen anscheinend ebenso vor einigen Autoimmunerkrankungen schützen können [20]. Zusätzlich konnte eine höhere Inzidenz von MS und T1D mit einer geringeren Zahl von Infektionen in den Industrieländern korreliert werden [21]. Weitere Auslöser können fehlgeleitete anti-bakterielle Immunreaktionen gegen das eigene Mikrobiom, wie bei entzündlichen Darmerkrankungen [15], oder auch durch UV-Strahlung induzierte Apoptose einer großen Anzahl an Zellen, wie beim kutanen Lupus, sein [22]. Hinsichtlich der Ernährung als auslösender Faktor für Autoimmunerkrankungen ist auffällig, dass Fettleibigkeit und das Vorkommen von Autoimmunerkrankungen in westlichen Ländern parallel ansteigen [14]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Fettleibigkeit mit dem Vorhandensein von Autoantikörpern in der Allgemeinbevölkerung assoziiert ist [23]. Für Medikamente als auslösender Faktor wird angenommen, dass bestimmte Wirkstoffe entweder direkt über ein spezifisches molekulares Ereignis und/oder indirekt durch Änderung des Mikrobioms die Bildung von Autoantikörpern mit beeinflussen können [14]. Zusätzlich konnte auch ein Zusammenhang an physischer Aktivität, Stress, Schlaf und dem Vorhandensein an Schichtarbeit als mögliche verantwortlichen Umweltfaktoren zur Bildung von Autoimmunerkrankungen beobachtet werden [14]. Die Fehlregulation der Lymphozyten entstehen wahrscheinlich durch Defekte bei der Rezeptorbildung der unreifen Zellen im Knochenmark bzw. Thymus und einer mangelnden oder auch fehlenden Kontrolle im peripheren Gewebe [24]. So besteht zum Beispiel ein Ungleichgewicht zwischen T Effektorzellen und funktionellen Tregs in T Zell-abhängigen entzündlichen Autoimmunerkrankungen, eine Abnahme der Treg-Anzahl oder die Entstehung einer Resistenz der T Effektorzellen gegenüber der Kontrolle durch Tregs [25] (siehe auch Kapitel 1.2).

1.1.3.2 Schwierigkeit bei Behandlung von Autoimmunerkrankungen

Eine Autoimmunreaktion ist ein Kreislauf, in dem verschiedene Immunzellen miteinander interagieren, Zytokine und andere Mediatoren freisetzen, die wiederum weitere Immunzellen aktivieren. Somit wird die Entzündung weiter vorangetrieben, was zu weiteren Gewebsschäden führt. Ein großes Problem dabei ist, dass die körpereigenen Antigene, gegen die die Ausgangsreaktion gerichtet ist, nicht entfernt werden können [15]. Dadurch ist die Behandlung Betroffener immer noch schwierig. Therapien für Autoimmunerkrankungen zielen bisher meistens darauf ab, die proinflammatorische Immunreaktion zu hemmen, indem sie spezifische adaptive Immunzellpopulationen dezimieren oder die Aktivierung von Immunzellen in Zielorganen zu supprimieren [26]. Diese Strategien sind zwar hilfreich, um die proinflammatorische Immunreaktion gegen körpereigene Proteine und Gewebe zu begrenzen, blockieren aber auch schützende Immunreaktionen gegen fremde Antigene und können dazu führen, dass das Immunsystem der Patienten geschwächt wird und sie anfällig für verschiedene Infektionen werden [27]. Neuere Therapien zielen daher zum Beispiel darauf ab, die suppressiven Fähigkeiten von Tregs zu nutzen, um Autoimmunzellen auf spezifische Weise zu unterdrücken [28] (siehe auch Kapitel 1.2.6).

1.2 Regulatorische T Zellen

Tregs sind eine Untergruppe der CD4+ T Zellen, deren Aufgabe es ist, Immunreaktionen zu unterdrücken und zu regulieren. Sie stellen sicher, dass die Reaktion des Immunsystems auf Fremdantigene und Selbstantigene in einem angemessenen Gleichgewicht bleiben. Dieses homöostatische Gleichgewicht stellt sicher, dass das Immunsystem ausreichend auf fremde Antigene, sowie auf Neoantigene von Tumorzellen reagiert. Gleichzeitig müssen Tregs ausreichend hemmend sein, damit Entzündungen nicht außer Kontrolle geraten und zu Gewebeschäden oder sogar zum Tod führen. Somit spielen Tregs eine wichtige Rolle in der Tumormunität, antimikrobiellen Resistenz, Allergie, Transplantation, sowie der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und somit dem Verhindern von Autoimmunerkrankungen [29–32].

1.2.1 Entdeckung der Tregs

In den frühen 1970er Jahren wurde das erste Mal von T Zellen berichtet, die in der Lage waren Immunantworten zu unterdrücken. Da aber zu dem Zeitpunkt keine spezifischen Marker für diese T Zellpopulation beschrieben werden konnten, stockte die Forschung zunächst [33]. Erst in den 1990er Jahren kam wieder Fahrt auf, als Sakaguchi et al. [31] eine CD4+ T Zellpopulation beschrieben, die die Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R) Alpha-Kette (CD25) exprimiert und immunsuppressive Eigenschaften aufwies. Dabei wurde festgestellt, dass CD25+ T Zellen anergisch sind und Autoimmunkrankheiten in thymektomisierten Mäusen unterdrücken können. Im Jahr 2000 bestimmte Chatila et al. Mutationen im *FOXP3* Gen als Ursache für eine autoimmune lymphoproliferative Störung beim Menschen, die als *X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome* (XLAAD) bezeichnet und später als IPEX kodiert wurde, bestimmten [17,34]. Die Identifizierung von FoxP3 als Hauptregulator der Treg-Entwicklung und -Funktion wurde kurz darauf durch den Nachweis unterstützt, dass die lymphoproliferative Erkrankung bei FoxP3-defizienten *Scurfy*-Mäusen auf einem Mangel an funktionellen Tregs beruht [35]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Induktion einer FoxP3-Expression in konventionellen CD25+ T Zellen ein regulatorischer Phänotyp hergestellt werden konnte und ein adoptiver Transfer von FoxP3+ Tregs in *Scurfy*-Mäuse die Entwicklung der Autoimmunität verhinderte. Dies zeigte, dass eine stabile Expression von Foxp3 wichtig für die Identität der Treg-Zell-Linie ist und als dominanter Regulator bei der Entwicklung und Funktion von Tregs wirkt [36–38].

1.2.2 Natürliche und periphere Tregs

Tregs werden je nach ihrem Ursprung, ihrer Entstehung und ihren Wirkmechanismen in zwei generelle Untergruppen unterteilt: die natürlichen und die peripheren Tregs. Beide Untergruppen weisen dabei komplementäre und sich überschneidende Funktionen bei der Kontrolle von Immunreaktionen auf. Natürliche Tregs (nTregs) entwickeln sich im Thymus und keimen in peripheren Geweben, wo sie die Aktivierung von Effektorzellen unterdrücken können [39]. Periphere Tregs (pTregs) umfassen wiederum verschiedene Subtypen von Zellen, darunter IL-10-produzierende Tr1 Zellen [40],

Transforming Growth Factor- β (transformierender Wachstumsfaktor β ; TGF- β) -produzierende Th3 Zellen [41] und FoxP3⁺ induzierbare T Zellen [42]. pTregs, die sich von CD4⁺ T Zellen in der Peripherie ableiten, haben oft einen ähnlichen Phänotyp und eine ähnliche Funktion wie nTregs, nutzen aber möglicherweise andere Mechanismen der Immunregulation [43,44].

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs sind die am besten untersuchte Untergruppe der CD4⁺ T-Suppressorzellen. Sie machen bei Mäusen 5-10 % der peripheren CD4⁺ T Zellpopulation aus und sind durch die konstitutive Expression von CD25 und eine geringe Expression von CD45RB gekennzeichnet [45,46]. Beim Menschen machen sie 1 % bis 2 % der gesamten CD4⁺ T Zellen aus und sind charakterisiert durch eine besonders hohe CD25-Expression [36]. CD25 ist jedoch kein spezifischer Marker für Tregs, da CD25 auch auf aktivierten T Zellen vorhanden ist und somit auch von Th1- und Th2-Effektorzellen exprimiert wird.

Ebenso gibt es mehrere Anzeichen dafür, dass eine alleinige Expression von FoxP3 an sich nicht unbedingt ausreicht, um die suppressive Funktion von Tregs stabil aufrechtzuerhalten oder funktionale Tregs zuverlässig von anderen CD4⁺ T Zellpopulationen abzugrenzen. Zum Beispiel exprimieren aktivierte menschliche T Effektorzellen vorübergehend FoxP3 auf niedrigem Niveau, ohne eine Treg-Zell-Suppressionsaktivität zu entwickeln [47]. Ebenso können CD4⁺ T Zellen im menschlichen peripheren Blut eine FoxP3⁺ T Zell-Subpopulation aufweisen, die jedoch keine Treg-suppressive Aktivität besitzt und bei Aktivierung sogar proinflammatorische Zytokine produziert [48]. Somit sind nicht alle FoxP3⁺ T Zellen funktionelle Tregs, und Treg-Signaturmoleküle können zumindest bis zu einem gewissen Grad auch ohne FoxP3 exprimiert werden [49]. Jedoch haben genomweite Analysen mehrere DNA-Regionen aufgedeckt, die unterschiedliche Muster der Methylierung oder Histonmodifikation zwischen T Effektorzellen und Tregs bei Menschen und Mäusen aufweisen [50–53]. So besitzen Tregs hochspezifische und stabile epigenetische Veränderungen, die sich in einer DNA-Hypomethylierung an bestimmten Loci einer begrenzten Anzahl von Genen äußern. Zu diesen Genen mit Treg-spezifischer DNA-Hypomethylierung gehören solche, die für Treg-funktionsassoziierte oder Treg-spezifische Moleküle kodieren, wie FoxP3, zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*; CTLA-4) und Eos [51]. Die phänotypische Stabilität von Tregs wird dabei am besten durch die Demethylierung der Treg-spezifischen demethylierten Region (TSDR) angezeigt, einem nicht codierenden, evolutionär konservierten Element innerhalb des Genlocus von FoxP3. Dies macht die Treg-spezifische DNA-Hypomethylierung zu einem zuverlässigen Marker zur Bewertung des epigenetischen Status von Tregs [49].

Da FoxP3, wie auch CD25, möglicherweise keine adäquaten Marker für Tregs, insbesondere bei Menschen, zu sein scheinen, wurde nach zusätzlichen Markern gesucht, um einen möglicherweise einzigartigen Phänotyp von Tregs zu identifizieren. Trotz der Entdeckung zahlreicher zusätzlicher Marker, darunter CTLA-4, der glucocorticoid-induzierte TNF-Rezeptor (GITR), CD62L^{high}, Neuropilin-1 (Nrp-1), CD103 (Integrin α E β 7), CD5, CD27, CD38, CD39, CD73, CD122, OX-40 (CD134), TNFR2, Lymphozytenaktivierungsgen 3 (LAG-3), CD45RB^{low}, CCR4, CCR7 und CCR8 [54], wurde kein exklusiver für Tregs gefunden. Derzeit werden zur Unterscheidung von Tregs von konventionellen aktivierten CD4⁺ T Zellen eine niedrige Expression von CD127 (der α -Kette des IL-7-Rezeptors) und eine modulierte

CD45RB-Expression [48] zusammen mit der Expression von FoxP3 und CD25 als Co-Marker im Menschen verwendet [55].

In Hinblick auf ihr Repertoire haben nTregs ein breites Spektrum zur Erkennung von körpereigenen und fremden Antigenen [56]. Sie werden im Thymus durch hoch-afide MHC-Klasse-II-abhängige Interaktionen mit dem TCR gebildet [57,58]. Diese Interaktion ist mit der Induktion von FoxP3 während der Thymusdifferenzierung von Tregs verbunden [59], während die TCR-induzierte Expression von FoxP3 in der Peripherie von der intrazellulären Signalübertragung, der Zellproliferation und der Synergie mit TGF- β und IL-2 beeinflusst wird [60]. Neben dem TCR scheint auch die CD28-Kostimulation eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Tregs zu spielen. So zeigen CD28- und CD80/CD86-defiziente Mäuse eine deutliche Abnahme der Häufigkeit von Tregs [61,62]. Diese Signale reichen jedoch möglicherweise nicht für die Hochregulierung von FoxP3 aus, und es sind möglicherweise noch andere Signale erforderlich, wie zum Beispiel IL-2 und in geringerem Maße zwei andere Zytokine: IL-7 und IL-15 [42].

Mehrere Treg-Subpopulationen wurden ebenfalls in nicht-lymphoiden Geweben entdeckt. Diese Tregs spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von Entzündungsreaktionen, sondern fügen sich auch in ein größeres biologisches Paradigma ein, das die Homöostase von Organen und Organismen mit reguliert [63]. So konnten Tregs im viszeralen Fettgewebe [64], im Muskel [65] und in der Haut (siehe Kapitel 1.3.3) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression und Transkription in diesen Zellen sich von denen in herkömmlichen Tregs unterscheiden [65]. Das Vorhandensein gewebeansässiger Tregs ermöglicht dem Immunsystem eine schnellere Reaktion auf Störungen der lokalen Homöostase, wie es bei Infektionen und Fremdkörpern der Fall ist [66].

1.2.3 Bedeutung von IL-2 für Tregs

IL-2 ist für die Funktion, Entwicklung und das Überleben der Tregs unerlässlich und unersetzlich: es erhält die Population aufrecht, ist notwendig zur Expansion und erleichtert die TGF- β -abhängige Differenzierung naiver T Zellen zu Foxp3⁺ Tregs [67]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Mäuse, denen IL-2 fehlt, spontan eine T Zell-vermittelte tödliche lymphoproliferative-entzündliche Erkrankung mit Autoimmunkomponenten und Hyperreaktivität gegenüber kommensalen Mikroben entwickeln [68]. Außerdem ist beim Menschen ein CD25-Mangel, der mit schwerer Autoimmunität und Allergie einhergeht, nicht von IPEX zu unterscheiden [69]. Dabei wurde gezeigt, dass das Syndrom auf einen Mangel oder einer Funktionsstörung der Tregs zurückzuführen ist [70].

Daneben wirkt IL-2 auch auf weitere Immunzellen, darunter anderen CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen, B Zellen und NKs. Dabei bewirkt es vielfältige zum Teil scheinbar widersprüchliche Reaktionen: es fördert die Differenzierung von CD4⁺ T Zellen zu Th1 und Th2 Zellen und das Wachstum von CD8⁺ T Gedächtniszellen und natürlichen Killerzellen. Andererseits fördert IL-2 die Apoptose in antigen-aktivierten T Zellen und hemmt die TGF- β /IL-6-abhängige Differenzierung naiver T Zellen zu entzündlichen Th17 Zellen [67].

Wenn man also davon ausgeht, dass die Hauptquelle von IL-2 aktivierte T Zellen sind, gibt es eine negative Rückkopplungskontrolle von Immunantworten über IL-2. Das heißt IL-2, das von aktivierten nicht-regulatorischen T Zellen produziert wird, trägt zur Aufrechterhaltung, Ausbreitung und Aktivierung von Tregs bei, was wiederum die Ausbreitung von nicht-regulatorischen T-Zellen begrenzt. Eine Unterbrechung dieser IL-2-vermittelten Rückkopplungsschleife fördert die Entwicklung von Autoimmun- und Entzündungskrankheiten. Darüber hinaus ist die Manipulation dieser Rückkopplungsschleife von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Intensität der Treg-vermittelten Unterdrückung und damit für die Stärke einer Vielzahl von Immunantworten [70].

1.2.4 Mechanismen der immunregulierenden Funktion von Tregs

Die Wirkungsmechanismen von Tregs beim Menschen und bei der Maus wurden hauptsächlich mit *in vitro*-Systemen untersucht. Es ist jedoch noch nicht klar, wie diese *in vitro* Studien die Aktivität von Tregs *in vivo* widerspiegeln [42]. Tregs sind in der Lage zahlreiche Immunzellen zu regulieren. Dazu gehören CD4+CD25- T Zellen, CD8+ T Zellen, B Zellen, Monozyten und DCs [71–74]. Die Mechanismen der Unterdrückung über Zell-zu-Zell-Kontakt beinhalten dabei zytotoxische Faktoren wie Perforin, Granzyme und die Expression von LAG-3 (*lymphocyte-activation gene-3*; Lymphozyt-Aktivierungsgen-3) [75]. Neben der Regulation über Zell-Zell-Kontakte, können Tregs Zielzellen über vier weitere Wege in ihrer Immunantwort modulieren: (i) Freisetzung hemmender Zytokine, (ii) Induktion von Zytolyse oder (iii) Stoffwechselstörungen und (iv) Modulation der DC-Funktion [75,76] (Abbildung 1).

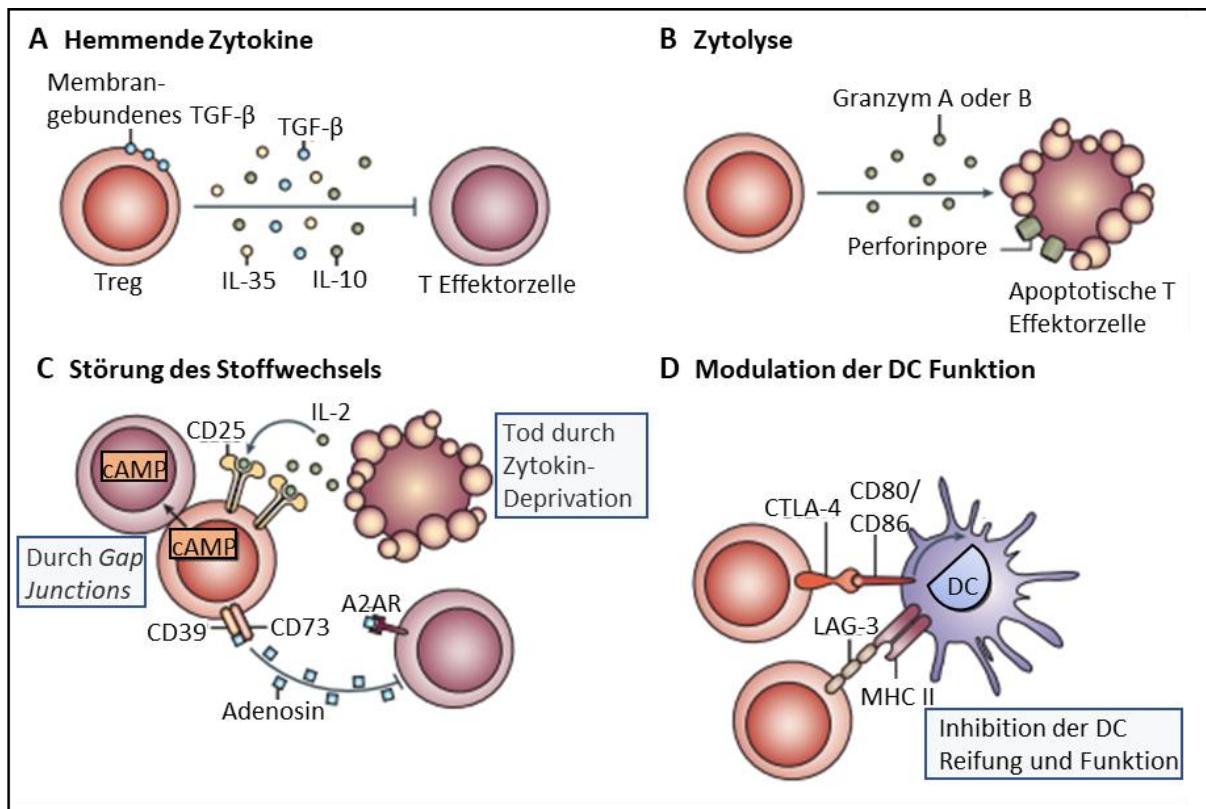


Abb. 1: Mechanismen der immunregulierenden Funktion von Tregs. Die immunregulierenden Mechanismen von Tregs können in vier Kategorien eingeteilt werden: **(A)** Regulierung über hemmende Zytokine, wie IL-10, IL-35 und TGF-β. **(B)** Regulierung mittels Zytolyse über Granzym A- und Granzym B-abhängige und Perforin-abhängige Tötungsmechanismen. **(C)** Regulierung über Störung des Stoffwechsels der Zielzelle über Apoptose mittels Zytokin-Entzugs, wie Entziehen von IL-2 über den IL-2 Rezeptor CD25, cAMP gesteuerte Inhibition und CD39- und/oder CD73-generierte A2AR-medierte Immunsuppression. **(D)** Regulierung durch Modulation der DC-Funktion, wie DC-Reifung und/oder Funktion über Interaktionen zwischen CTLA-4 und CD80/86, sowie LAG-3 und MHC II-Molekül. A2AR: Adenosin-A2A-Rezeptor; cAMP: *cyclic adenosin monophosphat* (zyklisches Adenosinmonophosphat); CTLA-4: *cytotoxic T lymphocyte protein-4* (); DC: *dendritic cell* (dendritische Zelle); IL-2: Interleukin-2; LAG-3: *lymphocyte-activation gene-3* (Lymphozyt-Aktivierungsgen-3); MHC II: *major histocompatibility complex II* (Haupthistokompatibilitätskomplex II); TGF-β: *transforming growth factor β* (transformierender Wachstumsfaktor β). Modifiziert nach [75].

1.2.5 Tregs in Autoimmunerkrankungen

Obwohl Tregs bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen vorhanden sind [77,78], scheint es dieser Zellpopulation sowohl an Autoantigen-Spezifität als auch an suppressiven Fähigkeiten zu fehlen [78–80]. Während die Anzahl der Tregs von Patienten zu Patienten und auch Autoimmunerkrankung variieren kann, ist bewiesen, dass der Treg-suppressive Phänotyp bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen begrenzt ist [81].

Ein Beispiel für eine veränderte Treg-Anzahl als auch einem Verlust der suppressiven Fähigkeit ist die systemische Autoimmunerkrankung SLE. Diese Autoimmunerkrankung ist gekennzeichnet durch den Verlust der Immuntoleranz gegenüber Selbstantigenen, die Aktivierung und Vermehrung autoreaktiver Lymphozyten und die Produktion von Entzündungsmediatoren und Autoantikörpern, die

infolgedessen zahlreiche Organe schädigen, unter anderem die Niere. Mehrere Studien haben die Rolle der Tregs beim SLE untersucht, manchmal mit kontroversen Ergebnissen [82]. Die meisten Studien haben eine verringerte oder normale Häufigkeit von Tregs bei SLE festgestellt [83], obwohl andere Studien auch eine erhöhte Anzahl gezeigt haben [42]. Es scheint jedoch, dass die Zahl der Tregs während aktiver Krankheitsschübe [84,85] und bei aktiven pädiatrischen SLE-Patienten verringert ist, wobei eine umgekehrte Korrelation zwischen Tregs und Krankheitsaktivität sowie Autoantikörperspiegeln besteht [86]. Funktionell ist die Suppressionskapazität von Tregs bei Patienten mit aktivem SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit inaktivem SLE reduziert [87,88]. In Mausmodellen des SLE kann ein Mangel an Tregs zum Verlust der Selbsttoleranz und zur Entwicklung einer Lupus-ähnlichen Erkrankung beitragen [89], während der adoptive Transfer von Tregs das Fortschreiten der Nierenerkrankung verlangsamt und die Sterblichkeit von Mäusen verringern kann. Lupus-anfällige Mäuse haben dabei eine geringere Häufigkeit von Tregs im Vergleich zu nicht-autoimmunen Stämmen [90].

Ein weiteres Beispiel für eine Autoimmunerkrankung mit einer Reduktion der Treg-Anzahl sowie einen Funktionsverlust ist MS [78,91]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ebenfalls in T1D Tregs funktionelle Defizite aufweisen. So ist hier zwar die Anzahl an Tregs in Patienten vergleichbar mit der Anzahl an Tregs in Kontrollprobanden, jedoch konnte gezeigt werden, dass isolierte Tregs von an T1D erkrankten Personen eine signifikant geringere Hemmung der T Zellproliferation aufweisen als isolierte Tregs aus gesunden Probanden [92].

1.2.6 Therapiemöglichkeiten mit Tregs

Wie weiter oben beschrieben, spielen Tregs eine entscheidende Rolle bei der Immunhomöostase und -toleranz. Infolgedessen wurden therapeutische Strategien für Autoimmunkrankheiten entwickelt, die direkt oder indirekt auf Tregs abzielen. Auf einige wird nachfolgend genauer eingegangen.

1.2.6.1 Therapie mit niedrig-dosiertem IL-2

Wie schon beschrieben hat IL-2 das Potenzial, die Proliferation von Tregs *in vivo* zu induzieren [93]. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine niedrige Dosis an IL-2 als Therapeutikum für Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden kann. Durch den Einsatz einer niedrigen Dosis zielt das IL-2 bevorzugt auf Zellen mit hoher CD25-Expression, also Tregs, ab [94]. Solche Ansätze wurden schon erfolgreich im Zusammenhang mit Infektionen und Transplantationen mit Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (*graft versus host disease*, GVHD) eingesetzt [95,96]. Im Zusammenhang mit Autoimmunität hat sich niedrig dosiertes IL-2 bei T1D und SLE am Patienten als sicher erwiesen [97–100]. Weitere Entwicklungen, die die Treg-fördernde Wirkung von IL-2 nutzen, umfassen die Verwendung von IL-2-anti-IL-2-Komplexen (IL-2 Antikörperkomplex) zur selektiven Vermehrung von Tregs *in vivo*. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung antigenspezifischer Tregs, die einen veränderten IL-2-Rezeptor exprimieren, der nur an ein modifiziertes IL-2 bindet. Dies führt dazu, dass bei IL-2 Gabe selektiv nur die antigenspezifische Treg-Untergruppe vermehrt wird [101,102]. Ein Vorteil der IL-2-

Therapie besteht darin, dass rekombinantes humanes IL-2 bereits als therapeutisches Medikament namens Aldesleukin oder Proleukin für die Behandlung von malignen Melanomen und Nierenzellkarzinomen in der Klinik verfügbar und zugelassen ist [103].

1.2.6.2 Therapie mittels adoptiven Transfer von Tregs

Um die dominante Immuntoleranz wiederherzustellen, wird postuliert, dass die Verabreichung von Tregs das Treg-Ungleichgewicht wiederherstellen kann, indem dadurch die Zahl der Tregs direkt erhöht wird. Der erste *in vivo*-Beweis im Tierversuch wurde vor 30 Jahren von Hall et al. [104] erbracht, welche zeigten, dass adoptiv übertragene CD25+ T Suppressorzellen die Toleranz in Rattentransplantationsmodellen aufrechterhalten können. Seitdem hat sich das Feld erweitert und eine Vielzahl von Ansätzen zur Verwendung von Tregs als Therapie mit einem adoptiven Transfer-Ansatz zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wurden entwickelt. Eine Reihe von klinischen Studien mit polyklonaler Treg-Therapie zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wurden bereits abgeschlossen oder laufen noch [105]. Die erste klinische Studie dieser Art (ISRCTN06128462) bei Kindern mit T1D zeigte, dass der adoptive Transfer von polyklonalen, autologen Tregs das Überleben der Pankreasinseln verlängerte. Einige Patienten zeigten Anzeichen einer klinischen Remission und blieben nach einem Jahr ohne jegliche Nebenwirkungen insulinunabhängig [106]. Eine weitere klinische Studie (NCT01210664), bei der polyklonale autologe *ex vivo*-expandierte Tregs bei erwachsenen T1D-Patienten eingesetzt wurden, zeigte, dass die Behandlung sicher und verträglich ist [107]. Die positiven Ergebnisse dieser klinischen Studien haben die Befürchtungen zerstreut, dass die polyklonale Treg-Therapie zu einer allgemeinen Immunsuppression und damit zu einem erhöhten Infektions- und Krebsrisiko führen könnte. Andere klinische Studien, in denen polyklonale Tregs zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, betreffen die Behandlung von aktivem kutanem Pemphigus (NCT03239470), autoimmuner Hepatitis (NCT02704338) und Morbus Crohn (NCT03185000). In einer dieser klinischen Phase-I-Studien (NCT02772679) wird die gleichzeitige Verabreichung von IL-2 mit polyklonalen Tregs untersucht. Es wird erwartet, dass die gleichzeitige Verabreichung von polyklonalen Tregs und niedrig dosiertem IL-2 die Anzahl und Funktion der Tregs nach der Verabreichung erhöht [105].

Die Therapie durch adoptiven Transfer von Tregs kann zusätzlich optimiert werden, indem autoantigenspezifische Tregs verwendet werden [108]. Damit diese Art der Therapie jedoch erfolgreich ist, muss sichergestellt werden, dass die Tregs spezifisch und stabil sind, langfristig überleben und ihre unterdrückende Wirkung beibehalten können [105].

1.2.6.3 Weitere Therapie-Möglichkeiten

Es gibt inzwischen zahlreiche weitere Therapie-Ansätze, die auf die Modulation der Treg-Population abzielt: zum Beispiel die Gabe von Rapamycin, ein mTOR-Inhibitor, welcher als starkes Makrolid-Immunsuppressivum wirkt und die Signalübertragung als Reaktion auf Zytokine oder Wachstumsfaktoren blockiert, die Progression des T-Zellzyklus hemmt und die TCR-induzierte T Zell-

Anergie und -Deletion fördert [109]. Antigen-spezifische Tregs, welche durch die Verabreichung von Autoantigenen aktiviert und vermehrt werden und als eine Art Impfstoff gegen Autoimmunität angesehen werden können [105]. Sowie eine Antigen-spezifische Treg-Therapie, in der die Tregs mit einem Autoantigen-spezifischen, hochaffinen TCR transduziert wurden und daher eine stärkere Suppressionsfunktion als Tregs, die mit einem unspezifischen TCR oder polyklonalen Tregs transduziert wurden, aufweisen [110]. Des Weiteren wurden bereits eine Vielzahl kreativer chimärer Tregs entwickelt, die sich in Modellen von Autoimmunerkrankungen als wirksam erwiesen haben [105].

Zum Schluss kann man ebenfalls davon ausgehen, dass Kombinationstherapie von Tregs mit anderen Therapien bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen ebenfalls eine verstärkende Wirkung haben. Bei der Anwendung der Treg-Therapie muss aber auch immer die immunsuppressive Behandlung der Patienten berücksichtigt werden. Immunsuppressiva, die üblicherweise zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, wie Methylprednisolon, Mycophenolat und Tacrolimus, reduzieren leider nachweislich die Treg-Proliferation und -Lebensfähigkeit auf dosisabhängige Weise [111]. Daher ist eine sorgfältige Abwägung bei der Festlegung eines geeigneten Behandlungsschemas für eine Treg-Therapie unerlässlich [105].

1.3 Die Haut

Die Haut ist ein komplexes Organ, das für die Bewahrung wichtiger physiologischer Funktionen des Körpers wie die Verhinderung von Flüssigkeitsverlusten, die Stabilisierung der Körpertemperatur und die Weiterleitung von Sinneseindrücken mitverantwortlich ist [112,113]. Darüber hinaus bildet sie eine hochspezialisierte immunologische Nische, die für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase, der Verteidigung und der Reparatur entscheidend ist.

1.3.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist in drei Schichten gegliedert: Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und das Unterhautfettgewebe (Subcutis) (Abbildung 2).

Die Epidermis, die äußerste Schicht der Haut, ist unterteilt in das *Stratum corneum*, das *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum* und *Stratum basale*. Das *Stratum corneum* enthält Kerneozyten, die differenzierte Keratinozyten im Endstadium darstellen. Diese Zellen werden kontinuierlich durch Keratinozyten aufgefüllt, die im *Stratum basale* lokalisiert sind [113]. Das *Stratum lucidum* ist eine dünne, klare Schicht aus abgestorbenen Keratinozyten und das *Stratum granulosum* stellt eine dünne Ebene zwischen dem *Stratum lucidum* und *Stratum basale* dar, welches Keratinfilamente miteinander verbindet [112]. Das *Stratum basale* enthält basale Keratinozyten, Immunzellen wie Langerhanszellen und T Zellen, sowie Melanozyten, die für die Pigmentierung der Haut sorgen [114].

Unter der Epidermis befindet sich die Dermis, die wiederum in papilläre und retikuläre Unterschichten eingeteilt wird. Beim Menschen bildet die papilläre Dermis Ausläufer, die bis zur Epidermis reichen und Kapillaren enthalten, die den Transport von Nährstoffen erleichtern [115]. Die retikuläre Dermis enthält Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen. Die retikuläre Dermis ist aufgrund der dichten Konzentration von kollagenen und retikulären Fasern, die in dieser Schicht verwoben sind, wesentlich dicker als die papilläre Dermis. Beide Hautschichten beherbergen Fibroblasten, Myofibroblasten und Immunzellen, wie Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen. Die Fibroblasten synthetisieren dabei eine extrazelluläre Matrix aus Kollagen, Proteoglykanen und elastischen Fasern, die die strukturelle Integrität der Dermis gewährleisten [116].

Unter der Dermis liegt das subkutane Fett. Diese Schicht besteht aus Fibrozyten und Adipozyten und ist reich an Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen, die der Schicht mukusähnliche Eigenschaften verleihen [117]. Das Hautfettgewebe speichert Energie in Form von Fettsäuren und fungiert als endokrines Organ, das für die Glukosehomöostase und den Fettstoffwechsel wichtig ist [118–120]. Diese Schicht produziert auch eine Vielzahl von Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren, Adipokine und Zytokine und enthält zahlreiche Immunzellen [121]. Darüber hinaus dient das subkutane Fett als Isolierschicht für den Körper [114].

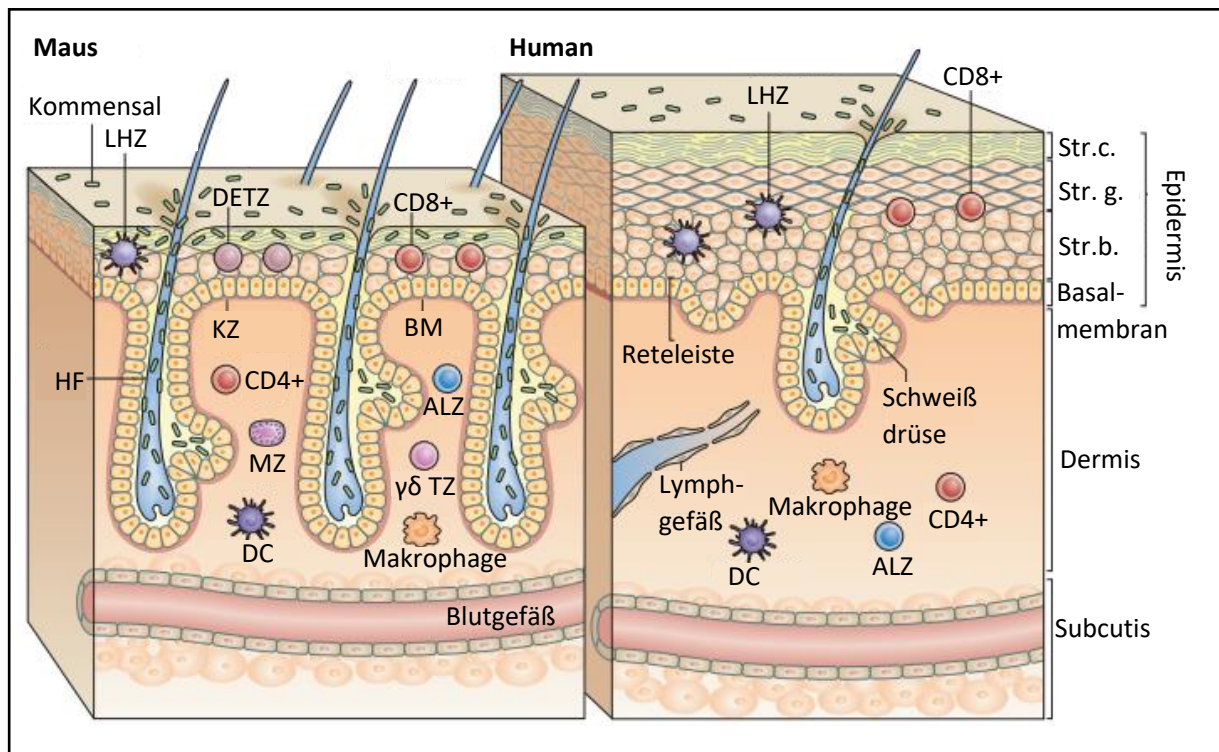


Abb. 2: Struktur und zelluläre Komponenten der murinen und humanen Haut. Murine Haut (links) weist dichtgepackte Haarfollikel auf, wohin hingegen humane Haut (rechts) größere Bereiche mit weniger Haarfollikel besitzen. Humane Haut unterscheidet sich von muriner Haut durch eine dickere Epidermis mit mehreren Zellschichten und einer dickeren Dermis mit für die humane Haut charakteristischen tiefreichenden Reteleisten. Die häufigsten Immunzellen in der humanen Epidermis sind Langerhanszellen und CD8+ T Zellen. In der murinen Epidermis befinden sich bevorzugt dendritische epidermale T Zellen, welche nicht in der humanen Haut zu finden sind. Im Menschen, wie auch in der Maus, besiedeln Makrophagen, Mastzellen, konventionelle $\alpha\beta$ T Zellen, als auch eine kleine Population an angeborenen lymphoiden Zellen die Dermis. In der murinen Haut befinden sich ebenfalls $\gamma\delta$ T Zellen. ALZ: angeborene lymphoide Zelle; DETZ: dendritische epidermale T Zelle; HF: Haarfollikel; LHZ: Langerhanszelle; KZ: Keratinozyt; MZ: Mastzelle; Str.b.: *Stratum basale*; Str.c.: *Stratum corneum*; Str.g.: *Stratum granulosum*; TZ: T Zelle. Modifiziert nach [122].

Mausmodelle in der dermatologischen Forschung sind von großem Wert und ahmen viele pathologische Aspekte nach, die bei menschlichen Hauterkrankungen beobachtet werden können. Es ist jedoch wichtig zu berücksichtigen, dass es Unterschiede in der Hautstruktur von Mäusen und Menschen gibt. So ist zum Einem die Dicke der Epidermis von Mäusen dünner als die des Menschen [123]. Des Weiteren enthält die Epithelarchitektur der menschlichen Haut Fortsätze, die in das darunter liegende Gewebe hineinragen, was bei muriner Haut nicht der Fall ist [124]. Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Haut der Maus außerdem keine Schweißdrüsen, mit Ausnahme der Brustdrüsen weiblicher Mäuse. Zusätzlich besitzen Mäuse eine dermale Muskelschicht, den so genannten *Panniculus carnosus*, die beim Menschen nicht vorhanden ist [123]. Dennoch haben sich Mausmodelle aufgrund ihrer geringen Kosten und guten Handhabung für die Untersuchung entzündlicher Erkrankungen der Haut bewährt [114].

1.3.2 Die Haut als Immunorgan

Eine der Hauptfunktionen der Haut besteht darin, den Körper vor Verletzungen, Infektionen, Licht und thermischen Einflüssen zu schützen. Dies wird durch physische Barrieren, Biomoleküle und ein kompliziertes Netzwerk aus residenten Immunzellen und nicht-immunen Zellen, sowie Hautstrukturen gewährleistet. Darüber hinaus fördern die in der Haut ansässigen Immunzellen (Abbildung 2) die physiologischen Funktionen der Haut [114].

Zu den hautresidenten myeloischen Zellen gehören Langerhans-Zellen, dermale DCs, Makrophagen, Mastzellen und Eosinophile. Neutrophile kommen in gesunder Haut nur selten vor und sind daher keine "hautbewohnenden Zellen". Allerdings bevölkern Neutrophile die Haut bei Entzündungen und nach einer Verletzung. Hautresidente myeloische Zellen tragen zur Homöostase der Haut bei, indem sie Wachstumsfaktoren absondern, die für das Überleben von Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen erforderlich sind. Darüber hinaus erhalten sie die optimale Gewebefunktion aufrecht, indem sie Debris und apoptotische Zellen phagozytieren, die Integrität der Blutgefäße unterstützen und die Toleranz fördern. Bei Entzündungen reagieren myeloische Zellen umgehend und produzieren entzündungsfördernde Mediatoren, die die Aktivierung von Zellen in der lokalen Umgebung und die Infiltration der betroffenen Stelle durch periphere Immunzellen vorantreiben. Myeloische Zellen der Haut dienen auch als APCs und somit als Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem [114].

Die Haut beherbergt verschiedene Arten von Lymphozyten, die alle sowohl bei Normalzustand als auch bei Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen. Sowohl die menschliche Haut als auch die Haut von Mäusen enthält $\alpha\beta$ T-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, sowie NKTs. $\gamma\delta$ T-Zellen sind die dominierende T Zell-Population in der Haut von Mäusen, während $\alpha\beta$ T-Zellen die dominierende T Zell-Population in der menschlichen Haut sind [125,126]. B Zellen sind in der Haut im Normalzustand eher selten und es ist unklar, ob sie tatsächlich in der Haut ansässig sind [127–129]. Die Rolle der B Zellen bei entzündlichen Erkrankungen der Haut ist jedoch gut beschrieben [130–132].

1.3.3 Tregs in der Haut

In der Haut erwachsener Mäuse sind 20-60 % der CD4+ T Zellen Tregs, und in der Haut erwachsener Menschen machen sie etwa 20 % aus [133]. Die meisten Tregs in der Haut sind dabei in beiden Spezies in der Nähe von Haarfollikeln lokalisiert [134,135].

Tregs erfüllen spezifische Aufgaben in der Haut, wie die Beschleunigung der Wundheilung [136], die Förderung der Immuntoleranz gegenüber kommensalen Mikroben der Haut [133] und die Förderung der stammzellvermittelten Haarfollikelregeneration [135]. Ebenso konnte die Existenz von hautresidenten Gedächtnis-Tregs nachgewiesen werden, die bei wiederholter Antigenexposition zur Milderung der Hautentzündung beitragen [137]. Im Gegensatz konnte auch gezeigt werden, dass Mäuse mit dysfunktionalen Tregs in jungen Jahren an einer fulminanten systemischen Entzündung mit offensichtlicher Dermatitis und Haarausfall sterben, was zusätzlich die Bedeutung der Tregs für die Entzündungshemmung in der Haut widerspiegelt [138].

1.3.4 Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)

1.3.4.1 EBA als blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut

Blasenbildende Autoimmunerkrankungen der Haut (*autoimmune skin blistering diseases, AIBD*) sind eine vielfältige Gruppe von Dermatosen, die durch die Bindung von Autoantikörpern an Antigene in der Haut und den Schleimhäuten gekennzeichnet sind. Sie lassen sich in Pemphigoid-Erkrankungen (PD) und Pemphigus-Erkrankungen unterteilen. PD kennzeichnen sich durch eine subepidermale Spaltbildung und Autoantikörperbindung an strukturelle Komponenten der dermal-epidermalen Grenzfläche (*dermal epidermal junction, DEJ*) aus. Pemphigus-Erkrankungen hingegen produzieren Autoantikörper, die gegen desmosomale Proteine gerichtet sind, welche benachbarte Keratinozyten verbinden [139,140] (Abbildung 3).

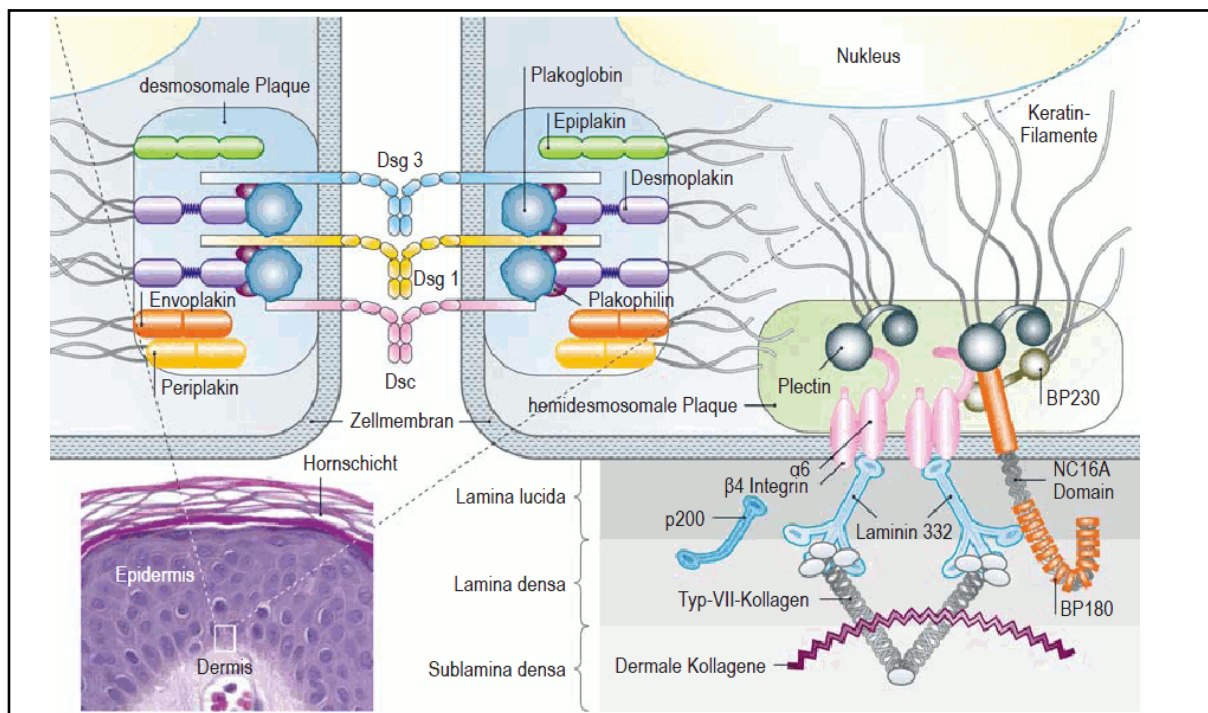


Abb. 3: Schematische Darstellung der Autoantigene bei Pemphigus- und Pemphigoid-Erkrankungen. BP180, Typ-XVII-Kollagen; BP230, Dystonin; Dsg: Desmoglein; Dsc: Desmocolin. Aus [141].

Klinisch sind pralle Blasenbildung und juckende urtikarielle Erytheme charakteristische Merkmale der PD und histopathologisch ist die subepidermale Blasenbildung in Verbindung mit einer eosinophilen und neutrophilen Infiltration kennzeichnend für diese Erkrankungen [139,142]. PDs lassen sich je nach Lokalisation der Autoantikörper in zwei große Subtypen einteilen: erstens das bullöse Pemphigoid (BP) mit Autoantikörpern gegen subepidermale Strukturen und zweitens die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) mit subepithelialen Autoantikörpern [139,143].

Obwohl die Inzidenz von EBA nicht im Detail bekannt ist, wird sie als selten, mit einer geschätzten Inzidenz von < 0,5 pro Millionen Einwohnern eingeschätzt [144–147]. In Deutschland wurde die EBA-Prävalenz kürzlich mit 2,8 Fällen pro Million Einwohner angegeben [148]. EBA kann dabei in jedem Alter auftreten, mit beschriebenen Erkrankungsaltern von 1 bis 94 Jahren [149–151]. Dabei scheinen

vor allem zwei Altersstufen besonders betroffen zu sein: Menschen im zweiten und Menschen im siebten Lebensjahrzehnt [148].

1.3.4.2 Formen der EBA

Es gibt zwei klinische Hauptformen der EBA: die entzündliche und die mechanobullöse (klassische oder nicht entzündliche) Form, wobei die entzündliche Form die häufigere ist [152,153].

Bei der mechanobullösen Form der EBA treten die Blasen an Stellen auf, die starkem Druck und Trauma ausgesetzt sind. Die Läsionen treten in der Regel ohne Ödeme oder Erytheme auf und erscheinen zeitnah oder höchstens einige Stunden nach dem Trauma der Haut. Schleimhautläsionen sind in dieser Form häufig. Ein weiteres klinisches Merkmal ist, dass sich im Laufe der Krankheitsentwicklung unter anderem atrophische Narben, Hyper- oder Hypopigmentierung entwickeln können [153]. Bei der entzündlichen Form treten Läsionen in der gesamten Haut auf, und die Hautbrüchigkeit selbst ist nicht so bedeutend. Sie kann daher anderen subepidermalen autoimmunen bullösen Dermatosen ähneln, wie zum Beispiel dem BP, dem Schleimhautpemphigoid (MMP) oder der linearen bullösen IgA-Dermatose [152–154]. Das Auftreten von Narben während der Krankheitsentwicklung ist dabei weniger häufig als bei der mechanobullösen EBA [153,154].

1.3.4.3 Pathogenese der EBA

Wie bei den meisten Autoimmunkrankheiten ist die genaue Ursache der Krankheit unbekannt. In Bezug auf die EBA deuten die Daten auf eine gewisse genetische Prädisposition, sowie auf einen Beitrag von Umweltfaktoren zur Pathogenese der EBA hin. Aufgrund der geringen Anzahl von EBA-Fällen ist es schwierig, den Einfluss bestimmter Umweltfaktoren oder Infektionen zu untersuchen. Die Anfälligkeit für EBA wird mit Genen innerhalb und außerhalb des MHC-Lokus in Verbindung gebracht. Insbesondere wurde beim Menschen in zwei unabhängigen Studien ein Zusammenhang mit dem MHC-Lokus HLA-DR2 nachgewiesen [155,156].

Das meistbetroffene Antigen, gegen welches sich Autoantikörper bilden, ist Kollagen-7 (COL7), das sich in der *Sublamina densa* der Basal-Membran-Zone befindet. COL7 ist ein Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen und ist ein 290 kDa großes Protein. Es besteht aus einer zentralen kollagenen Domäne, die von zwei nicht-kollagenen (*non-collagenous*, NC) Domänen, NC1 und NC2, flankiert wird [157]. Bei Patienten mit EBA richten sich die meisten Autoantikörper gegen Epitope, die sich in der NC1-Domäne befinden, obwohl in einer Minderheit der Fälle ebenso eine Reaktivität gegen die kollagenen oder NC2-Domänen festgestellt werden kann [158]. Im Allgemeinen sind dies Autoantikörper des Typs IgG. Bei einigen Patienten wurden jedoch auch schon Autoantikörper des Typs IgA, IgE und IgM nachgewiesen [159].

Die meisten Erkenntnisse zum Ablauf der Autoimmunreaktion der EBA stammen von Forschungen an passenden Mausmodellen: die Effektorphase der EBA, das heißt die durch Autoantikörper ausgelöste Entzündung und Blasenbildung, wird durch die Ablagerung von Autoantikörpern an der DEJ durch Bindung an das COL7-Epitop ausgelöst. Dies führt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur

Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen [159] und neutrophiler Chemotaxis [160]. Neutrophile binden anschließend über Fc γ -Rezeptoren an die Fc-Domäne der anti-COL7-Autoantikörpern [161] und setzen eine Signalkaskade in Gang, die die Neutrophilen aktiviert und sie veranlasst reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) und Proteasen freizusetzen [162]. Diese Mediatoren führen zu einer Zerstörung der Verankerungsfibrillen und damit zur Entstehung der Blasen auf der Haut und den Schleimhäuten [161]. Was die funktionelle Rolle der T Zellen betrifft, so wurde vor kurzem nachgewiesen, dass T Zellen die Rekrutierung von Neutrophilen in den Entzündungsbereich fördern können, indem sie die Expression des Zelloberflächenintegrins CD18 auf Neutrophilen modulieren. Interessanterweise wurde dieser Effekt weder durch CD4+ noch durch CD8+ Zellen vermittelt, sondern durch $\gamma\delta$ T Zellen [163]. Die Blockade von Tregs führte wiederum zu einer dramatischen Verschlechterung des klinischen Krankheitsbildes bei einer experimentellen Antikörpertransfer-induzierten EBA (Ak-EBA) [164]. Zusätzlich zu Granulozyten und Lymphozyten, können auch Makrophagen und/oder Monozyten an der Blasenbildung bei der EBA beteiligt sein. Die Blockade dieser Zellen ist jedoch technisch schwierig und beeinträchtigt das Fortschreiten der Krankheit nicht offensichtlich [165]. Dennoch sind weitere Studien erforderlich, da Makrophagen und Monozyten ebenso in der Lage sind, große Mengen an ROS nach Stimulation durch den Immunkomplex zu produzieren und *ex vivo* eine Spaltbildung in menschlichen Hautschnitten hervorzurufen [166].

1.3.4.4 Diagnose und Behandlung der EBA

Da EBA polymorphe Merkmale unterschiedlicher Schweregrade aufweisen kann, kann sie mit anderen subepidermalen bullösen Autoimmundermatose wie BP, MMP oder linearer bullöser IgA-Dermatose verwechselt werden. Die Differentialdiagnose basiert daher nicht nur auf der klinisch-pathologischen Korrelation, sondern erfordert auch den Nachweis von *in situ* und/oder zirkulierenden IgG-Autoantikörpern gegen COL7 [158]. Nachweismethoden einer EBA umfassen dabei zum Beispiel die Histopathologie, den Nachweis einer C3 und/oder IgG Ablagerung an der DEJ mittels direkter Immunofluoreszenz und der Nachweis zirkulierender Autoantikörper gegen COL7 mittels indirekter Immunofluoreszenz oder einen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) [167].

Die EBA-Behandlung zielt bisher hauptsächlich darauf ab, die Krankheitsaktivität zu kontrollieren und ein Wiederauftreten der Krankheit, sowie dauerhafte Folgeerscheinungen zu verhindern. Krankheitskontrolle ist definiert als das Ausbleiben des Auftretens neuer Läsionen und die Abheilung bereits bestehender Läsionen [168]. Aufgrund der Seltenheit dieser autoimmunen bullösen Dermatose und der vielfältigen klinischen Manifestationen gibt es nur wenige randomisierte, kontrollierte Studien zur Behandlung der EBA. Die aktuellen Empfehlungen basieren auf Fall- und Serienberichten sowie auf Expertenmeinungen aus nationalen und internationalen Konsensus- und Leitlinien [169–172]. Die meisten von ihnen schlagen vor, dass sich die Wahl der Therapie nach dem Schweregrad der Erkrankung richten sollte, der objektiv durch den *Bullous Pemphigoid Disease Area Index* (BPDAI) oder subjektiv durch den Grad der Schleimhautbeteiligung und das Risiko von Langzeitfolgen und funktionellen Einschränkungen beurteilt werden kann [169,170]. Ähnlich wie bei anderen AIBDs werden systemische Kortikosteroide weitgehend als erste Wahl bei der Behandlung von EBA

eingesetzt [139]. Neben diesen wurden bei der Behandlung der EBA auch steroidsparende Mittel wie Colchizin, Diaminodiphenylsulfon (Dapson), Methotrexat, Azathioprin, Cyclosporin, Mycophenolatmofetil und Cyclophosphamid eingesetzt. Weitere therapeutische Optionen wie hochdosiertes intravenöses Immunglobulin (IVIg), Rituximab, Plasmapherese und Immunadsorption sowie extrakorporale Photochemotherapie sind ebenfalls beschrieben worden [143,173]. Jedoch ergeben sich häufig unerwünschte Nebenwirkungen aus den Standardbehandlungen sowohl aus ihrer langfristigen Anwendung als auch aus ihrem eventuellen abrupten Abbruch. Außerdem geht die Immunsuppression mit der Entwicklung von Infektionen bei den Patienten einher [143].

1.3.4.5 Prognose der EBA

EBA ist eine chronische Krankheit, die durch Exazerbationen und Remissionen im Laufe von Monaten bis Jahre gekennzeichnet ist. Obwohl in der Literatur keine Daten zu den prognostischen Faktoren der EBA zu finden sind, geht man davon aus, dass die Prognose der EBA vom Schweregrad der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose abhängt. Die Prognose ist bei schweren Formen schlecht, was durch die Veröffentlichung zahlreicher Fallberichte über Therapieversagen belegt wird. Bei einigen Patienten kann die Krankheit schnell fortschreiten, mit Phasen schwerer Exazerbation und schneller Narbenbildung. Die Vernarbungen der Läsionen können die funktionelle Prognose beeinträchtigen und lebensbedrohlich sein. Die Gesamtprognose und das Ansprechen auf die Behandlung sind bei Kindern möglicherweise günstiger als bei Erwachsenen [174,175].

1.3.4.6 Mausmodelle der EBA

Tiermodelle sind für die Untersuchung der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten unverzichtbar. Sie werden beispielsweise zur Erforschung der Autoantikörper-induzierenden Wechselwirkungen von Molekülen, die dem Pathomechanismus zugrunde liegen [176], zur Auswahl von therapeutischen Zielkandidaten [162,177] oder zur Prüfung neuartiger therapeutischer Maßnahmen [162,178] verwendet.

Das Ak-EBA-Mausmodell

Das erste Tiermodell für EBA wurde durch die Herstellung polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Fragmente der immundominanten NC1-Domäne von murinen COL7 (mCOL7) etabliert [179]. Dabei wurden gereinigte IgG-Antikörper aus den Seren von immunisierten Kaninchen übertragen. Wenn Mäusen dieses gereinigte Kaninchen-IgG in hohen Dosen wiederholt injiziert wurde, entwickelten sich nach 2-4 Tagen dosisabhängig subepidermale Blasen und Erosionen. Darüber hinaus wurden verschiedene Ausmaße von Neutrophilen-Infiltration und IgG/C3-Ablagerungen an der DEJ zusammen mit zirkulierenden Anti-mCol7-Autoantikörpern festgestellt, die mit dem Ausmaß der Erkrankung korreliert waren. Weitere Arbeiten an einem adulten Mausmodell für EBA validierten mehrere entscheidende Faktoren für die Pathogenese der experimentellen EBA, wie unter anderem den alternativen Komplementweg [180], Neutrophile, CD18, NADPH-Oxidase [181], GM-CSF (*granulocyte*

monocyte/macrophage colony stimulating factor; Granulozyten-Monozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) [182], IL-6 [183], TNF- α [166], Hsp90 [184], CXCR1/2 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1/2) [185] und den neonatalen Fc-Rezeptor [186]. Um die unspezifischen Wirkungen hoher Mengen von Kaninchen-IgG zu vermeiden, wurde dieses Modell unter Verwendung von affinitätsgereinigtem IgG verfeinert [187]. In diesem Fall reichen viel geringere Dosen aus, um subepidermale Blasen und Erosionen zu erzeugen. In ähnlicher Weise wurden ebenso andere Antikörper-Transfer-Mausmodelle etabliert: zum Beispiel mit IgG aus Kaninchen-Antikörpern gegen die NC1-Domäne von humanen COL7 [188] oder affinitätsgereinigtem IgG von menschlichen EBA-Patienten, das klinische EBA-Läsionen in SKH1-Mäusen induzieren kann [189].

Das immunisierungs-induzierte EBA-Mausmodell

Das erste Modell für eine durch Immunisierung induzierte EBA-Erkrankung wurde im Jahr 2006 entwickelt. In diesem Modell wurden Mäuse mit einem rekombinanten Peptidfragment aus der immunogenen NC-1-Domäne von mCOL7^c immunisiert. Die Immunisierung mit vier separaten Verabreichungen von 40 μ g mCOL7^c löste bei allen getesteten Mausestämmen eine gegen mCOL7^c gerichtete Autoantikörperreaktion aus. Allerdings entwickelten nur SJL-Mäuse eine klinisch sichtbare Erkrankung [190]. Weitere Untersuchungen dieses Modells ergaben, dass die klinischen Läsionen mit der Bildung von Komplement-fixierenden Autoantikörpern einhergingen. Autoantikörper wurden bereits eine Woche nach der Immunisierung nachgewiesen, und Mäuse, die für EBA anfällig waren, entwickelten 1-2 Wochen nach dem Nachweis zirkulierender Autoantikörper Läsionen. Die Produktion von Autoantikörpern und die klinische Erkrankung wurden dabei für mindestens 24 Wochen aufrechterhalten. Die Anfälligkeit für einen klinischen Phänotyp der EBA in diesem Modell wurde mit dem MHC H2S-Haplotyp [191], der Th1-Polarisierung [192] und der Bildung von komplementbindenden Autoantikörpern der Subklassen IgG2a und IgG2b in Verbindung gebracht [190]. In der Folge wurde eine Abhängigkeit von T Zellen festgestellt, was durch Mäuse mit fehlenden T Zellen belegt wurde, die gegen die Krankheitsinduktion resistent waren. Iwata et al. [165] entwickelte anschließend ein zweites Immunisierungsmodell, bei dem eine einzige Immunisierung mit 60 μ g mCol7 in TitermaxTM verwendet wurde. In diesem Modell wurde die immundominante murine von Willebrand-Faktor A2-ähnliche Domäne (mCOL7^{VWFA2}) der NC1-Domäne zur Immunisierung von Mäusen verwendet [193]. Auch hier war die Krankheit mit dem H2S-Haplotyp verbunden und erforderte APC-induzierte CD4+ T Zellen, DCs und Makrophagen [165].

1.3.5 Tregs in PD

Die Rolle der Tregs in PD bleibt umstritten. So zeigten Studien eine signifikante Erniedrigung der zirkulierenden Tregs [194,195] und eine verringerte Anzahl von FoxP3+ und IL-10+ Zellen in BP-Haut im Vergleich zu Psoriasis und atopischer Dermatitis, jedoch wiesen insgesamt BP-Patienten eine erhöhte Anzahl an Tregs auf als gesunden Probanden. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass das entzündliche Milieu die verminderte Ansiedlung von Tregs in BP-befallener Haut als unabsichtliche Folge und nicht als Ursache der Erkrankung bedingen könnte [196]. Es muss jedoch beachtet werden, dass in der Studie von Antiga et al. [195] die BP-Patienten auf Grund ihres deutlich höheren Alters nicht mehr zu den Kontrollprobanden und den Patienten der anderen PD Alter-angepasst waren. Trotz allem exprimierten zirkulierende Tregs ein normales Maß an kutanem Lymphozyten-Antigen (CLA), und ihre hemmende Kapazität der T Zellproliferation war in BP nicht beeinträchtigt [197]. Es konnte jedoch in einem DREG-Mausmodell der EBA und BP gezeigt werden, dass eine Deletion der Tregs zu einer übermäßiger Entzündung und Blasenbildung, vermehrten neutrophilen Infiltraten und der Expression von Th1- und Th2-Zytokinen und Chemokinen führt, was auf eine Rolle der Tregs bei der Pathogenese der EBA und BP hindeutet [164].

Es sind jedoch weitere Studien erforderlich um die genauen Mechanismen, durch die Tregs zu den Entzündungsprozesse in PD beitragen zu verstehen, was in dieser Arbeit daher vertiefend untersucht wird.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Therapie von EBA-Patienten ist aufgrund unzureichender Wirksamkeit und/oder Nebenwirkungen der Medikamente nach wie vor unbefriedigend. Auch die pathogenen Mechanismen, die am Fortschreiten der Krankheit beteiligt sind, sind nur unvollständig verstanden und könnten der Schlüssel zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien sein. Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass myeloische Zellen wie Neutrophile die wichtigsten Effektorzellen für die Gewebeerstörung bei PDs sind [163,198]. Interessanterweise orchestrieren verschiedene Lymphozytenpopulationen, wie Tregs die Rekrutierung und Aktivierung dieser myeloischen Zellen [164]. Ungeachtet der Tatsache, dass gezeigt werden konnte, dass Treg-Populationen in PDs verändert sind [194,195], ist der Beitrag der Tregs während der PD-Effektorphase bisher nur wenig untersucht worden.

Frühere Studien unserer Gruppe zeigten, dass die Depletion von CD4+Foxp3+ Tregs das Fortschreiten der PD-Erkrankung in den verwendeten Mausmodellen fördert [164]. Sowohl im passiven EBA- als auch im BP-Modell ging die Depletion der Tregs mit einer Verschiebung hin zu einem eher proinflammatorischen Milieu in der Läsion einher.

Um die Rolle der Tregs im Einzelnen insgesamt besser zu verstehen, benötigt es aber noch weitere vertiefende Untersuchungen zum Zusammenspiel zwischen Tregs und angeborenen Effektorzellen während der PD-Effektorphase. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die molekularen Mechanismen aufzuklären, mit denen Tregs die Effektorphase von PDs modulieren, und diese Mechanismen für neue therapeutische Strategien zur Behandlung von PDs nutzbar zu machen. Mit der Hypothese, dass Tregs die PD-Hautentzündung durch mehrere Mechanismen unterdrücken, indem sie den Aktivitätszustand anderer Zelllinien, wie T-Effektorzellen und Neutrophilen in der läSIONalen Haut in den prä-inflammatorischen Zustand zurückversetzen, soll hier die Wirkung von Tregs auf diese Zellen mit *in vitro*- und *in vivo*-Methoden untersucht werden. Zusätzlich wird eine Immuntherapie durch Induktion von Tregs mit einem IL-2- Antikörperkomplex sowie durch adoptiven Transfer unter Verwendung von polyklonalen Tregs aus gesunden Mäusen angewendet werden, um die Mechanismen weiter zu entschlüsseln, durch die Tregs eine Schutzfunktion in PDs ausüben können.

3 Material und Methoden

3.1 Mäuse

Alle hier durchgeführten Versuche wurden vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume in Schleswig-Holstein unter den Tierversuchsvorhaben (28-4/18) und (26-4/20), sowie den Anzeigen 5.1_2020-11-16 und 5.1_2022_2022-05-02 genehmigt und von erfahrenem Personal unter spezifischen pathogenfreien (SPF) Bedingungen durchgeführt. Die Mäuse wurden unter SPF Konditionen in individuell belüfteten Käfigen (*individual ventilated cages*, IVC) mit einem 12-Stunden Hell/Dunkel-Zyklus und stabiler Umgebungstemperatur in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität von Lübeck gehalten. Der Zugang zu Wasser und Futter war *ad libitum* und die Gruppengröße innerhalb eines Käfigs bis zu fünf Tieren.

Für die Experimente wurden entweder Mäuse der Linien C57BL/6J, C57BL/6-Tg(Foxp3-GFP)90Pkrj/J (FoxP3-Reportermäuse; Referenz-ID: IMSR_JAX:023800) [199,200] oder B6.SJL-H2s C3c/1CyJ (B6.S) aus der eigenen Zucht der AG Ludwig verwendet, wurden aber ursprünglich von Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA, USA) erworben. Alle Linien weisen keine Belastung auf. In den einzelnen Versuchen wurden nur Tiere ab einem Alter von mindestens acht Wochen genutzt und in einem möglichst ausgewogenen Geschlechterverhältnis eingesetzt. In Bezug auf die FoxP3-Reportermäuse wurden lediglich Mäuse mit einem heterozygoten (tg/+) bzw. Wildtyp (+/+) Genotyp verwendet.

3.2 Materialien

3.2.1 Laborgeräte

Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Firma
Pipette (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette (10 µl, 200 µl, 300 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BZ-9000E-Mikroskop (Biorevo)	Keyence, Osaka, Japan
Crofton® Schnellkochtopf	Aldi, Essen, Deutschland
Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Geeichte Präzisionswaage PNJ 3000-2M	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
<i>gentleMACS™ Octo Dissociator</i> mit Heizungselement	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Glasflaschen Schott Duran (verschiedene Größen)	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
GloMax Discover System microplate Reader	Promega, Mannheim, Deutschland
Küchenwaage	Dirk Rossmann, Burgwedel, Deutschland
Leica Dmi Inverse Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
MACSQuant Analyzer 10	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung, RCT basic	IKA/Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland
Magnetrührer, verschiedenen Größen	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Mausinjektionskäfig MH-100	MidSci, St. Louis, Missouri, USA
Mini Plattenschüttler PSU-2T	LTF Labortechnik, Wasserburg (Bodensee), Deutschland
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
OctoMACS Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
pH 7110 Set 4 pH/mV-meter	WTW/Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Präpbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
QuadroMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Qubit™ 4 Photometers	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Schüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
scil Vet abc Plus+	Scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland

SIL 06 Infrarotlampe	Sanitas, Ulm, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Zellinkubator (HeraCell)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.2.2 Laborwaren und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Laborwaren, wie Messbecher, Messzylinder und Flaschen für Puffer in verschiedenen Größen aus Glas und Plastik stammten von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Th. Geyer (Renningen, Deutschland). Gängiges Verbrauchsmaterial wurde ebenfalls von der Firma Sarstedt erworben.

Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
10 µl Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
100 µl Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1000 µl Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterican Gr. 18 (26Gx1)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
70 µl Zellsieb	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Centricons Amicon-Ultra 15 (30 kDa)	Millipore, Bradford, USA
Dialysemembran Membra-Cel™, 44 mm, 30 m	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Microvette®500 K3E	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Feindosierungsspritze Omnican F (30Gx1/2)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Spritzen (1 mL, 20 mL)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Falcons (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
F-Boden 96-Well Suspensionsplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FEATHER Einmal-Skalpell	pfm medical, Köln, Deutschland
Filtropur V50, Vakuumfiltrationseinheit, 500 ml, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
flachbodige 96-Well Maxisorp NUNC-Immuno Platte	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>gentleMACS™ C Tube</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Klebefolie	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Lanzette, 4,0 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
LD-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

MS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Objektträger, Menzel Gläser (76x26 mm)	Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA
Pap-Stift	Merck, Darmstadt, Deutschland
Petrischalen (3 cm, 6 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Protein G Sepharose Säule	Amersham Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL, 5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>RNase-Away</i> Spray	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
S Handschuhe	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Superfrost Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Firma
2N NaOH-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Affi-Gel 10 Gel	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Albumin Fraktion V, biotinfrei, NZ-Origin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Atipamezol	Vetoquinol, Lure, Frankreich
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DAPI Fluoromount-G®	SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz-Lösung (0,1 N)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥ 99,8 % vergällt 5l	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 % vergällt 5l	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Faramount Einbettmedium, Aqueous	Dako, Glostrup, Dänemark
Fc Blockierungsreagenz, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Fixierbarer Lebendfarbstoff 620	BD Bioscience, Becton, New Jersey, USA

Fixierbarer Lebndfarbstoff 780	BD Bioscience, Becton, New Jersey, USA
Fixierungspuffer	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fötales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Gibco™ DPBS, ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Haemalaum, acidic Mayer	Waldeck, Münster, Deutschland
HEPES Puffer	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Kaninchen Referenzserum	Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA
Ketamin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Medetomidin	Vetoquinol, Lure, Frankreich
MEM NEAA (100x)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Moviol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl 0,9 % Fresenius Spüllösung	Fresenius Kabi, Frankreich
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Merck Biochrom, Berlin, Deutschland
<i>Pepsin Solution Digest-All™3 Ready to Use</i>	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Polyethylenglykol 20.000	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Proleukin®	Novartis, Basel, Schweiz
Propidiumjodidlösung	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Protein G Sepharose	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
<i>Red blood cell lysis solution</i> (RBCL-Puffer; Rote Blutzellen Lysispuffer)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
rekombinantes Maus Interleukin-2 (rm IL-2)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
rekombinantes murines COL7 ^{C-GST}	Eigenproduktion durch Claudia Kauderer nach Sitaru et al. [179]
rekombinantes murines COL7 ^{VWFA2}	Eigenproduktion durch Claudia Kauderer nach Kasprick et al. [165,193,201] (siehe auch 3.3.1.1)
ROTI®Histofix 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

ROTI®-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
RPMI w/o Phenolred mit L-Glutamin	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
Salzsäure (2 N)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin Protein, DyLight™ 594	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
TiterMax® klassisches Adjuvanz, flüssig	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
TMB One Solution (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Tris Base	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % (stab.) reinst	Chemsolute/Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Xylazin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Ziegenerum	Dako, Glostrup, Dänemark

3.2.4 Kits

Alle hier aufgelisteten Kits wurden, wenn nicht anders im Methodenteil beschrieben, nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Tab. 4: Liste der verwendeten Kits

Kit	Firma
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatorischer T Zell-Isolationskit, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CellTrace CFSE Zell-Proliferationskit	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNase I Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
FoxP3 Färbepuffer-Set	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Kaninchen IgG ELISA Quantifikationsset	Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA
LEGENDplex™ benutzdefinierter Maus 10-plex Panel (IL-1β, IL-4, IL-1α, IFN-γ, TNF-α, CXCL1, IL-10, IL-13, IL-17A und GM-CSF)	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA

LEGENDplex™ Maus Th Zytokinpanel (12-plex) V03 mit V-Bodenplatte	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Multi-Gewebedissoziationskit 1	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Neutrophil-Isolationskit, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Pan T Zell-Isolationskit II, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Qubit RNA Integritäts- und Qualitätstestkit	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Qubit™ RNA BR Testkit	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
SignalStain Boost IHC Detektionsreagenz (HRP, Rabbit)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
SignalStain DAB Substratkit	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Treg Expansionskit, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

3.2.5 Antikörper

Alle Antikörper wurden vor Verwendung in ihren entsprechenden Experimenten in Etablierungsversuchen hinsichtlich ihrer Verdünnung und Versuchsbedingungen für jede jeweilige Versuchsart optimiert.

Tab. 5.1: Liste der *in vivo* verwendeten Antikörper

Antigen	Spezies/Isotyp	Klon	Firma
IL-2, murin	Ratte IgG2a, κ	JES6-1A12	BioCell Technology, Irvine, Kalifornien, USA
normales Kaninchen IgG	Kaninchen		Eigenproduktion durch Claudia Kauderer und Alexandra Wobig nach Kasprick et al. [201] (siehe auch 3.3.1.2)
spezifisches anti-Maus COL7 ^{c-GST} IgG	Kaninchen		Eigenproduktion durch Alexandra Wobig und Claudia Kauderer nach Sitaru et al. [179] (siehe auch 3.3.1.2)

Tab. 5.2: Liste der verwendeten Antikörper für Durchflusszytometrie

Antigen	Spezies/Isotyp	Klon	Konjugat	Firma
Arginase-1, murin/human	Schaf IgG	polyklonal	APC	R&D Systems, Minnesota, USA
CCR10, murin	Ratte IgG2 β	IgG2A	PE	R&D Systems, Minnesota, USA
CD11b, murin/human	Ratte IgG2 β , κ	M1/70	Brilliant Violet 510 TM	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
CD18, murin	Ratte IgG2a, κ	M18/2	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD183 (CXCR3), murin	Armenischer Hamster IgG	CXCR3-173	APC/Fire TM 750	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
CD194 (CCR4), murin	Armenischer Hamster IgG	2G12	PE-Cy TM 7	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
CD196 (CCR6), murin	Armenischer Hamster IgG	29-2L17	Brilliant Violet 421 TM	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
CD206 (MMR), murin	Ratte IgG2a, κ	C068C2	Brilliant Violet 421 TM	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
CD25, murin	Human IgG, rekombinant	REAffinity TM	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD3 ϵ , murin	Human IgG, rekombinant	REAffinity TM	PE-Vio [®] 770	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4, murin	Human IgG, rekombinant	REAffinity TM	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4, murin	Ratte IgG2 β , κ	GK1.5	PerCP	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
CD4, murin	Human IgG, rekombinant	REAffinity TM	VioBlue [®]	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD45, murin	Ratte IgG2 β , κ	30F11	VioGreen TM	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD8a, murin	Human IgG, rekombinant	REAffinity TM	VioGreen TM	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
FoxP3, murin	Human IgG, rekombinant	REAffinity TM	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Helios, murin/human	Human IgG, rekombinant	REAffinity TM	PE-Vio [®] 615	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
IFN- γ , murin	Ratte IgG1 κ	XMG1.2	PE	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
IL-10, murin	Ratte IgG2 β , κ	JES5-16E3	APC	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA

IL-4, murin	Ratte IgG1κ	11B11	PE-Cy™7	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
iNOS, murin	Ratte IgG2a, κ	CXNFT	PE	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
LAP (TGF-β1) Antibody, murin	Maus IgG1κ	TW7-16B4	Brilliant Violet 421™	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ly6C, murin	Ratte IgMκ	AL-21	FITC	BD Bioscience, Becton, New Jersey, USA
Ly6C, murin	Ratte IgG2α	1G7.G10	VioGreen™	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Ly6G, murin	Ratte IgG2α	1A8	APC-Vio® 770	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Ly6G, murin	Ratte IgG2a, κ	1A8	PE-Cy™7	BD Bioscience, Becton, New Jersey, USA
TNF-α, murin	Ratte IgG1κ	MP6-XT22	PE-Cy™7	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA

Tab. 5.3: Liste der verwendeten Antikörper für immunhistochemische bzw. Immunfluoreszenz-Färbungen

Antigen	Spezies/Isotyp	Klon	Konjugat	Firma
C3, murin	Ziege IgG	Polyklonal	FITC	MP Biomedicals, Irvine, Kalifornien, USA
CD3ε, murin	Armenischer Hamster IgG	145-2C11	Biotin	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
F4/80, murin	Ratte IgG2β	A3-1		Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
FoxP3, murin	Kaninchen IgG, rekombinant	EPR22102-37		Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
IgG (H+L), Kaninchen	Esel IgG	Polyklonal	FITC	Jackson Immuno Research, Ely, Vereinigtes Königreich
IgG (H+L), Ratte	Ziege IgG	Polyklonal	Alexa Fluor® 594	Jackson Immuno Research, Ely, Vereinigtes Königreich
Ki-67, murin	Ratte IgG2a, κ	16A8		Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ly6G, murin	Ratte IgG2a, κ	1A8		Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Isotypkontrolle, murin	Armenischer Hamster IgG	HTK888	Biotin	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA

Isotypkontrolle, murin	Kaninchen IgG, rekombinant	EPR25A	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Isotypkontrolle, murin	Ratte IgG2a, κ	RTK2758	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA

3.2.6 Puffer und Medien

Alle Puffer wurden mit ddH₂O angesetzt, entweder unter sterilen Bedingungen unter einer Zellkulturwerkbank und/oder anschließend steril filtriert. Medien für *in vitro* bzw. *in vivo* Versuche wurden immer steril unter einer Zellkulturwerkbank hergestellt. Alle Puffer und Medien wurden vor Verwendung in kleinere Volumina aliquotiert.

Tab. 6: Liste der selbst angesetzten Puffer und Medien

Puffer/Medium	pH-Wert	Zusammensetzung
PBS	7,2	1,3 mM NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O, 136,89 mM NaCl
PBS-T	7,2	0,05 % Tween20 (v/v) in PBS
FACS-Puffer	7,2	0,5 % BSA (w/v) in PBS
MACS-Puffer	7,2	0,5 % BSA (w/v), 2 mM EDTA in PBS
Blockierungspuffer	7,2	1 % BSA (w/v) in PBS-T
TBS	7,6	50,35 mM Tris Base, 150,58 mM NaCl
TBS-T	7,6	0,05 % Tween20 (v/v) in TBS
Bindungspuffer		20 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl
Neutralisationspuffer	9,0	1 M Tris-HCl
MOPS-Puffer	7,5	0,1 M MOPS, 0,08 M CaCl ₂
Waschpuffer		0,1 % Triton-X-100 (v/v) in 850 nM NaCl
Elutionspuffer	2,8	0,1 M Glycin
Bicarbonatpuffer	9,6	0,05 M Na ₂ CO ₃ , 0,05 M NaHCO ₃
10 mM Na-Citrat Puffer	6,0	0,05 % Tween20 (v/v) in 10 mM Tri Sodium Citrate
Tris-EDTA Puffer	9,0	0,05 % Tween20 (v/v), 10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA (v/v)
CL-Medium		25 mM HEPES, 1 % FCS (v/v) in RPMI w/o Phenolrot mit L-Glutamine
T Zellmedium		10 % FCS (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v), 1 % NEAA (v/v) in RPMI 1640 mit L-Glutamine

3.2.7 Software

Tab. 7: Liste der verwendeten Software

Software	Version
GraphPad Prism	Version 9.4.1
LEGENDplex™ Data Analysis Suite	https://legendplex.qognit.com/ , 01.10.2022
MACSQuantify	Version 2.13.0
MS Office Package	Version 2211
R Studio für Windows	2022.12.0-353
R Paket: DESeq2	Version 3.16
R Paket: ggplot2	Version 3.4.0
Salmon	Version 1.10.0
WebGestalt	https://www.webgestalt.org/ , 01.03.2023

3.3 Methoden

3.3.1 *in vivo* Versuche

3.3.1.1 Induktion des immunisierungs-induzierten EBA-Mausmodells

Produktion des Autoantigens mCOL7^{vWFA2}

Das zu injizierende Autoantigen mCOL7^{vWFA2} bildet eine Unterdomäne der NC1 Domäne des mCOL7 Antigens (Abbildung 4). Es wurde, wie in etablierten Protokollen beschrieben [165,193,201], rekombinant in *E. coli* ER2566 produziert und anschließend über seinen N-terminalen Anhang von fünf zusätzlichen Aminosäuren [GRAMG] affinitätsaufgereinigt. Die Produktion und Aufreinigung erfolgte durch die technische Angestellte Claudia Kauderer. Das aufgereinigte und aufkonzentrierte Autoantigen wurde anschließend in einer Konzentration von 2 mg/ml in PBS (pH 7,2) bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

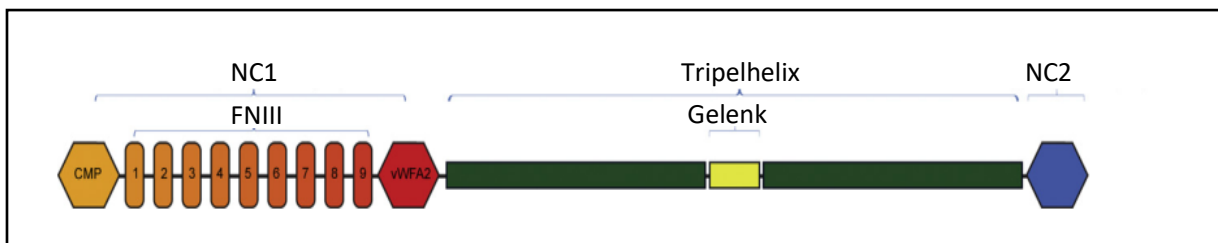


Abb. 4: Schematische Darstellung des Typ-VII-Kollagens. Typ VII-Kollagen enthält drei identische α -Ketten. Die 145-kDa-Tripelhelix wird von zwei nicht-kollagenen Domänen flankiert: einer 145-kDa-N-terminalen nicht-kollagenen 1-Domäne (*non-collagenous*; NC1) und einer 34-kDa-C-terminalen nicht-kollagenen 2-Domäne (NC2). Die NC1-Domäne umfasst ein Knorpelmatrixprotein (*cartilage matrix protein*; CMP), neun Fibronectin-III-ähnliche (FNIII) Domänen, eine von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne (vWFA) und eine Cystein- und Prolinreiche Domäne. Die Tripelhelix enthält eine 39 Aminosäuren lange Gelenkregion. Die NC2-Domäne am C-Terminus wird teilweise proteolytisch verarbeitet, bevor sie eine Disulfidbindung mit einer anderen NC2-Domäne bildet. Die NC1-Domäne am N-Terminus interagiert mit der Basallamina (Laminin-332 und Typ-IV-Kollagen) bzw. in geringerem Maße mit Typ-I-Kollagen. Modifiziert nach [161,193].

Herstellung der Emulsion des Autoantigens mCOL7^{vWFA2} in TiterMax

Das Autoantigen mCOL7^{vWFA2} wurde vor der Injektion in einem Verhältnis von 1:1 in dem Adjuvans TiterMax mit einer anschließenden Endkonzentration von 1 mg/ml emuliert.

Für die Herstellung der Emulsion von mCOL7^{vWFA2} in TiterMax wurde das Antigen auf 4 °C aufgetaut und anschließend zu dem entsprechenden Volumen an TiterMax gegeben. Die Emulsion wurde über Nacht bei 4 °C geschüttelt, bis eine homogene Lösung entstand und keine Trennung der beiden Schichten mehr stattfand. Die Vorbereitung der Emulsion des Autoantigens in TiterMax wurde von der technischen Angestellten Alexandra Wobig durchgeführt. Die Lagerung bis zur Injektion erfolgte auf Eis.

Immunisierung der Mäuse mit dem Autoantigen mCOL7^{vWFA2}

Für das immunisierungs-induzierte EBA-Mausmodell (Ag-EBA) wurden mindestens acht Wochen alte B6.S Mäuse beider Geschlechter verwendet. Für die Immunisierung wurden die Mäuse zunächst in Narkose gelegt (siehe auch 3.3.1.3). Sobald die zu injizierende Maus in tiefer Narkose war und keine Augenreflexe mehr zeigte, wurde, wie beschrieben [166], mit der Injektion des Autoantigens mCOL7^{vWFA2} begonnen. Dafür wurde die vorbereitete Emulsion in einer 1 ml Spritze aufgezogen und anschließend langsam je 60 µL s.c. in beide Fußsohlen der Hinterläufe injiziert, was einer Gesamtmenge von 120 µg mCOL7^{vWFA2} entsprach. Zur Beendigung der Behandlung wurden den Mäusen Bepanthen Augen- und Nasensalbe auf die Augen aufgetragen und nach Applikation des Antisedans Atipamezol (siehe auch 3.3.1.3) unter Rotlicht gestellt, bis sie wieder vollständig aus der Narkose erwacht waren. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte ebenfalls durch Alexandra Wobig.

3.3.1.2 Induktion des Ak-EBA-Mausmodells

Generierung von anti-mCOL7^{c-GST} Antikörpern

In *E. coli* rekombinant produziertes mCOL7^{c-GST} Autoantigen (hergestellt durch Claudia Kauderer nach Sitaru et al. [179]) wurden zur Eurogentec GmbH (Köln, Deutschland) zur Immunisierung von Neuseeländischen weißen Kaninchen geschickt. Das mCOL7^{c-GST} wurde in einer Menge von 250 µg, gelöst in kompletten Freund-Adjuvans, s.c. in die Kaninchen injiziert. Es erfolgte ein dreimaliges Boostern alle 14 Tage (250 µg, gelöst in inkompletten Freund-Adjuvans, s.c.). Den Kaninchen wurden in dreiwöchigen Abständen Serum entnommen und dieses wurde zurück zum Lübecker Institut der Experimentellen Dermatologie (LIED; Deutschland) geschickt.

Aufreinigung von spezifischen anti-mCOL7^{c-GST} Antikörpern

Die Aufreinigung von spezifischen Kaninchen anti-mCOL7^{c-GST} IgG erfolgte nach etablierten Protokollen [179] und wurde von Alexandra Wobig bzw. Claudia Kauderer durchgeführt.

Zunächst wurde Kaninchen anti-mCOL7^{c-GST} Immun-IgG über eine Protein G Affinitäts-Chromatografie aufgereinigt. Dafür wurde zuerst die Protein G-Agarose auf der Säule mit Waschpuffer äquilibriert. Die Kaninchenserum wurden anschließend in PBS verdünnt und mit der Protein G-Agarose in der Säule vermischt und für eine Stunde bei 4 °C schwenkend inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit Waschpuffer gespült, bis die optische Dichte (OD) unter 0,05 lag. Das an die Säulenmatrix gebundene Immun-IgG wurde mit 0,1 M Glycin-Puffer bis zu einer OD von 0,1 in ein Auffanggefäß mit 3 ml vorgelegtem Neutralisationspuffer herausgewaschen. Der pH-Wert der IgG-Lösung wurde anschließend mit Hilfe des Neutralisationspuffers auf 7,2 eingestellt und für 2 Stunden in Polyethylenglykol in einer Dialysemembran Membra-Cel™ (44 mm) aufkonzentriert. Als letzten Schritt für die Aufreinigung des anti-mCOL7^{c-GST} Immun-IgG wurde es unter Verwendung von *Amicon-Ultra Centricons 15* (30 kDa) durch Ultrazentrifugation von 4000 rpm bei 4 °C aufkonzentriert

und auf PBS umgepuffert. Die IgG Konzentration wurde an einem NanoDrop bei A280 mit PBS als Leerwert und einem Korrekturkoeffizienten von 0,74 bestimmt.

Als zweiten Schritt wurde das spezifische mCOL7^{c-GST} IgG über eine weitere Affinitäts-Chromatografie durch mit mCOL7^{c-GST}-gekoppelten Affi-Gel 10 nach Angaben des Herstellers mit geringfügigen Änderungen gewonnen. Kurz zusammengefasst wurden dafür 5 mg/ml mCOL7^{c-GST} in MOPS-Puffer eine Stunde lang in ebenfalls MOPS-gepufferten Affi-Gel 10 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine ebenfalls einstündige Inkubation in einer 1:20 Lösung von MOPS-Puffer und Ethanolamin, gefolgt von einem Wasch-Schritt in PBS. Zur Aufreinigung des spezifischen mCOL7^{c-GST} IgG wurde das zuvor gewonnene Immun-IgG eine Stunde lang mit dem vorbereiteten mCOL7^{c-GST} Affi Gel 10 bei 4 °C unter sanftes Schütteln inkubiert. Es folgte ein weiterer Wasch-Schritt mit PBS und anschließend ein Waschen der Säule mit Waschpuffer, bis die OD unter 0,01 lag und damit das unspezifische IgG vollständig herausgewaschen war. Das spezifische mCOL7^{c-GST} IgG wurde mit Hilfe des Elutionspuffer aus der Säule gewaschen. Zuletzt wurde der pH-Wert mit Neutralisationspuffer auf 7,2 eingestellt und das IgG unter Verwendung eines *Amicon-Ultra Centricons 15* auf die gewünschte Konzentration aufkonzentriert. Das IgG wurde steril-filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach Auftauen wurde es unter sterilen Bedingungen bei 4 °C weiter aufbewahrt.

Injektion der spezifischen anti-mCOL7^{c-GST} Antikörper

Für das Ak-EBA-Mausmodell wurden Mäuse der Linie C57BL/6J und heterozygote FoxP3-Reportertiere sowie Wildtyp-Geschwistertiere beiderlei Geschlechts ab einem Alter von acht Wochen verwendet.

Zur Induktion der Erkrankung wurden die aufgereinigten spezifischen mCOL7^{c-GST} Autoantikörper in einer zuvor getesteten Konzentration und Häufigkeit je nach IgG Charge in einem Volumen von 100 µL i.p. in die wachen Mäuse injiziert. Dies waren je 100 µg an den Tagen Null, Zwei, Vier, Sechs und Acht für den Therapieversuch mit der niedrig-dosierten IL-2 Gabe in heterozygote FoxP3-Reportertiere. Im Therapieversuch unter Anwendung eines adoptiven Treg Transfers wurden je 100 µg an den Tagen Null, Zwei und Vier in Wildtyp-Geschwistertiere injiziert. Das gleiche Injektionsschema wurde im Experiment zur Untersuchung der Treg Expression in den verschiedenen lymphatischen Organen über die Zeit in ebenfalls heterozygoten FoxP3-Reportertieren angewendet. Als Negativkontrolle wurde im letztgenannten Versuch normales Kaninchen IgG (*normal rabbit IgG*; NR IgG) in derselben Konzentration und Häufigkeit verwendet.

Die oben genannte Testung der aufgereinigten mCOL7^{c-GST} IgGs erfolgte im Rahmen des Tierversuchs (26-4/20) an C57BL/6 Mäusen. In diesem Versuch wurden von einer Charge jeweils an drei Mäusen die drei Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 1,5 mg/ml an den Tagen Null, Zwei und Vier injiziert. Wenn dabei am vierten Tag noch keine ausreichende Erkrankung von zumindest ein Prozent mit EBA betroffener Körperoberfläche in zwei der verwendeten Konzentrationen festgestellt werden konnte (siehe auch 3.3.1.4), erfolgten weitere Injektionen an Tag Sechs und Acht (Abbildung 5). Von diesen Mäusen wurden Lymphknoten und Haut für die weiteren *in vitro* Versuche entnommen (siehe auch 3.3.1.7).

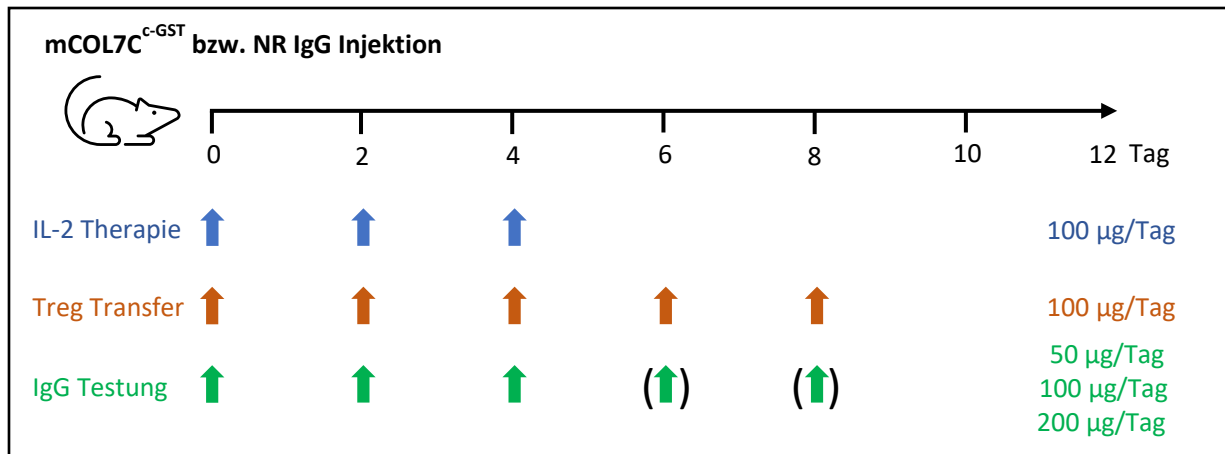


Abb. 5: Schematische Darstellung der mCOL7C^{C-GST} bzw. normales Kaninchen IgG Injektion in den einzelnen Versuchsteilen im Ak-EBA-Mausmodell. Je nach IgG Charge wurden 100 µl aufgereinigtes mCOL7C^{C-GST} bzw. normales Kaninchen IgG (normal rabbit IgG; NR IgG) jeweils an den Tagen Null, Zwei und Vier in einer Konzentration von 1 mg/ml für den Therapieversuch mit niedrig-dosiertem IL-2 und je 100 µl aufgereinigtes mCOL7C^{C-GST} in der gleichen Konzentration an den Tagen Null, Zwei, Vier, Sechs und Acht für die Therapie mittels adoptiven Treg Transfers i.p. injiziert. Für die Chargen-Testung der aufgereinigten mCOL7C^{C-GST} IgGs wurden jeweils 100 µl von drei verschiedene Konzentrationen (0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 1,5 mg/ml) an den Tagen Null, Zwei und Vier i.p. injiziert. Abhängig vom EBA-Score an Tag Vier wurde hier die Injektion an den Tagen Sechs und Acht fortgesetzt. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

3.3.1.3 Narkosebehandlung der Mäuse

Je nach Tierversuch wurden zwei unterschiedlich Narkosemittel verwendet. Bei dem Tierversuch (28/4-18) wurden 15 µg/g Körpergewicht (KG) Xylazin und 100 µg/g KG Ketamin in einem Injektionsvolumen von 200 µl i.p. injiziert. Das andere Narkosemittel im Rahmen des Tierversuches (26-4/20) bestand aus 75 µg/g KG Ketamin und 1 µg/g KG Medetomidin, welches ebenfalls i.p. in einem Volumen von 100 µl injiziert wurde. Diese Anästhesie war durch das verwendete Medetomidin antagonisierbar, weshalb hier 30 Minuten nach Gabe des Narkosemittels 5 µg/g KG Atipamezol (Antisedan) i.p. in einem Volumen von 50 µl verabreicht werden konnte. Dies beschleunigte das Aufwachen der Mäuse aus der Narkose und verbesserte das Erholen aus derselben.

Die Mäuse wurden zu einem für die Immunisierung mit dem Autoantigen mCOL7^{VWFA2} in die Fußsohlen narkotisiert, sowie jeweils für die Beurteilung der EBA-betroffenen Körperoberfläche (siehe auch 3.3.1.4). Dies erfolgte im Ag-EBA-Mausmodell ab Woche Drei einmal wöchentlich und im AK-EBA-Mausmodell an den Tagen Vier, Acht und Zwölf.

Nach der Beurteilung der Mäuse wurden den schlafenden Tieren Augensalbe gegen Austrocknung der Augen aufgetragen. Um ein Auskühlen entgegenzuwirken, wurden die Käfige bis zum Aufwachen der Mäuse unter Rotlicht gestellt.

3.3.1.4 Belastungsbewertung der Mäuse in den verwendeten EBA-Mausmodellen

Allgemeine Belastungsbewertung

Die Mäuse wurden während der Versuche hinsichtlich ihrer Belastung im Vergleich zu Tag Null in regelmäßigen Abständen bewertet: im Ag-EBA-Mausmodell geschah dies die ersten drei Tage täglich, anschließend bis Tag 28 zweimal wöchentlich und zuletzt einmal wöchentlich. Im Ak-EBA-Modell wurde die Belastung an Tag Vier, Acht und Zwölf erfasst.

Die Bewertung umfasste zu einem eine mögliche Gewichtsabnahme, das Allgemeinbefinden hinsichtlich des Aussehens der Maus, das Spontanverhalten, das klinische Befinden unter Betrachtung der Atmung und der Temperatur und die Belastung ausgehend von der induzierten EBA. Bis auf letzteren Punkt wurden alle Bewertungskriterien am wachen Tier untersucht. Alle einzelnen Kriterien wurden nach einem Punktesystem bewertet und die Summe ergab die totale Belastung der Maus. Dabei galt, dass null Punkte keiner Belastung entsprachen, eine geringe Belastung lag mit 1-10 und eine mittlere Belastung mit 11-20 Punkten vor. Über 20 Punkten definierte eine schwere Belastung und galt als Abbruchkriterium, wenn nach spätestens einem Tag keine Besserung zu einer mittleren Belastung erfolgte. Wenn die Bewertung unter Narkose des Tieres stattfand, wurde ebenfalls eine Fotodokumentation des Tieres durchgeführt.

Belastungsbewertung der von EBA betroffenen Körperoberfläche

Um den Grad der Erkrankung der EBA zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche an der narkotisierten Maus nach einem etablierten Protokoll erfasst [202]. Dafür wurden die unterschiedlichen Körperpartien auf Hautläsionen, Blasen, Schorfbildung und Haarverlust untersucht und bestimmt, wie viel Prozent die betroffene Stelle von dieser Körperpartie einnimmt. Dieser Wert wurde anschließend mit einem für diesen Körperteil definierten Faktor multipliziert: für jedes Ohr 0,025, für jedes Auge 0,005, orale Mukosa 0,025, Schnauze 0,025, Kopf mit einschließlich Nacken 0,09, jedes Vorderbein 0,05, jedes Hinterbein 0,1, Schwanz 0,1 und der restliche Torso 0,4. Die Summe der einzelnen Multiplikationen ergab zuletzt die mit EBA betroffenen Körperoberfläche der Maus (Abbildung 6). Im Ag-EBA-Mausmodell wurde diese Bewertung einmal wöchentlich ab Woche Drei und im Ak-Modell an den Tagen Vier, Acht und Zwölf durchgeführt. In den Versuchen mit unterschiedlichen Behandlungsgruppen erfolgte dies von einer geblindeten Person.

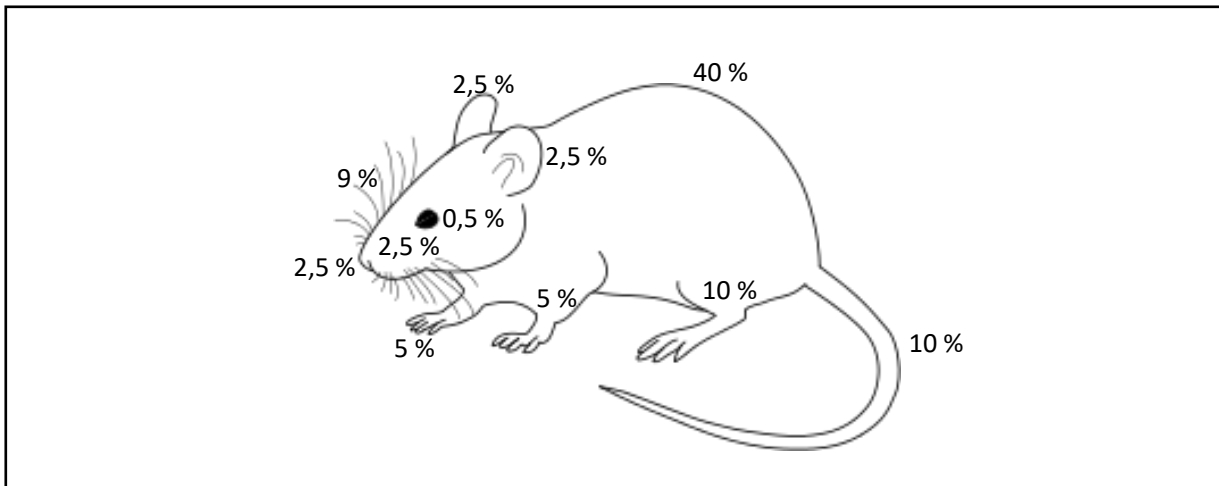


Abb. 6: Prozentualer Anteil der einzelnen Körperregionen einer Maus an ihrer Gesamtoberfläche. Angegeben sind die einzelnen Körperpartien einer Maus, an denen jeweils isoliert der Anteil an mit EBA-betroffenen Körperoberfläche erfasst wurde. Diese einzeln erfassten Werte wurden mit den für den jeweiligen spezifischen prozentualen Anteil an Gesamtoberfläche multipliziert und am Ende addiert, um die totale mit EBA betroffene Körperoberfläche zu erhalten.

3.3.1.5 Präventive Behandlung mit einem IL-2-Antikörperkomplex oder niedrigdosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell

Zur Etablierung einer Treg Behandlung mit IL-2 wurden entweder niedrig dosiertes IL-2 oder einen IL-2-Antikörperkomplex im Ak-EBA-Mausmodell verwendet. Die Induktion polyklonaler Treg erfolgte dabei präventiv.

Es wurden für die Anwendung mit IL-2-Antikörperkomplex zwei Konzentrationen getestet, da hier die Publikationen hinsichtlich der Konzentrationen stark variieren [203,204]. Für die Anwendung von niedrigdosiertem IL-2 hingegen wurde nur eine Konzentration angewendet.

Die Antikörperkomplexe wurden unter sterilen Bedingungen vorbereitet: rekombinantes murines IL-2 (rm-IL2; 0,1 µg/µl) und anti-IL-2 mAk (0,1 µg/µl bzw. 1 µg/µl) wurden in ihren entsprechenden Konzentrationen getrennt aliquotiert und nach Herstellerangaben gelagert (rm-IL-2 bei -20 °C und anti-IL-2 mAk bei 4 °C). Kurz vor Injektion wurden die benötigten Mengen von rm-IL-2 und anti-IL-2 zusammengemischt und mit DPBS auf ein Endvolumen von 100 µl pro Injektion aufgefüllt. Für eine erfolgreiche Komplexbildung wurde das Gemisch anschließend direkt vor Gabe für 30 Minuten bei 37 °C im Zellinkubator inkubiert. Die Injektion in die Mäuse erfolgte i.p.

Proleukin S wurde entsprechend der Herstellerangaben gelöst und vorbereitet. Da das gelöste Pulver nur eine Haltbarkeit von 24 Stunden aufwies, wurde es jeweils frisch an einem Behandlungstag angesetzt und für diesen, sowie den darauffolgenden Tag verwendet. Die Lösung erfolgte in einer sterilen 0,9 %-igen NaCl-Lösung mit einer Endkonzentration von 5000 IU/µl. Anschließend erfolgte wieder ein Auffüllen mit DBPS auf ein Endvolumen von 100 µl pro Injektion. Die nicht sofort verwendete Dosis wurde bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert. Die Gabe erfolgte ebenfalls i.p.

Der Versuch wurde an heterozygoten FoxP3-Reportertieren mit Acht bis Neun Mäusen pro Gruppe in insgesamt vier Gruppen vorgenommen. In allen Gruppen wurde, wie oben beschrieben das Ak-Mausmodell induziert (Tag Null) und es wurden drei verschiedene Behandlungsstrategien mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen: (i) die erste Therapiegruppe bekam eine niedrige Dosis des IL-2-Antikörperkomplex von 1 µg IL-2 und 5 µg des murinen IL-2 Antikörpers (anti-IL-2 mAk) vom Klon JES6-1A12 (1 µg IL-2/5 µg anti-IL-2 mAk) einmal täglich an den Tagen -5 bis -3 [203]. (ii) Die zweite Gruppe wurde mit einer höheren Dosis des Komplexes von 1,5 µg IL-2/50 µg anti-IL-2 mAk an den Tagen -2 bis 5 [204] behandelt. (iii) Die Dritte Therapiegruppe bekam die niedrigdosierte Dosis von IL-2 in Form von 25.000 IU Proleukin S an den Tagen -2 bis 2 [205] (Abbildung 7).

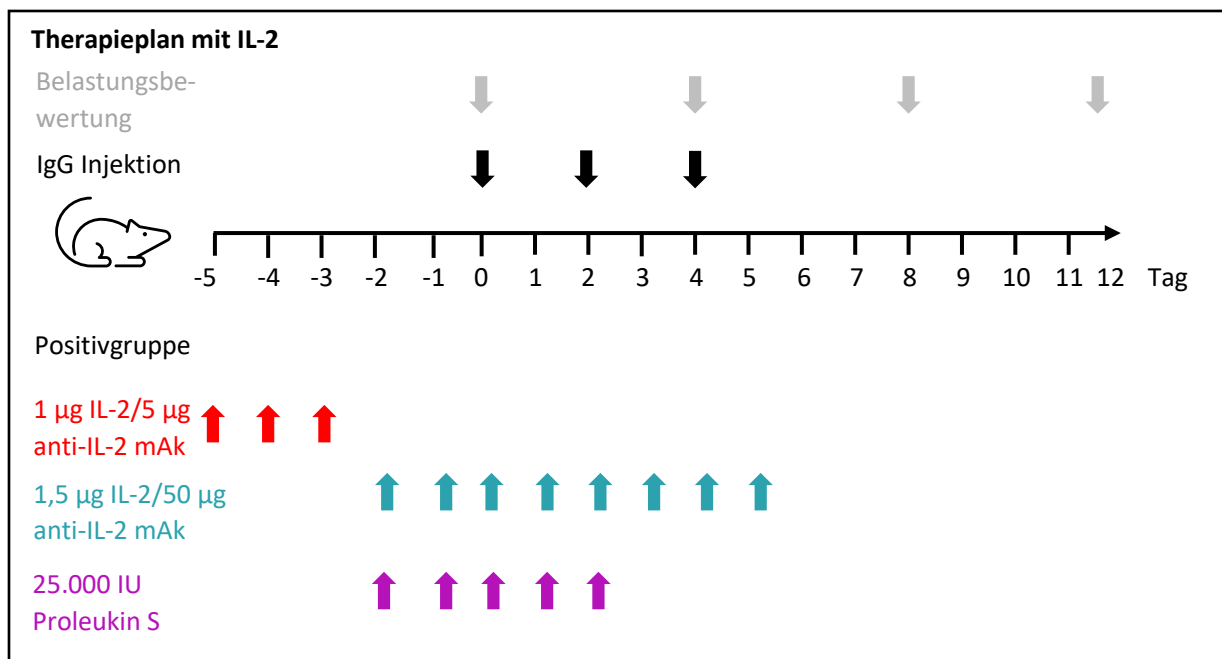


Abb. 7: Schematischer Zeitplan für die präventive Behandlung mit einem IL-2/ anti-IL-2 Antikörperkomplex oder niedrigdosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell. Abgebildet sind die drei Therapiegruppen (1 µg IL-2/5 µg anti-IL-2 mAk (rot), 1,5 µg IL-2/50 µg anti-IL-2 mAk (blau) und 25.000 IU Proleukin S (violett)) mit der Angabe an welchem Tag die Therapie stattfand und die Positivgruppe. In allen vier Gruppen wurde 100 µl aufgereinigtes mCOL7C^{C-GST} bzw. normales Kaninchen IgG (*normal rabbit IgG*; NR IgG) jeweils an den Tagen Null, Zwei und Vier in einer Konzentration von 1 mg/ml i.p. injiziert. Die Belastungsbewertung zu Tag Null fand an den Tagen Vier, Acht und Zwölf (Versuchsende) unter Narkose statt. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

3.3.1.6 Präventiver adoptiver Transfer polyklonaler Tregs im Ak-EBA-Mausmodell

Zum adoptiven Transfer wurden zunächst von unbehandelten heterozygoten FoxP3-Reportertieren polyklonale Tregs gewonnen. Dafür wurden die Spendertiere in Narkose getötet und ihre mesenterialen, inguinalen und poplitealen Lymphknoten entnommen (siehe auch 3.3.1.7), um eine Einzelsuspension herzustellen (siehe auch 3.3.2.2). Die Anzahl der Spendertiere entsprach dabei 1:1 zu den späteren Empfängertieren.

Die Einzelsuspensionen aller Tiere wurden zusammengeführt und anschließend unter Verwendung des „CD4+CD25+ Regulatorischer T Zell-Isolationskit, Maus“ unter Herstellerangaben die Tregs isoliert. Die Zellen wurden in allen folgenden Schritten auf Eis gehalten. Die gewonnenen Tregs wurden auf 5 ml mit DPBS aufgefüllt und 200 µl davon am MACSQuant Analyzer 10 mit Hilfe der Zählfunktion gezählt. Etwa 10^5 Zellen wurden für eine Reinheitsmessung entnommen. Der Rest der Tregs wurden mit *CellTraceTM* CFSE von *invitrogen* nach Herstellerangaben markiert. Zur Überprüfung der CFSE⁺-Markierung wurden wieder bis zu 10^5 Zellen für eine Reinheitsmessung entnommen. Die in diesem Abschnitt erwähnten Methoden werden unter 3.3.2 genauer beschrieben.

Wenn die Reinheit der Tregs mindestens 85 % und die CFSE⁺-Markierung über 95 % lag, wurden die CFSE⁺-positiven Tregs für die Injektion vorbereitet. Für den adoptiven Transfer wurden drei Gruppen angesetzt: $0,2 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 . Alle drei Gruppen wurden in einem Volumen von 150 µl in PBS i.v. in eine Schwanzvene injiziert. Die Injektion geschah in entweder C57BL/6 bzw. Wildtyp-Geschwistertiere mit jeweils 9 Tieren pro Gruppe. Eine Kontrollgruppe aus ebenfalls 9 Tieren bekam 150 µl DPBS i.v. injiziert.

Für die i.v. Injektion wurden die wachen Empfängertiere in eine Mausinjektionskäfig gesetzt, wobei der Schwanz außerhalb der Röhre lag und festgehalten werden konnte. Um die Venen besser sichtbar zu machen, wurde der Schwanz für etwa 20 Sekunden mit Rotlicht bestrahlt. Anschließend erfolgte die Injektion in einer der seitlichen Schwanzvenen und die Tiere wurden wieder in ihren Käfig zurückgesetzt. Für die Verblindung der Gruppen wurde die Injektion von Dr. Katja Bieber bzw. Dr. Diana Scheppan durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde, wie oben beschrieben, das Ak-EBA-Mausmodell induziert (Abbildung 8).

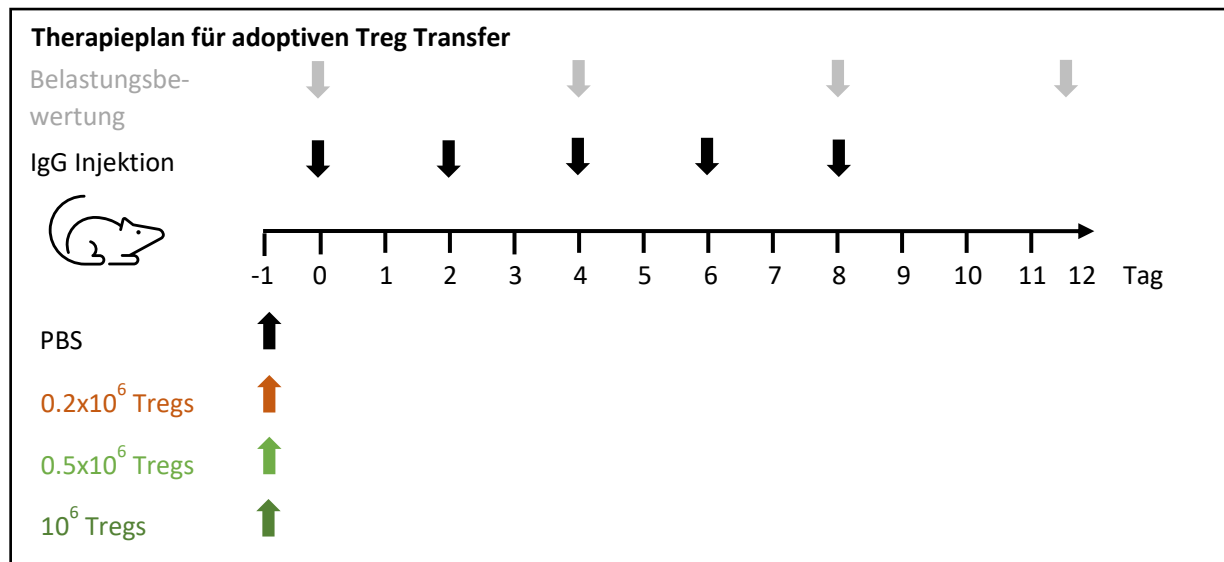


Abb. 8: Schematischer Zeitplan für die präventive Behandlung mittels adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell. Abgebildet sind die drei Therapiegruppen ($0,2 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6) und die Positivkontrolle (PBS). In allen vier Gruppen wurde einen Tag vor Induktion der Ak-EBA (Tag -1) je 100 μ l der entsprechenden Anzahl an isolierten Tregs bzw. DPBS i.v. injiziert. Zur Induktion der EBA wurde jeweils 100 μ l an aufgereinigtem mCOL7C^{C-GST} an den Tagen Null, Zwei und Vier in einer Konzentration von 1 mg/ml i.p. appliziert. Die Belastungsbewertung zu Tag Null fand an den Tagen Vier, Acht und Zwölf (Versuchsende) unter Narkose statt. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

3.3.1.7 Tötung und Probenentnahme

Zur Tötung der Mäuse wurde diese zunächst in Narkose gelegt. Den narkotisierten Mäusen wurde entweder zunächst Blut entnommen, oder sie wurden sofort mit einem Genickbruch getötet. Es folgten je nach Versuch weitere Probenentnahmen der Ohren, Haut, Milz, Lymphknoten und Knochen der Hinterbeine für die Isolation von Knochenmark.

Blutentnahme

Für die Blutentnahme wurde den narkotisierten Mäusen über die *Vena facialis* mit einer Lanzette bis zu 0,5 ml Blut entnommen. Das Blut wurde direkt in ein Microvette[®]500 K3E überführt, welches auf Eis gehalten wurde. Das Röhrchen wurde nach der Blutentnahme für eine Durchmischung des EDTAs mit dem Blut kurz geschüttelt, um einer Gerinnung und damit Verklumpung des Blutes entgegenzuwirken. Das Blut wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Die Maus wurde nach der Entnahme sofort mit einem Genickbruch getötet.

Entnahme der Ohren und Haut

Beide Ohren der getöteten Maus wurden an der Ohr Basis abgeschnitten und die Härchen so gut wie möglich mit einer Schere entfernt. Die Ohren wurden längs in jeweils zwei Hälften geteilt. Die beiden

medialen Hälften wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C. Die lateralen Hälften der Ohren wurden zusammen in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt mit 1,5 ml Histofix überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gehalten.

Für die Hautentnahme wurde entweder gesunde Haut von unbehandelten Mäusen bzw. nicht-läsionale Haut und/oder läsionale Haut von den Mäusen mit induzierter experimenteller EBA entnommen. Zunächst mussten für alle Varianten die Haare so gut wie möglich entfernt werden. Dafür wurden für gesunde bzw. nicht-läsionale Haut die Haare am Rücken mit zwei Fingern herausgezupft. Diese Methode hatte gegenüber Rasieren oder Haarentfernungscreme den Vorteil, dass ebenfalls die Haarwurzeln entfernt wurden. Für die läsionale Haut wurden die umliegenden Haare mit einer Schere so vorsichtig wie möglich entfernt, um das Gewebe nicht zu zerstören. Anschließend wurden die enthaarten Hautpartien herausgeschnitten und entsprechend den Versuchen bzw. gewünschten Proben aufgeteilt: zur Lagerung bei -80 °C für eine spätere Analyse der RNA (siehe 3.3.4) und zur Herstellung von Gewebeschnitten (siehe 3.3.3.2 und 3.3.3.3), zur Fixierung in Histofix, ebenfalls zur Herstellung von Gewebeschnitten (siehe 3.3.3.1 und 3.3.3.3) und/oder den Hautverdau zur Isolation von Einzelzellen (siehe 3.3.2.2). (i) Zur Lagerung bei -80 °C wurde gesunden bzw. nicht-läsionale Haut zurechtgeschnitten (bis zu etwa 0,5 cm x 0,5 cm) und auf ein in flüssigen Stickstoff vorgekühltes Metall zum Vorfrieren gelegt. Dies gewährleistete, dass die Haut glatt blieb. Anschließend wurde die Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im flüssigen Stickstoff eingefroren. Läsionale Haut (Größe variabel, aber auch nicht größer als die gesunde Haut) konnte sofort in den 1,5 ml Reaktionsgefäßen schockgefroren werden. (ii) Zur Fixierung in Histofix wurde etwa die gleiche Menge an gesunder bzw. nicht-läsionaler und läsionaler Haut in 2 ml Reaktionsgefäße mit 2 ml Histofix überführt. Die Lagerung beider Varianten geschah, wie schon bei den Ohren beschrieben. (iii) Für den Hautverdau wurde die gesamte Rückenhaut für gesunde bzw. nicht-läsionale Haut oder so viel wie möglich läsionale Haut in ein 5 ml Reaktionsgefäß mit 2,3 ml RPMI 1640 Medium überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten.

Entnahme der Milz, Lymphknoten und Knochen der Hinterbeine

Die Milz wurde von der Rückenseite aus entnommen. Dafür wurde der Rücken der Maus zunächst mit 70 %-igen Ethanol desinfiziert und anschließend ein Schnitt auf der linken Seite im mittleren Drittel des Rückens in die Körperhöhle gemacht. Die Milz liegt direkt unter dem Bindegewebe und konnte so einfach entnommen werden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml FACS-Puffer auf Eis gehalten.

Es wurden verschiedene Lymphknoten entnommen: mesenteriale, inguinale und/oder popliteale. Für alle drei Varianten wurde die Maus auf den Rücken an den Extremitäten fixiert und mit 70 %-igen Ethanol desinfiziert. Für die inguinalen Lymphknoten wurde die Haut am Bauch mittig aufgeschnitten, ohne die Bauchhöhle zu öffnen. Es wurden oben und unten Schnitte zu beiden Seiten der Maus durchgeführt, um die Haut damit seitlich aufziehen zu können. Die inguinalen Lymphknoten werden

dadurch auf beiden Seiten auf Höhe der Hüfte im einem Aderdreieck unter der Haut sichtbar und konnten herausoperiert werden. Alles übrige Gewebe wurde so säuberlich wie möglich entfernt. Für die poplitealen Lymphknoten wurde die Haut an den Hinterbeinen abgezogen. Damit wurden diese in der Nähe der Kniebeuge sichtbar und konnten ebenfalls herausoperiert werden. Für die mesenterialen Lymphknoten wurde die Bauchhöhle geöffnet und die oberen Darmschlingen des Dünndarms zur Seite gelegt. Die Lymphknoten befinden sich in einer Dreierkette an diesen Darmschlingen in einem Adernetz und können vom umliegenden Fettgewebe durch ihre leicht gelbliche Färbung unterschieden werden. Nach dem Herausoperieren wurden alle Lymphknoten in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 1 ml FACS-Puffer auf Eis überführt.

Zur späteren Gewinnung von Knochenmark aus den Knochen der Hinterbeine wurde, wenn nicht schon geschehen, die Haut an den Hinterbeinen abgezogen. Die Hinterbeine wurden am Hüftgelenk durch einen Schnitt vom restlichen Körper getrennt. Die Muskeln wurden von den Knochen zunächst grob mit einer Schere entfernt und der Fuß unterhalb des Fußgelenks abgeschnitten. Die Knochen wurden von den restlichen Muskeln durch Reiben des Knochens zwischen einem Papiertuch gesäubert. Anschließend konnten Femur und Tibia durch vorsichtiges Herausdrehen am Gelenk voneinander getrennt werden. Alle vier Knochen (Femur und Tibia von beiden Hinterbeinen) wurden bis zur weiteren Verarbeitung in ein 5 ml Reaktionsgefäß gefüllt mit 3 ml FACS-Puffer auf Eis gelagert.

3.3.2 *in vitro* Versuche

3.3.2.1 Blutbildanalyse am scil Vet abc Plus+

Die Blutbildanalyse am scil Vet abc Plus+ wurde in den Laboren der AG Riemekasten in der Klinik für Rheumatologie und klinischen Immunologie, UKSH Lübeck nach deren freundlichen Genehmigung durchgeführt. Dafür wurden etwa 20 µl des zuvor frisch gewonnenen Vollblutes in den Microvetten®500 K3E benötigt. Das Blut wurde in den Röhrchen nochmal kurz sanft geschwenkt und anschließend in das Gerät eingelesen. Das scil Vet abc Plus+ differenzierte anschließend die Blutzellen auf Basis ihrer unterschiedlichen Zellgröße in ein 4-fach Differentialblutbild. Die Messung erfolgte durch Alexandra Wobig.

3.3.2.2 Herstellung von Einzell-Suspensionen

Für die späteren Experimente (siehe 3.3.2.3 – 3.3.2.5) mussten aus dem gewonnenen Blut, der Haut, Milz, den Lymphknoten und Knochen auf Eis Einzell-Suspensionen in DPBS hergestellt werden.

Blutaufbereitung für Durchflusszytometrie

Für die später folgende Durchflusszytometrie (siehe 3.3.2.5) mussten zunächst die Erythrozyten aus dem Blut lysiert werden. Dafür wurden 200 µl des Blutes in 1 ml 1x RBCL-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde bei 400 g, 5 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Zum Entfernen des Überstandes wurde das 1,5 ml

Reaktionsgefäß dekantiert und anschließend, ohne das Gefäß wieder aufzurichten, sanft auf einem Papiertuch abgedrückt. Das Pellet wurde anschließend ein zweites Mal in 1 ml 1x RBCL-Puffer lysiert. Das nun weißliche Zellpellet wurde anschließend in 100 µl DPBS resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Herstellung von Einzell-Suspensionen aus Lymphknoten und Milz

Lymphknoten- und Milzzellen wurden für die Durchflusszytometrie verschiedener Zellisolationen benötigt (siehe 3.3.2.3 und 3.3.2.5). Um Einzell-Suspensionen aus den Organen zu bekommen, wurden diese in eine Petrischale, gefüllt mit DPBS überführt. Lymphknoten und Milzen wurden anschließend in Puffer zwischen den rauen Beschriftungsseiten zweier Objektträger sanft zerrieben. Dies wurde so lange gemacht, bis alle Zellen in das DPBS ausgewaschen worden waren und von den Organen nur noch die äußere weiße Kapselhaut vorhanden war. Die Zellsuspension wurde mit einer 20 ml Spritze über einen 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon überführt. Objektträger, Petrischale und Filter wurden nochmal mit DPBS gewaschen, die Zellsuspensionen zusammengeführt und das Falcon auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellzahl der Zellsuspensionen der Lymphknoten konnten danach direkt am MACSQuant Analyzer 10 bestimmt werden und wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Da in der Milz eine Vielzahl an Erythrozyten vorhanden sind, mussten diese zunächst lysiert werden. Dafür wurden die Falcons der Milzzellsuspensionen bei 400 g, 5 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml DPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 10 ml 1x RBCL-Puffer gemischt und für die Lyse der Erythrozyten für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine weitere Zentrifugation und der Überstand wurde wieder verworfen. Das nun weiße Zellpellet wurde in 10 ml DPBS resuspendiert und die Zellen wurden ebenfalls am MACSQuant Analyzer 10 gezählt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Milzzellen auf Eis gehalten.

Herstellung von Einzell-Suspensionen aus Knochen

Einzell-Suspensionen des Knochenmarks wurde für die Isolation von Neutrophilen benötigt (siehe 3.3.2.3). Die Köpfe der gesäuberten Femora und Tibiae wurden im Labor abgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe einer 26 G Nadel auf einer 20 ml Spritze mit MACS-Puffer über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Falcon ausgespült bis der Knochen weißlich durchscheinend war. Das auf dem Zellsieb verbliebende Knochenmark wurde mit der Spitze eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes vorsichtig durch das Zellsieb unter Zugabe von MACS-Puffer in das Falcon geklopft. Das Zellsieb wurde am Ende nochmal mit MACS-Puffer gewaschen, um keine Zellen zu verlieren. Das Falcon wurde mit Puffer aufgefüllt und die Zellen am MACSQuant Analyzer 10 gezählt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Herstellung von Einzell-Suspensionen aus Haut

Für Durchflusszytometrie, sowie die Isolation von Tregs mussten aus der läSIONalen und nicht-läSIONalen bzw. gesunden Haut der Mäuse Einzell-Suspensionen mittels eines Hautverdaus hergestellt werden. Dies erfolgte nach einem mit Miltenyi Biotec zusammen etablierten Protokoll [206]: die Haut wurde zunächst mit 2,3 mL RPMI 1640 Medium in eine Petrischale gegeben. Mit zwei Skalpelln wurde die Haut mittels Scherbewegungen in 1-2 mm große Stücke geschnitten und anschließend mit dem Medium in ein *gentleMACS™ C Tube* überführt. Ein Enzym-Mix, bestehend aus 150 µl Enzym D, 25 µl Enzym R und 12,5 µl Enzym A aus dem Multi-Gewebedissoziationskit 1 wurde zu der Haut dazugegeben und das *gentleMACS™ C Tube* auf ein *gentleMACS™ Octo Dissociator* mit Heizungselement platziert. Für den Verdau der Haut bei 37 °C wurde das 3-stündige Programm 37C_cus_wm_skin gestartet. Nach diesen drei Stunden wurden die *gentleMACS™ C Tubes* kurz bei 400 g und Raumtemperatur abzentrifugiert, um alle Zellen und mögliche Gewebereste aus dem Deckel des Röhrchens zu entfernen. Die Zellsuspension wurde über ein zuvor mit 3 ml DPBS angefeuchtetes 70 µm Zellsieb in ein 50 mL Falcon gegeben. Das *gentleMACS™ C Tube* und das Zellsieb wurden nochmals mit DPBS gewaschen. Die Zellsuspension im Falcon wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, der Überstand durch Dekantieren verworfen und das Pellet in 10 ml DPBS resuspendiert. Die Zellen wurden am MACSQuant Analyzer gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

3.3.2.3 Zellisolationen von Neutrophilen, T-Effektorzellen und Tregs mittels MACS

Um reine Zellpopulationen von Neutrophilen, T-Effektorzellen und Tregs zu bekommen, wurden an den Zellsuspensionen von Lymphknoten, Milz und Knochenmark die MACS (*magnetic activated cell separation*; magnetisch-aktivierte Zellseparation) Methode angewendet. Dafür wurden Zellisolutions-Kits von Miltenyi Biotec verwendet. Die Methodik der Kits beruht darauf, dass bestimmte Zellpopulationen über mit magnetischen Beads markierte Antikörper gebunden werden und diese dann über eine Säule an einem Magneten von den anderen Zellen separiert werden. Je nach Zellpopulation geschieht diese Isolation dabei über eine negative bzw. positive Selektion.

MACS-basierende Isolation von Neutrophilen aus Knochenmarkszellen

Neutrophile aus der hergestellten Knochenmarkszellsuspension von unbehandelten B6.S und C57BL/6 Mäusen für die Co-Kultivierung mit Tregs (siehe auch 3.3.2.4) wurden mit den „Neutrophil-Isolutionskit“ (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben und dem Prinzip der negativen Selektion isoliert.

Dafür wurde die Zellsuspension, nach Bestimmung der Zellzahl, bei 300 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 200 µl MACS-Puffer pro 5×10^7 Zellen resuspendiert und 50 µl Neutrophil Biotin-Antikörper Cocktail pro 5×10^7 Zellen hinzugefügt und gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubation wurden 5 mL MACS-Puffer pro 5×10^7 Zellen hinzugegeben, um die Bindungsreaktion

abzustoppen und erneut zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden das Zellpellet in 400 µL MACS-Puffer pro 5×10^7 Zellen resuspendiert und 100 µl pro 5×10^7 Zellen anti-Biotin MicroBeads hinzugegeben, gemischt und für 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Es wurden noch einmal 5 ml MACS-Puffer pro 5×10^7 Zellen dazu pipettiert und die Zellsuspension abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µL MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Die magnetische Separation erfolgte anschließend über LS-Säulen an einem QuadroMACS Magneten. Dafür wurden die Säulen zunächst nach Arretierung am Magneten mit 3 ml MACS-Puffer kalibriert. Sobald der Puffer vollständig über die Säule gelaufen war, wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und der Durchlauf, welcher die gewünschte Neutrophilen-Population enthielt, in einem 15 ml Falcon aufgefangen. Die Säule wurde danach noch dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchlauf ebenfalls mit in das 15 ml Falcon laufen gelassen. Anschließend wurde das Falcon mit den isolierten Neutrophilen kurz gemischt und 200 µl der Zellsuspension entnommen, um die Zellzahl am MACSQuant Analyzer 10 zu bestimmen. Es wurden anschließend für eine Reinheitsprüfung am Durchflussszytometer $0,5 \times 10^5$ – 1×10^5 Zellen entnommen (siehe auch 3.3.2.5) und der Rest der Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

MACS-basierte Isolation von Tregs aus Zellsuspensionen vom Lymphknoten bzw. Haut

Tregs wurden aus den Zellsuspensionen von inguinalen Lymphknoten mit Hilfe des „CD4+CD25+ Regulatorischer T Zell-Isolationskit“ isoliert. Dabei umfasst diese Isolation zunächst eine negative Selektion der CD4-positiven T Zellen, gefolgt von einer anschließenden positiven Selektion der CD4- und CD25-positiven T Zellen, welche die Treg-Population darstellten.

Die vorbereiteten Zellsuspensionen wurden bei 300 g für 10 Minuten auf Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 40 µL MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert und es wurden jeweils 10 µl CD4⁺CD25⁺ Regulatorischer T Zell Biotin-Antikörper Cocktail pro 10^7 Zellen hinzugegeben, gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubation wurden direkt 38 µl MACS-Puffer, 20 µl anti-Biotin MicroBeads und 2 µl CD25-PE Antikörper pro 10^7 Zellen dazu gegeben und für weitere 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Es folgte anschließend die negative Selektion der CD4-positiven T Zellen über LD-Säulen an einem QuadroMACS. Hierfür wurden die LD-Säulen nach Arretierung am Magneten zunächst mit 2 ml MACS-Puffer kalibriert. Nach komplettem Durchlauf des Puffers wurde die Zellsuspension in einem Minimalvolumen von 500 µl auf die Säule gegeben und der Durchlauf mit den gewünschten CD4-positiven T Zellen in einem 15 ml Falcon aufgefangen. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen und dieser Puffer mit in den 15 ml Falcon gegeben. Die CD4-positiven T Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 90 µl MACS-Puffer pro 10^7 Ausgangszellen resuspendiert und 10 µl anti-PE MicroBeads pro 10^7 Ausgangszellen hinzugegeben, gemischt und für 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Für die positive Selektion der CD4- und CD25-positiven Tregs, wurden MS-Säulen an dem OctoMACS befestigt und diese mit 500 µl MACS-Puffer kalibriert. Die CD4-positiven Zellsuspension wurde in einem Volumen von mindestens 500 µl auf die Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde zweimal mit 500 µl MACS-Puffer

gewaschen, um anschließend die gewünschten CD4- und CD25-positiven Tregs aus der Säulenmatrix zu spülen. Hierfür wurde die Säule vom Magneten entfernt und auf ein frisches 15 ml Falcon gesetzt. Es wurde 1 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und sofort mit dem Stempel der Säule die Zellen aus dieser ausgedrückt. Für eine höhere Reinheit wurde die magnetische Separation über die MS-Säule ein zweites Mal wiederholt. Die gewonnene Treg-Zellsuspension wurde auf 5 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und 200 μ L entnommen, um die Zellzahl am MACSQuant Analyzer zu bestimmen. Je $0,5 \times 10^5 - 1 \times 10^5$ Zellen wurden für eine anschließende Reinheitsprüfung am Durchflusszytometer entnommen (siehe auch 3.3.2.5). Tregs aus den inguinalen Lymphknoten wurden für Co-Kultivierungsexperimente (siehe auch 3.3.2.4) verwendet und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

MACS-basierte Isolation von T Effektorzellen aus Milzzellen

Für die Gewinnung von aufgereinigten T Effektorzellen für die Co-Kultivierungsexperimente (siehe auch 3.3.2.4) wurde auf die hergestellten Milzzellsuspensionen von unbehandelten B6.S und C57BL/6 Mäusen das „Pan T Zell-Isolationskit II“ angewendet. Da das Kit lediglich T Zellen isoliert, wurde im Anschluss mit Hilfe des CD4+CD25+ Regulatorischer T Zell-Isolationskit alle Tregs aus der Zellpopulation entfernt, so dass am Ende eine reine CD4-positive und CD25-negative T Effektorzellpopulation gewonnen werden konnte.

Das „Pan T Zell-Isolationskit II“ basierte wieder auf einer negativen Selektion der T Zellen. Die Milzzellen wurden bei 300 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 40 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert und 10 μ l Biotin-Antikörper Cocktail pro 10^7 Zellen hinzugegeben. Die Probe wurde gemischt und für 5 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubation wurden direkt 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l anti-Biotin MicroBeads pro 10^7 Zellen dazu gegeben und für weitere 10 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die magnetische Separation über LS-Säulen am QuadroMACS. Die Säule wurde zunächst mit 3 ml MACS-Puffer kalibriert. Nach vollständigem Durchlauf des Puffers wurde die Zellsuspension in einem Volumen von mindestens 500 μ l auf die Säule gegeben. Der Durchfluss, welcher in einem 15 ml Falcon aufgefangen wurde, stellte die gewünschte T Zellpopulation dar. Die Säule wurde einmal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Um nun die unerwünschten Tregs zu entfernen, wurden 200 μ l aus der T Zellsuspension entfernt und am MACSQuant Analyzer 10 die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Treg-Isolation mit Hilfe des CD4+CD25+ Regulatorischer T Zell-Isolationskit wie oben beschrieben. Nur wurde hier bei der eigentlichen positiven Selektion der CD4- und CD25-positiven Tregs über MS-Säulen nicht die Säulen ausgespült, sondern der Durchlauf aus den Säulen behalten. Dieser Durchlauf enthielt die gewünschte T Effektorzellpopulation ohne Tregs. Die Zellsuspension wurde auf 5 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und wieder 200 μ l entnommen, um am MACSQuant Analyzer 10 die Zellen zu zählen. Je $0,5 \times 10^5 - 1 \times 10^5$ Zellen wurden auch hier für eine anschließende Reinheitsprüfung am Durchflusszytometer entnommen (siehe auch 3.3.2.5). Der Rest der Zellen wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.3.2.4 Co-Kultivierung von Tregs mit T Effektorzellen bzw. Neutrophilen

Die aufgereinigten Tregs wurden jeweils mit den isolierten Neutrophilen oder den T Effektorzellen in einer flachbodigen 96-Well-Suspensionsplatte co-kultiviert.

Co-Kultivierung von Tregs mit T Effektorzellen

Mit der Co-Kultivierung von Tregs mit T Effektorzellen sollte der Effekt der Tregs aus unbehandelten oder EBA-induzierten Mäusen auf die Proliferation der T Effektorzellen untersucht werden. Um die Proliferation später erfassen zu können, wurde zunächst die aufgereinigte T Effektorzellpopulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert, und anschließend wurden die Tregs und T Effektorzellen zusammen mit anti-CD3 und anti-CD28 für drei Tage stimuliert, bevor die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden.

CFSE steht für Carboxyfluoresceinsuccinimidylester und ist zellmembranpermeabel. Es bindet an intrazelluläre Moleküle, und mit jeder Zellteilung wird der Farbstoff verdünnt, was mit einem abnehmenden Signal im Durchflusszytometer messbar wird. Dadurch kann die Proliferationsaktivität von Zellen analysiert werden. Für die Färbung der T Effektorzellen mit CFSE wurde das CellTrace CFSE Zell-Proliferationskit von Invitrogen nach Herstellerangaben genutzt. Dafür wurde die Zellsuspension zu einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml in DPBS gebracht. Anschließend wurde je $1 \mu\text{l}$ der in DMSO gelösten CFSE-Lösung pro 10^6 Zellen hinzugegeben und kurz gevortext. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 37°C im Zellinkubator inkubiert und alle fünf Minuten kurz gevortext, um den Farbstoff gleichmäßig zu verteilen. Nach der Inkubationszeit wurde das fünffache am ursprünglichen Volumen an 1 %-igen FCS in DPBS hinzugegeben und nochmal für fünf Minuten lichtgeschützt inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 400 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde im T Zellmedium mit einer Endkonzentration von 4×10^5 Zellen pro ml aufgenommen und für 10 Minuten ruhen gelassen.

Währenddessen wurde die aufgereinigte Treg-Population zu einer Konzentration von 8×10^5 Zellen pro ml in T Zellmedium eingestellt und der Stimulationsmix vorbereitet. Für den Stimulationsmix wurden die CD3/CD8 MACSiBead™ Partikel vom Treg Expansion Kit von Miltenyi nach Herstellerangaben mit leichten Abweichungen vorbereitet: die Beads wurden gründlich gevortext und das entsprechende Volumen für 4×10^4 CD3/CD8 MACSiBead™ Partikel pro Stimulationsansatz (entspricht am Ende einem Verhältnis von 1:1 zu der Anzahl an Tregs) zu dem sechsfachen Volumen an T Zellmedium gegeben. Die Beadlösung wurde für fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand durch Absaugen verworfen. Das Beadpellet wurde in T Zellmedium zugesetzt mit 8000 U/ml rm-IL-2 in einer Endkonzentration von 8×10^5 CD3/CD8 MACSiBead™ Partikel/ μl resuspendiert.

Zuletzt wurden alle vorbereiteten Lösungen und Zellsuspensionen in einer flachbodigen 96-Well-Suspensionsplatte zusammen pipettiert, wobei jede Bedingung als Doppelansatz angesetzt wurde: die Negativkontrollen waren entweder nur T Effektorzellen ohne Tregs und Stimulationsmix bzw. nur Tregs mit Stimulationsmix ohne T Effektorzellen. Die Positivkontrolle bestand aus T Effektorzellen mit Stimulationsmix ohne Tregs. In allen übrigen Wells wurden T Effektorzellen, Tregs und Stimulationsmix

zusammengegeben. Das Pipettiervolumen für die T Effektorzellen war 100 μl und für Tregs 50 μl , was jeweils einer Zellzahl von 4×10^4 Zellen, und damit einem Verhältnis von T Effektorzellen zu Tregs von 1:1 entsprach. Das Volumen an Stimulationsmix das pro Well dazu gegeben wurde betrug ebenfalls 50 μl , was am Ende ebenfalls zu 4×10^4 Beads und 400 U rm-IL-2 pro Well führte. Die Wells der Kontrollen wurden am Ende auf 200 μl mit T-Zellmedium aufgefüllt. Die Platte wurde für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator inkubiert. Nach den drei Tagen wurde die Proliferation der T Effektorzellen mittels Durchflusszytometrie erfasst (siehe auch 3.3.2.5).

Co-Kultivierung von Tregs mit Neutrophilen

Tregs aus unbehandelten oder EBA-induzierten Mäusen wurden zusammen mit isolierten aktivierten Neutrophilen aus unbehandelten Mäusen für 4,5 Stunden zusammen inkubiert, um im Anschluss den Effekt der Tregs auf die Expression des Neutrophilen-Migrationsmarkers CD18 im Durchflusszytometer zu analysieren.

Die Voraktivierung der Neutrophilen geschah durch einen auf der Platte beschichteten Antigen-Antikörperkomplex. Dafür wurde einen Tag vor der Isolation der Zellen eine flachbodige 96-Well Maxisorp NUNC-Immuno Platte mit rekombinanten mCOL7^{C-GST} beschichtet. Dafür wurde das Antigen in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in Bicarbonatpuffer verdünnt und jeweils 100 μl der Antigenlösung (entspricht 1 μg Antigen) in ein Well gegeben. Jede Bedingung wurde als Doppelbestimmung angesetzt. Die Negativkontrollen „Leerwert“, „nur Neutrophile“ und „nur Tregs“ wurden nicht mit dem Antigen beschichtet. Die Platte wurde über Nacht mit einer Folie abgeklebt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit je 200 μl pro Well PBS-T gewaschen. Anschließend wurden 200 μl pro Well an Blockierungspuffer hinzugegeben und die Platte für eine Stunde auf einen Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Nach der Blockierung folgte ein weiterer dreifacher Waschvorgang, um danach den spezifischen Antikörper an das Antigen binden zu lassen. Dafür wurden je 0,4 μg an mCOL7^{C-GST} IgG in einem Volumen von 100 μl in Blockierungspuffer in jedes Well bis auf die Negativkontrollen pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für anderthalb Stunden. Bevor die Neutrophilen auf die Platte gegeben wurden, wurde diese nochmal zweimal mit dem PBS-T gewaschen und anschließend einmal mit 200 μl CL-Medium. Je 2×10^5 aufgereinigte Neutrophilen wurden in einem Volumen von 100 μl in CL-Medium in jedes Well bis auf die Negativkontrollen „Leerwert“ und „nur Tregs“ gegeben. In die Wells dieser Negativkontrollen wurden jeweils 100 μl an CL-Medium pipettiert. Für eine vollständige Voraktivierung der Neutrophilen wurde die Platte für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator inkubiert.

Währenddessen wurden die Tregs in CL-Medium gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Nach der einstündigen Inkubation der Neutrophilen auf der Platte wurden je 100 μl der Treg-Zellsuspension in die entsprechenden Wells, bis auf die Negativkontrollen „Leerwert“ und „nur Neutrophile“ gegeben. In die Wells dieser Negativkontrollen wurde wieder jeweils 100 μl CL-Medium pipettiert. Das Verhältnis von Tregs zu Neutrophilen war damit 1:4 und die

Platte wurde für weitere 4,5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator inkubiert. Anschließend folgte die durchflusszytometrische Färbung und Messung der CD18-Expression auf den Neutrophilen (siehe auch 3.3.2.5).

3.3.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine weit verbreitete Methode in Forschung und Diagnostik zur Messung der Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel. Das Grundprinzip besteht darin, Zellen durch einen engen Flüssigkeitsstrom zu leiten und die Zellen einzeln mit Lasern zu bestrahlen. Anhand der Streuung des Lichts der Laser auf Detektoren kann Rückschluss auf die Größe und Granularität der einen Zelle gezogen werden. Durch die Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzantikörpern bzw. -markern können die Zellen weiter charakterisiert werden, wie zum Beispiel deren Expression von Oberflächenrezeptoren, intrazellulären und intranukleären Proteinen, Vitalität und Aktivierungs- und Proliferationsgrad [207].

Alle durchflusszytometrischen Experimente wurden an einem MACSQuant Analyzer 10 mit der entsprechenden Software MACSQuantify durchgeführt und zuvor an Testproben etabliert. Die Etablierung umfasste die Titration der verwendeten Antikörper, um die optimale Verdünnung zu erhalten, sowie die Kompensation der einzelnen Panels.

Zellzahlbestimmung am MACSQuant Analyzer 10

Der MACSQuant Analyzer 10 besitzt eine vorgespeicherte Einstellung, um die Gesamtzellzahl, sowie die Anzahl an lebenden Zellen in einer Probe zu bestimmen. Dafür wurden zu 200 µl einer zu zählenden Probe 2 µl Propidiumjodid (PI) gegeben, vermischt und in das Gerät eingelesen. Das eingespeicherte Analysetemplate gab am Ende der Messung jeweils die Anzahl, sowie die Konzentration der Zellen pro ml aller Zellen und aller lebenden Zellen an. Für weitere Versuche bzw. Analysen wurde nur die Angabe der lebenden Zellen verwendet. Alle zu bestimmenden Zellzahlen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieses Vorgehens bestimmt.

Färbung und Analyse verschiedener Immunzellpopulationen am MACSQuant Analyzer 10

Aus Einzellsuspensionen von Blut, Lymphknoten, Milz und Haut wurden mittels Durchflusszytometrie verschiedene Immunzellpopulationen innerhalb der verschiedenen Therapiegruppen miteinander verglichen. Dafür wurden vier Fluoreszenzpanels für den MACSQuant Analyzer 10 etabliert: ein Panel für T Helferzellen, eines für T Zell-Zytokine, eins für Makrophagen und eins für Tregs mit Granulozyten.

Für jede Probe jedes Panels wurden 10⁵ Zellen in einem Volumen von 100 µl der vorbereiteten Zellsuspension verwendet und die Färbung wurde in einer V-Boden 96-Well Platte pro Panel durchgeführt mit je einer Negativfärbung für jedes Organ und jedes Panel als Negativkontrolle. Die Zellen wurden bei 400 g und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand durch

Dekantieren und Abtupfen der Platte auf einem Papiertuch verworfen. Anschließend erfolgte die Lebend/Todfärbung in einer 1:1000 Verdünnung in DPBS mit dem fixierbaren Lebendfarbstoff 620 (BD620) für das T Helferzellen- und Makrophagenpanel und den fixierbaren Lebendfarbstoff 780 (BD780) für das T Zell-Zytokinen- und Treg-Panel. Die Zellen wurden in 50 µl der jeweiligen Lebend/Todfärbungslösung resuspendiert und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 100 µl FACS-Puffer abgestoppt, die Platten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte das Blockieren der Fc-Rezeptoren, um ein unspezifisches Binden der entsprechenden Antikörper zu verhindern, mit 50 µl Fc Blockierungsreagenz in einer 1:10 Verdünnung in FACS-Puffer und einer Inkubation von 10 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank. Direkt danach wurden je 50 µl an extrazellulären Antikörpermix des entsprechenden Panels hinzugegeben und mit der Zellsuspension vermischt (siehe Tabelle 8).

Tab. 8: Zusammensetzung der extra-zelluläre Antikörpermixe der Durchflusszytometrie-Panels. Dargestellt sind die jeweiligen extra-zellulär eingesetzten Antikörper mit ihrem entsprechenden gekoppelten Fluorophor und deren eingesetzten Verdünnung zur Untersuchung der T Helferzellen, T Zell-Zytokine, Makrophagen und Tregs in den unterschiedlichen Organen.

Panel	Antikörper	Fluorophor	Verdünnung	Lokalisation
T Helferzellen	anti-CCR6	BV421	1:100	extra-zellulär
	anti-CD8a	VioGreen	1:50	extra-zellulär
	anti-CCR10	PE	1:10	extra-zellulär
	anti-CCR4	PE/Cy7	1:100	extra-zellulär
	anti-CD4	APC	1:50	extra-zellulär
	anti-CXCR3	APC/Fire 750	1:100	extra-zellulär
T Zell-Zytokine	anti-CD45	VioGreen	1:50	extra-zellulär
	anti-CD4	PerCP	1:100	extra-zellulär
Makrophagen	anti-CD11b	BV510	1:50	extra-zellulär
Tregs	anti-CD4	VioBlue	1:50	extra-zellulär
	anti-Ly6C	VioGreen	1:10	extra-zellulär
	anti-CD25	PE	1:50	extra-zellulär
	anti-Ly6G	PE/Cy7	1:100	extra-zellulär

Die Zellen wurden mit den Antikörpern für 20 Minuten lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und anschließend die Bindungsreaktion wieder mit 100 µl FACS-Puffer abgestoppt. Die Platten wurden bei 400 g und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert und die Überstände verworfen.

Die Zellen, welche zu den Panels der T Helferzellen, Makrophagen und T Zell-Zytokinen gehörten wurden nun in je 100 µl Fixierungspuffer (Biolegend) für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen zugehörig zum Treg-Panel wurden in 100 µl FoxP3-Fixierungspuffer (Miltenyi Biotec) für die spätere intra-nukleäre Färbung von FoxP3 für 30 Minuten lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach Ende der jeweiligen Fixierung wurden wieder jeweils 100 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen abzentrifugiert und die Überstände verworfen.

Da das Panel für die T Helferzellen keine Marker für intrazelluläre Proteine beinhaltet, wurden die Zellen dieser Platte in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung am MACSQuant Analyzer 10 lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Zellen der drei anderen Panels wurden in je 100 µl 1x Permeabilisierungspuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für das Makrophagenpanel folgte ein weiteres Mal eine Blockierung der Fc-Rezeptoren, diesmal intrazellulär: der Fc Blockierungsreagenz wurde dafür 1:10 in 1x Permeabilisierungspuffer verdünnt und die Zellen in 50 µl der Blockierungslösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 50 µl des intrazellulären Antikörpermixes des entsprechenden Panels (siehe Tabelle 9).

Tab. 9: Zusammensetzung der Antikörpermixe der Durchflusszytometrie-Panels zur intra-zellulären bzw. intra-nukleären Färbung. Dargestellt sind die jeweiligen intra-zellulär eingesetzten Antikörper mit ihrem entsprechenden gekoppelten Fluorophor und deren eingesetzten Verdünnung zur Untersuchung der T Zell-Zytokine, und Makrophagen bzw. den intra-nukleären bindenden Antikörpern des Treg-Panels in den unterschiedlichen Organen.

Panel	Antikörper	Fluorophor	Verdünnung	Lokalisation
T Zell-Zytokine	anti-TGFβ	BV421	1:20	intra-zellulär
	anti-IFN-γ	PE	1:100	intra-zellulär
	anti-IL-4	PE/Cy7	1:20	intra-zellulär
	anti-IL-10	APC	1:50	intra-zellulär
Makrophagen	anti-CD206	BV421	1:50	intra-zellulär
	anti-iNOS	PE	1:100	intra-zellulär
	anti-TNFα	PE/Cy7	1:100	intra-zellulär
	anti-Arg-1	APC	1:20	intra-zellulär
Tregs	anti-Helios	PE-Vio615	1:50	intra-nukleär
	anti-FoxP3	APC	1:50	intra-nukleär

Die Antikörpermixe wurden mit den Zellen gut vermischt und für 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationen wurden wieder je 100 µl 1x Permeabilisierungspuffer hinzugegeben und die Platten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 100 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Anschließend erfolgte die Messung aller Platten am MACSQuant Analyzer 10 unter den individuellen Einstellungen eines jeden Panels. Insgesamt wurden von jeder Probe 75 µl der Zellsuspension eingelesen und die Zellen zunächst nach ihrer Größe und Granularität im *Forward Scatter* (FSC-A) und *Side Scatter* (SSC-A) in einem Plot dargestellt. Zellartefakte von toten Zellen wurden durch Einstellung des FSC-Triggers direkt aussortiert. Die durch den FSC-A und SSC-A sichtbaren drei Zellpopulationen von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten wurden auf den nächsten Plot zum Aussortieren aller Zellverklumpungen gegatet. In diesem Plot wurde das Signal von FSC-A gegen FSC-H abgebildet, was dazu führt, dass alle einzelnen Zellen auf einer Diagonalen dargestellt werden und Verklumpungen unter dieser Linie. Alle Einzelzellen wurden für die weitere Analysen ausgewählt und im nächsten Plot

gegen ihren jeweiligen Lebend/Todfarbstoff abgebildet, wobei tote Zellen positiv für das Fluoreszenzsignal waren und lebende negativ. Anschließend erfolgte das Gating aller lebenden Zellen für die einzelnen Zellpopulationen der jeweiligen Panels. Die Zellzahlen, -konzentrationen und -prozentage wurden von jeder Population eines jeden Panels und Organs erfasst und anschließend in Graph-Pad Prism analysiert und die Ergebnisse der verschiedenen Therapiegruppen miteinander verglichen.

Bestimmung der Proliferation von T Effektorzellen über das CFSE-Signal

Die Proliferationsrate der T Effektorzellen, welche mit aus unterschiedlichen Versuchsgruppen ((i) unbehandelte C57BL/6 bzw. (ii) B6.S, (iii) Ak-EBA, Ag-EBA mit entweder (iv) > 2 % oder (v) < 2 % an EBA-betroffener Körperoberfläche) stammenden Tregs co-kultiviert wurden, wurde mittels der Stärke des CFSE-Signals im Durchflusszytometer erfasst.

Dafür wurden die nach drei Tagen im Zellinkubator inkubierten Zellen zunächst auf eine V-Boden 96-Well-Platte überführt und bei 400 g und fünf Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 µl des in DPBS 1:1000 verdünnten Lebend-/Todfarbstoffs BD780 resuspendiert und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurden pro Well jeweils 100 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Platte unter ihren spezifischen Einstellungen am MACSQuant Analyzer 10 gemessen. Die Zellsuspensionen wurden zunächst durchmischt und anschließend je 100 µl davon in das Gerät eingelesen. Das Gating der Zellen erfolgte mit den Plots für FSC-A und SSC-A, gefolgt von den Einzelzellen und der Trennung nach toten und lebenden Zellen. Alle vitalen Zellen wurden anschließend auf das CFSE-Signal gated. Die Prozentzahlen der CFSE-positiven und -negativen aller lebenden T Effektorzellen wurde erfasst und auf die Positivkontrolle (stimulierte T Effektorzellen ohne co-Kultivierung mit Tregs) normalisiert. In Graph-Pad Prism wurden anschließend alle Gruppen miteinander verglichen.

Erfassung der Expression des Neutrophilen Migrationsmarkers CD18

Die Expression des Migrationsmarkers CD18 auf Neutrophilen nach Co-Kultivierung mit aus unterschiedlichen Versuchsgruppen ((i) unbehandelte C57BL/6 bzw. (ii) B6.S, (iii) Ak-EBA, Ag-EBA mit entweder (iv) > 2 % oder (v) < 2 % an EBA-betroffener Körperoberfläche) stammenden Tregs wurde ebenso mittels einer durchflusszytometrischen Färbung und Messung untersucht.

Nach der 4,5-stündigen Co-Kultivierung der Zellen miteinander, wurden diese auf eine V-Boden 96 Well-Platte überführt und bei 400 g und 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in 50 µl eines vorbereiteten Antikörpermixes resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Der Mix bestand aus CD45 VioGreen (1:50), CD18 PE (1:50) und Ly6G APC-Vio770 (1:10) verdünnt in FACS-Puffer. Nach Inkubation wurde je Well 100 µl FACS-Puffer mit 1,5 µl PI dazugegeben, vermischt und je 100 µl der Zellsuspension am MACSQuant Analyzer 10 mit den etablierten Einstellungen gemessen. Zunächst erfolgte das übliche Gating nach FSC-A, SSC-A,

Einzelzellen und lebenden Zellen über PI. Von den lebenden Zellen wurden die Neutrophilen über den Marker Ly6G gegatet und anschließend auf den Migrationsmarker CD18. Die Prozentzahlen der CD18-positiven und -negativen Neutrophilen wurden erfasst und auf die Positivkontrolle (stimulierte Neutrophile ohne co-Kultivierung mit Tregs) normalisiert. In Graph-Pad Prism wurden anschließend alle Gruppen miteinander verglichen.

Reinheitsüberprüfung der Zellpopulationen am Durchflusszytometer

Mittels MACS isolierte Zellpopulationen und mit CFSE-gefärbte Tregs für den adoptiven Transfer und T Effektorzellen wurden in ihrer Reinheit am Durchflusszytometer kontrolliert. Dafür wurden von jeder Probe $10^4 - 10^5$ Zellen entnommen und, bis auf die Überprüfung der CFSE-gefärbten Zellen, eine durchflusszytometrische Färbung mit für die jeweilige Zellpopulation charakteristischen Markern durchgeführt. Das prinzipielle Vorgehen mit Reihenfolge, Waschschritten und Inkubationszeiten waren dieselben wie oben beschrieben.

Die mittels MACS isolierten Neutrophilen wurden mit Ly6G PE/Cy7 (1:100), Ly6C FITC (1:100) und PI gefärbt. Eine erfolgreiche Isolation der Neutrophilen wurde mit mehr als 85 % aller Zellen mit einem positiven Signal für Ly6G und einem negativen Signal für Ly6C definiert.

Die Reinheitsprüfung der Tregs und T Effektorzellen fand mit derselben Färbung statt: mit CD4 VioBlue (1:50), CD8 VioGreen (1:50), CD25 PE (1:50) und CD3 PE-Vio770 (1:50) als extrazelluläre Färbung und FoxP3 APC (1:50) in der intranukleären Färbung. Isolierte T Effektorzellen sollten dabei mindestens 85 % positive CD3 T Zellen vorweisen, von denen höchstens jeweils 5 % CD8 und für Tregs (CD25+FoxP3+) positiv sein sollten. Mit MACS-isolierte Tregs aus Lymphknoten sollten ebenfalls mindestens 85 % positiv für CD3 und höchstens 5 % positiv für CD8 sein.

Um eine erfolgreiche Färbung mit CFSE zu bestätigen, wurden jeweils lediglich die gefärbten Zellen im MACSQuant Analyzer 10 eingelesen und kontrolliert, ob mehr als 95 % der Einzelzellen positiv für CFSE waren.

Nur wenn die Reinheiten der jeweiligen Populationen zufriedenstellend war, wurden die Ergebnisse der folgenden Experimente zur Auswertung berücksichtigt.

3.3.2.6 Plasma

Plasma wurde aus dem restlichen Blut von 3.3.2.2 gewonnen. Dafür wurde das Blut in den Microvette®500 K3E bei 10.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das in der oberen gelblichen Phase liegende Plasma wurde in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3.2.7 Enzyme-linked immunosorbent Assay

Um den Titer von injiziertem Kaninchen IgG in den Plasmaproben der Mäuse vom Ak-EBA-Mausmodell innerhalb der verschiedenen Therapiegruppen zu vergleichen, wurde ein spezifischer *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst eine 96-Well Platte mit hoher Bindungskapazität mit 50 µl von 2,5 µg/ml anti-Kaninchen IgG verdünnt in Bicarbonatpuffer über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank beschichtet. Am nächsten Tag wurde die beschichtete Platte dreimal mit je 250 µl PBS-T gewaschen. Um spätere unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Platte anschließend für eine Stunde mit 200 µl Blockierungspuffer pro Well auf einen Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubation wurde Kaninchen Serum von Bethyl Laboratories als Standard in einer 7-stufigen Verdünnungsreihe von 500 ng/ml bis 7,8 ng/ml und die zu untersuchenden Plasmaproben 1:10 in Blockierungspuffer verdünnt. Nach der einstündigen Blockierung der Platte folgte ein weiterer dreistufiger Waschschrift mit PBS-T und je 50 µl der vorbereiteten Standardreihe mit zusätzlichen Leerwert, und die verdünnten Plasmaproben wurden in je einem Doppelansatz auf die Platte gegeben und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation und weiterem dreimaligen Waschen mit PBS-T wurde der Zweitantikörper (HRP-konjugierten Ziegen anti-Kaninchen IgG-Fc; HRP: *horseradish peroxidase*; Meerrettichperoxidase) in einer 1:30.000 Verdünnung in Blockierungspuffer mit je 50 µl auf die Platte gegeben. Diese wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach einem letzten dreimaligen Waschen mit PBS-T erfolgte die Farbumsetzung durch HRP mit je 100 µl der TMB-Lösung. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl einer 0,9 M H₂SO₄-Lösung gestoppt. Zur Bestimmung der jeweiligen IgG Titer wurde zunächst die OD jedes Wells der Platte in einem GloMax Discover System microplate Reader bei 450 nm gemessen. Von jedem Duplikat wurde der Mittelwert der ODs gebildet und mit Hilfe der bekannten Konzentrationen des Standards eine vierparametrische sigmoidale Standardkurve gebildet. Dadurch konnte unter Verwendung der Software Graph-Pad Prism die Konzentrationen des injiziertem Kaninchen IgGs der einzelnen Proben berechnet werden.

3.3.2.8 LEGENDplex™ Bead-basierender Immuntest

Mit dem von Biolegend LEGENDplex™ Bead-basierenden Immuntest wurden verschiedene Zytokinkonzentrationen in den Plasmaproben der Mäuse vom Ak-EBA-Mausmodell innerhalb der verschiedenen Therapiegruppen analysiert. Das Prinzip dieses Immuntests beruht dabei auf der gleichen Grundlage wie Sandwich-Immuntests, bei denen das lösliche Analyt zwischen zwei Antikörpern eingefangen wird, wobei hier das Analyt auf einer Platte gebunden wird. Auf Grund unterschiedlicher Größen und unterschiedlichen Fluoreszenzwerten der Bead-Populationen, können diese in einem Durchflusszytometer voneinander unterschieden werden und die Konzentration eines jeden Analyten mit Hilfe einer bekannten Standardkurve bestimmt werden.

Es wurden zwei LEGENDplex™ von Biolegend verwendet: der „LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel (12-plex) V03 with V-Bottom Plate“ mit den 12 Bead-Populationen IFN-γ, IL-5, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-13 und ein Kunden-individueller „LEGENDplex™ Custom Mouse

10-plex Panel“ mit den 10 Bead-Populationen IL-1 β , IL-4, IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , CXCL1, IL-10, IL-13, IL-17A und GM-CSF.

Bei beiden LEGENDplex™ wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung von V-Boden 96-Well Platten mit leichten Veränderungen vorgegangen: Plasmaproben wurden kurz gevortext, bei 10,000 rpm und 4 °C für eine Minute abzentrifugiert und anschließend 1:2 im Testpuffer verdünnt. Der lyophilisierte Standard wurde nach Angabe mit Testpuffer rekonstituiert und eine 7-stufige Verdünnungsreihe angelegt mit einem zusätzlichen Leerwert an Testpuffer am Ende. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur und alle Inkubationsschritte lichtgeschützt durchgeführt. Standards und Proben wurden als Doppelansätze angelegt. Abweichend von den Herstellerangaben wurde immer nur die Hälfte des angegebenen Pipettierolumens verwendet. Zunächst wurden in jedes Standard-Well 12,5 μ l der lyophilisierten Matrix B und in jedes Proben-Well 12,5 μ l des Testpuffers gegeben. Anschließend wurden entsprechend 12,5 μ l des jeweiligen verdünnten Standards bzw. der verdünnten Plasmaprobe hinzugegeben. Zusätzlich wurden in jedes Well 12,5 μ l der gemischten Beads (mixed beads) pipettiert. Zur Bindung der Beads wurde die Platte für zwei Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Nach Inkubation wurde sie bei 250 g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Wells wurden mit 100 μ l 1x Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden je 12,5 μ l des Detektionsantikörpers hinzugegeben und die Platte wieder für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Direkt danach wurde in jedes Well 12,5 μ l SA-PE pipettiert und es folgte eine weitere Inkubation für eine halbe Stunde. Nach Inkubation wurde die Platte nochmal mit 1x Waschpuffer gewaschen. Die Beads wurden in je 150 μ l 1x Waschpuffer resuspendiert und die Platte am zuvor eingestellten MACSQuant Analyzer 10 gemessen.

Zur Einstellung des MACSQuant Analyzer 10 wurde die Anleitung von Biolegend zur Einstellung der Messung eines LEGENDplex™ für FACSCalibur™ mit Dual Lasern befolgt.

Die Auswertung der Daten geschah durch die von Biolegend zur Verfügung gestellte Software „LEGENDplex™ Data Analysis Suite“ in der Cloud-basierten Onlineversion und Graph-Pad Prism.

3.3.3 Histologische Färbungen

3.3.3.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbungen wurde an Histofix-fixierten Schnitten der Ohren von 3.3.2.2 durchgeführt, um den klinischen Phänotyp der EBA zu verifizieren, als auch um den Grad der Entzündung durch Betrachtung der Infiltration der Immunzellen zu bewerten.

Dafür wurden die in Histofix gelagerten Ohren zunächst durch eine aufsteigende Reihe an Ethanol und mit Histol, einem ungiftigeren Xylen Substitut, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Proben wurden in 4 μ m dicke Schnitte an einem Mikrotom auf Objektträger aufgezogen und nach einem Standardprotokoll des Histopathologischen Routinelabors des Instituts der Dermatologie (UKSH, Lübeck) mit H&E gefärbt. Die Anfertigung und Färbung der Schnitte wurde von den beiden Hilfswissenschaftlichen Angestellten Diana Wortmann und Bejtije Naumann durchgeführt.

Zur Analyse der Schnitte bezüglich der Dicke der Epidermis und dem Ausmaß der eingewanderten inflammatorischen Zellen wurden die Objektträger an einem Keyence der BZ-9000E-Serie mittels Lichtmikroskopie in einer hundertfachen Vergrößerung mikroskopiert und nach einem semi-quantitativen Bewertungsverfahren mit einem Punktesystem zwischen Null und Drei ausgewertet. Die Mikroskopie und Bewertung erfolgte verblindet durch die technische Angestellte Daniela Rieck.

3.3.3.2 Direkte Immunfluoreszenz-Mikroskopie von IgG und C3

Der derzeitige diagnostische Goldstandard für EBA ist die direkte Immunfluoreszenz (DIF)-Mikroskopie einer periläsionalen Hautbiopsie. Dabei werden für einen positiven Befund der Erkrankung lineare Ablagerungen von IgG, IgA und/oder C3 entlang der Basalmembran bzw. der dermalen-epidermalen Spalte mittels der DIF nachgewiesen [208]. Diese Nachweismethode wurde für die in flüssigen Stickstoff schockgefrorenen Ohren von den Mäusen aus den Ak-EBA-Mausmodellen angewendet, um den Grad der Erkrankung an EBA zwischen den verschiedenen Therapiegruppen zu bestätigen und weiter zu qualifizieren. Es wurde eine DIF-Färbung für murines C3 und für das injizierte Kaninchen IgG durchgeführt. Für beide Färbungen wurden die bei -80 °C gelagerten Ohren zunächst am Mikrotom in 5 µm dicke Schnitten auf Superfrost Objektträger gezogen. Anschließend wurde mit der jeweiligen Färbung spezifisch fortgefahren. Das Schneiden der Proben am Mikrotom wurde dabei von der Hilfswissenschaftlichen Angestellten Priscilla Mordey und beide Färbungen zusammen mit der technischen Angestellten Astrid Fischer durchgeführt.

Direkte Immunfluoreszenzfärbung von murinen C3

Um gewebegebundenes murines C3 an der dermalen-epidermalen Spalte detektieren zu können, wurden die Schnitte zunächst dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen, abgetrocknet und dann für weitere 10 Minuten in eiskaltem Aceton bei -20 °C fixiert. Um die späteren Lösungen auf den Schnitten durch eine hydrophobe Barriere zu halten, wurden die Gewebe mit einem Barriertestift (Pap-Stift) umkreist. Unspezifische Bindungsstellen am Gewebe wurden anschließend durch einen 30-minütigen Blockierungsschritt in 2 % BSA in PBS abgesättigt. Direkt danach folgte die Inkubation mit FITC-konjugiertem Ziegen IgG gegen murines C3 in einer 1:400 Verdünnung in 2 % Ziegenserum in PBS für 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation folgt ein weiterer Waschschrift in PBS für dreimal fünf Minuten. Danach erfolgte eine Zellkernfärbung mit DAPI in einer 1:1000 Verdünnung in PBS für 10 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur und ein letztes zweimaligen Waschen in PBS für jeweils fünf Minuten. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträger mit Moviol eingebettet und bis zur Mikroskopie bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Direkte Immunfluoreszenzfärbung von hautgebundenem Kaninchen IgG

Für den Nachweis von injiziertem Kaninchen IgG, welches an der dermal-epidermale Grenzfläche in den Ohren gebunden hat, wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zunächst an der Luft getrocknet und dann anschließend mit dem Pap-Stift umkreist. Es folgte sofort die Inkubation mit dem FITC-konjugiertem AffiniPure Esel anti-Kaninchen IgG in einer 1:100 Verdünnung in PBS für 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurden die Objektträger dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ebenfalls eine Zellkernfärbung mit DAPI in einer 1:1000 Verdünnung in PBS für fünf Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur und ein zweimaliges Waschen in PBS für fünf Minuten. Am Ende wurden die Objektträger ebenso in Movio eingebettet und bei 4 °C bis zur Mikroskopie lichtgeschützt gelagert.

Mikroskopie und Bewertung der DIF-gefärbten Objektträger

Die Bewertung der für murines C3 und Kaninchen IgG DIF-gefärbten Objektträger erfolgte am Keyence der BZ-9000E-Serie mittels Fluoreszenzmikroskopie in einer hundertfachen Vergrößerung. Es wurden die Fluoreszenzkanäle für FITC (CH2) und DAPI (CH1) verwendet. Von jedem Schnitt wurden fünf aufeinander folgenden Bilder gemacht und diese anschließend mit dem semi-quantitativen Bewertungsverfahren mit dem Punktesystem zwischen Null und Drei nach dem Grad der Färbung im FITC-Kanal ausgewertet. Die Mikroskopie und Bewertung erfolgte verblindet durch die technische Angestellte Daniela Rieck.

3.3.3.3 Weitere Immunfluoreszenz und -histochemischer Färbungen von Immunzellen

Um die Ak-EBA innerhalb der verschiedenen Therapiegruppen genauer zu charakterisieren, wurden durch Immunfluoreszenz und -histochemische Färbungen weitere Immunzellen nachgewiesen: Neutrophile, Makrophagen, T Zellen und Tregs. Zusätzlich wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung für den Zellproliferationsmarker Ki-67 durchgeführt. Dafür wurden die läsionalen und nicht-läsionalen Häute aus 3.3.2.2, welche entweder in flüssigen Stickstoff schockgefroren wurden (für die Immunfluoreszenz-Färbung von Makrophagen und T Zellen) oder welche in Histofix fixiert wurden (für die immunhistochemische Färbung von Neutrophilen und Tregs bzw. der Immunfluoreszenz-Färbung von Ki-67) verwendet.

Immunfluoreszenz-Färbung von CD3 für den Nachweis von T Zellen

Für die Detektion von T Zellen innerhalb läsionaler Haut im Vergleich der verschiedenen Therapiegruppen zur nicht-läsionalen Haut wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung gegen den spezifischen T Zellmarker CD3 durchgeführt. Die zuvor bei -20 °C gelagerten Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend für 10 Minuten im eiskalten Aceton bei -20 °C fixiert. Die Schnitte wurden dreimal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen und danach mit dem Pap-Stift für die hydrophobe Barriere umkreist.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation in 3 % BSA in TBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Direkt danach folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Biotin anti-mouse CD3 ϵ) bzw. der Isotyp-Kontrolle (Biotin-markiertes Armenischer Hamster IgG) in einer 1:100 Verdünnung in 3 % BSA in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend folgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift für fünf Minuten im TBS-T. Danach wurden die Gewebeschnitte mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper Streptavidin Dylight 594, welcher am Biotin des primären Antikörpers bindet, in einer 1:500 Verdünnung in TBS-T für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal für fünf Minuten im TBS-T gewaschen und am Ende in DAPI-Fluoromount eingebettet und bis zur Mikroskopie bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

Immunfluoreszenz-Färbung von F4/80 für den Nachweis von Makrophagen

Der für Makrophagen spezifische Marker F4/80 diente zum Nachweis dieser Immunzellen in den Hautproben der verschiedenen Therapiegruppen. Die Färbung erfolgte wieder über dem Prinzip einer indirekten Immunfluoreszenz-Färbung. Das prinzipielle Vorgehen war vergleichbar zu der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung von CD3 mit lediglich anderen Puffern, Antikörpern und Inkubationszeiten: als Waschpuffer wurde PBS verwendet und die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte in 5 % Ziegen Serum in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper (Ratte anti-Maus F4/80) und der Isotyp-Antikörper (Normales Ratten IgG) wurden 1:500 in 5 % Ziegen Serum in PBS verdünnt und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Gewebeschnitte gegeben. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (AlexaFluor 594 konjugiertes Ziegen anti-Ratte IgG) zur Bindung des primären bzw. des Isotyp-Antikörpers erfolgte in einer 1:500 Verdünnung in PBS für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

Immunfluoreszenz-Färbung von Ly6G für den Nachweis von Neutrophilen

Neutrophile in der läsionalen und nicht-läsionalen Haut in den verschiedenen Versuchsgruppen wurden über die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung des Neutrophilen-spezifischen murinen Markers Ly6G nachgewiesen. Die auf Superfrost Objektträger aufgezogenen Hautschnitte wurden zunächst in Histol für dreimal 10 Minuten entparaffiniert, gefolgt von jeweils fünf Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 %, 97 %, 70 % und 50 % zum Rehydrieren des Gewebes inkubiert. Die Objektträger wurden einmal für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und die Schnitte mit dem Dako-Pen umkreist. Durch die Fixierung des Gewebes mittels der 4 %-igen Formaldehyd-Lösung Histofix können Bindungsstellen von Antigenen maskiert werden, so dass Antikörper entsprechend nicht mehr an ihrer Bindungsstelle binden können. Daher wurde ein Enzym-induzierter Demaskierungsschritt durchgeführt. Durch den Verdau des Enzyms werden entsprechende Bindungsstellen wieder frei und die jeweiligen Antikörper können wieder an ihnen binden. In dieser Färbung wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten mit der Pepsin *ready-to-use* Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal für fünf Minuten in TBS Waschpuffer gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt der unspezifischen Bindungsstellen in 5 % Ziegen Serum in TBS

Waschpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Direkt danach wurden die Hautschnitte mit dem primären Antikörper (Ratte anti-Maus Ly6G) bzw. der Isotyp-Kontrolle (Normales Ratten IgG) in einer 1:100 Verdünnung in 5 % Ziegen Serum in TBS Waschpuffer über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger zunächst wieder dreimal für fünf Minuten in TBS Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (AlexaFluor 594 konjugiertes Ziegen anti-Ratte IgG) zur Bindung des primären bzw. des Isotyp-Antikörpers in einer 1:500 Verdünnung in TBS Waschpuffer für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden erneut dreimal für fünf Minuten in TBS Waschpuffer gewaschen und zuletzt in DAPI-Fluoromount eingebettet. Die Lagerung bis zur Mikroskopie erfolgte lichtgeschützt bei -20 °C.

Immunfluoreszenz-Färbung vom Zellproliferationsmarker Ki-67

Mittels indirekter Immunfluoreszenz-Färbung wurde ebenfalls die Zellproliferation der Zellen über den Proliferationsmarker Ki-67 in den Hautproben der unterschiedlichen Therapiegruppen analysiert. Dafür erfolgte, wie bereits oben beschrieben, die Entparaffinierung der Objektträger in Histol und der absteigenden Alkoholreihe. Die Demaskierung der Antigenbindungsstellen wurde hier durch einen Hitze-induzierten Schritt vollzogen: hierfür wurden die Objektträger für 10 Minuten in einem Liter 10 mM Na-Citrat Puffer bei 310 °C unter Druck in einem Schnellkochtopf gekocht. Zum Abkühlen der Proben wurde der Schnellkochtopf für etwa 30 Minuten auf Eis gestellt. Als die Objektträger wieder Raumtemperatur erreicht hatten, wurde diese dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte in 5 % Ziegen Serum in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubation des Primärantikörpers (Ratte anti-Maus Ki-67) in einer 1:20 Verdünnung bzw. des Isotyp-Antikörpers (Normales Ratten IgG) in einer 1:200 Verdünnung in 5 % Ziegen Serum in PBS erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte wieder ein Waschschrift mit PBS für dreimal fünf Minuten und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (AlexaFluor 594 konjugiertes Ziegen anti-Ratte IgG) in einer 1:500 Verdünnung in PBS für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und am Ende in DAPI-Fluoromount eingebettet und bis zur Mikroskopie bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

Immunhistochemische Färbung von FoxP3 für den Nachweis von Tregs

Für den Nachweis von Tregs innerhalb läsionaler Haut im Vergleich zwischen den verschiedenen Therapiegruppen zur nicht-läsionaler Haut wurde eine immunhistochemische Färbung gegen den spezifischen Treg Marker FoxP3 durchgeführt. Hierfür wurden zunächst, wie oben beschrieben, die Objektträger in Histol und der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Die Demaskierung erfolgte auch hier über einen Hitze-induzierten Schritt, wie auch bei der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung von Ki-67, nur wurde hier Tris-EDTA Puffer verwendet. Nach Abkühlen der Schnitte auf Eis wurde diese für dreimal fünf Minuten in TBS Waschpuffer gewaschen und mit dem Dako-Pen umkreist. Da das später verwendete Detektionssystem auf Peroxidase basierte, wurde im

nächsten Schritt die endogene Peroxidase im Gewebe blockiert, um eine unspezifische Färbung zu vermeiden. Dafür wurde auf die Hautschnitte 3 %-iges H_2O_2 in TBS Waschpuffer gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift in TBS Waschpuffer für jeweils fünf Minuten und die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen des Primärantikörpers in 5 % Ziegen Serum und 0,3 % Triton-X in TBS Waschpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Direkt danach wurde der Primärantikörper (Kaninchen anti-Maus FoxP3) in einer 1:1000 Verdünnung bzw. der Isotyp-Antikörper (Kaninchen IgG) in einer 1:4300 Verdünnung in 5 % Ziegen Serum in TBS Waschpuffer auf das Gewebe gegeben. Die Objektträger wurden mit den Antikörpern über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben wieder dreimal für fünf Minuten in TBS Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Detektionssystem des Kits SignalStain Boost IHC Detektionsreagenz (HRP, Kaninchen) von Cell Signaling für 30 Minuten bei Raumtemperatur nach Angaben des Herstellers. Dieses Kit ersetzt dabei die Verwendung eines eigenen sekundären Antikörpers und ermöglicht die anschließende spezifische Färbung des gewünschten Markers über die enthaltene HRP. Nach diesem Inkubationsschritt folgte ein weiterer Waschschrift in TBS Waschpuffer. Für die spezifische Färbung von FoxP3 wurde das Kit SignalStain DAB Substratkit von Cell Signaling nach Herstellerangaben verwendet: 30 μ l des SignalStain DAB Chromogenkonzentrat wurde in 1 ml SignalStain DAB Verdünnungspuffer gegeben und die Lösung durch vortexen gemischt. Je 50 μ l der Lösung wurden auf die Gewebeschnitte gegeben und in der zuvor bestimmten Reaktionszeit von 9 Minuten auf den Objektträgern gelassen. Innerhalb dieser Inkubation setzte die DAB-Lösung das HRP in der Haut um und es kam zu einer braunen Färbung der FoxP3-positiven Zellen. Nach diesen 9 Minuten wurden die Objektträger sofort dreimal fünf Minuten in TBS Waschpuffer gewaschen, um eine unspezifische Färbung zu verhindern. Es folgte eine Zellkernfärbung mit Mayer's Hämalaun. Dafür wurden die Objektträger zunächst für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen, um Pufferreste zu entfernen. Die Zellkernfärbung erfolgte anschließend für zwei Minuten in Mayer's Hämalaun. Die Schnitte wurde zuletzt unter fließendem Leitungswasser gebläut, abgetrocknet und mit DAKO Faramount eingebettet. Die Lagerung bis zur Mikroskopie erfolgte bei Raumtemperatur.

Mikroskopie und Auswertung der Immunfluoreszenz und -histochemischer Färbungen von Immunzellen

Die Mikroskopie der verschiedenen Immunfluoreszenz und -histochemischen Färbungen erfolgte ebenfalls am Keyence der BZ-9000E-Serie. Dabei erfolgte die Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit den Fluoreszenzkanälen CH3 für die Detektion der sekundären Antikörper Streptavidin Dylight 594 und AlexaFluor 594 konjugiertes Ziegen anti-Ratte IgG und CH1 für die Zellkernfärbung mit DAPI. Die immunhistochemische Färbung von FoxP3 wurde mittels Lichtmikroskopie analysiert.

Es wurden von jedem Hautschnitt je drei aufeinander folgende Ausschnitte von der Positivprobe und ein Ausschnitt von der Isotyp-Kontrolle in einer 200-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Die Schnitte wurden dabei jeweils so ausgerichtet, dass die Epidermis, wenn vorhanden, mit oben im Bild sichtbar war.

Die Auswertung erfolgte wieder geblindet nach einem quantitativen Bewertungsverfahren mit einem Punktesystem von 0 bis 4. Dabei galt „0“ als keine Färbung von Immunzellen, „1“ für eine Färbung von unter 10 % für Ki-67, Ly6G und F4/80 und 1-5 Zellen für CD3 und FoxP3, „2“ für eine Färbung zwischen 11 - 30 % für Ki-67, Ly6G und F4/80 und 6-10 Zellen für CD3 und FoxP3, „3“ für eine Färbung zwischen 31 - 75 % für Ki-67, Ly6G und F4/80 und 11-15 Zellen für CD3 und FoxP3 und „4“ wurde für eine Färbung von über 75 % für Ki-67, Ly6G und F4/80 und mehr als 15 positive Zellen für CD3 und FoxP3 vergeben. Die Bewertung erfolgte dabei einmal für die gesamte Haut, als auch für die Epidermis und Dermis jeweils getrennt. Da eine Hautläsion der EBA verschiedene Stadien von Bildung bis Verheilung durchläuft und diese durch Einwanderung verschiedener Immunzellen charakterisiert ist [209] wurden nur Proben der läsionalen Haut, welche sich in einem mittleren bis späten Stadium befanden, berücksichtigt und miteinander verglichen. Das mittlere bzw. späte Stadium wurde durch eine Verdickung der Epidermis und eventuell der zusätzlichen Ausbildung einer Blase zwischen Epidermis und Dermis definiert.

3.3.4 Trizol-basierende RNA-Aufreinigung aus muriner Haut

Aus 3.3.1.7 in flüssigen Stickstoff schockgefrorene und bei -80 °C gelagerten Proben läsionaler Haut und gesunder Haut wurde eine auf Trizol-basierende RNA-Aufreinigung nach dem Protokoll von A. Untergasser [210] durchgeführt. Es wurden dafür von je fünf Mäusen (i) gesunde Haut von unbehandelten B6.S und (ii) C57BL/6 Mäusen, sowie von je fünf Mäusen (iii) läsionale Haut aus der Positivgruppe und (iv) der mit 10^6 transferierten Tregs-Gruppe aus dem Ak-EBA-Mausmodell des adoptiven Treg Transfer-Versuchs verwendet. Vor Beginn der RNA-Aufreinigung wurde der Arbeitsplatz und alle verwendeten Hilfsmittel mit RNase-Spray gesäubert. Von jedem Hautstück wurde für die RNA-Aufreinigung etwa 4x4 mm Haut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß möglichst klein geschnitten und 1 ml Trizol hinzugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 200 µl Chloroform dazu pipettiert. Die Proben wurden zum Mischen gevortext und noch einmal für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden bei 12.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen: die obere durchsichtige Phase mit der enthaltenen RNA wurde in ein jeweils neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (etwa 600 µl) und das gleiche Volumen von 70 % EtOH hinzugegeben und gut durchmischt. Die gesamte Lösung wurde in je eine Säule des RNeasy Mini Kits von Qiagen gegeben und für 15 Sekunden bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden je 700 µl des RW1 Puffers des RNeasy Mini Kit dazu pipettiert und nochmals zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Vom DNase I Kit von Qiagen wurden pro Probe vorsichtig je 10 µl Qiagen DNase mit 70 µl RDD-Puffer vermischt und auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden mit der DNase-Lösung für 15 Minuten zum Verdau der DNA bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde auf jede Säule 350 µl RW1-Puffer des RNeasy Mini Kit dazu gegeben, und diese noch einmal für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit einem Verwerfen des Durchflusses. Auf jede Säule wurden 500 µl des RPE-Puffers gegeben und für eine Minute bei 8.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Säulen wurden danach auf je ein neues Sammelgefäß gesetzt und für zwei Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit aus der Säulenmatrix

zu entfernen. Anschließend wurden die Säulen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, und, um die RNA aus der Säulenmatrix zu eluieren, wurden je 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt bei höchster Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Es folgte eine Quantitäts- und Qualitätsmessung der RNA an einem Qubit™ 4 Photometers von Invitrogen. Während dieser Messungen wurde die RNA auf Eis gehalten.

Zur Bestimmung der Menge der eluierten RNA wurde das Qubit™ RNA BR Assay Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet: zunächst wurde die Qubit™ Arbeitslösung aus einer 1:200 Verdünnung des Qubit™ RNA BR Reagent in Qubit™ RNA BR Buffer für je 190 µl Endvolumen für die beiden Standards und 198 µl pro Probe in Qubit™ Gefäßen angesetzt. In den beiden Standard-Gefäßen wurde je 10 µl eines Standards und pro Proben-Gefäß je 2 µl der entsprechende eluierten RNA-Probe hinzugegeben. Die Gefäße wurden gründlich gevortext und für etwa zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Qubit™ 4 Photometers wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe der Standards equilibriert und anschließend die Proben gemessen, um die Menge an eluierter RNA zu bestimmen.

Anschließend wurde eine Integritätsmessung der eluierten RNA durchgeführt, um zu überprüfen, dass keine bzw. kaum Degradierung der RNA während der Aufreinigung stattfand. Dafür wurde das Qubit RNA Integritäts- und Qualitätstestkit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit beruht auf der Verwendung zweier Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum, wobei einer davon selektiv an intakte RNA und der andere an degradierte RNA bindet. Durch die Kombination der beiden Emissionssignale mit Hilfe eines bestimmten Algorithmus erhält man einen Wert zwischen 1 - 10, der das Verhältnis zwischen degradierter und intakter RNA beschreibt. Wobei „10“ für eine vollständig intakte RNA steht. Für die Integritätsmessung wurde zunächst die Qubit™ IQ-Arbeitslösung aus einer 1:200 Verdünnung des Qubit™ RNA IQ Reagenz in Qubit™ RNA IQ Puffer für je 190 µl Endvolumen für die drei Standards und 198 µl pro Probe in Qubit™ Gefäßen angesetzt. Zu den drei Standard-Gefäßen wurde je 10 µl des entsprechenden Standards und pro Proben-Gefäß je 2 µl der entsprechende eluierten RNA-Probe hinzugegeben. Die Gefäße wurden gründlich gevortext und für etwa zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Qubit™ 4 Photometers wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe der Standards equilibriert und anschließend die Proben gemessen, um die Integrität an eluierter RNA zu bestimmen. Wenn der Integritätswert einer eluierten RNA-Probe unter „8“ gelegen hätte, wäre diese Probe verworfen worden und eine neue RNA-Aufreinigung aus der Hautprobe wäre durchgeführt worden.

Nach der Quantitäts- und Integritätsmessung wurden je 20 µl jeder RNA-Probe extra aliquotiert und alle Proben wurden bei -80 °C gelagert. 20 µl jeder Probe wurden anschließend zu Novogene (Cambridge, Vereinigtes Königreich) zur mRNA-Sequenzierung mit 20 Millionen Reads pro Probe versendet.

3.3.5 Analyse Dateien sequenzierter Einzel- bzw. totaler mRNA

Die Analyse der Dateien der totalen mRNA aus läSIONALER Haut bzw. nicht-läSIONALER Haut, generiert von Novogene, wurden von Dr. Katja Bieber und Dr. Artem Vorobjev mit Hilfe von Salmon (Version 1.10.0) quantifiziert und zum Mausgenom mm10 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_000001635.9/; 01.03.2023) als Referenz ausgerichtet und verglichen. Dies ergab für jede Probe eine Datei mit Auflistung jedes auftretenden Transkripts, dessen Länge und seiner Häufigkeit in Bezug auf Transkripte pro Millionen und der geschätzten Anzahl an Lesevorgängen. Nachfolgende Analysen erfolgten mittels R Studio für Windows (Version 2022.12.0-353). Die quantifizierten sequenzierten mRNA-Daten wurden durch Anwendung des R Pakets DESeq2 (Version 3.16) auf unterschiedlich exprimierte Gene (*Differential Expressed Genes*; DEGs) mit einem Cut-Off des bereinigten p-Werts $< 0,01$ und $-1 > \log_2 \text{fold change (FC)} > 1$ untersucht. Mit Hilfe der R Pakete ggplot2 (Version 3.4.0) wurden die Ergebnisse bildlich dargestellt. Um festzustellen, ob die DEGs mit einem bestimmten biologischen Prozess oder einer molekularen Funktion verbunden sind, wurde WebGestalt (*WEB-based Gene Set Analysis Toolkit*: <https://www.webgestalt.org/>, 01.03.2023) verwendet. Der *Fisher's exact statistical test* wurde zur Berechnung der p-Werte herangezogen.

3.3.6 Statistik

GraphPadPrism Software (Version 9.4.1) wurde für die statistischen Auswertungen verwendet. Die jeweiligen verwendeten statistischen Tests, sowie die Fehlerwahrscheinlichkeit (p) und der zugehörige Stichprobenumfang (n) sind bei den zugehörigen Abbildungen angegeben. Gewonnene Datensätze wurden zunächst auf Ausreißer mit Grubb's Test (mit $\alpha = 0,05$) und auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Bestätigte signifikante Ausreißer wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Bei einer Normalverteilung der Daten erfolgte die anschließende statistische Analyse von metrischen Datensätzen mittels t-Tests bzw. One-way-ANOVA für zwei bzw. mehrere Gruppen. Datensätze, welche als zusätzliche Einflussgröße die Zeit innehatten, wurden mittels Two-way-ANOVA auf Signifikanz getestet. Als Post-Hoc Analyse wurde bei Vergleich mehrere Gruppen der Holm-Šidák's multiple comparison- oder beim Vergleich zu einer Kontrollgruppe der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die statistische Auswertung ordinaler, nicht-parametrischer Datensätze erfolgte über einen Mann-Whitney-Test. Alle Daten wurden als Mittelwerte und mit Standardfehler (MW \pm SEM; *standard error of the mean*) dieses dargestellt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen mit für p: * $< 0,05$, p: ** $< 0,01$, p: *** $< 0,002$ und p: **** $\leq 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Der Anteil an Tregs steigt in läsionaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell

Es konnte schon in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden, dass Tregs auf Grund einer reduzierten Anzahl oder eines Funktionsverlustes den Verlauf einer Erkrankung negativ beeinflussen können [78–81]. In Bezug auf PDs sind die Daten über Tregs zum Teil jedoch widersprüchlich und vornehmlich deskriptiv [164,194–197]. Um die Rolle der Tregs in der Effektorphase der EBA besser zu verstehen, wurde daher zunächst untersucht, wie sich der Anteil der Tregs in dem hier verwendeten Ak-EBA-Mausmodell allgemein verhält.

4.1.1 Der Anteil an Tregs ist im Ak-EBA-Mausmodell unverändert in lymphatischen Organen, weist jedoch einen Anstieg in läsionaler Haut auf

Zunächst wurde der Anteil der Tregs, gemessen an der totalen CD4+ Zellpopulation, in Ak-EBA-Mäusen in verschiedenen lymphatischen Organen und der Haut über die Zeit mit einer mit NR IgG behandelten Kontrollgruppe verglichen. Dafür wurden an Tag Null (Induktion der EBA), Vier und Zwölf von jeweils drei bis vier Mäusen pro Gruppe mittels Durchflusszytometrie die Treg-Populationen (CD3+CD4+CD25+FoxP3+) von Milz, mesenterialen Lymphknoten (LK-M), Blut und Haut erfasst (Abbildung 9). In der Milz blieb der Anteil an Tregs an CD4+ Zellen in beiden Gruppen über die Zeit mehr oder weniger konstant und vergleichbar miteinander mit 7,15 % ± 2,36 an Tag Null zu 6,40 % ± 0,45 für NR IgG bzw. 5,05 % ± 2,95 für Ak-EBA an Tag Zwölf (Abbildung 9A). In Bezug auf LK-M waren beide Gruppen hinsichtlich der Verteilung der Treg wieder über die untersuchte Zeit kaum zu unterscheiden, hier verdoppelte sich jedoch der Anteil der Tregs von 5,21 % ± 0,64 zu Beginn auf 8,79 % ± 2,47 (NR IgG) bzw. 10,76 % ± 2,65 (Ak-EBA) an Tag Zwölf in beiden Gruppen (Abbildung 9B). Im Blut wiesen die Positiv- und Kontrollgruppe ebenfalls keinen Unterschied zueinander auf (0,99 % ± 1,01 an Tag Null und 2,15 % ± 1,01 NR IgG bzw. 1,88 % ± 1,16 Ak-EBA an Tag Zwölf), die Werte zwischen den Mäusen unterlagen jedoch einer großen Standardabweichung an den verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 9C). Für die Haut wurde, wenn vorhanden, läsionale Haut für die Durchflusszytometrie verwendet. Das war für die Positivgruppe an Tag Zwölf der Fall. Hier zeigte sich dann ebenfalls ein Trend ($p = 0,0571$; Mann-Whitney-Test) in Bezug auf den Treg-Anteil zwischen den Gruppen, mit 12,7 % ± 4,3 in der Ak-EBA-Gruppe und 3,4 % ± 0,6 in der NR-IgG Kontrollgruppe. An Tag Null (5,15 % ± 2,33) und Vier (1,08 % ± 1,29 NR IgG bzw. 0,81 % ± 0,40 Ak-EBA) waren die Werte beider Gruppen zueinander nahezu identisch und vergleichbar mit dem Wert von der Kontrollgruppe an Tag Zwölf (Abbildung 9D).

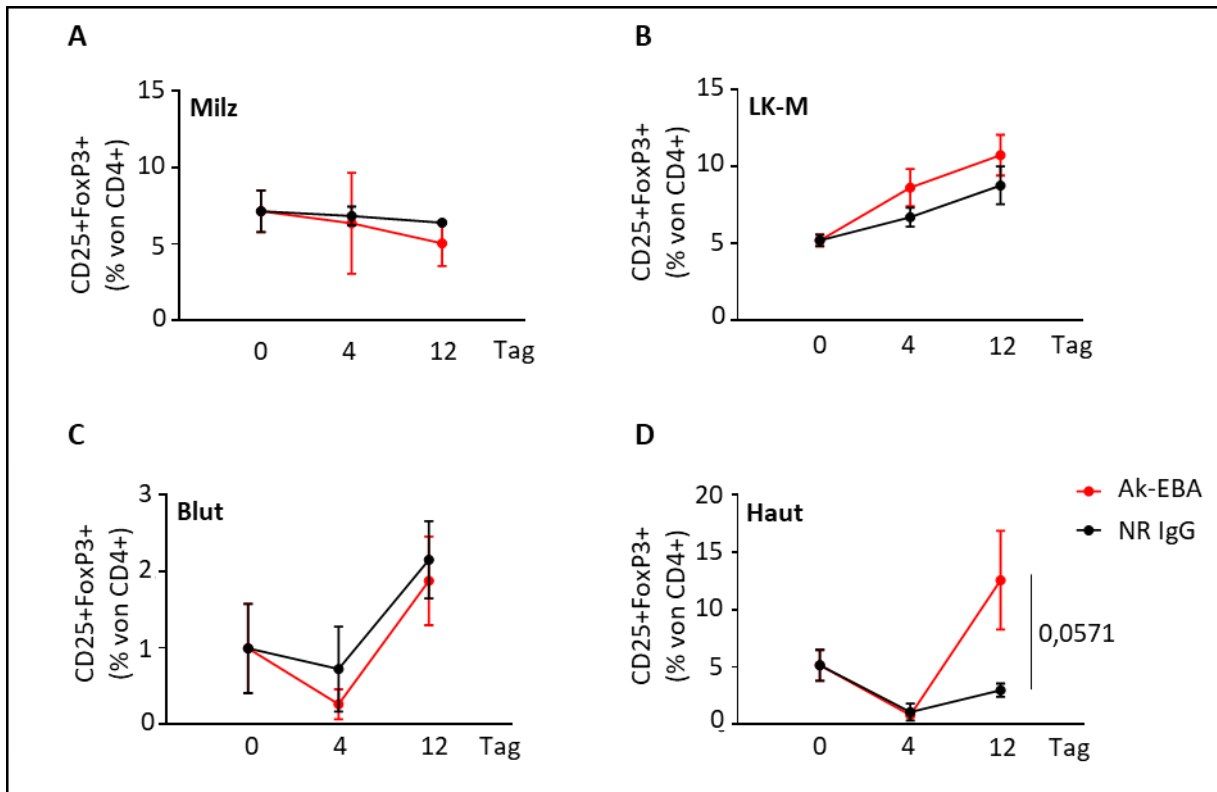


Abb. 9: Anteil der Tregs an CD4+ Zellen in verschiedenen Organen im Ak-EBA-Mausmodell im Vergleich zur Kontrollgruppe über die Zeit. Dargestellt sind die mittels Durchflusszytometrie erfassten Anteile an Tregs (CD25+FoxP3+) an CD4+ Zellen **(A)** in der Milz, **(B)** im mesenterialen Lymphknoten (LK-M), **(C)** im Blut und **(D)** der Haut in den Gruppen der Ak-EBA und der Kontrollgruppe (NR IgG) an den Tagen Null, Vier und Zwölf. Datensätze zeigen den MW \pm SEM mit $n = 3-4$. Lediglich an Tag Zwölf konnte ein Trend mit einem Anstieg am Anteil der Tregs in der Haut in der Positivgruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden ($p = 0,0571$; Mann-Whitney-Test). Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; NR IgG: *Normal Rabbit IgG* (Normales Kaninchen IgG).

4.1.2 Der Anteil an Tregs ist signifikant höher in läSIONALER Haut als in nicht-läSIONALER Haut in Mäusen der Ak-EBA

Als nächstes wurde untersucht, ob sich der Anteil an Tregs in der Haut in Mäusen der Ak-EBA innerhalb einer Maus zwischen läSIONALER Haut und nicht-betroffener Haut (nicht-läSIONALER Haut) unterscheidet. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen von Tregs von in Paraffin-eingebetteten Hautschnitten von acht bis zwölf unterschiedliche Mäuse ausgewertet. Es zeigte sich, dass in läSIONALER Haut ($2,35 \pm 0,22$) signifikant mehr Tregs ($p \leq 0,001$; Mann-Whitney-Test) zu finden sind als in nicht läSIONALER Haut ($0,71 \pm 0,08$) (Abbildung 10A). Insbesondere in der oberen Dermis unterhalb der Spaltbildung konnte eine erhöhte Ansammlung an Tregs detektiert werden, die in nicht-läSIONALER Haut in der oberen Dermis ansonsten nicht zu finden war (Abbildung 10B).

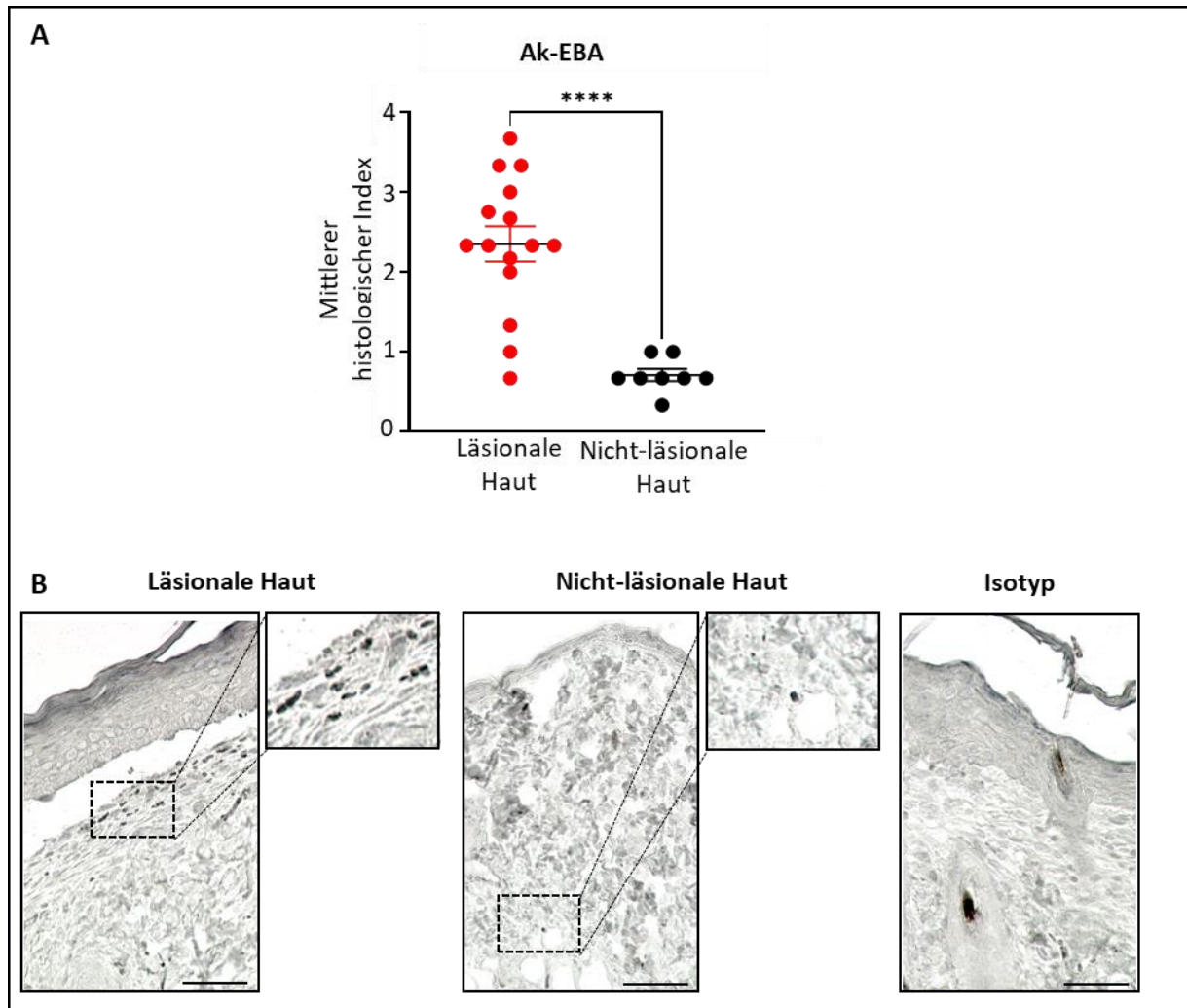


Abb. 10: Anteil an Tregs in läSIONALER Haut im Vergleich zur nicht-läsionaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell. (A) Dargestellt ist der mittlere histologische Index, welcher den Anteil an Tregs (FoxP3+) in immunhistochemisch-gefärbten Paraffin-eingebetteten Schnitten von läSIONALER bzw. nicht-läsionaler Haut abbildet. Datensätze zeigen den MW \pm SEM mit $n = 8-12$ und einem signifikanten Unterschied von $p \leq 0,001$ (Mann-Whitney-Test). (B) Repräsentative mikroskopische Bilder mit einer zusätzlichen Vergrößerung der positiven Tregs (braun-schwarz angefärbte Zellen) einer läSIONALen (links) und nicht-läsionalen Haut (Mitte), sowie einer Färbekontrolle derselben läSIONALen Haut mit dem passenden Isotyp-Antikörper (rechts). Maßstab: 50 μ m. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*. ****: $p \leq 0,001$.

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

Unabhängig von der ursprünglichen Anzahl an Tregs konnte schon in mehreren Autoimmunerkrankungen, wie auch in allergischen Erkrankungen und GVHD, gezeigt werden, dass eine Therapie mit niedrig dosiertem IL-2 bzw. einem IL-2-Antikörperkomplex vorhandene Treg-Populationen stimulieren und proliferieren lassen und somit einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung haben [203,205]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls versucht, ein zunächst präventives Behandlungsschema mit niedrig dosiertem IL-2 in der Form von Proleukin S oder einen IL-2-Antikörperkomplex in zwei unterschiedlichen Konzentrationen im Ak-EBA-Mausmodell als eine Therapiemöglichkeit zu etablieren. Neben dem klinischen Verlauf der EBA und dem Anteil an Tregs in Haut und lymphatischen Organen wurde der Grad der Entzündung, das Vorhandensein von inflammatorischen Immunzellen, sowie der Anteil an zirkulierenden Autoantikörpern und pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen bestimmt.

4.2.1 Die präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 bewirkt keine klinische Verbesserung der EBA im Ak-EBA-Mausmodell

Eine Möglichkeit, die Anzahl polyklonaler Tregs zu expandieren, ist die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 oder IL-2-Antikörperkomplexen [94,203,204]. Um die Auswirkung der Gabe der zwei Konzentrationen an IL-2-Antikörperkomplexen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk und 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk) bzw. dem niedrig dosiertem IL-2 (25.000 IU Proleukin S) im Ak-EBA-Mausmodell zu bewerten, wurde zunächst der klinische Verlauf untersucht.

Dafür wurde zum einen der Anteil an betroffener Körperoberfläche an den vier Bewertungstagen jeder Therapiegruppe erfasst und mit den Werten einer gleichzeitig analysierten unbehandelten Gruppe (PBS) verglichen. Jede Gruppe bestand dabei aus sieben bis neun Mäusen. Insgesamt stieg in allen Gruppen der prozentuale Anteil an betroffener Körperoberfläche über die betrachtete Zeit an. Während aber bis Tag Acht alle vier Gruppen von ihrem Anteil an mit EBA betroffener Körperoberfläche vergleichbar waren, wiesen an Tag Zwölf die beiden Therapiegruppen 1 µg / 5 µ anti-IL-2 mAk und 5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk einen signifikanten höheren Wert (5,68 % ± 2,47 mit $p < 0,01$ und 6,21 % ± 0,92 mit $p \leq 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (4,12 % ± 1,24). Die Mäuse aus der Therapiegruppe mit Gabe des 25.000 IU Proleukin S zeigten an Tag Zwölf ebenfalls eine geringfügig höhere prozentuale betroffene Körperoberfläche auf (4,15 % ± 2,07) (Abbildung 11).

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

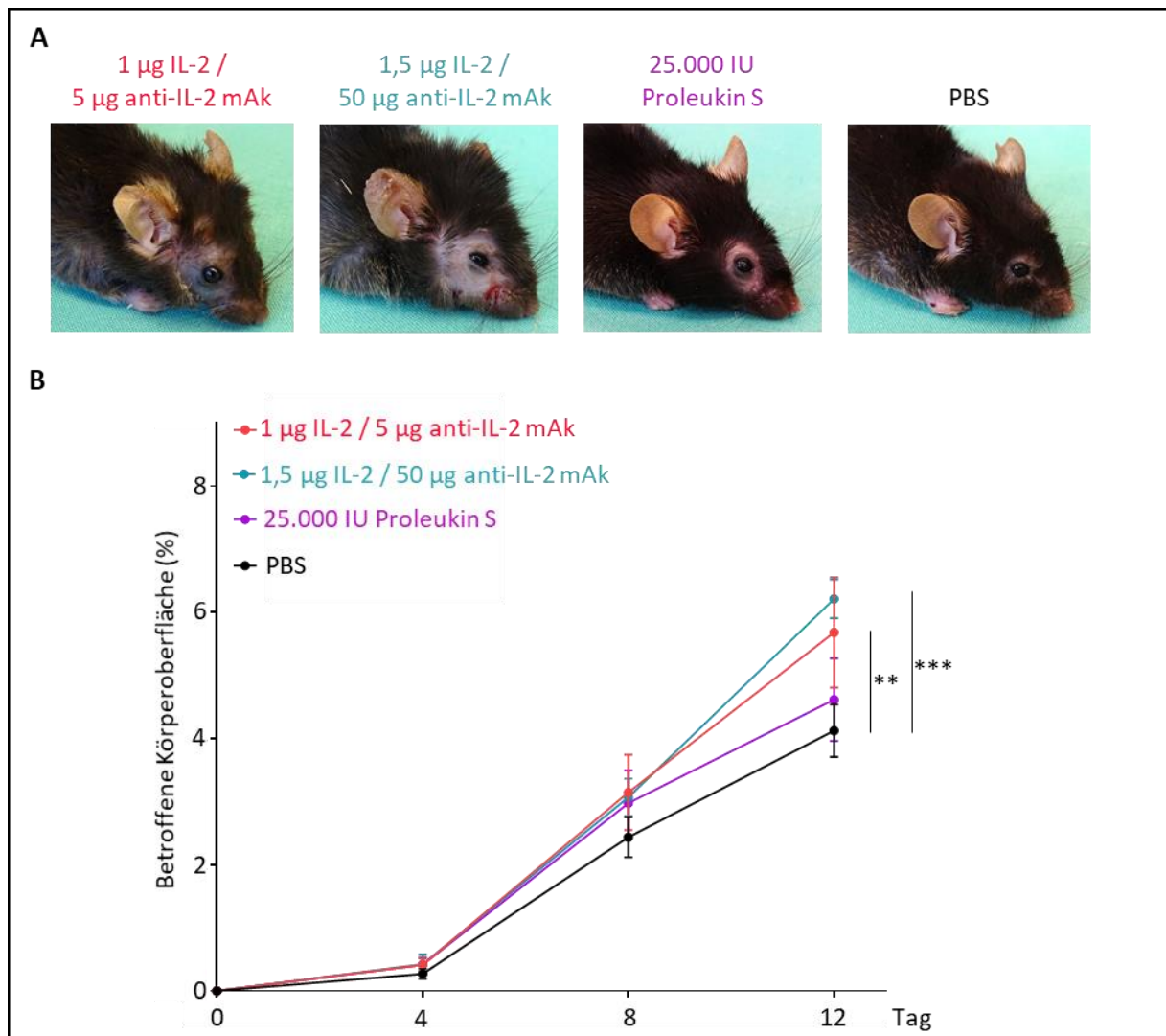


Abb. 11: Die präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 bewirkt keine Verminderung der betroffenen Körperoberfläche im Ak-EBA-Mausmodell. (A) Repräsentative Bilder je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk; 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. **(B)** Darstellung des Verlaufs der betroffenen Körperoberfläche in Prozent über die Zeit. Die Mäuse aus der Positivgruppe wiesen den niedrigsten klinischen Wert auf, gefolgt von einem nur geringfügig höheren Wert der Mäuse aus der 25.000 IU Proleukin S Gruppe. Mäuse aus den Gruppen, welche die IL-2 / anti-IL-2 mAk bekamen, zeigten einen signifikanten Anstieg an betroffener Körperoberfläche im Vergleich zur Positivgruppe an Tag Zwölf auf mit $p < 0,002$ für die Gruppe mit 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk und $p < 0,01$ für die Gruppe mit 1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk. Datensätze sind als MW ± SEM mit $n = 7-9$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels *Two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparison* Post Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,002$.

Um den klinischen Phänotyp der EBA weiter zu charakterisieren und um die Auswirkung der Therapieformen mit IL-2 auf diesen spezifischer zu bewerten, wurden von den Mäusen H&E Färbungen von deren Ohren ausgewertet. Diese Art der Histopathologie ist eine der Goldstandards zum Nachweis einer EBA [167]. Hier zeigte sich, dass alle vier Gruppen die charakteristische Verdickung der Epidermis

aufwiesen mit einem ähnlichen Trend, wie schon bei der betroffenen Körperoberfläche: die Positivgruppe wies im Mittel die geringste Verdickung auf ($1,80 \pm 0,56$), gefolgt von vergleichbaren Werten der 25.000 IU Proleukin S ($2,27 \pm 0,63$) und $1 \mu\text{g} / 5 \mu\text{g}$ anti-IL-2 mAk ($2,15 \pm 0,49$) Gruppen. Der Mittelwert der Gruppe mit dem höher konzentrierten IL-2 Antikörperkomplex bildete auch hier wieder den höchsten Wert ($2,84 \pm 0,28$) (Abbildung 12A und B). Auch der Grad der Entzündung bzw. die Infiltration von Immunzellen ergab ein ähnliches Bild: eine erhöhte Anzahl eingewanderter Immunzellen konnte bei jeder Gruppe beobachtet werden, aber die beiden Gruppen, welche mit IL-2 Antikörperkomplexen therapiert wurden, wiesen einen höheren Entzündungs-Index auf ($2,57 \pm 0,17$ bzw. $2,80 \pm 0,10$) als die Gruppen, welche 25.000 IU Proleukin S ($1,80 \pm 0,51$) erhalten hatte und die Positivkontrolle ($1,97 \pm 0,51$) (Abbildung 12A und C).

Ein weiterer diagnostische Goldstandard für EBA ist die direkte Immunofluoreszenz (DIF)-Mikroskopie einer periläsionalen Hautbiopsie. Dabei werden für einen positiven Befund der Erkrankung lineare Ablagerungen von IgG, IgA und/oder C3 entlang der Basalmembran bzw. der dermalen-epidermalen Spalte mittels der DIF nachgewiesen [208].

Um den Grad der Erkrankung an EBA zwischen den verschiedenen Therapiegruppen weiter zu bestätigen und qualifizieren, wurden DIF-Färbungen von C3 und des injizierten Kaninchen IgG (anti-mCOL7^{c-GST} IgG) an Schnitten von den gleichen Ohren, wie bei der H&E-Färbung durchgeführt, um deren Ablagerung entlang der Basalmembran bzw. der dermal-epidermalen Spalte nachzuweisen [208]. Bezüglich der C3 Ablagerung ergab sich zwischen den vier betrachteten Gruppen kein signifikanter Unterschied. Dabei ergab sich für die beiden Gruppen, welche mit den IL-2 Antikörperkomplexen behandelt wurden ein Fluoreszenzsignal für C3 mit $1,54 \pm 0,39$ bzw. $1,46 \pm 0,43$. Einen niedrigeren Wert mit gerade etwa der Hälfte von der vorherigen Gruppe besaß die Positivkontrolle mit einem deutlich schwächeren Fluoreszenzsignal, aber noch gut sichtbar ($0,87 \pm 0,26$). Die Gruppe mit niedrig dosiertem IL-2 halbierte sich fast wieder im Vergleich zur vorherigen Gruppe und zeigte einen Wert von unter 1 mit $0,46 \pm 0,21$ an, was heißt, dass hier bei einigen Mäusen der Gruppe kaum C3 detektiert werden konnte (Abbildung 13).

Die Ergebnisse der Auswertung der IgG Ablagerung ergaben wieder ein ähnliches Bild: es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit jeweils einem mittleren Fluoreszenz-Index für IgG von $1,74 \pm 0,25$ bzw. $1,36 \pm 0,31$ für die beiden Gruppen, welche mit den IL-2-Antikörperkomplexen therapiert worden sind, und $0,81 \pm 0,28$ für Proleukin S bzw. $0,51 \pm 0,16$ für die Kontrollgruppe (Abbildung 14).

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

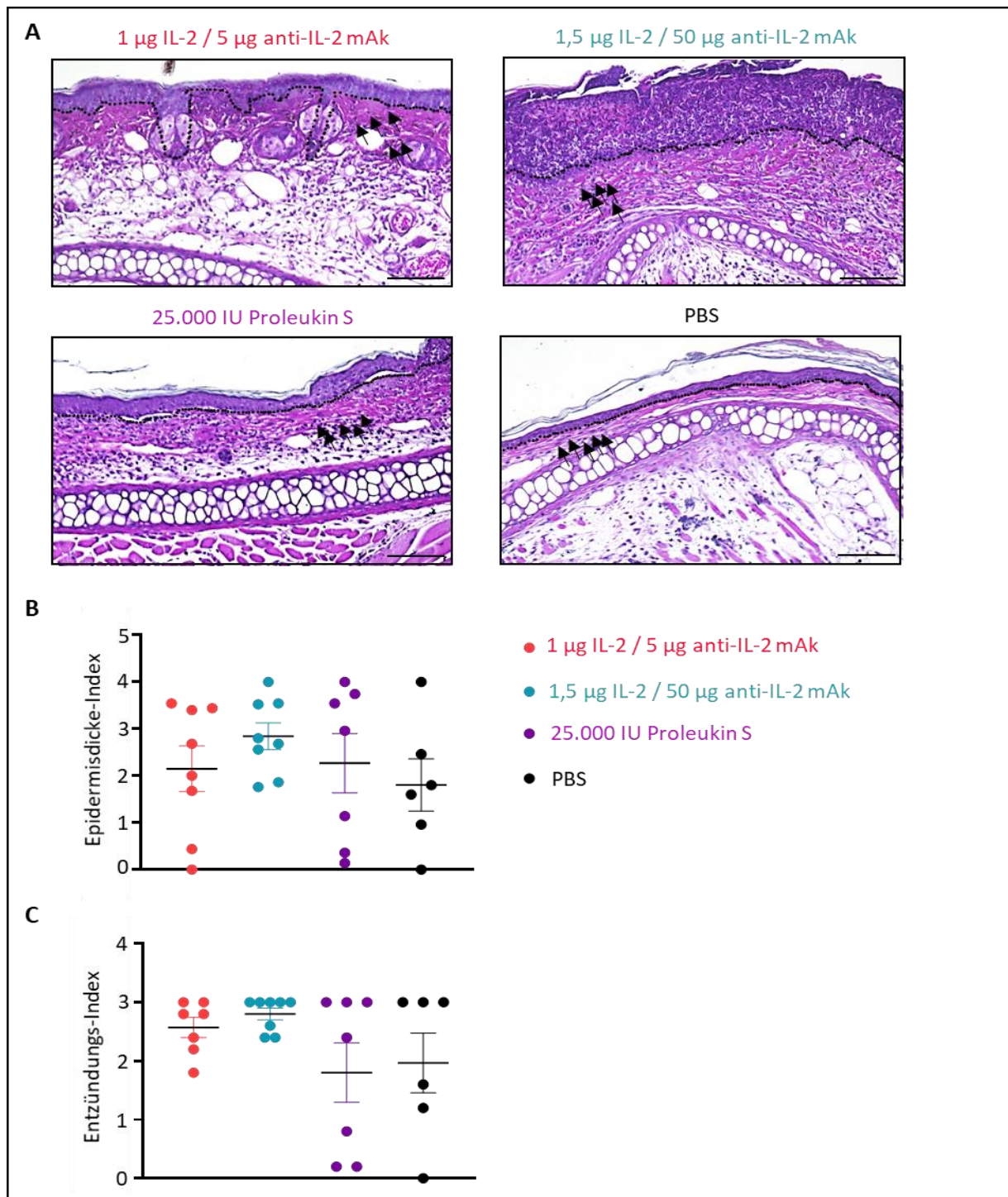


Abb. 12: Entzündung und Dicke der Epidermis im Ak-EBA-Mausmodell werden nach präventiver Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 nicht beeinflusst. **(A)** Repräsentative Bilder je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 μg IL-2 / 5 μg anti-IL-2 mAk; 1,5 μg IL-2 / 50 μg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Die Grenze zwischen Dermis und Epidermis wird durch gestrichelte Linie und eingewanderte Immunzellen (violett gefärbte Zellen) durch je fünf Pfeile dargestellt. **(B)** Epidermisdicke und **(C)** der Grad der Entzündung der vier betrachteten Gruppen mit n = 7-9 pro Gruppe. Keine der drei Therapiegruppen wies bei einem der beiden betrachteten Parameter einen signifikanten Unterschied zur Positivgruppe auf. Datensätze sind als MW \pm SEM dargestellt. Maßstab: 100 μm . Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

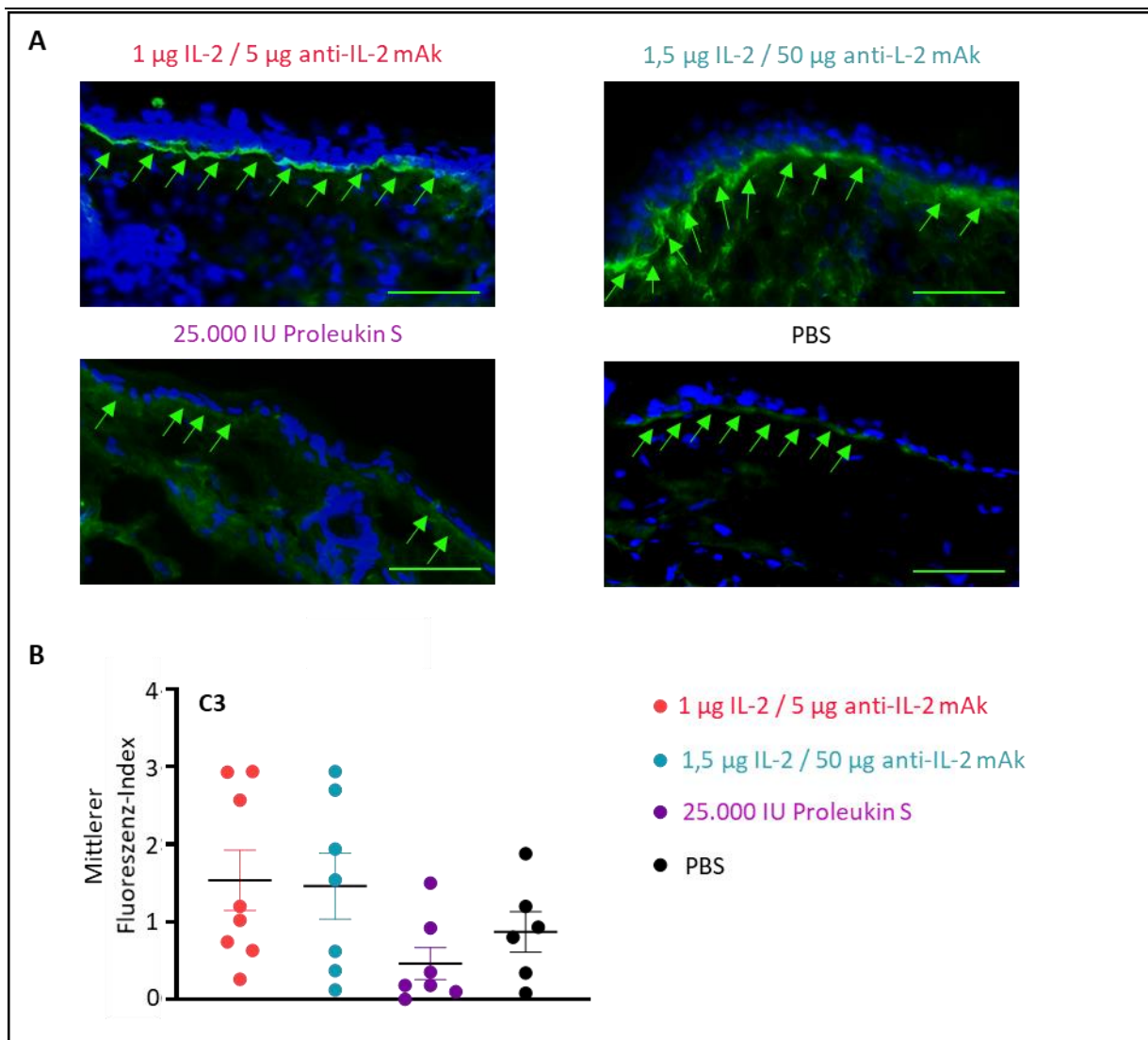


Abb. 13: C3 Ablagerung entlang der Basalmembran wird nicht signifikant durch eine präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell beeinflusst. (A) Repräsentative mikroskopische Bilder der C3 Färbung je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk; 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. C3 Ablagerung wird hier in grün dargestellt und ist entlang der Basalmembran (Pfeile) sichtbar. Kernfärbung mittels DAPI hier in blau. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von C3 der vier Gruppen mit n = 7-9 pro Gruppe. Keine der drei Therapiegruppen wies einen signifikanten Unterschied zur Positivgruppe auf. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt. Maßstab: 100 µm. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

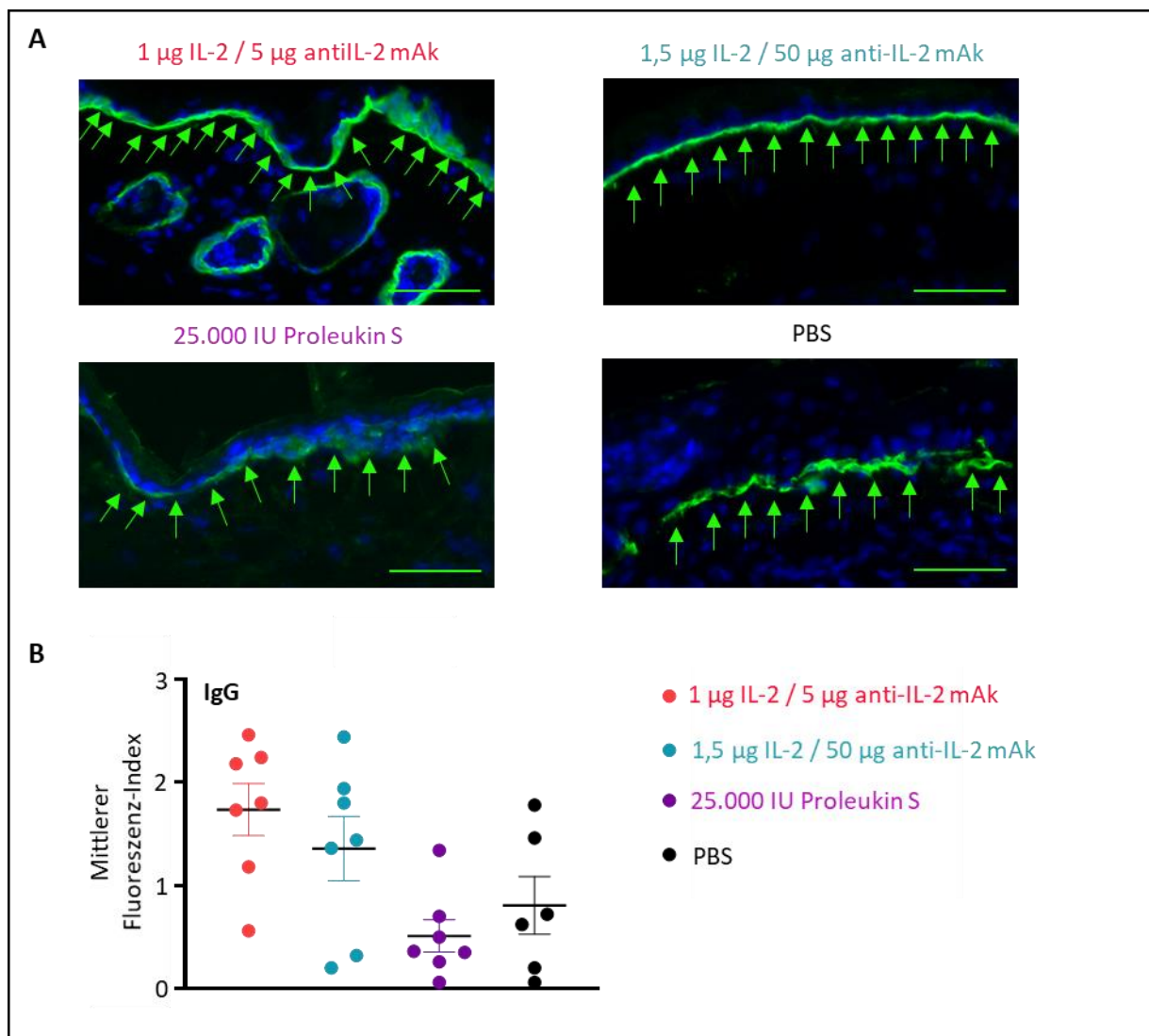


Abb. 14: DIF von IgG zeigt keinen signifikanten Einfluss der präventiven Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAb oder niedrig dosiertem IL-2 bezüglich der IgG Ablagerung entlang der Basalmembran im Ak-EBA-Mausmodell. **(A)** Repräsentative mikroskopische Bilder der IgG Färbung je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAb; 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAb und 25.000 IU Proleukin S) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. IgG Ablagerung wird hier in grün dargestellt und ist entlang der Basalmembran (Pfeile) sichtbar. Kernfärbung mittels DAPI hier in blau. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von IgG der vier Gruppen mit n = 7-9 pro Gruppe. Keine der drei Therapiegruppen wies einen signifikanten Unterschied zur Positivgruppe auf. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt. Maßstab: 100 µm. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*. DIF: direkte Immunfluoreszenz.

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

4.2.2 Eine präventive Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk bewirkt eine längere Zirkulation des injiziertem Kaninchen IgGs im Plasma des Ak-EBA-Modells

Eine weitere Nachweismethode der EBA beinhaltet den Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern, [167], im Ak-EBA-Mausmodell entsprechend dem injizierten Kaninchen IgG. Um möglichen Auswirkungen der angewendeten IL-2 Therapie auf den Titer der injizierten Kaninchenantikörper zu erfassen, wurde mittels eines spezifischen ELISAs die Titer dieses IgGs im Plasma am Ende des Versuches gemessen. Die Kaninchenantikörper stellen dabei die spezifischen Autoantikörper mCOL7^c_{GST} IgG dar. Es stellte sich heraus, dass nur noch in der 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk Gruppe IgG mit 5,36 µg/ml ± 2,60 nachgewiesen werden konnte ($p < 0,05$). Bei allen anderen Gruppen konnte dieses im Plasma nicht mehr detektiert werden (Abbildung 15).

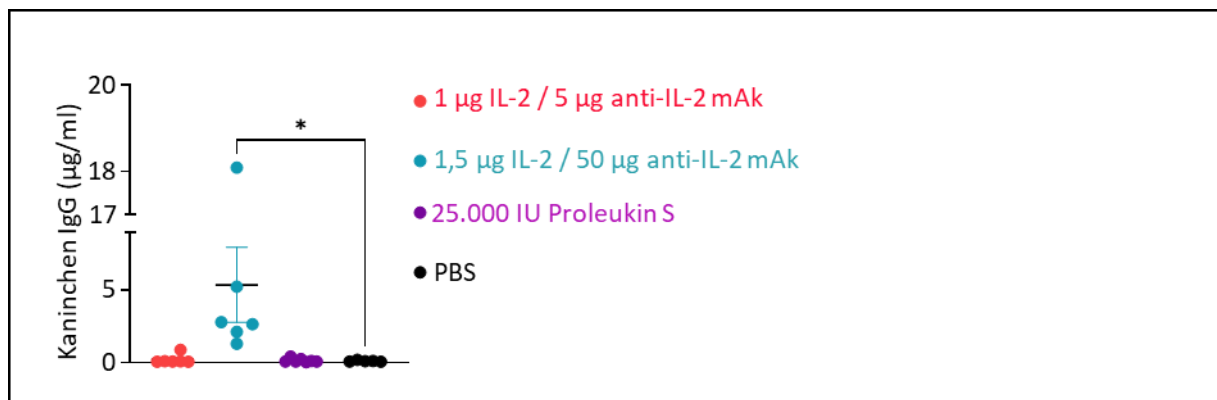


Abb. 15: Eine präventive Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk bewirkt eine längere Zirkulation des injiziertem Kaninchen IgGs im Plasma des Ak-EBA-Modells. Titer des injiziertem Kaninchen IgGs der drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk; 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der Positivgruppe (PBS) im Plasma in µg/ml an Tag Zwölf nach erstmaliger Injektion des IgGs. Nur die Gruppe 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk wies mit einem höheren Wert einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zur Positivgruppe auf. Datensätze sind als MW ± SEM mit $n = 7-9$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*. *: $p < 0,05$.

4.2.3 Die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma wird nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell signifikant erhöht

Zytokine sind wichtige Mediatoren, die Immun- und Entzündungsreaktionen über komplexe Netzwerke steuern und regulieren und als Biomarker für viele Krankheiten dienen. Die Schwankungen des Zytokinspiegels in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten wie Serum, Blut, Stuhl, Speichel und Schweiß liefern wertvolle Informationen über Diagnose, Stadium und Prognose verschiedener Krankheiten, darunter auch Autoimmunerkrankungen. Die genaue Quantifizierung von Zytokinen liefert daher wertvolle Informationen über den Immunstatus eines Patienten [211]. Um den Effekt der präventiven Gabe an niedrig dosiertem IL-2 bzw. der zwei verwendeten IL-2 Antikörperkomplexe in Ak-EBA-Mausmodell auf in Blut zirkulierende freie Zytokine zu erfassen, wurde mittels LEGENDplex™ die Konzentrationen von insgesamt 16 verschiedene Zytokine im Plasma gemessen: zum einen die für Th1 charakteristischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2. Ebenso die von Th2 produzierten Zytokine IL-4,

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

IL-5 und IL-13 und das von Th9 freigesetzte IL-9. Th17 typische Zytokine, welche ebenfalls mitgemessen wurden, waren IL-17A, IL-17F und IL-22. Zusätzlich wurde noch die Konzentration an IL-10, welches Tregs und T Follikularhelferzellen zugeordnet werden kann, und die Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-1 α , IL-6 und GM-CSF im Plasma gemessen [212,213]. Als 16. Analyt wurde CXCL1 gewählt, welches eine bedeutende Rolle in der Rekrutierung von Neutrophilen in das Gewebe besitzt [214].

Lediglich für IL-2 wies die Gruppe mit 1,5 μ g IL-2 / anti-IL-2 mAk einen signifikanten Anstieg der Konzentration des Zytokins (121,53 pg/ml \pm 45,71) im Plasma gegenüber der Kontrollgruppe (42,66 pg/ml \pm 20,01) auf ($p < 0,05$). Alle anderen Zytokinkonzentrationen in den drei Therapiegruppen waren ähnlich zu denen in der Positivgruppe (Tabelle 10).

Tab. 10: Die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma wird nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell signifikant erhöht. Mittels Legendplex wurden von 16 Zytokinen deren Konzentration in pg/ml in Plasma der drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 μ g IL-2 / 5 μ g anti-IL-2 mAk; 1,5 μ g IL-2 / 50 μ g anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs gemessen. Die Gruppe 1,5 μ g IL-2 / 50 μ g anti-IL-2 mAk wies eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der IL-2 Konzentration im Plasma im Vergleich zu der Positivgruppe (PBS) auf. Datensätze sind als MW \pm SEM mit $n = 5-9$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*. *: $p < 0,05$.

Zytokin	PBS	1 μ g IL-2 / 5 μ g anti-IL-2 mAk	1,5 μ g IL-2 / 50 μ g anti-IL-2 mAk	Proleukin S (25.000 IU)
IL-1 β	1,42 \pm 1,23	1,46 \pm 1,39	2,16 \pm 3,51	1,23 \pm 2,12
IL-4	0,79 \pm 0,27	0,88 \pm 0,70	0,77 \pm 0,34	0,33 \pm 0,26
IL-1 α	4,83 \pm 2,74	3,40 \pm 1,31	3,44 \pm 1,67	3,49 \pm 2,38
IFN- γ	0,52 \pm 0,24	0,64 \pm 0,49	0,55 \pm 0,34	0,52 \pm 0,51
TNF- α	7,25 \pm 6,52	6,10 \pm 4,84	5,85 \pm 6,23	10,76 \pm 7,13
CXCL1	48,01 \pm 29,00	88,43 \pm 73,53	57,11 \pm 29,76	36,49 \pm 17,53
IL-10	4,51 \pm 2,97	6,34 \pm 2,48	18,43 \pm 21,52	4,76 \pm 3,28
IL-13	1,97 \pm 0,91	2,38 \pm 0,70	1,81 \pm 0,42	2,62 \pm 0,83
IL-17A	1,21 \pm 0,19	1,82 \pm 0,90	0,96 \pm 0,35	1,66 \pm 0,64
GM-CSF	0,59 \pm 0,06	0,57 \pm 0,21	0,83 \pm 1,23	0,40 \pm 0,05
IL-5	5,35 \pm 2,55	3,66 \pm 1,95	4,29 \pm 1,87	4,68 \pm 3,06
IL-2	42,66 \pm 20,01	38,94 \pm 43,39	121,53 \pm 45,71 (*)	36,78 \pm 22,20
IL-6	86,56 \pm 31,11	174,22 \pm 106,06	120,78 \pm 50,74	111,42 \pm 50,57
IL-9	13,23 \pm 11,23	30,80 \pm 25,33	10,20 \pm 8,39	14,00 \pm 11,29
IL-17F	0,57 \pm 0,38	1,20 \pm 1,04	0,51 \pm 0,36	1,03 \pm 0,46
IL-22	3,10 \pm 1,82	4,24 \pm 2,67	3,44 \pm 1,02	7,76 \pm 7,09

4.2.4 Der Anteil spezifischer Immunzellpopulationen steigt in der Milz nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell

Die Gabe der IL-2-Antikörperkomplexe bzw. des niedrig dosiertem IL-2 hatte das Ziel, die polyklonalen Treg-Populationen zu proliferieren. Daher wurden mittels Durchflusszytometrie Tregs, sowie auch weiterer Immunzellen, in Milz, mesenterialen Lymphknoten, Blut und läsionaler Haut erfasst. Es zeigte sich, dass lediglich in der Milz die Gruppe mit 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk mit einer Verdreifachung des Treg-Anteils an CD4+ Zellen mit 17,65 % ± 1,91 mit einem signifikanten Anstieg an Tregs gegenüber der Positivgruppe von 5,42 % ± 0,67 einherging ($p \leq 0,001$) (Abbildung 16A). Innerhalb der anderen lymphatischen Organe (nicht gezeigt), als auch der läsionalen Haut (Abbildung 16D, links) zeigte sich kein Unterschied des Treg-Anteils an CD4+ Zellen der Therapiegruppen zu der Positivgruppe. In der Milz konnte aber ebenfalls in der Gruppe mit hoher IL-2-Antikörperkomplex Gabe ein signifikanter Anstieg der T Effektorzellen mit einer Verdreifachung des Anteils an CD4+ Zellen von 3,85 % ± 0,18 auf 10,80 % ± 0,19 ($p \leq 0,001$) (Abbildung 16B) und einer Verdopplung an CD11b+ Zellen mit 29,33 % ± 1,70 (Abbildung 16C) gegenüber der Positivgruppe mit 14,95 % ± 2,37 festgestellt ($p < 0,01$) werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse der 25.000 IU Proleukin S Gruppe eine signifikante Erniedrigung des Anteils an T Effektorzellen mit etwa nur noch zweidrittel des Wertes (2,66 % ± 0,22) gegenüber zur Positivgruppe ($p < 0,01$) (Abbildung 16B). In der läsionalen Haut gab es, wie schon bei den Tregs, keinen signifikanten Unterschied der weiteren untersuchten Zellpopulationen der Therapiegruppen zu der Positivgruppe (Abbildung 16D).

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

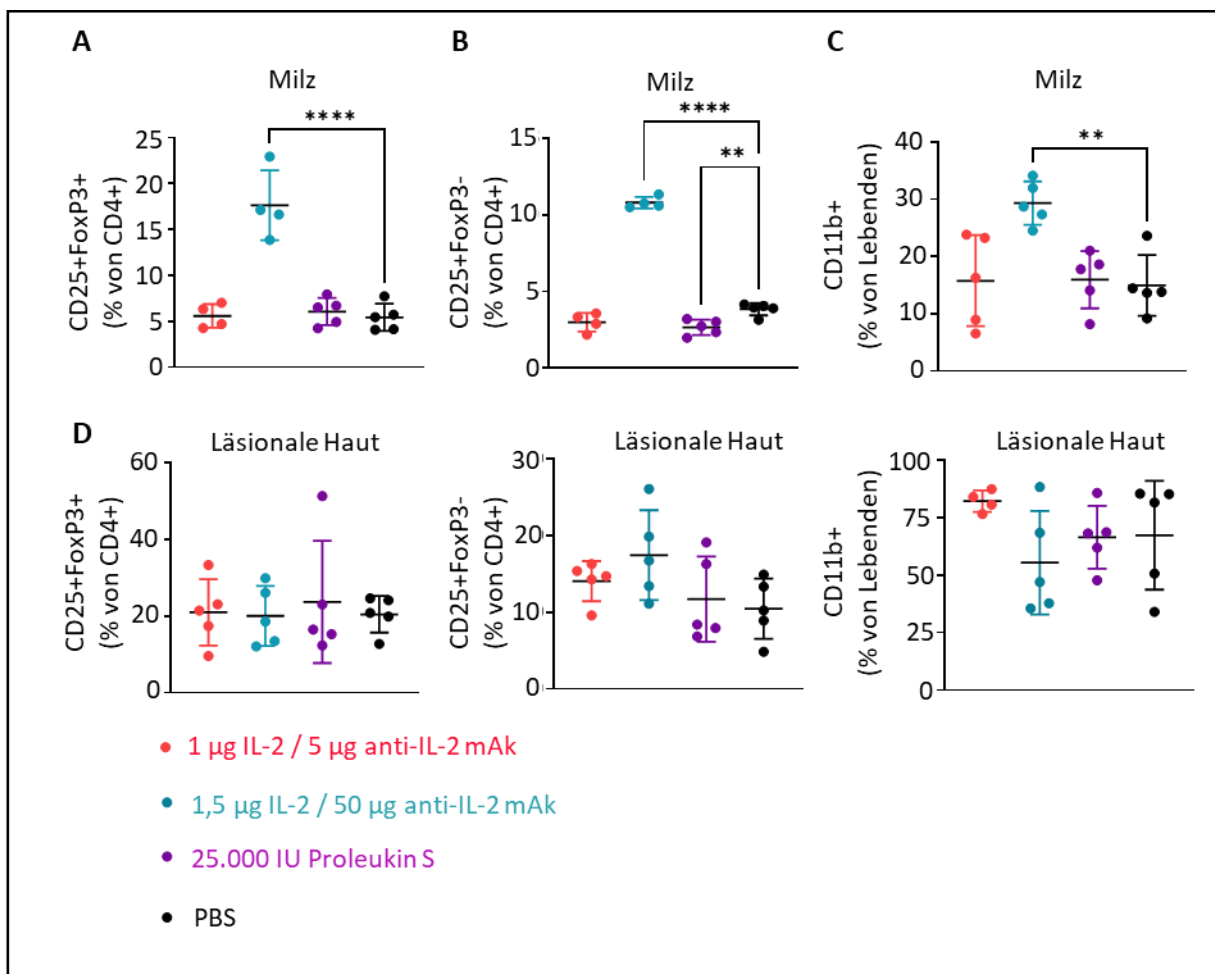


Abb. 16: Der Anteil spezifischer Immunzellpopulationen steigt in der Milz nach einer präventiven Behandlung mit einer hohen Dosis an IL-2/anti-IL-2 mAk im Ak-EBA-Mausmodell. Darstellung der drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk; 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs bezüglich des Anteils an **(A)** Tregs (CD25+FoxP3+) an CD4+ Zellen, **(B)** T Effektorzellen (CD25+FoxP3-) an CD4+ Zellen und **(C)** CD11b+ Zellen an lebenden Zellen in der Milz. Die Gruppe 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk wies für alle drei Zellpopulationen einen signifikanten Anstieg gegenüber zur Positivgruppe auf (Tregs und T Effektorzellen: $p \leq 0,001$ und CD11b+ Zellen: $p < 0,01$). Mäuse der 25.000 IU Proleukin S Gruppe zeigten im Mittel einen signifikanten geringeren Anteil an T Effektorzellen zur Positivgruppe auf ($p < 0,01$). **(D)** In der läsionalen Haut konnten keine signifikanten Unterschiede der untersuchten Zellpopulationen aus den drei Therapiegruppen zur Positivgruppe festgestellt werden. Datensätze sind als MW \pm SEM mit $n = 7-9$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels *Holm-Šidák's multiple comparison Test*. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*. **: $p < 0,01$; ****: $p \leq 0,001$.

4.2.5 Präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Anzahl der Zellen verschiedener Immunzellpopulationen in läsionaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell

Die Effektorphase der EBA ist gekennzeichnet durch eine hohe Infiltrationsrate von inflammatorischen Zellen in die läsionale Haut, wie Neutrophile, T Effektorzellen, als auch Monozyten bzw. Makrophagen [159]. Um festzustellen, ob eine präventive Gabe an niedrigdosiertem IL-2 bzw. IL-2-Antikörperkomplexen in der Effektorphase der Ak-EBA in läsionaler Haut einen direkten oder auch indirekten Effekt auf Tregs, als auch weiteren Immunzellen, bewirkt, wurden verschiedene immunfluoreszenz- bzw. histochemische Färbungen angefertigt. Zum einen wurde die Proliferation der Zellen, als auch die Größe der Makrophagen-, Neutrophilen-, T Zell- und Treg-Populationen in der läsionalen Haut zwischen den drei Therapiegruppen und der Kontrollgruppe im Vergleich zu einer gesunden Haut miteinander verglichen. Für eine verbesserte Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wurden nur Läsionen mit einer aktiven Entzündung bewertet.

Zur Erfassung des Proliferationsgrades der Zellen in läsionaler Haut wurde der Marker Ki-67 betrachtet. Ki-67 gilt als einer der zuverlässigsten Marker für proliferierenden Zellen und kann während des gesamten Zellzyklus bis auf in der Ruhephase G_0 nachgewiesen werden [215]. In allen drei Behandlungsgruppen und der Positivgruppe konnten vermehrt positiv gefärbte Ki-67 Zellen in der Dermis läsionaler Haut in Vergleich zu nicht-läsionalen Hautbereichen derselben Tiere gefunden werden. Die Ki-67 positiven Zellen fanden sich dabei bevorzugt im Bereich der Spaltbildung oder um Haarfollikel zentriert (Abbildung 17A). Der Unterschied zwischen nicht-läsionaler Haut und läsionaler Haut in Bezug der Ki-67 Expression wurde auch durch den signifikanten Anstieg der Ki-67-positiven Zellen in läsionaler Haut der Positivkontrolle ($1,96 \pm 0,28$) im Vergleich zu den nicht-läsionalen Häuten aller vier Gruppen deutlich ($0,17 \pm 0,17$ mit $p < 0,01$). Gleichzeitig zeigte jedoch die Auswertung der für Ki-67 gefärbten prozentualen Anteils keinen signifikanten Unterschied der drei Behandlungsgruppen ($1,60 \pm 0,37$; $1,72 \pm 0,23$ und $2,40 \pm 0,39$) zu der läsionalen Haut der Positivkontrolle (Abbildung 17B).

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

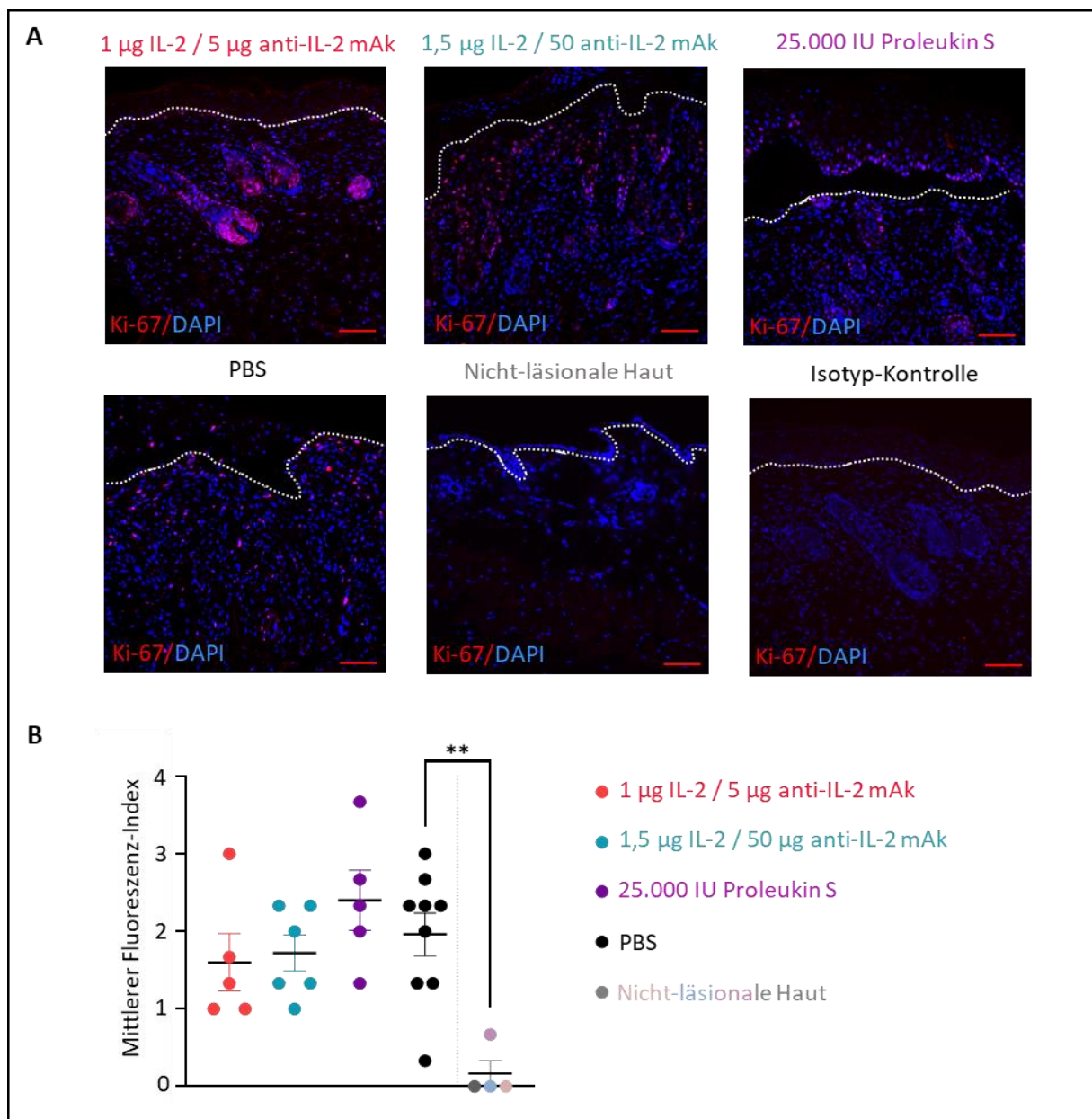


Abb. 17: Präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 bewirkt keinen Unterschied bezüglich der Ki-67 Expression in läsionaler Haut. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Ki-67 Färbung in läsionaler Haut je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 μg IL-2 / 5 μg anti-IL-2 mAk; 1,5 μg IL-2 / 50 μg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S), der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{C-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. Ki-67 positive Zellen werden in Rot dargestellt und Kernfärbung mittels DAPI in Blau. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von Ki-67 der gesamten läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 4-9). Der Datensatz der nicht-läsionalen Haut beinhaltet je einen Wert von einer nicht-läsionalen Haut aus einer der vier betrachteten Gruppen (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Keine der drei Therapiegruppen wies einen signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle auf. Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut mittels Mann-Whitney-Test verglichen und zeigten einen signifikanten Anstieg mit $p < 0,01$. Datensätze sind als MW \pm SEM dargestellt. Maßstab: 100 μm ; **: $p < 0,01$.

Eine der Immunzellpopulation, die auf einen möglichen Effekt der IL-2 Behandlung auf derselben mittels einer Immunfluoreszenzfärbung betrachtet wurde, waren Makrophagen. Es gibt Hinweise, dass auch Makrophagen mit an der Blasenbildung der EBA beteiligt sein können, da diese Zellen ebenso in der Lage sind größere Mengen an ROS nach Stimulation zu produzieren und zumindest *ex vivo* in der Lage sind eine Spaltbildung in menschlicher Haut zu induzieren [165,166]. Für die Erfassung der Makrophagen in der Haut wurde das Glykoprotein F4/80 verwendet. F4/80 gilt, auch wenn eventuell weitere Zellen diesen Marker exprimieren, immer noch als einer der spezifischsten Zelloberflächenmarker für murine Makrophagen [216,217]. Er wird in hohem Maße und konstitutiv auf den meisten residenten Gewebemakrophagen exprimiert, einschließlich der Langerhans-Zellen in der Haut [218]. In den betrachteten Gruppen zeigte sich bezüglich der Makrophagen in allen drei Behandlungsgruppen und der Positivkontrolle vermehrt positiv gefärbt F4/80 Zellen in der läsionalen Haut in Vergleich zu den nicht-läsionalen Hautbereichen derselben Tiere. Die detektierten Makrophagen in der läsionalen Haut befanden sich dabei in hoher Anzahl bevorzugt im Bereich der unteren Dermis und zogen sich hoch in die obere Dermis bis unter die verdickte Epidermis. Im Vergleich dazu wies die nicht-läsionale Haut nur vereinzelt Makrophagen verteilt innerhalb der Dermis aus (Abbildung 18A). Der Unterschied zwischen nicht-läsionaler Haut und läsionaler Haut in Bezug des Anteils an positiv gefärbten Makrophagen wurde auch durch den signifikanten Anstieg der F4/80 positiven Zellen in läsionaler Haut der Positivkontrolle ($3,46 \pm 0,19$) im Vergleich zu den nicht-läsionalen Häuten aller vier Gruppen deutlich ($1,00 \pm 0,24$ mit $p < 0,01$). Auch hier zeigte jedoch die Auswertung der für F4/80 gefärbten prozentualen Anteils keinen signifikanten Unterschied der drei Behandlungsgruppen ($3,20 \pm 0,25$; $2,97 \pm 0,33$ und $3,46 \pm 0,33$) zu der läsionalen Haut der Positivkontrolle (Abbildung 18B).

Die Haupteffektorzellen der Effektorphase der EBA sind die Neutrophilen, welche nach Bindung und Aktivierung die EBA-typischen entzündlichen Gewebsschäden durch Freisetzung ihrer Mediatoren bewirken [161,162]. Daher wurde als nächstes in der läsionalen Haut der verschiedenen Gruppen die Neutrophilen betrachtet. Diese wurden anhand ihres exklusiv exprimierten Markers Ly6G identifiziert [219,220]. Hier zeigte sich, dass in der nicht-läsionalen Haut nur wenig Ly6G-positive Zellen detektiert werden konnten ($0,08 \pm 0,08$). Hingegen wies die läsionale Haut der Positivkontrolle vermehrt positiv gefärbte Zellen innerhalb der gesamten Dermis auf ($2,30 \pm 0,34$) mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zu der nicht-läsionalen Haut. Hingegen ergab sich zwischen der läsionalen Haut der Positivkontrolle und den läsionalen Häuten der Therapiegruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens der Neutrophilen in der Haut ($2,67 \pm 0,42$; $1,83 \pm 0,33$ und $2,73 \pm 0,54$) (Abbildung 19).

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

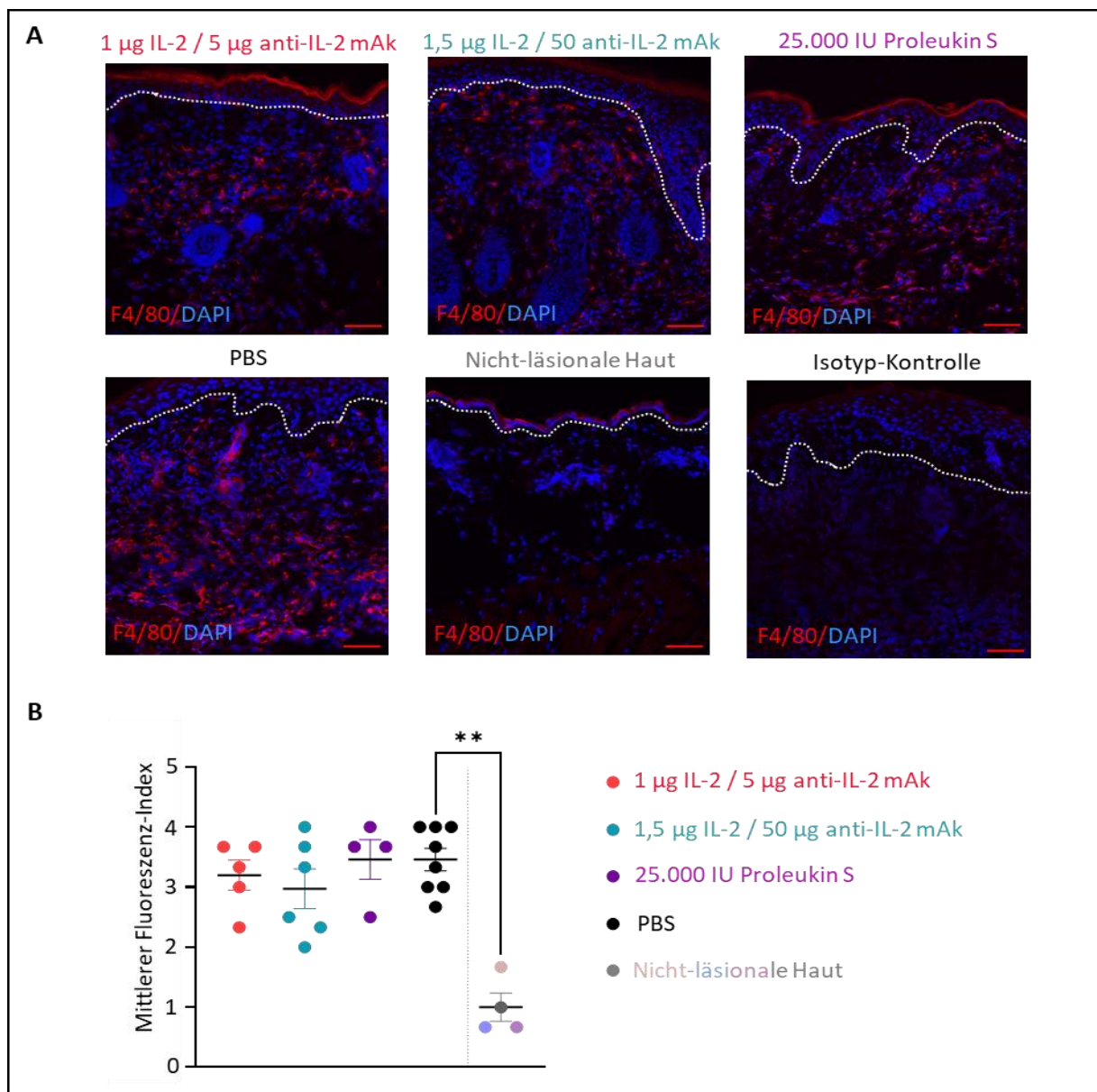


Abb. 18: Die Makrophagen-Population in läSIONALER Haut bleibt vergleichbar zur Positivkontrolle nach präventiver Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 im Ak-EBA-Mausmodell. **(A)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der mittels F4/80 gefärbten Makrophagen in läSIONALER Haut je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 μg IL-2 / 5 μg anti-IL-2 mAk; 1,5 μg IL-2 / 50 μg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S), der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. F4/80 positive Zellen werden Rot und Kernfärbung mittels DAPI Blau dargestellt. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von F4/80 in läSIONALER Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 4-9). Datensatz der nicht-läsionalen Haut beinhaltet je einen Wert von einer nicht-läsionalen Haut aus einer der vier betrachteten Gruppen (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Keine der drei Therapiegruppen wies einen signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle auf. Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut mittels Mann-Whitney-Test verglichen und zeigten einen signifikanten Anstieg mit $p < 0,01$. Datensätze sind als MW \pm SEM dargestellt. Maßstab: 100 μm . Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; **: $p < 0,01$.

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

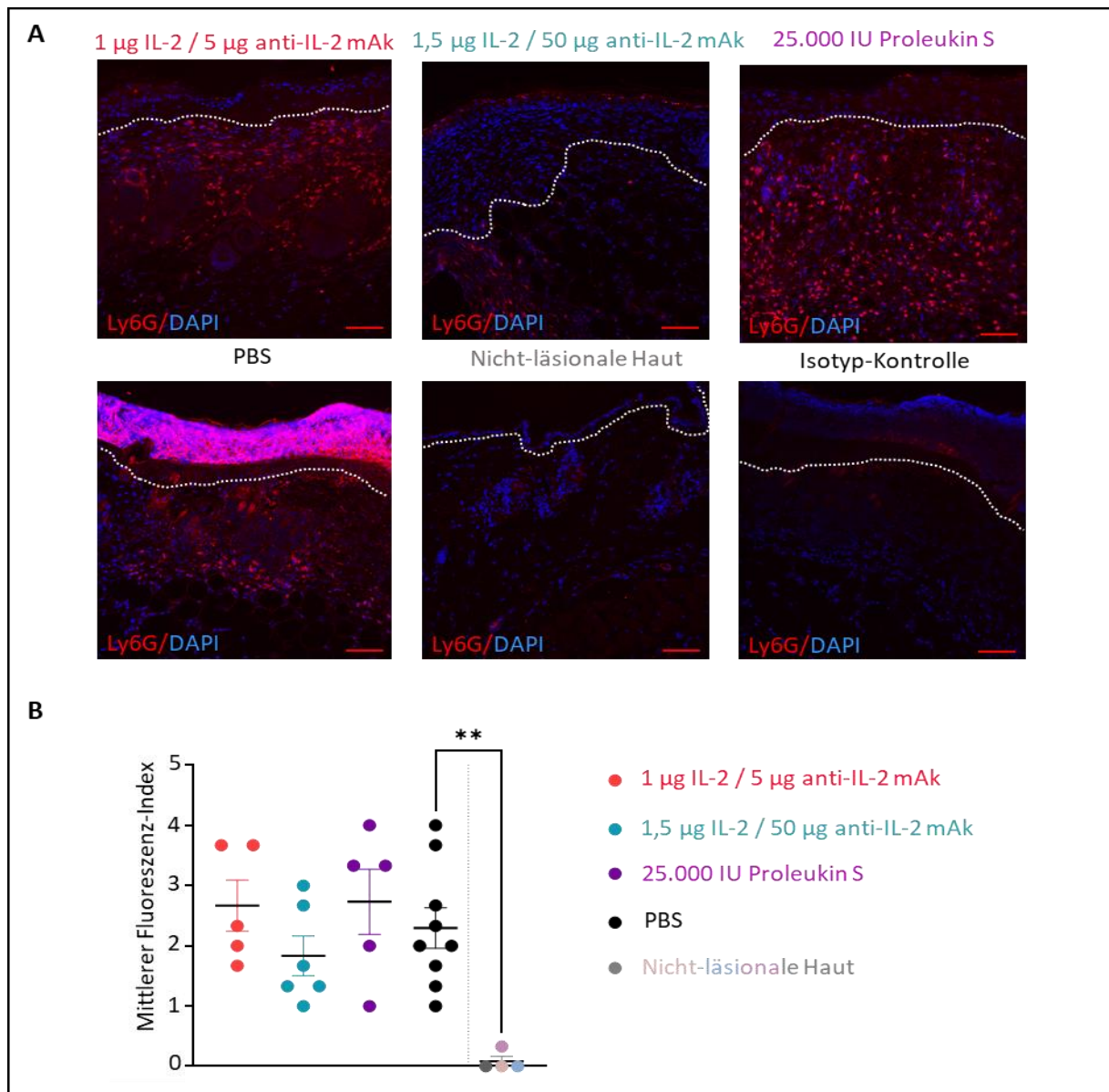


Abb. 19: Präventive Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 hat keine Auswirkungen auf die Neutrophilen-Population in läsionaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der mittels Ly6G gefärbten Neutrophilen in läsionaler Haut je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk; 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S), der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. Ly6G positive Zellen werden Rot und Kernfärbung mittels DAPI Blau dargestellt. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von Ly6G in läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 4-9). Datensatz der nicht-läsionalen Haut beinhaltet je einen Wert von einer nicht-läsionalen Haut aus einer der vier betrachteten Gruppen (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Keine der drei Therapiegruppen wies einen signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle auf. Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut mittels Mann-Whitney-Test verglichen und zeigten einen signifikanten Anstieg mit $p < 0,01$. Datensätze sind als MW \pm SEM dargestellt. Maßstab: 100 µm. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; **: $p < 0,01$.

Eine der Zellarten, die die Rekrutierung der Neutrophile in den Entzündungsbereich fördern, und daher ebenfalls eine wichtige Rolle in der EBA spielen, sind T Zellen. Insbesondere für $\gamma\delta$ T Zellen konnte diese Funktion nachgewiesen werden [163]. Eine direkte Beteiligung an Th Zellen konnte zwar noch nicht nachgewiesen werden [164]. Dennoch scheinen sie eine entscheidende Rolle bei der Antikörperproduktion und Aufrechterhaltung der Autoimmunreaktion in bullösen autoimmunen Dermatosen zu haben [165,192]. Daher wurde als nächstes allgemein T Zellen in den drei Behandlungsgruppen im Vergleich zu der Positivgruppe betrachtet. Zur Identifikation der T Zellen wurde der charakteristische Zelloberflächenmarker CD3 verwendet [221].

Da Epidermis und Dermis unterschiedliche T Zellpopulationen beherbergen, wurde zum Erfassen der T Zellpopulation einmal die Epidermis und Dermis zusammen (Abbildung 20B) und jeweils einmal nur die Dermis (Abbildung 20C) und Epidermis (Abbildung 20D) betrachtet: so befinden in der Epidermis dendritische epidermale T Zellen (DETZ), wie auch CD8+ gewebebewohnende T Gedächtniszellen (*CD8+ tissue resident memory cells*; CD8+ TRM-Zellen) und in der Dermis $\gamma\delta$ T Zellen und ebenfalls T Gedächtniszellen, sowie eingewanderte CD4+ T Zellen [222]. Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen zeigten in den drei Behandlungsgruppen jeweils nur eine geringe Anzahl an CD3 positiven Zellen innerhalb der Dermis. Die geringste Anzahl wies dabei die Gruppe mit 1 μ g IL-2 / 5 μ g anti-IL-2 mAk auf, gefolgt von der Gruppe mit 1,5 μ g IL-2 / 50 μ g anti-IL-2 mAk und etwas mehr in der Gruppe mit 25.000 IU Proleukin S. Die Positivkontrolle zeigte in der Dermis eine ähnliche Anzahl an T Zellen, wie die Proleukin S Gruppe, wies aber im Gegensatz zu den drei Behandlungsgruppen ebenso vermehrt CD3 positive Zellen innerhalb der Epidermis auf. T Zellen in der Epidermis, wie auch innerhalb der Dermis, konnten ebenso in nicht-läsionaler Haut vermehrt detektiert werden (Abbildung 20A). Epidermis und Dermis zusammen ergaben keinen signifikanten Unterschied der drei Behandlungsgruppen ($0,67 \pm 0,24$; $1,33 \pm 0,42$ und $1,93 \pm 0,63$) zu der Positivkontrolle ($2,13 \pm 0,29$) hinsichtlich der T Zellanzahl. Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen läsionaler Haut der Positivkontrolle und nicht-läsionaler Haut ($3,00 \pm 0,47$). Nicht-läsionale Haut wies dabei die höchste Anzahl an T Zellen auf (Abbildung 20B). Ein ähnliches Bild ergab sich, als nur die Dermis unter Ausschluss der Epidermis betrachtet wurde: die Datensätze waren alle ähnlich verteilt, nur zeigte hier die nicht-läsionale Haut eine etwas verringerte Anzahl an T Zellen auf ($2,23 \pm 0,73$), lag aber im Mittel immer noch auf einer ähnlichen Stufe wie die läsionale Haut der Positivgruppe ($1,75 \pm 0,30$) (Abbildung 20C). Lediglich die ausschließliche Betrachtung der Epidermis ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen: innerhalb der drei Behandlungsgruppen wies die Gruppe mit 1 μ g IL-2 / 5 μ g anti-IL-2 mAk gar keine T Zellen innerhalb der Epidermis auf und die beiden anderen Therapiegruppen nur ein paar vereinzelte Zellen ($0,20 \pm 0,13$). Da in der Positivkontrolle, wie schon oben beschrieben, vermehrt T Zellen in der Epidermis detektiert werden konnten ($1,84 \pm 0,44$), wurde dies anhand eines signifikanten Unterschiedes zwischen der Positivkontrolle und der 1 μ g IL-2 / 5 μ g anti-IL-2 mAk Gruppe sichtbar ($p < 0,05$). Gleichzeitig konnte in nicht-läsionaler Haut ($3,78 \pm 0,11$) ebenso signifikant mehr T Zellen innerhalb der Epidermis im Vergleich zur läsionalen Haut der Positivkontrolle gefunden werden ($p < 0,05$) (Abbildung 20D).

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

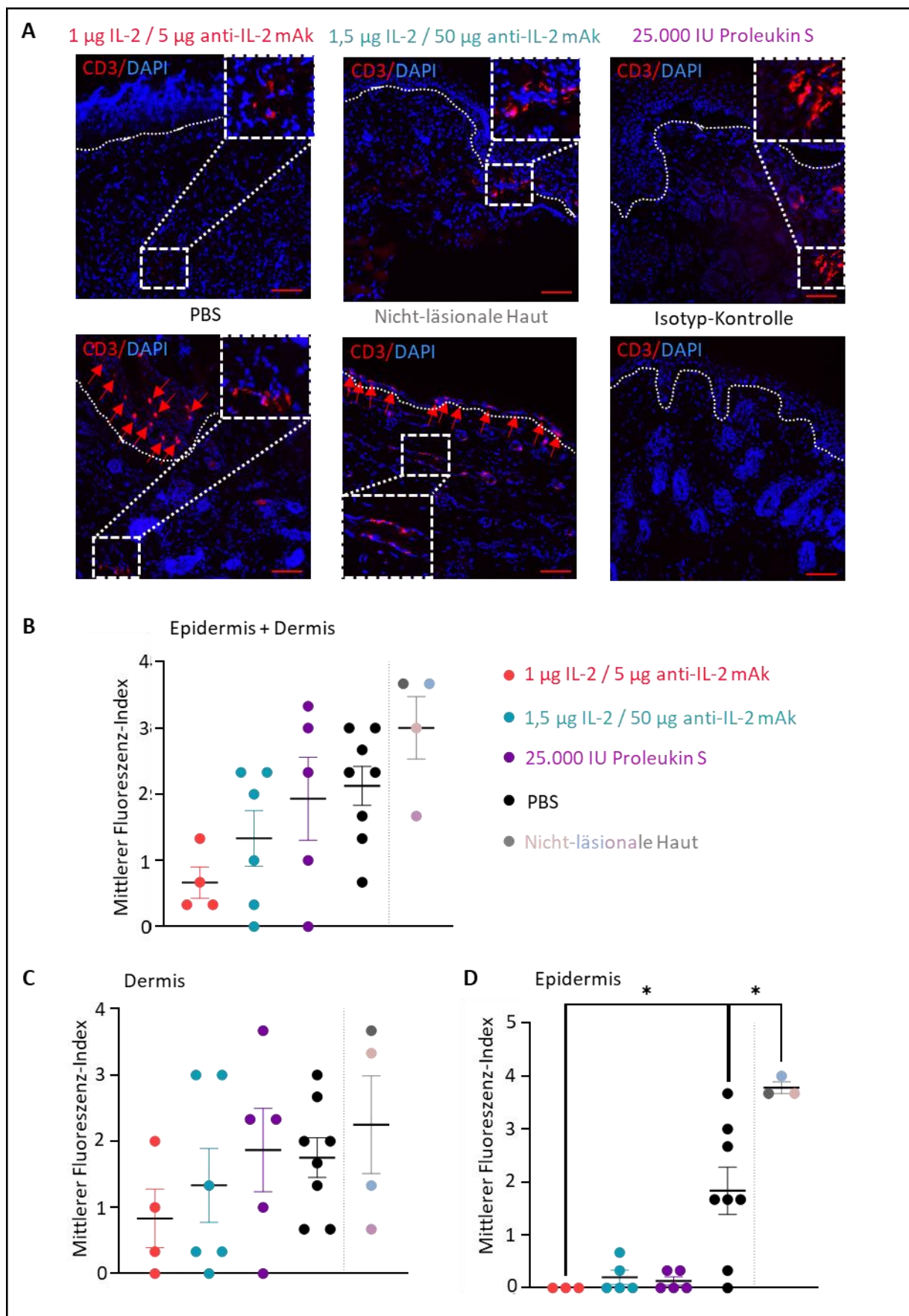


Abb. 20: In der Epidermis läsionaler Haut befinden sich signifikant weniger CD3+ T Zellen nach präventiver Behandlung mit IL-2/anti-IL-2 mAk oder niedrig dosiertem IL-2 als in einer Positivkontrolle. **(A)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der CD3+ T Zellen in läsionaler Haut je einer Maus aus den drei unterschiedlichen

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

Therapiegruppen (1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk; 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S), der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörpergefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. CD3⁺ Zellen werden Rot und Kernfärbung mittels DAPI in Blau dargestellt. Beispiele positiv gefärbte Zellen innerhalb der Dermis sind nochmals vergrößert in einer Ecke des Bildes und positive Zellen in der Epidermis mittels Pfeile besser sichtbar gemacht worden. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B-D)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von CD3 in läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 3-9) in einmal **(B)** Epidermis und Dermis zusammen, **(C)** Dermis und **(D)** Epidermis einzeln betrachtet. Datensätze der nicht-läsionalen Haut beinhalten je einen Wert von einer nicht-läsionalen Haut aus einer der vier betrachteten Gruppen (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Lediglich die ausschließliche Betrachtung der Epidermis ergab einen signifikanten Unterschied der 1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk Gruppe zur Positivkontrolle mit $p < 0,05$ auf (Kruskal-Wallis-Test). Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut-Gruppe mittels Mann-Whitney-Test verglichen und zeigten ebenso nur eine signifikante Erniedrigung mit $p < 0,5$ unter ausschließlicher Betrachtung der Epidermis auf. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt. Maßstab: 100 µm; *: $p < 0,05$.

Da das Ziel war durch Gabe der IL-2-Antikörperkomplexe bzw. des niedrig dosiertem IL-2 die polyklonalen Treg-Populationen zu proliferieren, wurde mittels immunhistochemischer Färbung von FoxP3, die Treg-Population innerhalb der läsionalen Haut untersucht. Im Vergleich zur Untersuchung der Tregs mittels Durchflusszytometrie erlaubte diese Methode eine Lokalisation der Tregs innerhalb der untersuchten Haut. In allen vier Gruppen der läsionalen Haut fanden sich die Tregs innerhalb der Dermis und dabei bevorzugt im oberen Bereich nahe der verdickten Epidermis bzw. der Spaltbildung. Nicht-läsionale Haut besaß nur vereinzelte FoxP3-positive Zellen innerhalb der Dermis (Abbildung 21A). Die Gruppe mit 1 µg IL-2 / 5 µg anti-IL-2 mAk wies dabei die niedrigste Anzahl an Tregs auf ($1,75 \pm 0,16$), gefolgt von der Positivgruppe ($2,45 \pm 0,32$). Die höchste Anzahl an Tregs besaßen die Gruppen mit 1,5 µg IL-2 / 50 µg anti-IL-2 mAk ($3,33 \pm 0,15$) und 25.000 IU Proleukin S ($3,30 \pm 0,28$). Jedoch ergab sich auch hier, wie schon bei den durchflusszytometrischen Daten, kein signifikanter Unterschied zwischen einer der drei Behandlungsgruppen mit der Positivkontrolle. Nicht-läsionale Haut wies jedoch signifikant weniger Tregs auf als die läsionale Haut der Positivkontrolle ($0,59 \pm 0,09$ mit $p < 0,01$; Mann-Whitney-Test) und die Gruppe, welche die niedrige Konzentration am IL-2-Antikörperkomplex bekam, war signifikant zu den beiden anderen Therapiegruppen: einmal mit $p < 0,05$ zur Gruppe mit dem höheren IL-2-Antikörperkomplex und $p < 0,01$ zur Proleukin S Gruppe (jeweils *One-way ANOVA* und *Holm-Šidák's multiple comparison Test*) (Abbildung 21B).

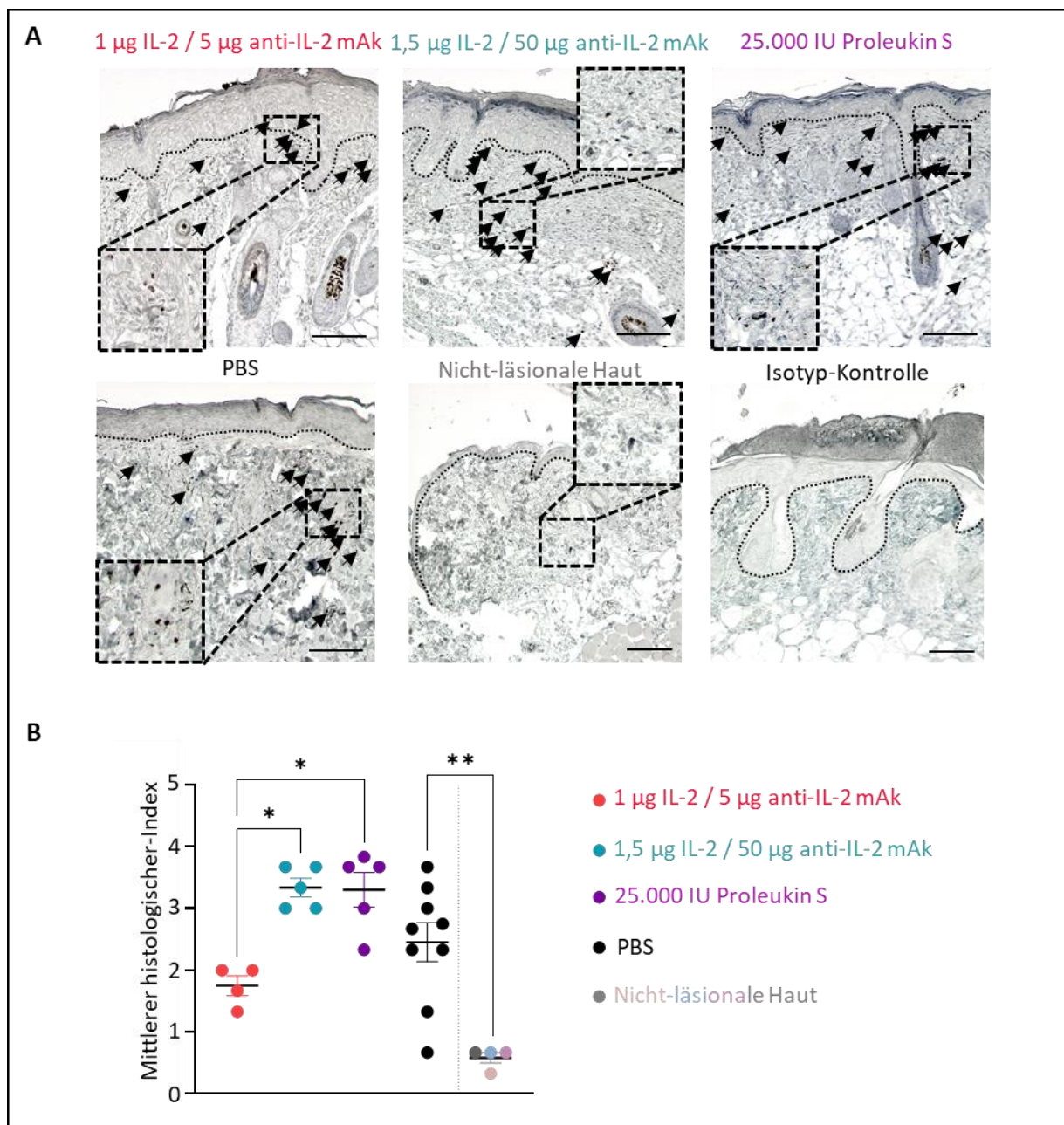


Abb. 21: Präventive Behandlung mit einer hohen Konzentration an IL-2/anti-IL-2 mAk bzw. niedrig-dosiertem IL-2 führt zu signifikant mehr Tregs in läsionaler Haut als mit einer geringen Konzentration an IL-2/anti-IL-2 mAk. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der FoxP3 gefärbten Tregs in läsionaler Haut je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (1 μg IL-2 / 5 μg anti-IL-2 mAk; 1,5 μg IL-2 / 50 μg anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S), der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. FoxP3+ Zellen wurden schwarz-braun mittels DAB gefärbt. Kernfärbung erfolgte mittels Mayer's Hämalaun. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte schwarze Linie dargestellt **(B)** Mittlerer histologischer Index von FoxP3 in läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 4-9). Datensatz der nicht-läsionalen Haut beinhaltet je einen Wert von einer nicht-läsionalen Haut aus einer der vier betrachteten Gruppen (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut-Gruppe mittels Mann-Whitney-Test verglichen und zeigten einen signifikanten Anstieg mit p < 0,01. Zusätzlich wurden die drei Therapiegruppen und die Positivkontrolle

4.2 Die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

untereinander mit dem *One-way ANOVA* und *Holm-Šidák's multiple comparison Test* auf Unterschiede getestet: die Gruppe mit der geringen Konzentration am IL-2-Antikörperkomplex wies signifikant weniger Tregs als die Therapiegruppe mit der hohen IL-2 Antikörperkomplex-Konzentration ($p < 0,05$) und der Proleukin S Gruppe ($p < 0,01$) auf. Datensätze sind als $MW \pm SEM$ dargestellt. Maßstab: 100 μm . DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.3 Adoptiver Treg Transfer hat einen hemmenden Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

Ein Therapieansatz um die dominante Immuntoleranz wiederherzustellen, ist die Verabreichung von Tregs, die das Treg-Ungleichgewicht wiederherstellen sollen, indem die Zahl der Tregs direkt erhöht wird [105]. Als zweiten Ansatz einer möglichen Therapie mit Tregs wurden daher isolierte polyklonale Tregs präventiv adoptiv in Empfängertiere transferiert, um diese Erhöhung der Treg-Anzahl zu erreichen und um von Anfang an eine verstärkte Immunsuppression in den Mäusen zu etablieren. Auch hier wurden neben dem klinischen Verlauf der EBA und dem Anteil an Tregs ebenfalls, wie auch schon bei der IL-2 Therapie, (i) die Infiltrationsrate in die Haut und Epidermisdicke mittels H&E-Färbungen, (ii) die C3 und IgG Ablagerung an der Basalmembran durch DIF, (iii) der Titer des injizierten Kaninchen IgGs mittels ELISA, (iv) der Analyse der Blutwerte und Zytokine durch LEGENDplex™ und der Erstellung eines 4-fach Differentialblutbildes, (v) sowie der Analyse verschiedener Immunzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie und immunhistochemischer und -fluoreszenz Färbungen.

4.3.1 Adoptiver Treg Transfer verringert signifikant der betroffenen Körperoberfläche im Ak-EBA-Mausmodell

Für den adoptiven Transfer der Tregs wurden zunächst von Geschwistertieren polyklonale Tregs aus Milzen und Lymphknoten mittels MACS isoliert. Die reine Treg-Population wurde anschließend in eine der drei Konzentrationen ($0,2 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ oder 10^6) i.v. über die Schwanzvene einen Tag vor Induktion der Ak-EBA in die Mäuse injiziert. Die Ak-EBA wurde, wie auch schon für den Therapieansatz mit IL-2, für zwölf Tage laufen gelassen. Während dieser Zeit wurde der klinische Phänotyp der drei Behandlungsgruppen im Vergleich zu der Positivkontrolle (i.v. injiziertes PBS) an den Tagen Vier, Acht und Zwölf anhand der mit EBA betroffenen Körperoberfläche erhoben.

Am Endtag (Tag Zwölf) konnte hinsichtlich der Bewertung der betroffenen Körperoberfläche eine Verbesserung des Krankheitsgrades der Mäuse in den drei Gruppen, die die aufgereinigten polyklonalen Tregs bekommen hatten, im Vergleich zu den Mäusen, welche unbehandelt blieben, festgestellt werden (Abbildung 22A-C). Es zeigte sich, dass schon ab Tag Acht die beiden Behandlungsgruppen mit den höheren Konzentrationen der applizierten Tregs mit $1,80 \% \pm 0,50$ bzw. $1,91 \% \pm 1,22$ eine signifikant geringere mit EBA betroffene Körperoberfläche aufwiesen als die Positivkontrolle mit $3,31 \% \pm 1,24$ (beide mit $p < 0,05$). Am Ende des Versuches (Tag Zwölf) war die Körperoberfläche aller drei Behandlungsgruppen signifikant weniger betroffen als die Positivkontrolle ($4,88 \% \pm 1,35$). Hier ergab sich für die mittlere Konzentration ein $p < 0,002$ ($2,83 \% \pm 1,22$) und für die beiden anderen jeweils ein $p \leq 0,001$ ($2,58 \% \pm 1,67$ und $2,36 \% \pm 1,29$) (Abbildung 22).

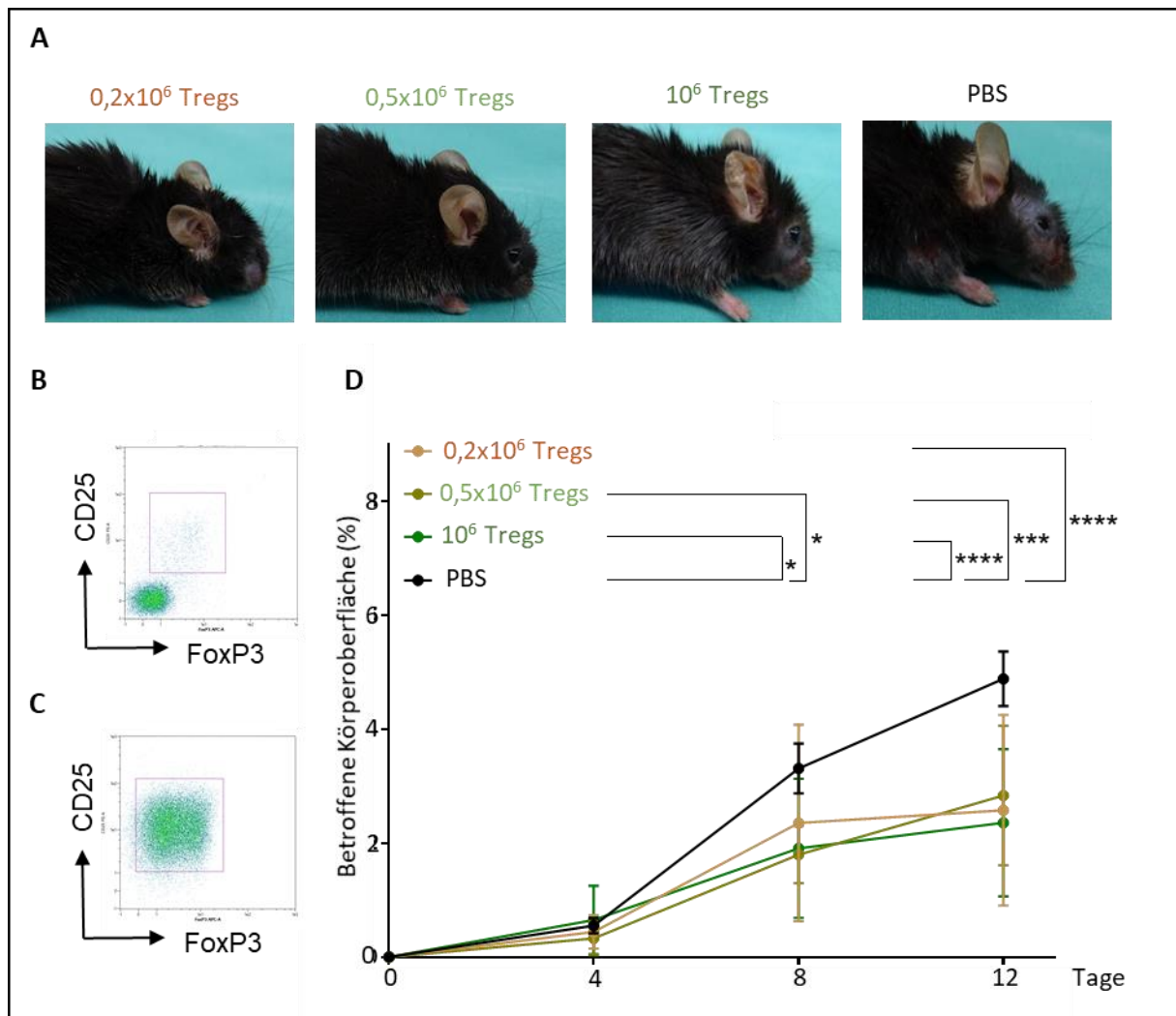


Abb. 22: Adoptiver Treg Transfer verringert signifikant die betroffene Körperoberfläche im Ak-EBA-Mausmodell. (A) Repräsentative Bilder je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (0,2x10⁶, 0,5x10⁶ und 10⁶ Tregs) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. **(B und C)** Darstellung der Reinheit der injizierten Treg-Population (CD25+FoxP3+) aus Lymphozyten **(B)** vor und **(C)** nach Isolation der Tregs mittels MACS anhand durchflusszytometrischer Dichtediagramme. Abgebildete Zellen sind auf Einzelzellen/Lebende/CD3+/CD4+ vorgegattet. **(D)** Abbildung des Verlaufs der betroffenen Körperoberfläche in Prozent der einzelnen Gruppen an Tag Null, Vier, Acht und Zwölf. Alle drei Behandlungsgruppen zeigten eine signifikant geringere betroffene Körperoberfläche im Vergleich zur Positivkontrolle mit den beiden höheren Konzentrationen mit jeweils $p < 0,05$ an Tag 8 und die mittlere Konzentration mit $p < 0,002$ und die beiden anderen mit $p \leq 0,001$ an Tag 12. Datensätze sind als MW \pm SEM mit $n = 8$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels *Two-way ANOVA* und *Šidák's multiple comparison* Post Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,002$; ****: $p \leq 0,001$.

Wie auch schon bei der IL-2 Therapie im Ak-EBA-Mausmodell, wurden auch hier der Grad der Erkrankung an EBA mittels typischer diagnostischer Methoden erfasst und zwischen den Gruppen verglichen: (i) eine H&E-Färbung der Ohren, um die Epidermisdicke und den Grad der Entzündung zu bestimmen, sowie jeweils eine DIF für die Ablagerung an (ii) C3 und (iii) IgG an der Basalmembran der Ohren.

Hinsichtlich der Epidermisdicke und des Entzündungs-Index von der H&E-Färbung ergab sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der Positivkontrolle für beide Parameter, jedoch konnte zumindest trotz teilweise hoher Streuung innerhalb der Gruppen ein Trend festgestellt werden: die Gruppe mit $0,2 \times 10^6$ Tregs wies für die Epidermisdicke und den Grad der eingewanderten Immunzellen jeweils den höchsten Mittelwert auf ($1,17 \pm 0,35$ und $1,50 \pm 0,40$), während die Werte der Gruppe mit $0,5 \times 10^6$ Tregs ($0,97 \pm 0,19$ und $1,24 \pm 0,24$) und der Positivkontrolle ($0,77 \pm 0,17$ und $1,23 \pm 0,32$) jeweils etwas niedriger und miteinander vergleichbar waren. Die Gruppe, die die höchste Konzentration an Tregs bekam, wies für beide Kriterien den jeweils niedrigsten Mittelwert auf ($0,49 \pm 0,16$ und $0,68 \pm 0,22$). So verringerte sich durch Injektion der 10^6 Tregs die Dicke der Epidermis und die Einwanderung von weiteren Immunzellen um etwa die Hälfte gegenüber von unbehandelten Mäusen (Abbildung 23).

Für die DIFs ergab sich für die C3 Ablagerung entlang der Basalmembran in allen vier Gruppen jeweils deutliches Fluoreszenzsignals (Abbildung 24A). Es zeigte sich, dass die Gruppe mit der niedrigsten Anzahl an Tregs, wie auch schon davor, den höchsten Mittelwert ($1,64 \pm 0,37$) im Vergleich zu allen vier Gruppen aufwies. Die drei anderen Gruppen lagen auf einem ähnlichen etwas geringeren Niveau ($1,00 \pm 0,43$; $0,99 \pm 0,27$ und $1,07 \pm 0,37$). Auch hier lag eine hohe Streuung innerhalb der Gruppen vor (Abbildung 24B).

Bezüglich der DIF für die Detektion der IgG Ablagerung entlang der Basalmembran, wies die Gruppe mit der niedrigsten Treg Konzentration das schwächste Fluoreszenzsignal auf. In den drei anderen Gruppen wurde die IgG Ablagerung anhand eines jeweils starken Fluoreszenzsignals deutlich sichtbar (Abbildung 25A). Jedoch konnte auch hier auf Grund der teilweise höheren Streuung innerhalb der Gruppen und der damit resultierenden ähnlichen Mittelwerte kein signifikanter Unterschied der Therapiegruppen ($2,17 \pm 0,37$; $2,78 \pm 0,19$ und $2,42 \pm 0,42$) zu der Positivgruppe ($2,78 \pm 0,34$) festgestellt werden (Abbildung 25B).

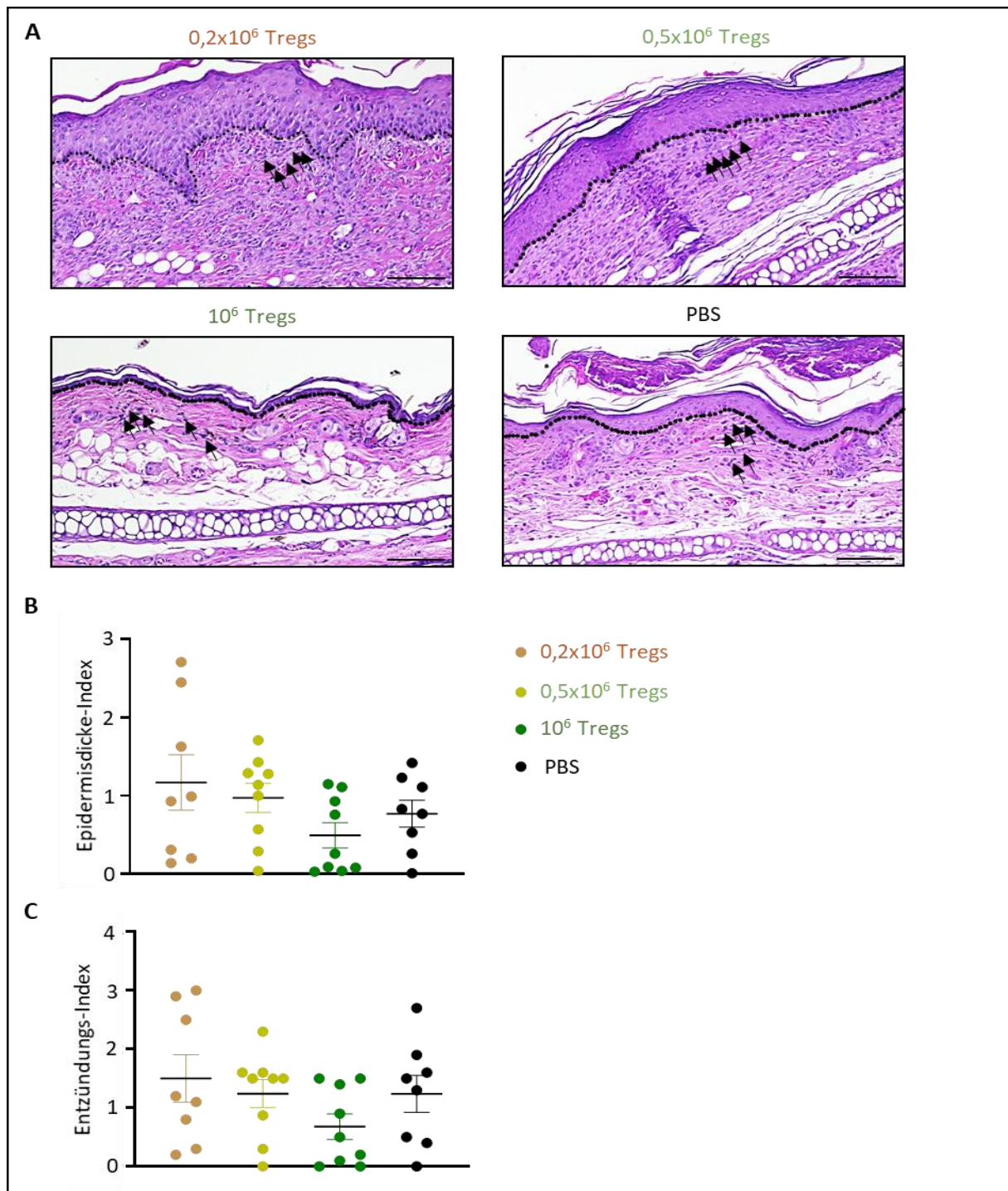


Abb. 23: Entzündung und Dicke der Epidermis im Ak-EBA-Mausmodell werden nach adoptiven Treg Transfer nicht beeinflusst. (A) Repräsentative Bilder je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (0,2x10⁶, 0,5x10⁶ und 10⁶ Tregs) und der Positivkontrolle (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Die Grenze zwischen Dermis und Epidermis wird durch gestrichelte Linie und eingewanderte Immunzellen (violett gefärbte Zellen) anhand je fünf Pfeile dargestellt. (B) Epidermisdicke und (C) Entzündungsgrad der vier betrachteten Gruppen (n = 8-9). Keine der drei Therapiegruppen wies bei einem der beiden betrachteten Parameter einen signifikanten Unterschied zur Positivgruppe auf. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt. Maßstab: 100 µm. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

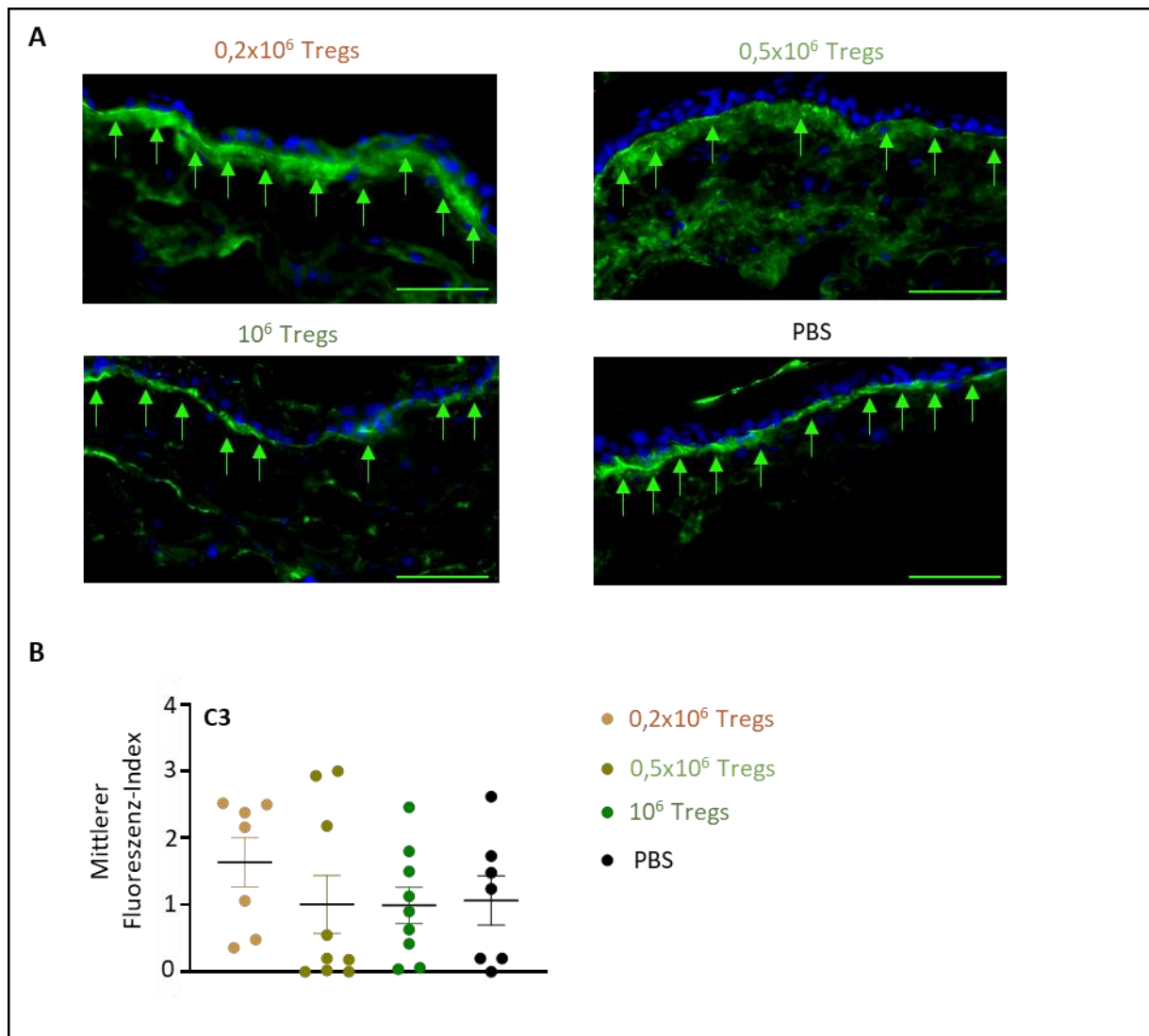


Abb. 24: C3 Ablagerung entlang der Basalmembran wird nicht signifikant durch adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell beeinflusst. (A) Repräsentative mikroskopische Bilder der C3 Färbung je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (0,2x10⁶, 0,5x10⁶ und 10⁶ Tregs) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. C3 Ablagerung wird hier in grün dargestellt und ist entlang der Basalmembran (Pfeile) sichtbar. Kernfärbung mittels DAPI hier in blau. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von C3 der vier Gruppen mit n = 7-9 pro Gruppe. Keine der drei Therapiegruppen wies einen signifikanten Unterschied zur Positivgruppe auf. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt. Maßstab: 100 µm. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

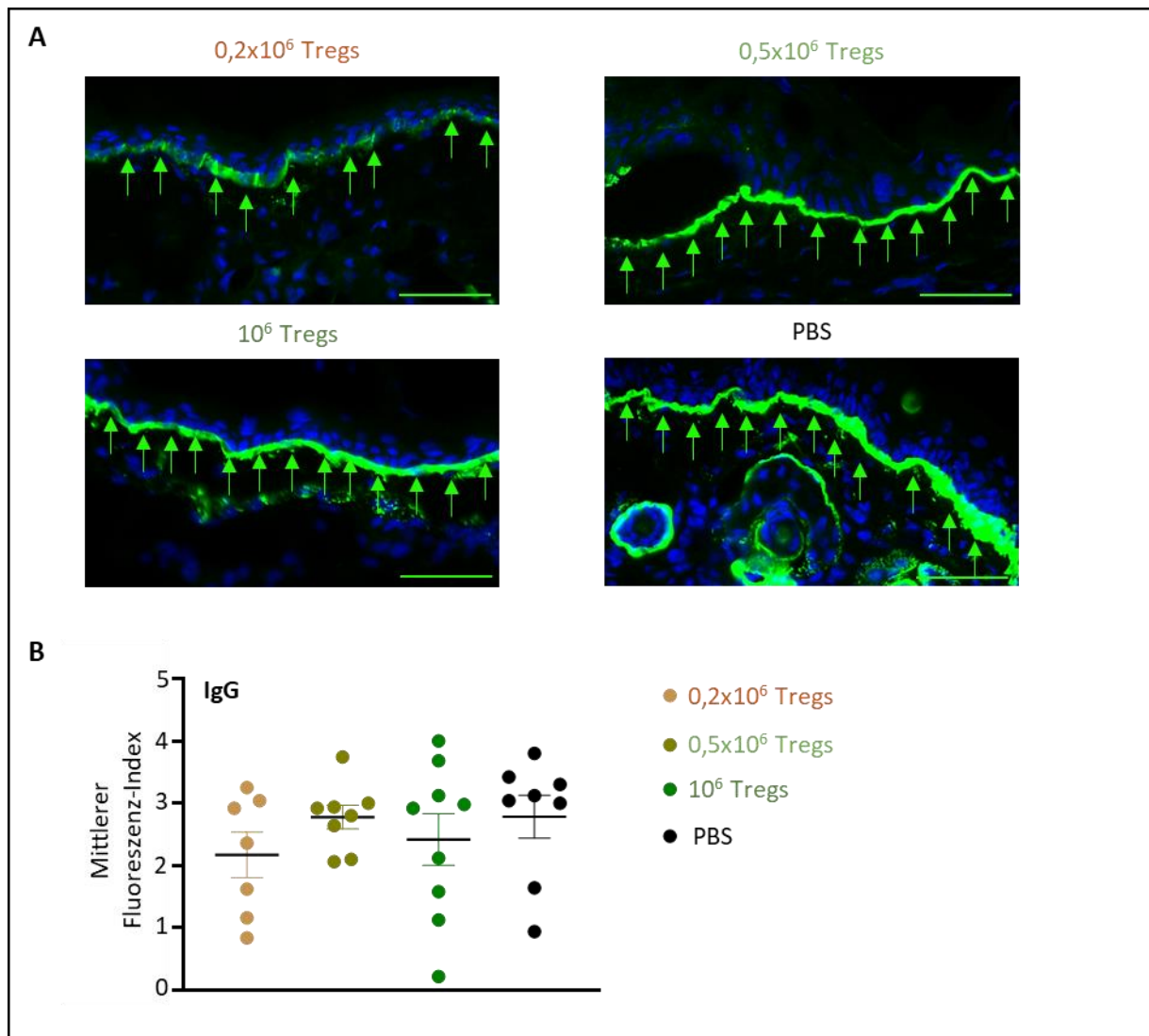


Abb. 25: DIF von IgG zeigt keinen signifikanten Einfluss des adoptiven Treg Transfers bezüglich der IgG Ablagerung entlang der Basalmembran im Ak-EBA-Mausmodell. (A) Repräsentative mikroskopische Bilder der IgG Färbung je einer Maus aus den drei unterschiedlichen Therapiegruppen (0,2x10⁶, 0,5x10⁶ und 10⁶Tregs) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. IgG Ablagerung wird hier in grün dargestellt und ist entlang der Basalmembran (Pfeile) sichtbar. Kernfärbung mittels DAPI hier in blau. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von IgG der vier Gruppen mit n = 7-9 pro Gruppe. Keine der drei Therapiegruppen wies einen signifikanten Unterschied zur Positivgruppe auf. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt. Maßstab: 100 µm. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

4.3.2 Anzahl an Eosinophile und Blutplättchen werden nach adoptiven Treg Transfer signifikant im Vollblut reduziert

Das Blut ist die Pipeline des Immunsystems: Zellen des Immunsystems reifen und führen ihre Funktionen aus, indem sie zwischen zentralen und peripheren Lymphorganen zirkulieren und über das Blut zu und von Verletzungsstellen wandern. Da das Blut durch den ganzen Körper fließt und naive und stimulierte Immunzellen von einem Ort zum anderen transportiert, fungiert es als wichtiger Transportweg für das Immunsystem [223]. So führen, zum Beispiel, entzündliche Erkrankungen zu Abweichungen in bestimmten Blutwerten vom Normalwert und lassen so auch auf chronische Erkrankungen oder der Schwere der Erkrankung schließen [224].

Mit Hilfe des am scil Vet abc Plus+ gemessenen Vollblutes konnte für die einzelnen Mäuse aus den drei Behandlungsgruppen und der Positivgruppe ein jeweils individuelles 4-fach Differentialblutbild erstellt werden. In diesem wurden 14 Parameter erfasst und die Mittelwerte derselben der therapierten Gruppen, mit denen der Positivgruppe verglichen. Zusätzlich wurden die Werte aus der Positivgruppe mit Werten aus unbehandelten C57BL/6 Mäusen (freundlicherweise bereitgestellt von M. Sc. Sadegh Mousavi) verglichen. So wurde an Zellen die Konzentration an Eosinophilen, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Erythrozyten, sowie die Konzentration an Thrombozyten (Plättchen) bestimmt. Als weitere Parameter wurde der Hämatokrit (HCT; Anteil der Zellbestandteile zum Blutvolumen), das Hämoglobin (HGB), das mittlere korpuskulare Hämoglobin (MCH; durchschnittliche Konzentration an HGB in einem einzelnen Erythrozyt), die mittlere korpuskulare Hämoglobin-Konzentration (MCHC; durchschnittliche Konzentration an HGB in allen Erythrozyten), das mittlere Zellvolumen der Erythrozyten (MCV; *mean cell volume*), das mittlere Volumen der Thrombozyten (MPV; *mean platelet volume*) und die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW; *red cell width* als Maß für die Größenstreuung der Erythrozyten) erfasst.

Auch hier zeigte sich in einigen Fällen eine hohe Standardabweichung zwischen den einzelnen Mäusen einer Gruppe. Jedoch konnte jeweils in der Gruppe mit $0,2 \times 10^6$ Tregs eine signifikante Erniedrigung der Konzentrationen an Eosinophile und Blutplättchen ($0,04 \times 10^9/L \pm 0,02$ bzw. $727,60 \times 10^9/L \pm 189,37$) im Vergleich zur Positivgruppe ($0,12 \times 10^9/L \pm 0,08$ bzw. $1242,50 \times 10^9/L \pm 320,02$) mit jeweils einem $p < 0,05$ festgestellt werden. Es sollte jedoch beachtet werden, dass in Falle der Plättchen auch die anderen behandelten Gruppen einen deutlich niedrigeren Mittelwert als die Positivgruppe aufwiesen, hier jedoch eine hohe Streuung zu Tage trat. Im Vergleich der Positivgruppe zu der unbehandelten Kontrollgruppe zeigt sich ein Abfall des MCH ($13,65 \text{ pg} \pm 0,31$ gegen $16,20 \text{ pg} \pm 0,64$), des MCHC ($305,00 \text{ g/L} \pm 4,08$ gegen $329,63 \text{ g/L} \pm 8,52$) und des MCV ($44,50 \text{ fL} \pm 1,00$ gegen $49,13 \text{ fL} \pm 2,03$) mit jeweils einem $p < 0,01$ und ein Anstieg der Plättchen ($1242,50 \times 10^9/L \pm 320,02$ gegen $721,88 \times 10^9/L \pm 284,99$) und der Erythrozyten ($13,51 \times 10^{12}/L \pm 0,95$ gegen $10,54 \times 10^{12}/L \pm 2,41$) mit jeweils einem $p < 0,05$ in der Positivgruppe (Tabelle 11).

4.3 Adoptiver Treg Transfer hat einen hemmenden Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

Tab. 11: Anzahl der Eosinophile und Blutplättchen sind in mit adoptiven Treg Transfer therapierten Mäusen im Vollblut signifikant im Vergleich zur Positivgruppe reduziert. Mittels des scil Vet abc Plus+ wurde vom Vollblut der drei unterschiedlichen Therapiegruppen (0,2x10⁶, 0,5x10⁶ und 10⁶Tregs) und der Positivgruppe (PBS) ein 4-fach Differentialblutbild mit 14 untersuchten Parametern an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs erstellt. Zusätzlich wurden von acht unbehandelten C57BL/6 Mäusen das Vollblut gemessen. Die Gruppe mit 0,2x10⁶ injizierten Tregs wies eine signifikante (p < 0,05) Reduzierung der Konzentration der Eosinophile und der Plättchen im Vollblut im Vergleich zu der Positivkontrolle (PBS) auf. Die unbehandelte Kontrollgruppe wies gegenüber der Positivgruppe signifikant mehr MCH, MCHC und MCV (jeweils p < 0,01), sowie signifikant weniger Plättchen und Erythrozyten (jeweils p < 0,05) auf. Datensätze sind als MW ± SEM mit n = 5-9 pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gruppen der Ak-EBA und mittels eines Mann-Whitney-Tests zwischen der Positivgruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe. HCT: Hämatokrit, HGB: Hämoglobin, MCH: mittlere korpuskulare Hämoglobin, MCHC: mittlere korpuskulare Hämoglobin-Konzentration, MCV: *mean cell volume* (mittleres Zellvolumen der Erythrozyten), MPV: *mean platelet volume* (mittleres Volumen der Thrombozyten), RDW: *red cell distribution width* (Erythrozytenverteilungsbreite); *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Parameter	0.2x10 ⁶ Tregs	0.5x10 ⁶ Tregs	1x10 ⁶ Tregs	PBS	Unbehandelte Kontrolle
Eosinophile (10 ⁹ /L)	0,04 ± 0,02 (*)	0,17 ± 0,19	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,08	0,15 ± 0,15
Granulozyten (10 ⁹ /L)	1,68 ± 0,72	2,33 ± 1,14	1,85 ± 0,77	1,38 ± 0,71	1,29 ± 0,69
HCT (L/L)	0,64 ± 0,04	0,62 ± 0,08	0,61 ± 0,03	0,60 ± 0,04	0,52 ± 0,12
HGB (g/L)	190,40 ± 11,80	188,83 ± 21,84	186,33 ± 8,41	184,75 ± 15,69	170,38 ± 38,50
Lymphozyten (10 ⁹ /L)	2,62 ± 1,14	3,67 ± 1,18	2,47 ± 0,52	2,63 ± 1,36	3,78 ± 1,04
MCH (pg)	13,48 ± 0,15	13,83 ± 0,55	13,58 ± 0,26	13,65 ± 0,31	16,20 ± 0,64 (**)
MCHC (g/L)	300,40 ± 2,30	304,17 ± 6,46	306,50 ± 4,59	305,00 ± 4,08	329,63 ± 8,52 (**)
MCV (fL)	44,80 ± 0,45	45,33 ± 1,03	44,50 ± 0,55	44,50 ± 1,00	49,13 ± 2,03 (**)
Monozyten (10 ⁹ /L)	0,32 ± 0,23	0,40 ± 0,18	0,37 ± 0,18	0,20 ± 0,08	0,13 ± 0,07
MPV (fL)	5,78 ± 0,28	6,00 ± 0,33	5,63 ± 0,36	5,85 ± 0,34	5,71 ± 0,31
Plättchen (10 ⁹ /L)	727,60 ± 189,37 (*)	742,67 ± 311,65	883,83 ± 163,76	1242,50 ± 320,02	721,88 ± 284,99 (*)
Erythrozyten (10 ¹² /L)	14,13 ± 0,83	13,67 ± 1,61	13,71 ± 0,69	13,51 ± 0,95	10,54 ± 2,41 (*)
RDW (%)	16,38 ± 0,56	16,72 ± 0,46	16,48 ± 0,20	16,40 ± 0,58	17,44 ± 1,19
Weiße Blutzellen (10 ⁹ /L)	4,62 ± 1,79	6,40 ± 2,35	4,68 ± 1,24	4,20 ± 2,14	5,19 ± 1,75

4.3.3 Der IgG Titer der injizierten Kaninchenantikörper wird durch einen adoptiven Treg Transfer nicht beeinflusst

Um zu überprüfen, ob der adoptive Treg Transfer einen Einfluss auf den Titer der injizierten Kaninchenantikörper hat, wurde als nächstes ebenfalls mittels eines spezifischen ELISAs die Titer am injiziertem Kaninchen IgG im Plasma am Ende des Versuches gemessen. Da zwischen den drei verwendeten Konzentrationen an transferierten Tregs kein nennenswerter Unterschied in den zuvor untersuchten klinischen Parametern festgestellt werden konnte, wurden hier, wie für alle folgenden Versuchen, lediglich die Gruppe mit 10^6 applizierten Tregs gegenüber der Positivgruppe betrachtet.

In beiden Gruppen wiesen die Konzentrationen an injizierte Kaninchen IgG einen ähnlichen Mittelwert auf, so dass es keinen signifikanten Unterschied gab. So lag dieser in der Positivkontrolle bei $0,07 \mu\text{g/ml} \pm 0,01$ in der behandelten Gruppe bei $0,06 \mu\text{g/ml} \pm 0,01$ (Abbildung 26).

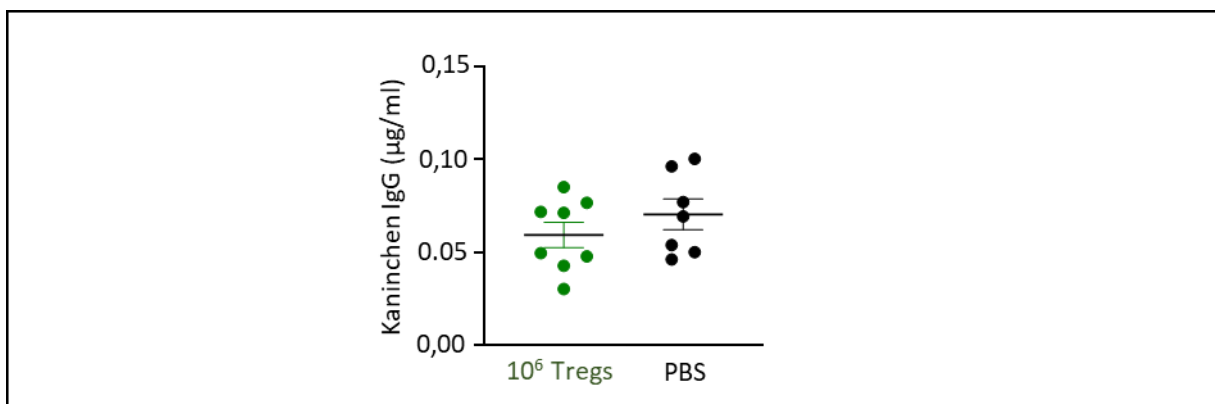


Abb. 26: Der IgG Titer der injizierten Kaninchenantikörper wird durch einen adoptiven Treg Transfer nicht beeinflusst. Titer des injiziertem Kaninchen IgGs der Behandlungsgruppe mit 10^6 injizierten Tregs und der Positivkontrolle (PBS) bezüglich der Konzentration des injizierten Kaninchen IgGs im Plasma in $\mu\text{g/ml}$ an Tag Zwölf nach erstmaliger Injektion des IgGs. Datensätze sind als MW \pm SEM mit $n = 7-9$ pro Gruppe dargestellt. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

4.3.4 Adoptiver Treg Transfer verringert die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma im Ak-EBA-Mausmodell

Um den Effekt des adoptiven Transfers von 10^6 Tregs im Ak-EBA-Mausmodell auf in Blut zirkulierende freie Zytokine zu erfassen, wurde mittels derselben LEGENDplex™, wie auch schon für die Behandlung mit IL-2, die Konzentrationen von 16 Zytokinen im Plasma vom Endtag der Ak-EBA-Versuchs gemessen: IFN- γ , TNF- α , IL-2 (alle drei von Th1 Zellen produziert), IL-4, IL-5, IL-13 (alle drei von Th2 Zellen produziert), IL-9 (typisch für Th9 Zellen), IL-17A, IL-17F, IL-22 (alle drei von Th22 Zellen produziert), IL-10 (charakteristisch für Tregs und T Follikularhelferzellen), sowie die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-1 α , IL-6 und GM-CSF und das CXCL1 (bedeutende Rolle in der Rekrutierung von Neutrophilen in das Gewebe [214]).

Im Gegensatz zum Therapieversuch mittels IL-2 Antikörperkomplexen bzw. niedrig-dosiertem IL-2, hatte der adoptive Treg Transfer zur Folge, dass sich die IL-2 Konzentration im Plasma der Mäuse signifikant mit einem $p < 0,01$ verringerte ($66,70 \text{ pg/ml} \pm 25,40$ gegenüber zu $28,19 \text{ pg/ml} \pm 18,63$).

4.3 Adoptiver Treg Transfer hat einen hemmenden Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

Ansonsten zeigten sich lediglich Trends, wie eine Erhöhung an CXCL1 und IL-9, sowie einer Erniedrigung an IL-17A und IL-6 in der behandelten Gruppe im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen (Tabelle 12).

Tab. 12: Adoptiver Treg Transfer verringert die Konzentration an freiem IL-2 im Plasma im Ak-EBA-Mausmodell. Mittels LEGENDplex™ wurden von 16 Zytokinen deren Konzentration in pg/ml in Plasma der Behandlungsgruppe mit 10⁶ injizierten Tregs und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs gemessen. Die behandelte Gruppe wies eine signifikante ($p < 0,01$) Verringerung der IL-2 Konzentration im Plasma im Vergleich zu der Positivgruppe (PBS) auf. Datensätze sind als MW \pm SEM mit $n = 7-9$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*. ns: nicht signifikant; **: $p < 0,01$.

Zytokin	PBS	10 ⁶ Tregs	p-Wert
IL-1 β	7,18 \pm 5,72	4,98 \pm 5,84	ns
IL-4	1,24 \pm 0,42	1,36 \pm 0,86	ns
IL-1 α	5,01 \pm 4,32	6,39 \pm 4,34	ns
IFN- γ	1,43 \pm 0,72	1,30 \pm 0,53	ns
TNF- α	6,88 \pm 8,44	8,20 \pm 5,12	ns
CXCL1	46,42 \pm 25,89	83,95 \pm 58,77	ns
IL-10	7,59 \pm 8,40	7,68 \pm 4,84	ns
IL-13	1,01 \pm 1,08	1,48 \pm 1,74	ns
IL-17A	2,22 \pm 2,47	0,72 \pm 0,53	ns
GM-CSF	0,12 \pm 0,19	0,07 \pm 0,20	ns
IL-5	6,98 \pm 3,34	8,59 \pm 2,56	ns
IL-2	66,70 \pm 25,40	28,19 \pm 18,63	**
IL-6	50,47 \pm 32,96	29,29 \pm 27,56	ns
IL-9	28,62 \pm 31,84	41,29 \pm 41,47	ns
IL-17F	1,91 \pm 0,43	1,79 \pm 0,53	ns
IL-22	3,96 \pm 3,86	4,07 \pm 3,07	ns

4.3.5 Adoptiv transferierte Tregs können in läsionaler Haut im Ak-EBA-Mausmodell nachgewiesen werden

Der adoptive Transfer an polyklonalen Tregs hatte das Ziel, die durch die Treg entstehende immunsuppressive Wirkung zu erhöhen und damit die Pathogenese der EBA zu hemmen. Um diese Wirkung besser zu untersuchen, wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil an Tregs, sowie auch weiterer Immunzellen und Zytokinen, in Milz, mesenterialen Lymphknoten, Blut und läsionaler Haut der behandelten Mäuse erfasst und mit den Werten der Mäuse der Positivkontrolle verglichen.

In Bezug auf die Tregs konnte in den Therapiegruppen zum einen zwischen allen in dem jeweiligen Organ betrachteten Tregs (endogene Tregs) und zum anderen, dank der vorangegangenen Markierung mit CFSE, den injizierten Tregs unterschieden werden. Es stellte sich heraus, dass in den einzelnen Organen der Anteil an Tregs an CD4+ T Zellen sich nicht im Vergleich zu der Positivkontrolle veränderte. So lag in der Milz der Treg-Anteil bei beiden Gruppen bei etwa jeweils $12,93 \% \pm 1,48$ und $12,53 \% \pm 0,97$, in den mesenterialen Lymphknoten bei $13,01 \% \pm 1,41$ und $13,36 \% \pm 0,87$, im Blut bei $4,02 \% \pm 0,37$ und $3,91 \% \pm 0,35$ und in der läsionalen Haut bei $15,24 \% \pm 2,74$ und $13,53 \% \pm 5,46$ (Abbildung 27A). Um herauszufinden, wohin die transferierten Tregs nach Injektion wanderten, wurde diese zuvor mit CFSE markiert. Mittels Durchflusszytometrie konnte somit das Fluoreszenzsignal von CFSE innerhalb der gemessenen Treg-Population in den einzelnen Organen gemessen werden. In Milz und mesenterialen Lymphknoten stellten die injizierten Tregs nur einen kleinen Bruchteil in zwei bis drei Mäusen dar. Die anderen Mäuse wiesen kein Signal für CFSE auf. Im Blut konnten in drei Mäusen transferierte Tregs mit einem mittleren Anteil von $0,94 \pm 0,44$ an allen Tregs gemessen werden. In der läsionalen Haut konnten mit Abstand der höchste Anteil an injizierten Tregs an allen Tregs mit $29,17 \% \pm 8,69$ erfasst werden (Abbildung 27B).

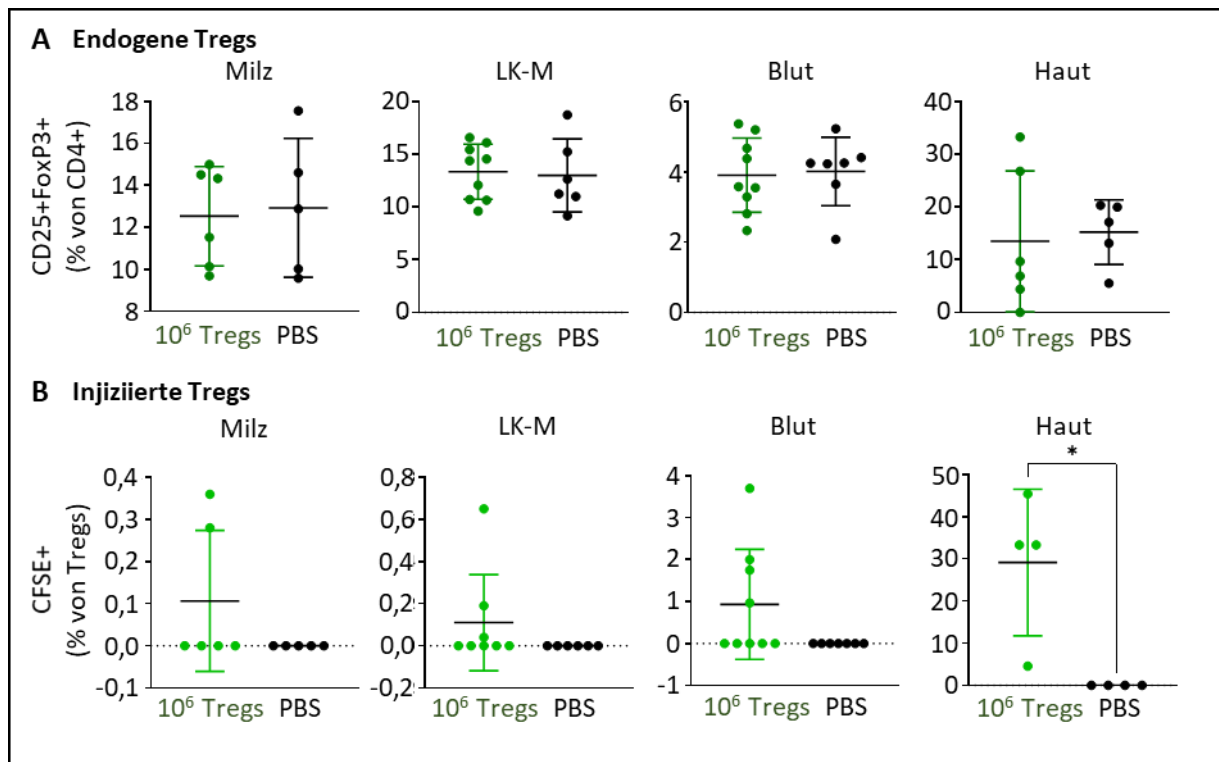


Abb. 27: Adoptiv transferierte Tregs können in läSIONALER Haut im Ak-EBA-Mausmodell nachgewiesen werden. (A) Darstellung der Behandlungsgruppe mit 10⁶ injizierten Tregs und der Positivgruppe (PBS) bezüglich des Anteils aller Tregs (CD25+FoxP3+; endogene Tregs) an CD4+ Zellen in Milz, mesenterialen Lymphknoten (LK-M), Blut und läSIONALER Haut. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich ihres Treg-Anteils an CD4+ T Zellen festgestellt werden. (B) Darstellung der beiden Gruppen bezüglich des Anteils der injizierten Tregs (CFSE+) an den endogenen Tregs in den betreffenden vier Organen. In läSIONALER Haut machten die transferierten Tregs den höchsten Anteil mit etwa 30 % aus und wiesen damit einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied zur Positivkontrolle auf. Datensätze sind als MW \pm SEM mit $n = 4-9$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; *: $p < 0,05$.

Analyse weiterer Immunzellen mittels des Durchflusszytometers erbrachte innerhalb der vier Organen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Daten nicht gezeigt). Untersuchung der vier Zytokinen TGF β , IL-10, IL-4 und IFN- γ in CD4+ T Zellen erbrachte eine signifikante Erhöhung an IL-10 im Blut in der Gruppe mit transferierten Tregs mit einem $p < 0,05$ (5,19 % \pm 1,88 gegenüber zu 8,50 % \pm 3,03). Bezüglich des Zytokins IL-4 konnte bis in der Milz eine deutliche Erhöhung des mittleren Anteils an CD4+ T Zellen gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, nur war hier die Streuung innerhalb der beiden Gruppen wieder zu groß, um einen signifikanten Unterschied zu erkennen (Tabelle 13).

4.3 Adoptiver Treg Transfer hat einen hemmenden Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

Tab. 13: Die Konzentration an IL-10 in CD4+ T Zellen ist nach adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell im Vergleich zur Positivkontrolle erhöht. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil der vier Zytokine TGF β , IL-10, IL-4 und IFN- γ in CD4+ T Zellen der Behandlungsgruppe mit 10⁶ injizierten Tregs und der Positivgruppe (PBS) gemessen. Die behandelte Gruppe wies eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der IL-10 Konzentration in CD4+ T Zellen im Blut im Vergleich zu der Positivgruppe (PBS) auf. Datensätze sind als MW \pm SEM mit $n = 7-9$ pro Gruppe dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*, ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$.

	Organ	PBS	10 ⁶ Tregs	p-Wert
TGFβ (% von CD4+)	Blut	8,08 \pm 3,31	10,97 \pm 3,71	ns
	LK-M	5,61 \pm 1,85	5,93 \pm 1,25	ns
	Milz	12,70 \pm 9,04	7,30 \pm 4,98	ns
	Haut	12,55 \pm 10,03	8,53 \pm 6,63	ns
IL-10 (% von CD4+)	Blut	5,19 \pm 1,88	8,50 \pm 3,03	*
	LK-M	1,52 \pm 0,21	1,86 \pm 1,11	ns
	Milz	3,32 \pm 3,69	1,09 \pm 0,83	ns
	Haut	16,65 \pm 13,73	12,45 \pm 8,96	ns
IL-4 (% von CD4+)	Blut	4,10 \pm 2,80	8,81 \pm 6,52	ns
	LK-M	2,82 \pm 2,25	10,43 \pm 13,47	ns
	Milz	6,56 \pm 6,51	5,64 \pm 5,15	ns
	Haut	28,58 \pm 31,19	36,04 \pm 30,13	ns
IFN-γ (% von CD4+)	Blut	3,71 \pm 1,48	7,79 \pm 4,76	ns
	LK-M	2,75 \pm 2,08	1,87 \pm 1,83	ns
	Milz	6,23 \pm 2,55	4,67 \pm 1,69	ns
	Haut	12,87 \pm 8,22	11,63 \pm 10,99	ns

4.3.6 Die Anzahl an Neutrophilen und T Zellen verändert sich in läsionaler Haut signifikant nach adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell

Die Effektorphase der EBA ist gekennzeichnet durch eine hohe Infiltrationsrate von inflammatorischen Zellen in die läsionale Haut, wie Neutrophile, T Effektorzellen, als auch Monozyten bzw. Makrophagen [159]. Zusätzlich weisen Daten auf eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein an Tregs und des Krankheitsgrades, ausgelöst durch proinflammatorische Zellen bzw. Mediatoren, der EBA hin: eine Deletion der Tregs führte zum Beispiel zu einer übermäßiger Entzündung und Blasenbildung, vermehrten neutrophilen Infiltraten und der Expression von Th1- und Th2-Zytokinen und Chemokinen [164]. Daher wurde auch für diesen Therapieansatz wieder mittels immunhistochemischer und -fluoreszenz Färbungen untersucht, ob eine Erhöhung der Treg-Anzahl durch den adoptiven Transfer

einen umgekehrten Effekt auf die ansonsten hohe Infiltrationsrate der inflammatorischen Zellen in die läsionale Haut hat.

Wie auch schon bei den Mäusen, die im Therapieansatz mit IL-2-Antikörperkomplexen bzw. niedrig-dosiertem IL-2 therapiert wurden, wurde hier ebenfalls auf (i) die Proliferation der Zellen (mittels Ki-67) und die Populationen an (ii) Makrophagen (über F4/80), (iii) Neutrophilen (über Ly6G), (iv) T Zellen allgemein (über CD3) und (v) Tregs (über FoxP3) in läsionaler Haut analysiert. Für eine verbesserte Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wurden auch hier nur Läsionen mit einem gleichen Grad der Entzündung verwendet.

In der behandelten Gruppe, wie auch der Positivkontrolle konnten wieder vermehrt positiv gefärbte Ki-67 Zellen in der läsionalen Haut in Vergleich zu nicht-läsionalen Hautbereichen derselben Tiere gefunden werden. Die Ki-67 positiven Zellen fanden sich dabei bevorzugt in Bereich der Spaltbildung oder um bzw. in Haarfollikeln und Blutgefäßen (Abbildung 28A). Der Unterschied zwischen nicht-läsionaler Haut und läsionaler Haut in Bezug der Ki-67 Expression wurde auch hier durch den signifikanten Anstieg der Ki-67 positiven Zellen in der gesamten läsionalen Haut der Positivkontrolle ($2,06 \pm 0,23$) im Vergleich zu den nicht-läsionalen Häuten der beiden Gruppen deutlich ($0,58 \pm 0,28$ mit $p < 0,05$). Gleichzeitig zeigte aber die Auswertung der für Ki-67 gefärbten prozentualen Anteils jedoch keinen signifikanten Unterschied der behandelten Gruppe ($2,42 \pm 0,42$) zu der läsionalen Haut der Positivkontrolle (Abbildung 28B). Um einen möglichen Effekt der Therapie auf die Proliferation unterschiedlicher Zellpopulationen zu erfassen, wurden Dermis (Abbildung 28C) und Epidermis (Abbildung 28D) zusätzlich getrennt voneinander ausgewertet: hier ergaben sich ebenfalls signifikant mehr Ki-67 positive Zellen in läsionaler Haut der Positivkontrolle ($2,11 \pm 0,41$ für Dermis und $1,92 \pm 0,24$ für Epidermis) im Vergleich zur nicht-läsionalen Haut ($0,58 \pm 0,25$ für Dermis und $0,67 \pm 0,30$ für Epidermis) mit einmal $p < 0,01$ (Dermis) und $p < 0,05$ (Epidermis). Aber auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Positivkontrolle zu der Therapiegruppe ($2,40 \pm 0,41$ für Dermis und $2,29 \pm 0,42$ für Epidermis) (Abbildung 28C und D).

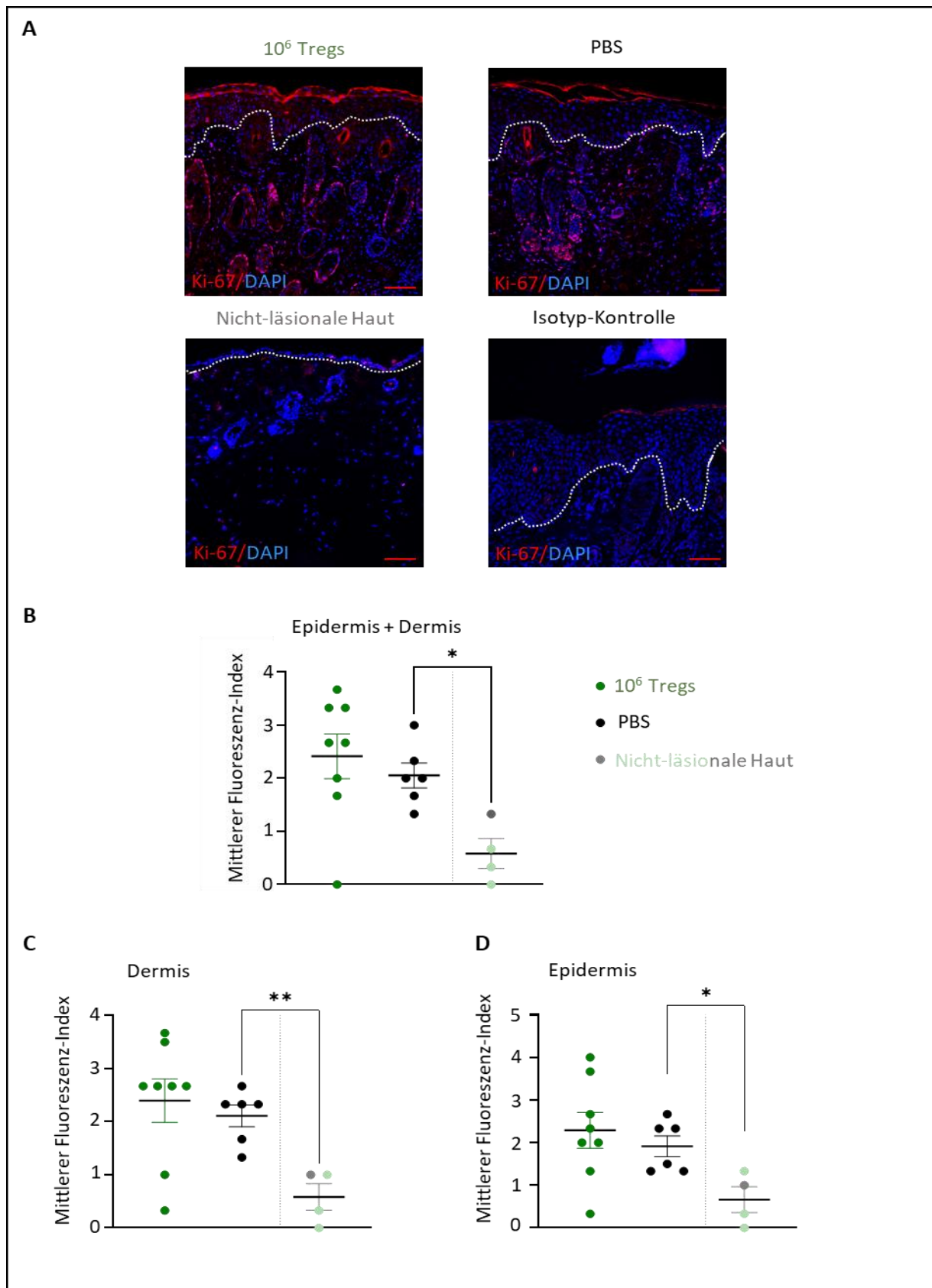


Abb. 28: Adoptiver Treg Transfer bewirkt keinen Unterschied bezüglich der Ki-67 Expression in läSIONALER Haut. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Ki-67 Färbung in läSIONALER Haut je einer Maus aus der Behandlungsgruppe mit 10^6 injizierten Tregs, der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung.

4.3 Adoptiver Treg Transfer hat einen hemmenden Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

Ki-67 positive Zellen werden in Rot dargestellt und Kernfärbung mittels DAPI in Blau. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B-D)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von Ki-67 in läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 4-6) in einmal **(B)** Epidermis und Dermis zusammen, **(C)** Dermis und **(D)** Epidermis einzeln betrachtet. Datensätze der nicht-läsionalen Haut beinhaltet drei Werte von einer nicht-läsionalen Haut aus der behandelten Gruppe und einen Wert aus der Positivkontrolle (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). In allen drei Bereichen (Epidermis und Dermis, nur Dermis und nur Epidermis) zeigte die behandelte Gruppe eine signifikante Erhöhung des mittleren Fluoreszenz-Index für ki-67 zur Positivgruppe mit **(A und D)** $p < 0,05$ und **(C)** $p < 0,01$. Werte der Positivkontrolle und Werte der nicht-läsionalen Haut-Gruppe zeigten keinen signifikanten Unterschied. Datensätze sind als $MW \pm SEM$ dargestellt und statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Maßstab: 100 μm ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Bezüglich der Makrophagen, Immunzellen, welche ebenso an der Spaltbildung mitbeteiligt sein können [165,166], konnten keinen signifikanten Unterschieden festgestellt werden: die Mäuse, die polyklonalen Tregs injiziert bekamen und die Positivkontrolle wiesen etwas mehr positiv gefärbt F4/80 Zellen in der läsionalen Haut in Vergleich zu den nicht-läsionalen Hautbereichen derselben Tiere auf. Die detektierten Makrophagen in der läsionalen Haut befanden sich dabei in hoher Anzahl bevorzugt im Bereich der unteren Dermis und zogen sich vereinzelt hoch bis in die obere Dermis bis unter die verdickte Epidermis in der Positivkontrolle. In der therapierten Gruppe fanden sich zwar eine vergleichbare Anzahl an Makrophagen in der Haut. Hier lagen die Makrophagen jedoch verstärkt in der unteren Dermis und schienen nicht in die obere Dermis verstärkt einzuwandern. Im Vergleich dazu wies die nicht-läsionale Haut nur vereinzelt Makrophagen verteilt innerhalb der Dermis auf (Abbildung 29A). Der Unterschied zwischen nicht-läsionaler Haut und läsionaler Haut in Bezug des Anteils an positiv gefärbten Makrophagen wurde diesmal nicht durch einen signifikanten Anstieg der F4/80 positiven Zellen in läsionaler Haut der Positivgruppe ($2,73 \pm 0,66$) im Vergleich zu den nicht-läsionalen Häuten beider Gruppen ($1,92 \pm 0,31$) deutlich. Es konnte nur ein Trend festgestellt werden. Auch hier zeigte die Auswertung der für F4/80 gefärbten prozentualen Anteils keinen signifikanten Unterschied der behandelten Gruppe ($3,05 \pm 0,32$) zu der läsionalen Haut der Positivgruppe (Abbildung 29B).

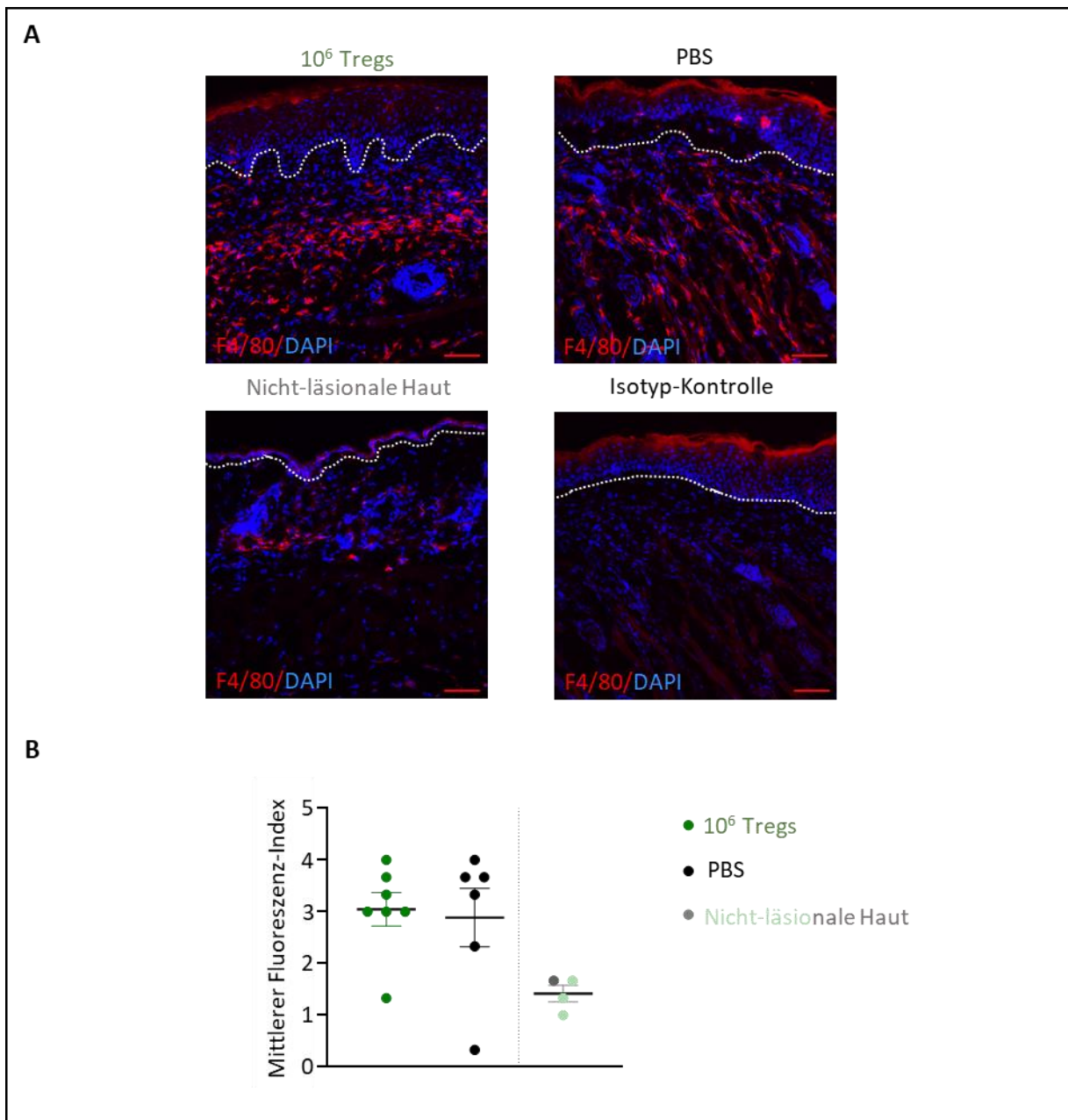


Abb. 29: Die Makrophagen-Population in läSIONALER Haut bleibt vergleichbar zur Positivkontrolle nach adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der F4/80 Färbung in läSIONALER Haut je einer Maus aus der Behandlungsgruppe mit 10^6 injizierten Tregs, der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läSIONALEN Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{C-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörpergefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. F4/80 positive Zellen werden Rot und Kernfärbung mittels DAPI Blau dargestellt. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von F4/80 in läSIONALER Haut und nicht-läSIONALER Haut (n = 4-7). Datensatz der nicht-läSIONALEN Haut beinhaltet drei Werte von einer nicht-läSIONALEN Haut aus der behandelten Gruppe und einen Wert aus der Positivkontrolle (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Es trat kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle auf. Datensätze sind als MW \pm SEM dargestellt. Maßstab: 100 μ m. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

Im Hinblick auf die Haupteffektorzellen der EBA, den Neutrophilen [161,162], zeigte sich, dass in der Therapiegruppe deutlich weniger positiv gefärbte Zellen innerhalb der läSIONalen Haut detektiert werden konnten als in der Positivkontrolle. In der Kontrollgruppe hingegen ergab sich über die ganze Gruppe hinweg ein starkes Fluoreszenzsignal vor allem im Bereich der Epidermis, Spaltbildung und oberen Dermis. Nicht-läsionale Haut wies im Gegensatz dazu wieder praktisch keine positive Ly6G-Färbung auf (Abbildung 30A). Dieser Unterschied zwischen nicht-läsionaler Haut und läSIONaler Haut wurde auch hier wieder statistisch mit einem signifikanten Anstieg der Neutrophilen in der läSIONalen Haut der Positivgruppe ($2,93 \pm 0,34$) im Vergleich zu der nicht-läsionalen Haut sichtbar ($0,08 \pm 0,08$ mit $p < 0,05$). Diesmal zeigte sich auch statistisch die Verringerung der Neutrophilen-Population zwischen der behandelten Gruppe ($1,50 \pm 0,25$) gegenüber der Positivkontrolle mit einem $p < 0,05$ (Abbildung 30B).

Als nächstes wurde wieder allgemein die T Zellpopulation anhand der CD3 Expression in der Therapiegruppe im Vergleich zu der Positivkontrolle analysiert. Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen zeigten in der behandelten Gruppe vergleichbar viele CD3+ Zellen in der gesamten Haut, wie in nicht-läsionaler Haut. In der Therapiegruppe konnten jedoch mehr T Zellen innerhalb der Dermis und in nicht-läsionaler Haut mehr T Zellen in der Epidermis beobachtet werden. Läsionale Häute der Mäuse aus der Positivgruppe wiesen insgesamt die niedrigste Anzahl an positiven CD3 Zellen auf. Dies spiegelte sich auch statistisch wider: die behandelte Gruppe ($3,05 \pm 0,39$) zeigte gegenüber der Kontrollgruppe in der gesamten Haut ($1,28 \pm 0,46$ mit $p < 0,05$), wie auch Dermis ($3,39 \pm 0,20$ bzw. $1,16 \pm 0,40$ mit $p < 0,01$) bzw. Epidermis ($1,00 \pm 0,34$ bzw. $0,00 \pm 0,00$ mit $p < 0,05$) einzeln betrachtet, eine signifikante Erhöhung des CD3+ Signals. Nicht-läsionale Haut besaß ebenso signifikant mehr T Zellen in der gesamten Haut ($3,33 \pm 0,27$ mit $p < 0,05$) als auch in der Epidermis ($3,25 \pm 0,34$ mit $p < 0,01$) einzeln betrachtet (Abbildung 31).

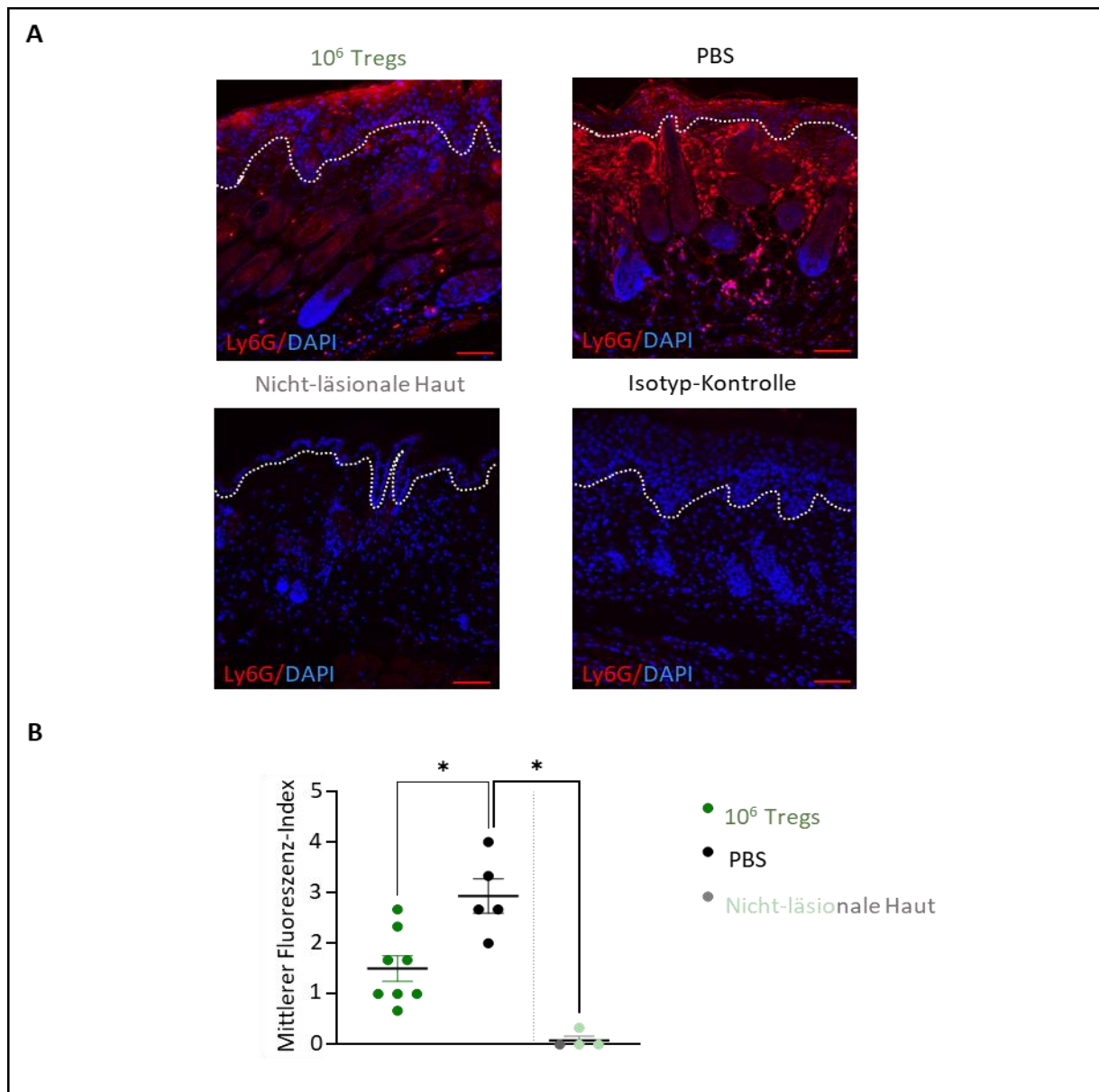


Abb. 30: Die Neutrophilen-Population ist signifikant in läsionaler Haut nach adoptiven Treg Transfer im Vergleich zur Positivkontrolle reduziert. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Ly6G Färbung in läsionaler Haut je einer Maus aus der Behandlungsgruppe mit 10⁶ injizierten Tregs, der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. Ly6G positive Zellen werden Rot und Kernfärbung mittels DAPI Blau dargestellt. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von Ly6G in läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 4-8). Datensatz der nicht-läsionalen Haut beinhaltet drei Werte von einer nicht-läsionalen Haut aus der behandelten Gruppe und einen Wert aus der Positivgruppe (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Die behandelte Gruppe wies einen signifikanten niedrigeren mittleren Fluoreszenz-Index als die Positivkontrolle mit p < 0,05 auf. Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut verglichen und zeigten einen signifikanten Anstieg mit p < 0,05. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt und statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Maßstab: 100 µm; *: p < 0,05.

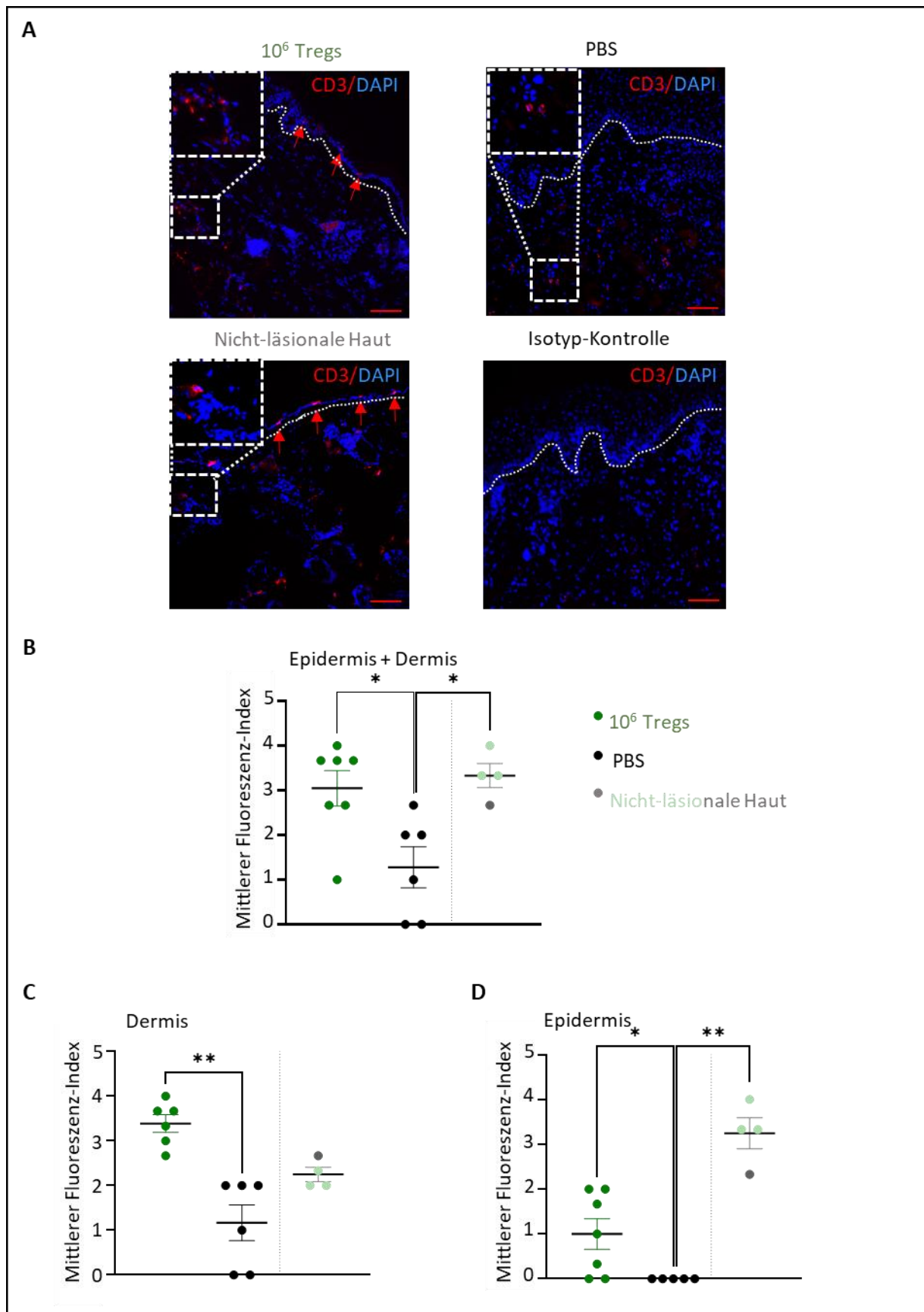


Abb. 31: T Zellen sind nach adoptiven Treg Transfer signifikant in läSIONALER Haut im Vergleich zur **Positivkontrolle erhöht.** (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der CD3 gefärbten T Zellen in läSIONALER Haut je einer Maus der Behandlungsgruppe mit 10^6 injizierten Tregs, der Positivkontrolle (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{GST} IgGs. Zusätzlich

4.3 Adoptiver Treg Transfer hat einen hemmenden Einfluss auf die Pathogenese der EBA im Ak-induziertem Mausmodell

eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. CD3+ Zellen werden Rot und Kernfärbung mittels DAPI in Blau dargestellt. Beispiele positiv gefärbte Zellen innerhalb der Dermis sind nochmals vergrößert in einer Ecke des Bildes und positive Zellen in der Epidermis mittels Pfeile besser sichtbar gemacht worden. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte weiße Linie dargestellt. **(B-D)** Mittlerer Fluoreszenz-Index von CD3 in läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut (n = 4-6) in einmal **(B)** Epidermis und Dermis zusammen, **(C)** Dermis und **(D)** Epidermis einzeln betrachtet. Datensätze der nicht-läsionalen Haut beinhaltet drei Werte von einer nicht-läsionalen Haut aus der behandelten Gruppe und einen Wert aus der Positivkontrolle (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). In allen drei Bereichen (Epidermis und Dermis, nur Dermis und nur Epidermis) zeigte die behandelte Gruppe eine signifikante Erhöhung des mittleren Fluoreszenz-Index für CD3 zur Positivgruppe mit **(A und D)** $p < 0,05$ und **(C)** $p < 0,01$. Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut-Gruppe verglichen und zeigten eine signifikante Erniedrigung **(B)** mit $p < 0,5$ für die Epidermis und Dermis zusammen und **(D)** mit $p < 0,01$ unter ausschließlicher Betrachtung der Epidermis auf. Datensätze sind als $MW \pm SEM$ dargestellt und statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Maßstab: 100 μm ; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Um zu untersuchen, ob auch immunhistochemisch eine erhöhte Anzahl an Tregs durch den adoptiven Treg Transfer in läsionaler Haut detektiert werden können, wurden ebenfalls nochmals Tregs innerhalb der Haut anhand ihrer FoxP3 Expression erfasst. In beiden Gruppen der läsionalen Haut fanden sich die Tregs wieder innerhalb der Dermis und dabei bevorzugt im oberen Bereich nahe der verdickten Epidermis bzw. der Spaltbildung. Nicht-läsionale Haut zeigte wieder nur vereinzelte FoxP3+ Zellen innerhalb der Dermis (Abbildung 32A). Im Gegensatz zu den Daten der Durchflusszytometrie konnte hier in der behandelten Gruppe ($3,19 \pm 0,30$) durch eine um einen fast ein Drittel höheren Mittelwert signifikant ($p < 0,05$) mehr Tregs im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($2,17 \pm 0,37$) erfasst werden. Nicht-läsionale Haut ($0,84 \pm 0,10$) wies ebenfalls wieder signifikant weniger Tregs auf als die läsionale Haut der Positivkontrolle ($p < 0,05$) (Abbildung 32B).

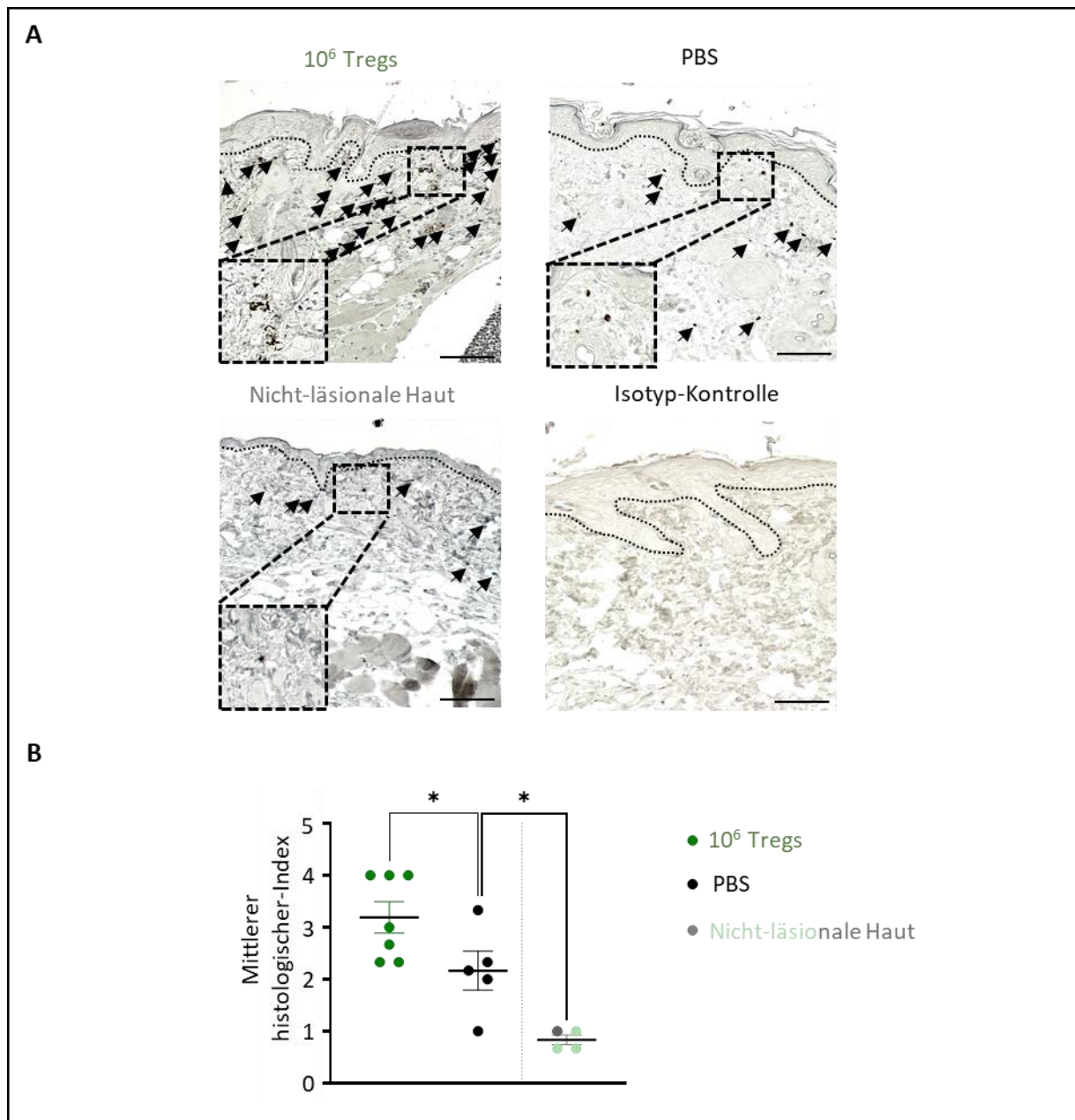


Abb. 32: Adoptiver Treg Transfer bewirkt eine signifikante Erhöhung der Treg-Population in läSIONALER HAUT. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der mittels FoxP3 gefärbten Tregs in läSIONALER HAUT je einer Maus aus der Behandlungsgruppe mit 10⁶ injizierten Tregs, der Positivgruppe (PBS) und einer nicht-läsionalen Haut an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs. Zusätzlich eine repräsentative Aufnahme einer mit einem Isotypantikörper-gefärbten Kontrolle zum Ausschluss einer falsch-positiven Färbung. FoxP3+ Zellen wurden schwarz-braun mittels DAB gefärbt. Kernfärbung erfolgte mittels Mayer's Hämalaun. Grenze der Dermis zu der Epidermis bzw. Bildung der Dermal-Epidermalen-Spalte wird durch die gestrichelte schwarze Linie dargestellt (B) Mittlerer histologischer Index von FoxP3 in läSIONALER HAUT und nicht-läsionaler Haut (n = 4-7). Datensatz der nicht-läsionalen Haut beinhaltet drei Werte von einer nicht-läsionalen Haut aus der behandelten Gruppe und einen Wert aus der Positivkontrolle (dargestellt durch gleiche Farbschattierung in Grau). Die behandelte Gruppe wies einen signifikanten höheren mittleren histologischen Index als die Positivkontrolle mit p < 0,05 auf. Werte der Positivkontrolle wurden mit Werten der nicht-läsionalen Haut-Gruppe verglichen und zeigten einen signifikanten Anstieg mit p < 0,05. Datensätze sind als MW ± SEM dargestellt und statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Maßstab: 100 µm; *: p < 0,05.

4.4 Tregs aus EBA-induzierten Mäusen weisen eine geringere Suppressionsfähigkeit *in vitro* auf

Für einen tieferen Einblick in die Rolle der Tregs in EBA, wurden Co-Kultivierungsexperimente von isolierten Tregs mit Neutrophilen und T Effektorzellen durchgeführt. Neutrophile und T Effektorzellen spielen eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf der EBA [161–163] und in Abwesenheit von Tregs steigert sich die Aktivität dieser Zellen [164]. Gleichzeitig ist insbesondere für T Effektorzellen bekannt, dass unter anderem deren Proliferation durch Tregs gehemmt werden kann [225]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob sich Tregs aus EBA-induzierten Mäusen von aus gesunden Mäusen isolierten Tregs bezüglich ihrer Suppressionsfähigkeit auf Neutrophile und T Effektorzellen unterscheiden. Es wurden dabei einmal Tregs aus dem Ak-EBA-Mausmodell isoliert, welches die Effektorphase der EBA nachbildet. Zusätzlich wurden Tregs aus dem immunisierungsinduzierten EBA-Mausmodell (Ag-EBA) gewonnen, welches den gesamten Krankheitsverlauf der EBA von Toleranzverlust bis zur Effektorphase darstellt [165].

4.4.1 Tregs aus EBA-induzierten Mäusen weisen eine geringere Suppressionsfähigkeit auf die Proliferationsrate von T Effektorzellen *in vitro* auf

Mit der Co-Kultivierung von Tregs mit T Effektorzellen wurde der Effekt der Tregs aus unbehandelten oder EBA-induzierten Mäusen auf die Proliferation der T Effektorzellen mit Hilfe von CFSE untersucht. Dafür wurden T Effektorzellen mit Hilfe von CD3/CD28 Beads für drei Tage stimuliert, was somit einer Aktivierung der T Effektorzellen durch APCs simulierte und unter anderem deren Proliferation zur Folge hat [226].

Zunächst wurden isolierte Tregs aus dem Ak-EBA-Modell betrachtet, um zu testen, ob Tregs hinsichtlich ihrer Suppressionsfähigkeit auf die Proliferationsrate von T Effektorzellen während der Effektorphase der EBA Defizite aufweisen. Hier zeigte sich, dass nicht stimulierte T Effektorzellen noch nach drei Tagen ein starkes CFSE-Signal und damit kaum Proliferation aufwiesen, während allein kultivierte T Effektorzellen unter Stimulation jeweils einen deutlichen Verlust des CFSE-Signals zeigten und daher eine hohe Proliferationsrate besaßen. Wurden T Effektorzellen nun mit isolierten Tregs aus gesunden unbehandelten C57BL/6 Mäusen co-kultiviert, besaßen die T Effektorzellen ein zur stimulierten Kontrolle normalisiertes signifikant höheres CFSE-Signal ($206,00 \% \pm 35,62$) mit $p < 0,05$ und damit eine geringere Proliferationsrate als dies in Abwesenheit der Tregs der Fall war. Was eine erfolgreiche Hemmung der Proliferationsrate der T Effektorzellen durch die Tregs zeigte. Co-Kultivierung der T Effektorzellen mit isolierten Tregs aus dem Ak-EBA-Mausmodell führte hingegen wieder zu einem deutlichen Verlust des CFSE-Signals ($82,26 \% \pm 9,91$) mit $p < 0,01$ im Vergleich zum CFSE-Signal von mit Tregs aus gesunden unbehandelten C57BL/6 Mäusen co-kultivierten T Effektorzellen und entsprach daher einer weniger starken Hemmung der Proliferationsrate der T Effektorzellen durch Tregs aus Ak-EBA Mäusen (Abbildung 33).

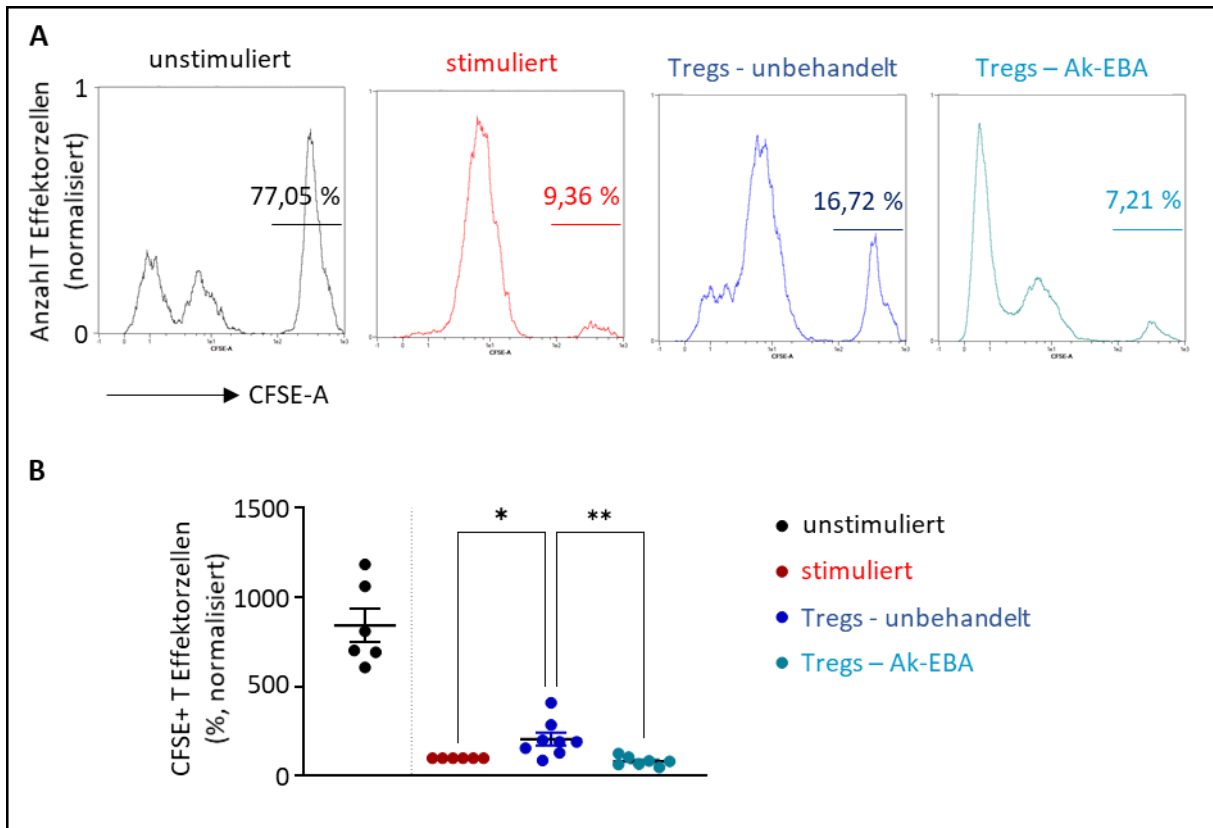


Abb. 33: Isolierte Tregs aus Tieren der Ak-EBA hemmen die Proliferationsrate von T Effektorzellen signifikant weniger als Tregs unbehauelter Mäuse. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Histogramme für das CFSE-Signal von unstimulierten (schwarz) und stimulierten (rot) T Effektorzellen, sowie von T Effektorzellen, welche mit Tregs aus unbehauelten Mäusen (blau) und aus Mäusen der Ak-EBA (türkis) co-kultiviert wurden an Tag Drei nach Beginn der Stimulation und Co-Kultivierung. **(B)** Punktdiagramm der vier Gruppen bezüglich der CFSE-positiven Zellen normalisiert auf die stimulierte Kontrolle mit $n = 6-8$ pro Gruppe. T Effektorzellen, welche mit Tregs aus unbehauelten Mäusen co-kultiviert wurden, zeigten ein signifikanten höheren Mittelwert für CFSE mit einem $p < 0,05$ an. Im Gegensatz dazu wiesen T Effektorzellen nach Co-Kultivierung mit Tregs aus dem AK-EBA-Mausmodell einen signifikant niedrigeren Wert mit einem $p < 0,01$ als nach Co-Kultivierung mit Tregs aus unbehauelten Mäusen auf. Datensätze sind als $MW \pm SEM$ dargestellt, und die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way ANOVA* und *Holm-Šidák's multiple comparison* Post Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Um zu untersuchen, ob im anderen EBA-Mausmodell, das Ag-EBA-Modell, Tregs hinsichtlich in ihrer Suppressionsfähigkeit auf T Effektorzellen gehemmt bzw. verändert sind, wurden hier ebenfalls Tregs aus Ag-EBA Mäusen isoliert und mit CD3/CD28 stimulierten T Effektorzellen aus gesunden unbehauelten B6.S Mäusen für drei Tage co-kultiviert. Der Effekt dieser isolierten Tregs auf die Proliferationsrate der T Effektorzellen wurde ebenfalls mit dem der Co-Kultivierung von T Effektorzellen mit Tregs aus gesunden unbehauelten Mäusen verglichen. Auch hier zeigte die unstimulierte Kontrolle ein zur stimulierten Kontrolle normalisiertes (100 %) hohes CFSE-Signal und damit kaum Proliferation auf. Hingegen wiesen T Effektorzellen, welche mit isolierten Tregs aus gesunden unbehauelten Mäusen co-kultiviert wurden ein signifikant höheres CFSE-Signal ($201,6 \% \pm 39,28$) mit einem $p < 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrolle auf.

Im Fall der Tregs aus dem Ag-EBA-Modell musste zunächst zusätzlich zwischen Mäusen mit einem EBA-Wert der betroffenen Körperoberfläche von über zwei Prozent und Mäusen mit einem Wert von unter zwei Prozent unterschieden werden, da nach Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe lediglich Erstere einen typischen Verlauf der EBA in diesem Modell abbilden. Nach eigenen Beobachtungen kommt es in diesem Mausmodell jedoch in bis zu 30 % den Mäusen vor, dass innerhalb von drei Monaten die betroffenen Körperoberfläche unter diesem Wert bleibt und manchmal sogar zu gar keiner Ausbildung der EBA. Um einen möglichen Einfluss der Tregs auf dieses Phänomen zu untersuchen, wurden daher Tregs aus beiden Gruppen isoliert. T Effektorzellen, die mit Tregs aus Mäusen mit ausgebildeter EBA (Score > 2 %) co-kultiviert wurden lagen mit ihrem CFSE-Signal ($145,30 \% \pm 28,38$) und damit ihrer Proliferationsrate zwischen der stimulierten Kontrolle (100 %) und der mit unbehandelten Tregs co-kultivierten T Effektorzellen ($195,40 \% \pm 23,70$). Im Gegensatz zum Ak-EBA-Mausmodell reichte die Differenz hier jedoch nicht zu einer Signifikanz, was auf einen weniger starken Funktionsverlust der Tregs hinsichtlich ihrer Suppressionsfähigkeit auf T Effektorzellen hinweist. Wurden aber nun T Effektorzellen mit Tregs aus Mäusen, welche keine EBA ausbildeten (Score < 2 %) co-kultiviert, zeigten diese nach drei Tagen ein immer noch starkes CFSE-Signal und damit kaum Proliferation der Zellen innerhalb dieser Zeit. Normalisierung auf die stimulierte Kontrolle ergab einen signifikanten Unterschied mit $344,30 \% \pm 53,15$ und einem $p < 0,002$. Zusätzlich wies diese Gruppe einen jeweils signifikanten Unterschied zu der Gruppe mit Co-Kultivierung von Tregs aus gesunden unbehandelten Mäusen ($p < 0,05$) und der Gruppe mit Co-Kultivierung von Tregs aus Ag-EBA mit > 2 % EBA auf ($p < 0,01$). Dies zeigt, dass Tregs aus nicht erkrankten Ag-EBA-Mäusen eine höhere Suppressionsfähigkeit hinsichtlich der Proliferationsrate der T Effektorzellen aufweisen (Abbildung 34).

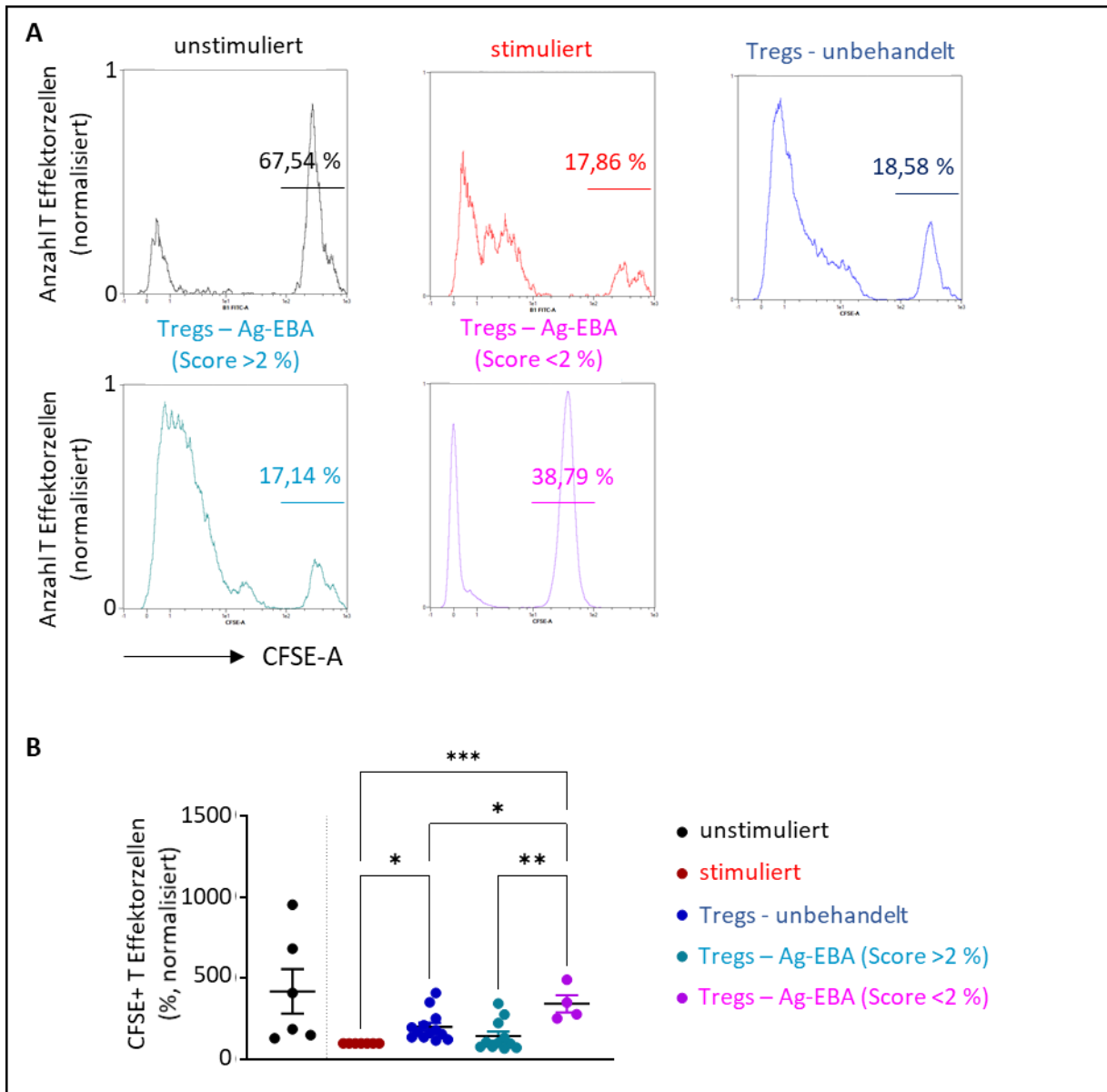


Abb. 34: Isolierte Tregs aus nicht erkrankten Mäusen aus dem Ag-EBA-Mausmodell hemmen die Proliferationsrate von T Effektorzellen stärker als aus erkrankten Ag-EBA Mäusen. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Histogramme für das CFSE-Signal von unstimulierten (schwarz) und stimulierten (rot) T Effektorzellen, sowie von T Effektorzellen, welche mit Tregs aus unbehandelten Mäusen (blau) und aus Mäusen des Ag-EBA-Modells einmal mit einer EBA mit über zwei Prozent (Score > 2 %; türkis) und einmal unter zwei Prozent (Score < 2 %; rosa) betroffener Körperoberfläche co-kultiviert wurden an Tag Drei nach Beginn der Stimulation und Co-Kultivierung. **(B)** Punktdiagramm der fünf Gruppen bezüglich der CFSE-positiven Zellen normalisiert auf die stimulierte Kontrolle mit n = 4-11 pro Gruppe. T Effektorzellen, welche mit Tregs aus unbehandelten Mäusen co-kultiviert wurden, zeigten ein signifikant höheren Mittelwert für CFSE zur Positivkontrolle mit einem $p < 0,05$ an. Zusätzlich wiesen T Effektorzellen nach Co-Kultivierung mit Tregs aus dem Ag-EBA-Mausmodell, welche nicht erkrankten, einen jeweils signifikant höheren Wert zur stimulierten Kontrolle ($p < 0,002$), zu der Gruppe mit Co-Kultivierung von gesunden unbehandelten Tregs ($p < 0,05$), sowie zur Gruppe mit Co-Kultivierung mit Tregs aus Ag-EBA mit > 2% EBA ($p < 0,01$) auf. Datensätze sind als MW \pm SEM dargestellt und statistische Analyse erfolgte mittels *One-way ANOVA* und *Holm-Šidák's multiple comparison* Post Test. Ag-EBA: Immunsierungs-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,002$.

4.4.2 Tregs aus EBA-induzierten Mäusen weisen eine geringere Suppressionsfähigkeit auf die CD18 Expression in Neutrophilen auf

Mit der Co-Kultivierung von Tregs mit Neutrophilen wurde der Effekt der Tregs auf die Expression des Integrins CD18 auf Neutrophile untersucht. Dieses vermittelt die Adhäsion von Neutrophilen an ihre Zielstruktur im Gewebe [227]. In *in vitro* Versuchen konnte schon gezeigt werden, dass eine Co-Kultivierung von isolierten gesunden Tregs mit isolierten Immunkomplex-stimulierten Neutrophilen die CD18 Expression auf den Neutrophilen herunterreguliert [164]. Nach diesem Protokoll wurden hier nun ebenfalls Neutrophile mittels eines Immunkomplex für eine Stunde stimuliert und anschließend mit isolierten Tregs aus gesunden unbehandelten und EBA-induzierten Mäusen für viereinhalb Stunden co-kultiviert und anschließend die CD18 Expression der Neutrophile mittel Durchflusszytometrie erfasst und miteinander verglichen.

Unstimulierte Neutrophile zeigten für C57BL/6 Mäuse einen geringen Prozentsatz an Zellen, welche CD18 exprimierten (60,10 % \pm 4,40 nach Normalisierung auf stimulierten Ansatz). Stimulierte Neutrophile ohne Zugabe von Tregs wiesen hingegen einen deutlichen Anstieg der CD18 Expression auf. Co-Kultivierung mit Tregs aus unbehandelten Mäusen führte nach Normalisierung zur stimulierten Kontrolle (100 %) zu einer signifikanten Erniedrigung der CD18-positiven Neutrophilen mit einem $p \leq 0,001$ für C57BL/6 Mäuse (68,13 % \pm 3,66). Was frühere Daten bestätigt [164]. Wurden Neutrophile mit Tregs aus dem Ak-EBA-Mausmodell co-kultiviert stieg die Anzahl an CD18 positiven Neutrophile im Vergleich zu mit co-kultivierten Tregs aus unbehandelten Mäusen signifikant mit 90,57 % \pm 0,88 und einem $p \leq 0,001$, lag aber immer noch normalisiert auf einen niedrigeren Wert als die stimulierte Positivkontrolle ohne Zugabe von Tregs mit einer Signifikanz mit $p < 0,05$. Dies zeigt, wie auch schon für die T Effektorzellen, eine geringere Suppressionsfähigkeit der Tregs hinsichtlich der Neutrophilen (Abbildung 35).

Auch für die Kontrollen der B6.S Mäuse für die Ag-EBA zeigte sich, dass unstimulierte Neutrophile wenig CD18 exprimierten (56,77 % \pm 2,13 nach Normalisierung auf stimulierten Ansatz). Die stimulierte Positivkontrolle ohne Zugabe von Tregs wies auch hier eine deutlich höhere Expression an CD18 auf. Ebenso kam es nach Co-Kultivierung mit isolierten Tregs aus gesunden unbehandelten B6.S Mäusen, zu einer signifikanten Erniedrigung der CD18-positiven Neutrophilen mit einem $p < 0,01$ (88,68 % \pm 1,89). Dagegen führte Co-Kultivierung von Neutrophilen mit Tregs aus erkrankten Mäusen des Ag-EBA-Modells zu einer signifikanten Erhöhung des Mittelwertes der CD18 Expression (100,6 \pm 2,02) gegenüber dem Wert mit co-kultivierten Tregs aus unbehandelten Mäusen mit einem $p < 0,002$, was ebenso auf einen Funktionsverlust der Suppressionsfähigkeit der Tregs hinsichtlich der Neutrophile auch in diesem EBA-Modell weist. Im Gegensatz zu dem Effekt auf T Effektorzellen, zeigten die Tregs aus nicht erkrankten Mäusen aus dem Ag-EBA-Modells keinen starken Suppressionseffekt auf die CD18 Expression auf Neutrophilen nach co-Kultivierung auf: hier lag der Mittelwert mit 98,24 % \pm 4,62 zwischen dem der Positivkontrolle und dem mit aus unbehandelten Mäusen co-kultivierten Tregs, aber ohne jeglichen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. Dies zeigt, dass trotz Verlust der Suppressionsfähigkeit der Tregs hinsichtlich der Neutrophilen es zu keiner Ausbildung des klinischen Phänotyps der EBA kommt (Abbildung 36).

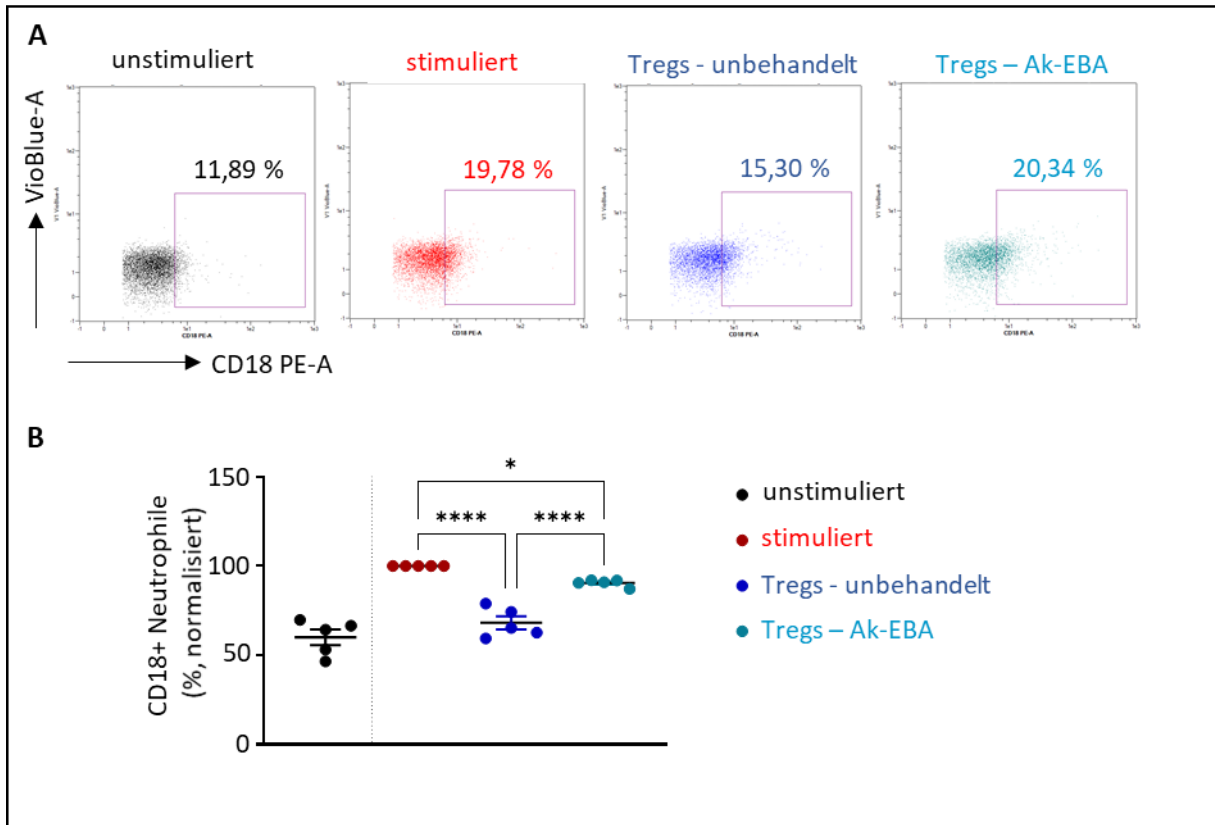


Abb. 35: Isolierte Tregs aus Tieren der Ak-EBA hemmen die CD18 Expression in Neutrophilen signifikant weniger als Tregs un behandelter Mäuse. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Punktdiagramme hinsichtlich des CD18-Signals im PE-Kanal von unstimulierten (schwarz) und Immunkomplex-stimulierten (rot) Neutrophilen, sowie von Neutrophilen, welche mit Tregs aus unbehandelten Mäusen (blau) und aus Mäusen des Ak-EBA-Modells (türkis) für viereinhalb Stunden co-kultiviert wurden. **(B)** Punktdiagramm der vier Gruppen bezüglich der CD18 positiven Zellen normalisiert auf die stimulierte Kontrolle mit $n = 5$ pro Gruppe. Neutrophile, welche mit Tregs aus unbehandelten Mäusen co-kultiviert wurden, zeigten einen signifikant niedrigeren Mittelwert für CD18 positive Zellen mit einem $p \leq 0,001$ an. Hingegen zeigten Neutrophile nach Co-Kultivierung mit Tregs aus dem AK-EBA-Mausmodell einen signifikant höheren Wert mit einem $p \leq 0,001$ als nach Co-Kultivierung mit Tregs aus unbehandelten Mäusen, aber einen immer noch signifikant niedrigeren Wert mit einem $p < 0,05$ zur Positivkontrolle auf. Datensätze sind als $MW \pm SEM$ dargestellt, und die statistische Analyse erfolgte mittels *One-way ANOVA* und *Holm-Šidák's multiple comparison* Post Test. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

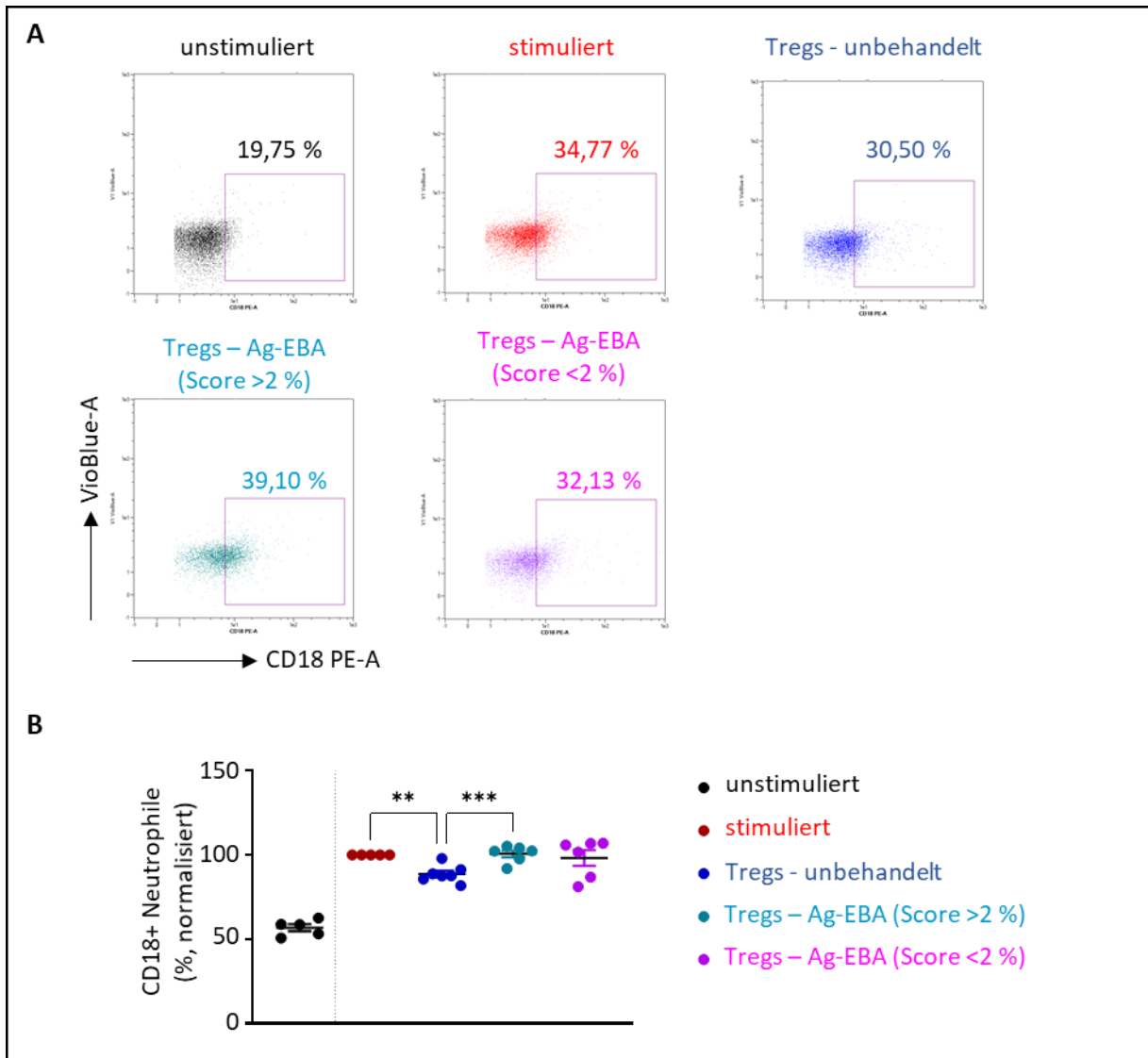


Abb. 36: Isolierte Tregs aus Tieren der Ag-EBA hemmen die CD18 Expression in Neutrophilen signifikant weniger als Tregs unbehandelter Mäuse. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Punktdiagramme hinsichtlich des CD18-Signals im PE-Kanal von unstimulierten (schwarz) und Immunkomplex-stimulierten (rot) Neutrophilen, sowie von Neutrophilen, welche mit Tregs aus unbehandelten Mäusen (blau) und aus Mäusen des Ag-EBA-Modells einmal mit einer EBA mit über zwei Prozent (Score > 2 %; türkis) und einmal unter zwei Prozent (Score < 2 %; rosa) betroffener Körperoberfläche für viereinhalb Stunden co-kultiviert wurden. **(B)** Punktdiagramm der fünf Gruppen bezüglich der CD18 positiven Zellen normalisiert auf die stimulierte Kontrolle mit n = 5-6 pro Gruppe. Neutrophile, welche mit Tregs aus unbehandelten Mäusen co-kultiviert wurden, zeigten ein signifikant niedrigeren Mittelwert für CD18 zur Positivkontrolle mit einem $p < 0,01$ an. Hingegen wiesen Neutrophile nach Co-Kultivierung mit Tregs aus dem Ag-EBA-Mausmodell, welche an EBA erkrankten einen signifikant höheren Wert mit einem $p < 0,002$ zur Gruppe mit co-kultivierten Tregs aus unbehandelten Mäusen auf. Datensätze sind als MW \pm SEM dargestellt und statistische Analyse erfolgte mittels *One-way ANOVA* und *Holm-Šidák's multiple comparison* Post Test. Ag-EBA: Immunsierungs-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,002$.

4.5 Die Genexpression von 429 Genen wir in läsionaler Haut des Ak-EBA-Mausmodells nach einem adoptiven Treg Transfer signifikant verändert

RNA-Sequenzierung ist eine weit verbreitete Technologie zur Erstellung von Profilen der Genexpression. Sie zielt auf die Identifizierung von Genen oder molekularen Pfaden ab, die zwischen zwei oder mehr biologischen Bedingungen unterschiedlich exprimiert werden [228]. Um zu untersuchen, welche Veränderungen der adoptive Treg Transfers auf Genomebene induziert, wurden aus läsionaler Haut der Positivgruppe und der 10^6 Treg Transfer-Gruppe, sowie aus nicht-läsionaler Haut unbehandelter C57BL/6 Mäuse totale RNA isoliert und sequenziert. Nach Analyse mit Hilfe von geeigneten bioinformatischen Softwares und Plattformen, konnten insgesamt 18196 Gene analysiert werden. Davon waren 2853 in läsionaler Haut der Positivgruppe im Vergleich zu nicht-läsionaler Haut unbehandelter Mäuse differenziell exprimiert. In läsionaler Haut der 10^6 Treg Transfer-Gruppe im Vergleich zur läsionaler Haut der Positivgruppe war die Genexpression von insgesamt 522 Genen unterschiedlich. Die Betrachtung ausschließlich der differenziell exprimierten Gene in der läsionalen Haut nach Treg Transfer (Vergleich Transfer von 10^6 Treg zu EBA Kontrollgruppe), die abhängig von der Induktion einer EBA waren (Vergleich entzündeter Haut der EBA Kontrollgruppe zu gesunder Haut) ergab eine Überschneidung von 429 Genen zwischen den Gruppen mit einem signifikanten adjustierten p-Wert (*adjusted p-value = Padj*) $\leq 0,05$. Davon waren in der Therapiegruppe 225 hoch- und 204 herunterreguliert (siehe Anhang Tabelle A3). Darunter zum Beispiel *Ccr4* mit einer erhöhten Expression und *Cxcl12* mit einer erniedrigten Expression mit jeweils einem *Padj* $\leq 0,001$.

Die Visualisierung der veränderten Genexpression der 429 Gene in einer *Heatmap* (Abbildung 37B) und einem PCA-Plot (*principle component analysis*; Hauptkomponentenanalyse) (Abbildung 37C) zeigte ein deutliches *Clustering* der nicht-läsionalen Haut von unbehandelten Mäusen und der läsionalen Haut der Positivgruppe mit einer deutlich veränderten Genexpression. Die Gruppe der läsionalen Haut der Therapiegruppe schien sich in ihren Merkmalen genau zwischen den beiden anderen Gruppen, mit einem Ausreißer zu der läsionalen Gruppe der Positivgruppe, zu positionieren (Abbildung 37).

4.5 Die Genexpression von 429 Genen wird in läSIONALER Haut des Ak-EBA-Mausmodells nach einem adoptiven Treg Transfer signifikant verändert

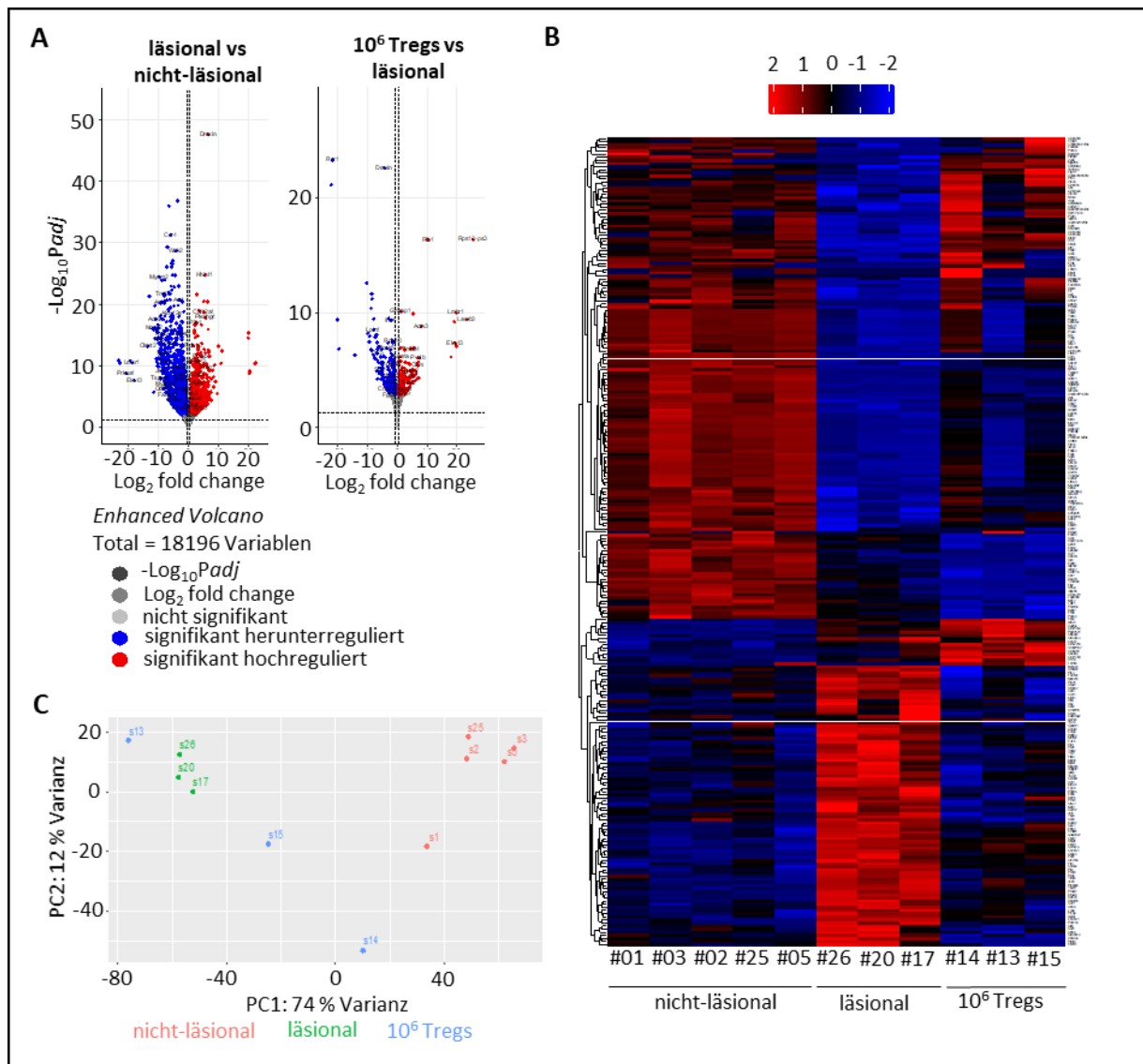


Abb. 37: Die Genexpression ist in 429 Genen nach adoptiven Treg Transfer in läSIONALER Haut verändert. (A) *EnhancedVolcano*-Plots von DEGs in läSIONALER Haut der Positivgruppe im Vergleich zu nicht-läSIONALER Haut unbehandelter Mäuse (links) und läSIONALER Haut von Mäusen der Gruppe mit adoptiv transferierten Tregs gegen läSIONALE Haut der Positivgruppe (rechts). Rot dargestellte Punkte sind signifikant hochregulierte Gene und blau signifikant herunterregulierte Gene mit einem Cut-Off des adjustierten p-Werts < 0,01 und $-1 > \log_2 \text{fold change (FC)} > 1$. **(B)** *Heatmap* der 431 DEGs der drei untersuchten Gruppen mit Darstellung der hochregulierten Gene in Rot, der unveränderten in Schwarz und der herunterregulierten in Blau. **(C)** PCA-Plot der drei untersuchten Gruppen nach Eingruppierung in die zwei Hauptkomponenten PC1 (74 % Varianz) und PC2 (12 % Varianz) für eine lineare Darstellung der unterschiedlichen Merkmale. DEG: *Differential Expressed Genes* (unterschiedlich exprimierte Gene); *Padj*: *adjusted p-value* (adjustierter p-Wert); PCA: *principle component analysis* (Hauptkomponentenanalyse); PC: *principle component* (Hauptkomponente).

Mit Hilfe von WebGestalt wurden die DEGs auf Zugehörigkeit zu bestimmten zellulären Signalwegen untersucht. Es fanden sich mehrere biologische Prozesse, die in der läSIONALen Haut der Therapiegruppe im Vergleich zur läSIONALen Haut der Positivgruppe hoch- bzw. herunterreguliert waren. Darunter zum Beispiel die Runterregulierung der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK)-

4.5 Die Genexpression von 429 Genen wird in läsionaler Haut des Ak-EBA-Mausmodells nach einem adoptiven Treg Transfer signifikant verändert

Familie Signaltransduktion-Kaskaden mit einem *Normalized Enrichment Score* von etwa -1,5 und einer FDR (*false discovery rate*; Falscherkennungsrate) von größer 0,05 (Abbildung 38).

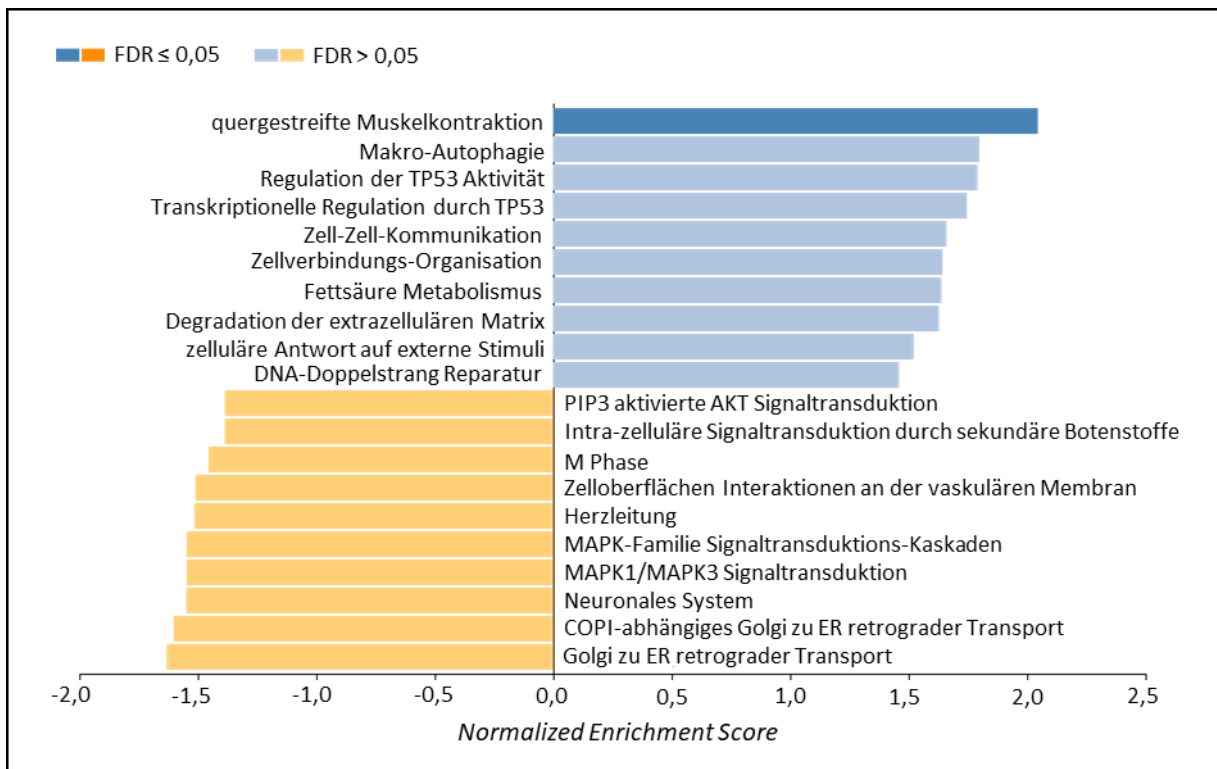


Abb. 38: MAPK-Familie Signaltransduktions-Kaskade sind nach adoptiven Treg Transfer in läsionaler Haut herunterreguliert. Darstellung der veränderten zellulären Signalwege in läsionaler Haut von Mäusen der Gruppe mit adoptiv transferierten Tregs im Vergleich zu läsionaler Haut der Positivgruppe in einem *Normalized Enrichment Score*-Plot. Hochregulierte Signaltransduktionswege sind in blau und Herunterregulierte in Gelb dargestellt. Signifikante Ergebnisse wurden mit der Falscherkennungsrate FDR (*false discovery rate*) ≤ 0,05 im jeweils dunkleren Farbton abgebildet.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Mechanismen aufzuklären, mit denen Tregs die Effektorphase von PDs modulieren, und diese Mechanismen für neue therapeutische Strategien zur Behandlung von PDs nutzbar zu machen. Es konnte schon gezeigt werden, dass Tregs bezüglich des Krankheitsverlaufs der EBA eine Rolle spielen, da durch deren Depletion sich das Krankheitsbild signifikant verschlechterte [164]. Diese Entdeckung macht sie zu einer interessanten potenziellen Therapieoption. Aber ob und wie Tregs in der EBA, wie auch in anderen Autoimmunerkrankungen [76-79], in einer geringeren Anzahl vorhanden sind oder einem Funktionsverlust unterliegen und wirken, ist nicht genau bekannt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Therapieoptionen mit Tregs in dem Ak-EBA-Mausmodell unter der Hypothese getestet, dass Tregs die PD-Hautentzündung durch mehrere Mechanismen unterdrücken, indem sie den Aktivitätszustand anderer Zelllinien, wie T-Effektorzellen und Neutrophilen in der läsionalen Haut in den prä-inflammatorischen Zustand zurückversetzen. Dieser Aspekt der Rolle der Tregs wurde anschließend genauer in *in vitro* Experimenten untersucht, um zu entschlüsseln, wie sich die Suppressionsfähigkeit der Tregs auf T-Effektorzellen und Neutrophilen innerhalb der Effektorphase der Ak-EBA verhält. Genexpressionsanalyse mit EBA-betroffener Haut aus dem Ak-EBA-Mausmodell nach einem Treg-Transfer dienten für eine vertiefendere Betrachtung der durch die Tregs modulierten biologischen Signalwege, welche auch weitere mögliche Therapieansätze liefern könnten.

5.1 Eine IL-2-Behandlung hat keinen therapeutischen Effekt im AK-EBA-Mausmodell

Tregs spielen eine entscheidende Rolle in der Immunhomöostase und -toleranz. Daher wurden in den letzten Jahren neue therapeutische Strategien für Autoimmunerkrankungen entwickelt, welche direkt oder indirekt auf Tregs abzielen [105]. Ein Ansatz ist die Proliferation von Tregs *in vivo* zu induzieren, was durch die Gabe von IL-2 bzw. IL-2-Antikörperkomplexen erreicht werden kann [93]. Auch in dieser Arbeit war der erste Ansatz zur Etablierung einer Treg-Therapie im Ak-EBA-Mausmodell die Gabe von niedrig-dosiertem IL-2 bzw. zwei verschiedene Konzentrationen an IL-2-Antikörperkomplexen. IL-2 war die erste Immuntherapie, die Anfang der 1990er Jahre für die Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms und des malignen Melanoms zugelassen wurde und bei 15-17 % der Patienten mit diesen Krebsarten eine Gesamtansprache bewirkte, darunter 5-10 % dauerhafte Komplettremissionen [229,230]. Es hatte sich gezeigt, dass eine langfristige, niedrig dosierte IL-2-Therapie Tregs aufgrund ihrer konstitutiv hohen Expression von CD25 bevorzugt stimuliert und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und zur Verzögerung der Abstoßung von Transplantaten eingesetzt werden kann [231,232]. So wurde bewiesen, dass niedrig dosiertes IL-2 bei T1D und SLE-Patienten sich als sicher erwiesen hat [97–100]. Die kurze Halbwertszeit und schwerwiegende Nebenwirkungen im Zusammenhang mit einer hochdosierten IL-2-Behandlung stellen jedoch große Nachteile dar [233]. Daher wurden zahlreiche Versuche unternommen, die IL-2-basierte Therapie zu

verbessern. Einer der vielversprechendsten Ansätze ist die Verwendung von Komplexen aus IL-2 und bestimmten IL-2-Antikörperkomplexen. Es hat sich gezeigt, dass diese Komplexe nicht nur die Halbwertszeit von parenteral verabreichtem IL-2 deutlich verlängern (von Minuten auf Stunden), sondern je nach verwendetem Antikörper auch eine selektive stimulierende Wirkung auf verschiedene Immunzellpopulationen ausüben [204,234]. Komplexe aus murinem IL-2 und anti-IL-2 Klon S4B6 (IL-2/S4B6) stimulieren nachweislich CD8+ T- und NK-Gedächtniszellen, während Komplexe aus murinem IL-2 und anti-IL-2 Klon JES6-1 (IL-2/JES6) hochselektiv Tregs expandieren [204,234,235]. Diese Selektivität von IL-2/JES6 kommt daher, dass sich die Bindungsstelle für JES6-1 Antikörper und CD122/CD132 im IL-2-Molekül fast vollständig überlappen. CD122 und CD132 stellen die Bestandteile des dimeren IL-2 Rezeptors auf CD8+ T- und NK-Zellen dar. IL-2/JES6 ist daher nicht in der Lage, an den IL-2R dieser Zellen zu binden und seine Signalwirkung auszulösen. CD25 kann jedoch an IL-2, das an JES6-1 Antikörper gebunden ist, binden und dadurch seine Wirkung auf CD25+ Zellen entfalten. So hat sich gezeigt, dass der Komplex aus IL-2/JES6 zu einer Expansion von Tregs *in vivo* führt, was es zu einem attraktiven Immuntherapeutikum macht [233] und wurde daher auch hier in diesen Versuchen verwendet.

Da je nach Erkrankung und Therapieansatz die Dauer und Menge der Gabe des IL-2 Antikörperkomplexes in der Literatur teilweise stark variieren [203,204], wurden hier zwei Ansätze gewählt: einmal in einer präventiven kurzen Gabe mit einer niedrigen Konzentration [203] und einmal eine längere und später angefangenen Gabe mit einer höheren Dosis [204]. Für den Therapieansatz mit niedrig-dosiertem IL-2 wurde das human rekombinante IL-2 Proleukin gewählt, welches eine vergleichbare biologische Aktivität und eine fast identische biochemische Struktur zum nativen humanen IL-2 aufweist ausgewählt [236]. Zusätzlich ist es als Therapeutikum gegen malignen Melanomen und Nierenzellkarzinomen in der Klinik verfügbar bereits verfügbar [103].

In allen drei betrachteten Therapiegruppen konnten, wie in der Positivgruppe, die typischen Merkmale der EBA nachgewiesen werden: eine typische Histopathologie mit Verdickung der Epidermis, Blasenbildung und Einwanderung von Entzündungszellen, sowie die C3 und IgG Ablagerung an der DEJ mittels DIF [208]. Die Ak-EBA wurde also in allen vier Gruppen ausgelöst und die auf IL-2 basierende Therapieansätze zeigten somit keinen positiven Einfluss auf die Effektorphase der EBA. Es war eher das Gegenteil der Fall, da insbesondere in den Mäusen, die die IL-2 Antikörperkomplexe bekamen, eine Verschlechterung des klinischen Phänotyps festgestellt werden konnte. Zusätzlich konnte lediglich in der Gruppe mit Gabe der späten und hohen Dosis eine Erhöhung an Tregs in der Milz festgestellt werden, jedoch auch mit einer gleichzeitigen Erhöhung an CD11b+ Effektorzellen. Gleichzeitig konnte in dieser Gruppe zum Versuchsende ein jeweils signifikant höherer Titer an injizierten spezifischen mCOL7^{C-GST} IgGs und freiem IL-2 detektiert werden. In Bezug auf die anderen zwei Therapiegruppen gab es hingegen für diese Parameter keinen bedeutenden Unterschied zu der Positivgruppe. Das injizierte IgG war in diesen drei Gruppen ebenso gar nicht mehr nachweisbar.

Der Grund warum Proleukin nicht als niedrig-dosierte IL-2 Therapie funktionierte, könnte sein, dass dies eben ein rekombinantes humanes IL-2 ist. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass humanes IL-2 ebenso murine T Zellen stimulieren kann [237], aber eventuell bräuchte es in der Maus andere

Konzentrationen als hier eingesetzt wurden. Da für diese Gruppe in keinem untersuchten Bereich ein signifikanter Unterschied zur Positivgruppe festgestellt wurde, sieht es danach aus, als hätte es keinen Effekt auf die induzierte EBA gehabt.

Webster et al. [238] konnten mit der ebenso hier verwendeten niedrigen Konzentration an IL-2 Antikörperkomplex zeigen, dass präventive Behandlung mit diesem Komplex zu einer Unterdrückung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis im Mausmodell führt, aber Behandlung nach Krankheitsbeginn keinen Schutz vor Erkrankung mehr aufwies. Ebenso konnte in einem Kontakt-Hypersensibilitätsmodell gezeigt werden, dass Gabe des IL-2 Antikörperkomplexes vor Induktion des Modells zur Unterdrückung der Hypersensibilitätsreaktion und zu einer Expansion der Treg-Population mit einer gleichzeitigen Verminderung einer Neutrophilen-Infiltration in entzündete Haut führte [203]. Daher wurde hier ebenso vor Induktion der experimentellen EBA der IL-2 Antikörperkomplex in der gleichen Konzentration für mehrere Tage verabreicht. Auch hier konnte die beschriebene Expansion an Tregs in verschiedenen Organen nach drei Tagen beobachtet werden [238] (Daten nicht gezeigt). Jedoch war dieser Effekt zu Ende des Versuches nicht mehr nachweisbar. Dies würde ebenso im Einklang mit Webster et al. Kinetikstudien stehen, die nachweisen konnten, dass die Expansion der Tregs nach Gabe des IL-2 Antikörperkomplex mit nur drei Injektionen sehr kurzlebig ist: mit einem Höhepunkt am fünften Tag und anschließend einem Abfall der Treg-Anzahl auf ein normales Niveau bis spätestens dem 15. Tag [238]. Da das Ak-EBA-Mausmodell 12 Tage läuft und die Injektion des Komplexes drei Tage vor Induktion angefangen wurde, würde das Versuchende genau auf das Einpendeln der Treg-Anzahl auf das Anfangsniveau fallen. Auch wenn die Tregs am Anfang expandiert waren, konnten sie ebenfalls noch keine Effektorzellen in der Haut supprimieren, da diese zu Beginn der Erkrankung wahrscheinlich noch nicht in ausreichenden Mengen die Haut eingewandert waren.

Diese kurze Zeitspanne der Treg-Expansion und das Nicht-Aufeinandertreffen der Tregs mit den Effektorzellen hätte daher mit der späteren Gabe des IL-2 Antikörperkomplexes umgangen werden können. Es zeigte sich zwar, dass die Tregs hier zumindest in der Milz expandierten, aber mit dieser hohen Konzentration eben auch myeloide CD11b+ Zellen. Dies konnte auch schon Tomala et al. [233] beobachten: sie konnten zeigen, dass die Gabe des IL-2 Antikörperkomplexes zu einem Anstieg an Granulozyten, Eosinophilen und DCs und zu einem gewissen Grad auch von Monozyten und Makrophagen führt. Es ist bekannt, dass allgemeine lymphoide Vorläuferzellen durch Stimulation eines exogen exprimierten IL-2 Rezeptors zu Zellen der myeloiden Linie differenzieren können [239]. Tomala et al. vermuten, dass die allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen und Pro-T-Zellen über ein latentes Programm zur Differenzierung der Granulozyten-/Monozyten-Linie verfügen, das durch Signale des rekonstitutiven IL-2-Rezeptors ausgelöst werden kann. Sie stellen die Hypothese auf, dass ein starkes IL-2-Signal, das von IL-2/JES6 bereitgestellt wird, zu einer ähnlichen Wirkung führen kann. Diese Hypothese setzt jedoch voraus, dass zumindest ein Teil der allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen in einem bestimmten Stadium ihrer Entwicklung einen vollständigen trimeren IL-2R exprimieren [233]. Zumindest kann anhand der hohen IL-2 Konzentration im Plasma nachgewiesen werden, dass das Zytokin da ist und damit in der Lage ist auf die jeweiligen Zielzellen zu wirken.

Ebenso kam es neben dem Anstieg der Treg-Anzahl zu einem Anstieg an T Effektorzellen in der Milz nach Gabe der hohen Konzentration am IL-2 Antikörperkomplex. Interessanterweise stieg bei beiden Zellpopulationen der Anteil um etwa das dreifache und blieben damit mehr oder weniger im gleichen Verhältnis zueinander bestehen. Auch in der Haut schien sich das Verhältnis der Tregs zu T Effektorzellen sich nicht zu verändern. Daher deuten diese Ergebnisse auf einen Funktionsverlust der induzierten Tregs hin. Allgemein gilt nämlich, dass die suppressive Kapazität einer bestimmten Treg-Population nicht allein durch ihre Anzahl bestimmt wird, sondern vielmehr durch das Verhältnis von Tregs zu konventionellen Effektorzellen [240]. Dabei führt ein höheres Verhältnis zu einer Immunsuppression [240] und ein niedrigeres Verhältnis kann eine Autoimmunität bestärken [36,241]. Da hier das Verhältnis gleichblieb, die Autoimmunerkrankung dennoch verstärkt wurde, muss die fehlende Suppression der Tregs einen anderen Hintergrund haben (siehe auch 5.3).

Eine Erhöhung an CD11b+ Zellen bedeutet gleichzeitig auch eine Erhöhung an Zellen, die in der Lage sind den neonatalen Fcγ-Rezeptor (FcRn) zu exprimieren [242]. Eine der wichtigsten Funktionen von FcRn während des gesamten Lebens ist die Regulierung der IgG-Homöostase durch den Schutz von endozytiertem IgG vor lysosomalem Abbau, wobei internalisierte IgG-Moleküle im Blut wieder an die Zelloberfläche zurückgeführt werden. Aufgrund dieses selektiven Recyclings haben IgGs im Vergleich zu anderen Antikörperklassen eine außergewöhnlich lange Serumhalbwertszeit. Bei Mäusen, denen eine der FcRn-Untereinheiten fehlt, konnte nachgewiesen werden, dass die endogenen IgG-Spiegel nachweislich deutlich niedriger und die Halbwertszeiten ähnlich wie bei anderen Ig-Klassen sind [243–246]. Durch die möglicherweise erhöhte Expressionsrate des FcRn könnte somit das in großen Mengen injizierte IgG nach Aufnahme in den Kreislauf im Blut bevorzugt an die Rezeptoren gebunden haben und dadurch länger vor Abbau geschützt worden sein.

Dass die drei verschiedenen Therapieformen auch nicht in der Lage waren die Treg-Anzahl an ihrem Wirkort, der läSIONalen Haut, bis zum Ende des Versuches zu erhöhen, wurde auch anhand der immunhistochemischen Färbungen der Tregs sichtbar. Hier konnte nochmal beobachtet werden, dass in läSIONaler Haut die Treg Anzahl im Vergleich zur nicht-läSIONalen Haut ansteigt, aber kein signifikanter Unterschied zwischen der Positivgruppe und den Therapiegruppen bestand.

Ähnlich war es mit den weiteren untersuchten Immunzellen in läSIONaler Haut: die Therapien hatten keinen Einfluss auf die Einwanderung an Neutrophilen und Makrophagen und auf die Proliferationsrate der Zellen in der Haut allgemein nach Induktion der Ak-EBA. Lediglich für T Zellen allgemein ergab sich ein Effekt: interessanterweise konnten keine CD3+ Zellen mehr nach Gabe einer der auf IL-2 basierenden Therapieformen in der Epidermis nachgewiesen werden. In der Epidermis von Mäusen und auch Menschen finden sich DETZ (auch $\gamma\delta$ T Zellen), die eine entscheidende Rolle für die epidermale Immunantwort und Wundheilung sind [247,248]. Es konnte schon gezeigt werden, dass die Anzahl an DETZ in chronischen Wunden oder auch in bestimmten Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Psoriasis, geringer ist als in gesunden Kontrollen [249,250]. Dies konnte auch hier beobachtet werden. Da jedoch in den Mäusen der Therapiegruppen keine CD3+ T Zellen, und damit auch keine DETZ, mehr nachweisbar waren, scheint es, dass die Gabe von IL-2 die DETZ in ihrem Überleben oder eventuell in ihrer Migration aus der Epidermis beeinflusst. Da, wie oben schon

erwähnt, DETZ wichtig für die Wundheilung sind, könnte dies eine weitere Erklärung für die Verschlechterung des klinischen Bildes innerhalb dieser Gruppen sein. Eine weitere Gruppe an epidermalen T Zellen in der Maus sind die CD8+ TRM-Zellen [222]. Diese Zellen dienen als Alarmsensoren oder zytotoxische Zellen und damit als Abwehr von Pathogenen, welche über die Haut eintreten [251]. Eine weitere besondere Eigenschaft ist ihre besondere Langlebigkeit von Monaten bis Jahre in der Haut [252]. Während einer Infektion oder Entzündung der Haut gelangen CD8+ T Effektorzellen aus dem Blut in die Dermis und können dann in die Epidermis rekrutiert werden. Dieser Prozess hängt von Chemokinrezeptor-Signalen, einschließlich CXCR3, ab [253]. Ob auch andere Chemokinrezeptoren für den Eintritt von CD8+ T Zellen in die Epidermis erforderlich sind, ist unklar, obwohl dies wahrscheinlich ist, da die Bildung von CD8+ TRM-Zellen nur teilweise blockiert wurde, wenn den CD8+ T Effektorzellen die CXCR3-Expression fehlte. Im Gegensatz dazu müssen T Zellen die Expression von CCR7 hochregulieren, um die Haut über die Lymphgefäße verlassen zu können [254]. Ob, und wie, die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 bzw. IL-2 Antikörperkomplexen die Auswanderung von CD8+ TRM-Zellen aus der Epidermis bewirkt haben könnte, kann hier jetzt nicht gesagt werden. Es konnte jedoch schon gezeigt werden, dass sie neben ihren positiven schützenden Eigenschaften vor Infektionen der Haut, sie auch pathogene Merkmale in mehreren autoinflammatorischen Hauterkrankungen aufweisen. Eine dieser Erkrankungen ist Psoriasis, in welcher die CD8+ TRM-Zellen in erhöhter Anzahl in läsionaler Haut gefunden werden konnten [251]. Die Rolle dieser Zellen in EBA ist noch nicht bekannt und ob es sich hier nun um diesen Zelltyp handelt oder um DETZ kann anhand der vorhandenen Daten nicht genau gesagt werden. DETZ gehören zu den ersten T Zellen, die sich in Mäusen sehr früh im Leben bilden und in die Haut einwandern und durch Homöostase aufrechterhalten werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass es in der vorkommenden Anzahl an DETZ und CD8+ TRM-Zellen innerhalb der Epidermis eine inverse Beziehung zu bestehen scheint, der über Monate zu beobachten war: eine Untersuchung von DETZ in Maushaut nach der Beseitigung einer *Herpes simplex virus*-Infektion ergab einen erheblichen und anhaltenden Rückgang der DETZ-Zahlen um die Infektionsstelle und einen entsprechenden Anstieg der Anzahl virusspezifischer gewebebewohnenden T Gedächtniszellen [255]. Da hier in gesunder nicht-läsionaler Haut signifikant mehr CD3+ T Zellen in der Epidermis detektiert werden konnten als in läsionaler Haut des Ak-EBA Mausmodells und CD8+ gewebebewohnenden T Gedächtniszellen zunächst als Reaktion auf die Entzündung in die Haut einwandern müssten [254], ist anzunehmen, dass zumindest in der nicht-läsionalen Haut, vorwiegend DETZ vorliegen. Ob dies jedoch auch noch der Fall in der läsionalen Haut ist, ist jedoch nicht bekannt. Unter einer hohen mikroskopischen Auflösung könnten eventuell, neben der Verwendung von spezifischen Markern, die beiden Zelltypen morphologisch voneinander unterschieden werden: während die CD8+ TRM-Zellen viele amorphe Formen bilden, die durch kurze Dendriten und viele kleine, filopodienähnliche Fortsätze in lateraler Richtung gekennzeichnet sind, bilden DETZ eine relativ konstante Anzahl langer Dendriten in Richtung des *Stratum corneum* [255]. Weitere Untersuchungen, um welchen Zelltyp es sich handelt und welche eventuellen Auswirkungen dieser auf die EBA hat, sind hierfür aber noch nötig.

Insgesamt wurde deutlich, dass eine Treg-Therapie über IL-2, sei es niedrig-dosierte bzw. einen IL-2 Antigen-Antikörperkomplex, in der hier angewendeten Weise keine Option für die Behandlung einer

Ak-EBA war. Durch mögliche Änderungen des Therapieplans, wie längere Gabe der niedrigeren Konzentration des IL-2 Antikörperkomplexes oder einer Anpassung des niedrig-dosiertem IL-2 könnte dies gegebenenfalls noch geändert werden. Ebenfalls wäre es möglich Rapamycin zusätzlich zum IL-2 Antikörperkomplex mit zu verabreichen, welches die Proliferation von T Effektorzellen inhibiert, aber gleichzeitig auch die Expansion an Tregs langanhaltend verstärkt [256].

5.2 Präventiver adoptiver Transfer polyklonaler Tregs hemmt erfolgreich die Effektorphase im Ak-EBA-Mausmodell

Es besteht ein wachsendes Interesse am therapeutischen Potenzial des adoptiven Transfers gesunder Tregs in Patienten mit einer Vielzahl von Erkrankungen, darunter auch Autoimmunerkrankungen, um zu versuchen, das Gleichgewicht in Bereichen mit aktiver Entzündung in Richtung einer toleranteren Mikroumgebung zu verschieben. In den Bereichen GVHD und T1DM wurden bereits klinische Studien in der Frühphase durchgeführt, die vielversprechende Sicherheit und potenziell wirksame Ergebnisse zeigten [257]. So konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel bei Kindern mit T1D ein adoptiver Transfer von polyklonalen, autologen Tregs das Überleben der Pankreasinseln verlängerte. Dabei zeigten einige Patienten Anzeichen einer klinischen Remission und blieben nach einem Jahr ohne jegliche Nebenwirkungen insulinunabhängig [106]. Eine weitere klinische Studie (NCT01210664), bei der polyklonale autologe *ex vivo*-expandierte Tregs bei erwachsenen T1D-Patienten eingesetzt wurden, zeigte, dass die Behandlung sicher und verträglich ist [107]. Auch hier wurde nun ein adoptiver Transfer polyklonaler Tregs als Therapieansatz im Ak-EBA-Mausmodell angewendet.

Da nicht bekannt ist, welche Anzahl an Tregs die beste therapeutische Wirkung entfaltet und dies ebenfalls je nach Erkrankung und Art der Tregs variieren kann [258], wurden hier zunächst drei verschiedene Konzentrationen an Tregs für den präventiven adoptiven Transfer im Ak-EBA-Mausmodell getestet. Alle drei Konzentrationen zeigten im Verlauf des Versuches eine signifikante Reduzierung der mit EBA betroffenen Körperoberfläche der Mäuse. Dies zeigt, dass eine hohe Menge an zugeführten Tregs in der Lage ist, die Ausbildung an Läsionen während der Effektorphase zu unterdrücken. Weitere klinische Parameter der EBA wurden jedoch von den transferierten Tregs nicht beeinflusst, wie die Bindung des Autoantikörpers oder der C3 Ablagerung an der Basalmembran. Ebenso der Titer des injizierten mCOL7^{C-GST} IgGs war zwischen den Gruppen nicht verändert. Dieser war, im Gegensatz zum obigen Therapieversuch mit IL-2, noch detektierbar, da hier im Versuch für eine erfolgreiche Induktion der Ak-EBA das mCOL7^{C-GST} IgG auf Grund der IgG Charge häufiger und bis Tag Acht injiziert werden musste. Somit war dieser wahrscheinlich noch nicht vollständig abgebaut worden. Hinsichtlich der Verdickung der Epidermis und der Infiltration an allgemeinen Entzündungszellen in die Dermis konnte mittels H&E-Färbung nur ein Trend festgestellt werden, da hier in der Gruppe mit einer Million transferierten Tregs es eine hohe Streuung vorlag. Des Weiteren wies der EBA-Score, nur die Ohren betreffend, keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen der Positivgruppe und den Therapiegruppen am Ende des Versuches auf (siehe Anhang Abbildung A1). Der Unterschied zwischen den Gruppen kam daher hauptsächlich über EBA-Läsionen am restlichen Körper zustande. Zusätzlich muss angemerkt werden, dass an den Mäusen am restlichen Körper fast keine betroffenen Hautläsionen mehr vorlagen bzw. diese schon am Verheilen waren (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Tregs hier keine Rolle in der frühen Phase der Effektorphase der Ak-EBA haben, wie bei der Bindung der Autoantikörper und der Komplementaktivierung, jedoch eine Wirkung auf die Infiltration weiterer Entzündungszellen und damit dem Fortschreiten der Erkrankung. Es muss hier auch beachtet werden, dass die Autoantikörper von den Mäusen nicht selbst gebildet werden

mussten, sondern künstlich zugeführt wurden. Da schon gezeigt werden konnte, dass Tregs in der Lage sind B Zellen und deren Antikörperproduktion zu unterdrücken [259], könnte eventuell die Treg vermittelte Suppression der EBA im Ag-EBA-Mausmodell oder auch im Menschen schon bei der Autoantikörperbildung anfangen. Es konnte jedoch auch schon im Ak-EBA-Mausmodell gezeigt werden, dass durch Injektionen von IgG zur Induktion der Ak-EBA ab Tag Zwölf von der Maus gebildete Antikörper gegen das injizierte IgG nachweisbar waren [260]. Um zu testen, ob die adoptiv transferierten Tregs die Antikörperbildung der B Zellen unterdrücken, müsste daher das Serum auf diese Antikörper gegen das injizierte mCOL7^{C-GST} IgG untersucht werden.

Da der Effekt eines adoptiven Treg Transfers dadurch besteht, dass die Anzahl an Tregs im Organismus erhöht wird [105], wurde ebenfalls getestet, ob eine Erhöhung der Treg-Anzahl in lymphatischen Organen und/oder Haut beobachtet werden kann und ob es ersichtlich ist wohin die transferierten Tregs nach Injektion wandern. Mittels Durchflusszytometrie konnte zwar keine Erhöhung des allgemeinen Treg-Anteils in mesenterialen Lymphknoten, Milz und Blut festgestellt werden. Jedoch konnten dank der Markierung der transferierten Tregs mit CFSE, diese vor allem in läSIONALER Haut nachgewiesen werden. Hier machten sie etwa ein Drittel der totalen Tregs aus, was zeigt, dass die Tregs zu dem Ort der Entzündung gewandert sind und damit auch direkt vor Ort in der Lage waren weitere Immunzellen zu supprimieren und der Entzündung entgegenzuwirken. Immunhistochemische Färbungen von Tregs in der Haut zeigten, im Gegensatz zur Durchflusszytometrie, dass die Anzahl an Tregs auch insgesamt in läSIONALER Haut stieg. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Methoden könnte, wie auch oben schon erwähnt, die Ungenauigkeit der durchflusszytometrischen Messung auf Grund der unterschiedlichen entnommenen Stadien der Läsionen zurückzuführen sein. Im Gegensatz zum Therapieversuch mit IL-2 konnte hier also bis zum Ende des Versuches eine stabile Erhöhung der Treg-Anzahl erreicht werden. Interessant wäre es, weitere immunologische Färbungen in der Haut vorzunehmen, um die transferierten Tregs von endogenen Tregs zu unterscheiden. Da die injizierten Tregs alle von Reporter-mäusen kommen, die im FOXP3-Promotor die Sequenz von GFP tragen, exprimieren alle diese Mäuse GFP in Tregs. Ohne Verstärkung des GFPs war dieses auf Grund der Behandlung der Hautschnitte zur allgemeinen Färbung der Tregs am Ende nicht mehr detektierbar. Jedoch könnte eventuell durch zusätzliche anti-GFP Antikörper dies wieder sichtbar gemacht werden. Hiermit könnte auch in weiteren Doppelfärbungen Interaktionen und Positionierung der transferierten Tregs mit weiteren Immunzellen untersucht werden. Ebenso wäre die Betrachtung zu verschiedenen Zeitpunkten interessant, um herauszufinden, wann die transferierten Tregs in die Haut einwandern.

Da nachgewiesen werden konnte, dass ein adoptiver Transfer von einer Millionen Tregs das Krankheitsbild der EBA im Ak-EBA-Mausmodell signifikant verbesserte und gleichzeitig auch eine signifikant erhöhte Anzahl an Tregs in läSIONALER Haut nachgewiesen werden konnte, wurde nun untersucht, in welcher Weise die Tregs ihren positiven Effekt in den betreffenden Mäusen ausübten.

Zunächst wurde allgemein das Blutbild der Mäuse betrachtet. Zur Kontrolle wurden zunächst die Werte der Positivgruppe mit den Werten von acht unbehandelten C57BL/6 Mäusen verglichen. Das Blutbild dieser unbehandelten Mäuse stimmte dabei mit von „The Jackson Laboratory“

bereitgestellten physiologischer Werte erwachsener C57BL/6 Mäuse überein (https://www.jax.org/-/media/jaxweb/files/jax-mice-and-services/physiological_data_000664.pdf; 10.03.2023). Es zeigte sich, dass Ak-EBA induzierte Mäuse, im Vergleich zu gesunden unbehandelten Mäusen, signifikant mehr Thrombozyten und Erythrozyten aufwiesen, aber gleichzeitig signifikant geringere Werte für MCV, MCHC und MCH. Die reduzierten Werte an MCV und MCHC sind dabei typische Anzeichen einer mikrozytären hypochromen Anämie, in welcher die zirkulierenden Erythrozyten Betroffener in der Größe und im Gehalt an Hämoglobin reduziert sind. Die häufigste Ursache für diese Art von Anämie sind verminderte Eisenreserven des Körpers, was mehrere Gründe haben kann. Dies kann auf einen verminderten Eisengehalt in der Ernährung, eine schlechte Aufnahme von Eisen aus dem Darm, akuten und chronischen Blutverlust, einen erhöhten Eisenbedarf in bestimmten Situationen wie Schwangerschaft oder Erholung von einem schweren Trauma oder einer Operation zurückzuführen sein [261]. Die genauen Ursachen sind jedoch nicht bekannt: der Zustand könnte einfach auf Grund des Handling der Mäuse durch Stress ausgelöst worden sein oder er liegt der EBA zu Grunde. Betreffend EBA konnte kein Zusammenhang mit einer Anämie gefunden werden, jedoch konnte für BP Patienten eine signifikante Korrelation mit einer Anämie in einer Studie gezeigt werden. Hier lag aber vor allem eine andere Form der Anämie vor: die normochromische normozytische Anämie [262], welche sich typischerweise durch gleich bleibend große Erythrozyten und deren Hämoglobingehalts, aber einer Reduzierung der Erythrozyten-Anzahl kennzeichnet. Diese Arte der Anämie tritt dabei meist als Begleiterscheinung anderer Erkrankungen auf [263]. Diese Eigenschaften lagen hier in den Mäusen nicht vor. Jedoch sollte beachtet werden, dass es sich zum einen in der Studie um eine andere Erkrankung handelte (BP an Stelle der EBA) und um Menschen und nicht um Mäuse. Interessanterweise konnte in der gleichen Studie aber ebenfalls eine Erhöhung der Thrombozyten in BP-Patienten festgestellt werden (siehe auch unten), welche die Autoren mit einer BP-assoziierte systemische Entzündungsreaktion erklärten [262]. Für detailliertere Hintergründe müssten jedoch noch weitere Versuche mit mehr Tieren durchgeführt werden, um zu klären, ob und welche Anämie genau hier in den Mäusen eventuell vorliegt und worauf diese beruhen würde.

Im Vergleich der Blutwerte der Positivgruppe zu mit adoptiv transferierten Tregs therapierten Mäusen zeigte sich, dass die Gruppe mit transferierten Tregs gegenüber der Positivgruppe eine niedrigere Anzahl an Eosinophile und Thrombozyten im Blut aufwies. Die Thrombozyten Anzahl sank damit wieder auf den Mittelwert gesunder C57BL/6 Mäuse. In EBA-Patienten ist eine Veränderung der Eosinophilen-Anzahl im Blut noch nicht beschrieben, jedoch ist bekannt, dass in der inflammatorischen Form der EBA vermehrt Eosinophile in läsionale Haut einwandern können [167] und in BP-Patienten konnte ein Anstieg der Eosinophile im Blut beobachtet werden [264]. Ähnlich ist die Datenlage betreffend der Thrombozyten: zu EBA-Patienten sind keine öffentlichen Daten vorhanden. In BP-Patienten konnte jedoch eine Erhöhung der Thrombozyten-Aktivierung festgestellt werden, was auf eine Beteiligung der Thrombozyten in der Erkrankung hindeutet [142,264]. Insgesamt konnte schon gezeigt werden, dass die Beziehung zwischen Thrombozyten und Eosinophile symbiotisch ist: so wurde schon in mehreren Krankheitsmodellen und Erkrankungen eine positive Korrelation zwischen der Anzahl und/oder Aktivierung der Thrombozyten und Eosinophile festgestellt werden [265–267]. Gleichzeitig sind Tregs in der Lage Eosinophile in ihrer Aktivität zu inhibieren [268] und eine negative

Korrelation zwischen der Anzahl an Tregs und Eosinophile konnte schon in einem Allergie-Mausmodell beobachtet werden [269]. Diese positive Korrelation zwischen Thrombozyten und Eosinophile und die negative Beziehung zwischen Tregs und Eosinophile konnten hier nun gleichzeitig festgestellt werden. Durch Verminderung der Eosinophilen-Anzahl durch Tregs könnte daher auch indirekt auch die Thrombozyten-Anzahl mitreguliert worden sein. Da Eosinophile in Autoimmunerkrankungen durch Ausschüttung ihrer Mediatoren in der Lage sind Gewebsschäden hervorzurufen oder weitere Immunzellen zu aktivieren [270], bedeutet die Regulation durch Tregs einen Schutz vor weiteren Schäden und damit Läsionen. Das gleiche gilt in Bezug auf Thrombozyten, welche ebenfalls immunregulatorische, insbesondere inflammatorische, Eigenschaften aufweisen können, indem sie das Endothel aktivieren und damit die Entzündung bzw. Einwanderung von weiteren Immunzellen in das entzündete Gewebe fördern [271]. Daher könnte eine hohe Anzahl einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der EBA haben.

Im Blut konnte ebenfalls signifikant weniger freies IL-2 in der Therapiegruppe im Vergleich zu der Positivgruppe gemessen werden. Dies kann auf Grund der höheren Anzahl an Tregs zurückgeführt werden, da dies im Gesamten mehr IL-2 an die höhere Anzahl an CD25 auf Tregs binden und somit die Konzentration an freiem IL-2 sinken lässt. Des Weiteren konnte in CD4+ T Zellen der Therapiegruppe signifikant mehr IL-10 detektiert werden. IL-10 ist ein Zytokin mit umfassenden immunregulierenden Funktionen, so kann es zum Beispiel die Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen und die Aktivierung bestimmter Zytokine hemmen und damit die Effektorfunktionen von T Zellen, Makrophagen und NK-Zellen regulieren [272]. Tregs, aber auch praktisch alle Th Untergruppen sind mit in der Lage IL-10 zu bilden und damit immunregulierende Funktionen auszuüben [273]. Welche Untergruppe der CD4+ T Zellen vermehrt IL-10 gebildet hat, lässt sich hier nicht mit absoluter Sicherheit sagen, da aber eben auch Tregs IL-10 produzieren und Tregs injiziert worden sind und in vermehrter Anzahl vorliegen, liegt es nahe, dass auch in diesem Aspekt die Tregs die Quelle sind.

Insgesamt hatte der adoptive Transfer der Tregs keine Auswirkung auf die Proliferationsrate der Zellen in der läsionalen Haut. Jedoch wird auch hier nicht sichtbar, welche Zellen proliferieren. Die proliferierenden Zellen in der Therapiegruppe könnten auch ebenfalls von „guten“ Zellen kommen, wie den Tregs oder Zellen, die die Wundheilung induzieren und nicht nur von aktiven Entzündungszellen. Um diese Frage zu beantworten, müssten auch wieder Doppelfärbungen durchgeführt werden.

Auch bezüglich der Makrophagen-Population konnte kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl zwischen den Gruppen festgestellt werden. Jedoch schienen in der Therapiegruppe die Makrophagen vermehrt in der unteren Dermis zu verweilen. Während in der Positivgruppe die Makrophagen verstärkt direkt unter der Blase bzw. der Läsion wanderten und sich somit über die ganze Dermis von unten nach oben zogen. Hautresidente Makrophagen sind der häufigste Immunzelltyp in der Dermis. Als Reaktion auf, zum Beispiel, eine lokale Hautverletzung wandern die ansässigen Makrophagen und Monozyten an die betroffene Stelle [274], was eben auch hier in der Positivgruppe beobachtet werden konnte. Angekommen, differenzieren sich die Zellen als Reaktion auf lokal produzierte Zytokine in pro-

inflammatorische Makrophagen (M1 Makrophagen) [275]. Mit dem Fortschreiten der Entzündungsreaktion werden die Makrophagen 24-72 Stunden nach der Verletzung zu der dominierenden professionellen Phagozytenpopulation [276]. Makrophagen weisen dabei mehrere Funktionen auf, darunter antimikrobielle Wirkung, Phagozytose gealterter Neutrophiler und Wundregulation [274]. Die Beteiligung mit an der Effektorphase als proinflammatorische Zellen in der EBA wird auf Grund von *in vitro* und *ex vitro* Versuchen zur ROS-Freisetzung und positiven Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis vermutet [165]. Es konnte schon allgemein *in vitro* gezeigt werden, dass Tregs in der Lage sind speziell auf Monozyten zu wirken und deren Differenzierung, Zytokin Sekretion und Antigenexpression zu verhindern. Nach Co-Kultur mit Tregs zeigten Monozyten klassische M2 Makrophagen-Merkmale, wie eine erhöhte Expression von CD206 und CD163, sowie eine verringerte Fähigkeit, auf proinflammatorische Stimuli zu reagieren, was durch eine verringerte IL-6- und TNF- β -Produktion und NF- κ B-Aktivierung belegt wurde [277]. Welche Makrophagenpopulation hier wirklich vorlagen müsste mittels differenzierter immunologischer Färbungen noch festgestellt werden, die Daten sprechen aber möglicherweise für eine M2 dominierenden Population.

In der Therapiegruppe konnten signifikant mehr CD3⁺ T Zellen in läsionaler Haut als in der Positivgruppe detektiert werden. Dies ist nicht überraschend, da ja auch signifikant mehr Tregs dort vorhanden sind, was durch immunhistologische Färbungen der Tregs auch direkt gezeigt werden konnte. Ob noch eine andere T Zell-Population anstieg, ist so nicht beantwortbar. Überraschend war, dass diesmal zwar die CD3⁺ T Zellen in der Epidermis, also CD8⁺ TRM-Zellen und/oder DETZ [222], in der Therapiegruppe mehr oder weniger bestehen blieb, jedoch in der Positivgruppe nicht mehr vorhanden war. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Positivgruppen der zwei Therapieansätze war die unterschiedliche Gabe an mCOL7^{C-GST} IgG. Ob dies einen Effekt auf DETZ oder CD8⁺ TRM-Zellen haben könnte, ist nicht bekannt. Jedoch ist bekannt, dass CD8⁺ TRM-Zellen für ein Bestehen in der Epidermis die Marker CD69 und CD103 exprimieren müssen. Die Bildung von CD103 wiederherum ist abhängig vom Vorhandensein von TGF- β [253]. Von welcher Zellart das TGF- β dafür kommt, ist noch nicht bekannt [278], aber Tregs wurden, neben vielen anderen Zelltypen, als Quelle von TGF- β beschrieben [279]. CD8⁺ TRM-Zellen, die nicht in der Lage sind, CD103 hoch zu exprimieren, verbleiben auch für eine kürzere Zeit in der Epidermis [278]. Ob, auf Grund dem Vorhandensein von mehr Tregs in läsionaler Haut nach dem adoptiven Transfer, nun vermehrt TGF- β produziert wird und daher eventuell CD8⁺ TRM-Zellen besser in der Epidermis verbleiben könnten, müsste noch untersucht werden. Aber, wie auch schon beim IL-2 Therapieversuch, müsste zunächst untersucht werden, welche T Zellpopulation überhaupt in der Epidermis jeweils vorliegt.

Ebenso konnte in den Mäusen, die die Tregs injiziert bekamen, signifikant weniger Neutrophile beobachtet werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den *in vitro* Co-Kultivierungsversuchen in denen gezeigt werden konnte, dass Tregs in der Lage sind, CD18 auf Neutrophilen herunter zu regulieren und damit deren Migration in das Gewebe zu beeinflussen [164]. Dies ist wahrscheinlich auch einer der Hauptgründe, warum in der Therapiegruppe signifikant weniger Körperoberfläche von EBA-Läsionen betroffen war, da die hauptverantwortlichen Zellen der Effektorphase in geringerer Zahl vorlagen. Die Effektorphase der EBA im Ak-induzierten Mausmodell wurde somit mehr oder weniger nach der

Komplementaktivierung und vor oder während der Neutrophil-Rekrutierung abgestoppt oder zumindest abgebremst (für Auswirkungen der Tregs auf Neutrophile, siehe auch nächstes Kapitel).

Insgesamt konnte durch den adoptiven Treg Transfer erfolgreich die Effektorphase der EBA und damit die Ausbildung des klinischen Phänotyps unterdrückt werden. Neben Neutrophile, und der DETZ- und/oder CD8+ gewebebewohnende T Gedächtniszell-Population, die hochreguliert wurden, hatte der adoptive Treg Transfer ebenso einen Effekt auf die Konzentration an Eosinophile und Thrombozyten im Blut. Diese wurden herunterreguliert und hatten damit möglicherweise ebenfalls einen positiven Einfluss auf das Verhindern des Fortschreitens der EBA. Vor allem die reduzierte Anzahl an Thrombozyten könnte die erhöhte Einwanderung der Neutrophile mit verhindert haben [271]. Es muss jedoch beachtet werden, dass hier lediglich ein präventiver Therapieansatz bisher getestet wurde. Ob der adoptive Treg Transfer auch bei schon bestehender Erkrankung funktionieren würde, müsste noch untersucht werden. Vorzugsweise zunächst ebenfalls am Ak-EBA-Mausmodell und bei positiven Ergebnissen im Ag-EBA-Mausmodell, um eine bessere Vergleichbarkeit zur Erkrankung im Menschen zu bekommen.

Obwohl die Therapie mittels adoptiven Treg Transfers für einige Autoimmunerkrankungen, wie auch hier für die EBA, vielversprechend ist, sollte man nicht vergessen, dass sie auch einige Herausforderungen mit sich bringt: (i) die Isolation von Tregs, (ii) die eventuell notwendige Expansion der Tregs *in vitro*, sowie (iii) die Re-Infusion von einer reinen und stabilen Treg-Population können Probleme bzw. Schwierigkeiten mit sich bringen. So ist, zum Beispiel, frisches Eigenblut die beste Option, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden und unabhängig von der Verfügbarkeit eines Spenders. Patienten mit Autoimmunerkrankungen profitieren jedoch möglicherweise nicht in vollem Umfang von ihren eigenen Tregs, da diese nachweislich in ihrer Funktion eingeschränkt sind und in geringerer Zahl zirkulieren [280]. Aufgrund der geringen Anzahl von Tregs im Blut ist die *in vitro* Expansion der isolierten Tregs der unvermeidliche zweite Schritt. Während der Expansion ist es wichtig, den suppressiven Charakter der Zellen aufrechtzuerhalten und das Auswachsen von Nicht-Tregs zu verhindern. Mit der Expansion sind jedoch einige erhebliche Nachteile verbunden. Währenddessen besteht das Risiko einer Kontamination mit T Effektorzellen oder Mikroorganismen. Zusätzlich wurde über einen Verlust der suppressiven Funktion nach der Treg-Expansion berichtet. Daher wurde ein Konsens erzielt, die *in vitro* Expansionszeit auf maximal 2 Wochen zu begrenzen [280,281]. Zur Optimierung der Treg-Expansion wurde aber festgestellt, dass der mTOR-Kinase-Inhibitor Rapamycin hochsuppressive FoxP3+ Tregs selektiv expandiert [282]. Die Produktion von Entzündungszytokinen wird ebenfalls verhindert [111,283] und die Zellen behalten eine demethylierte TSDR [282]. Wie oben bereits erwähnt, können isolierte Treg-Populationen bei einer autologen Transplantation, insbesondere bei manchen Autoimmunerkrankungen, weniger funktionell sein. Um diese Probleme zu überwinden, wurde in den letzten Jahren an *ex vivo* Manipulationen geforscht, um eine ordnungsgemäße und stabile Funktion der Tregs *in vivo* sicherzustellen [280,284]. Diese Strategien umfassen dabei meist die Stabilisierung der FOXP3 Genexpression mittels genetischen Editierens unter dem Einsatz von retro- und lentiviralen Vektoren [280].

5.3 Tregs erleiden einen Funktionsverlust im Ak-EBA-Mausmodell

Es wurde schon in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen beobachtet, dass Tregs auf Grund einer reduzierten Anzahl oder eines Funktionsverlustes den Verlauf einer Erkrankung negativ beeinflussen können [78–81]. So konnte gezeigt werden, dass Tregs bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen zwar noch vorhanden sind [77,78], es ihnen aber sowohl an Autoantigen-Spezifität als auch an suppressiven Fähigkeiten zu fehlen scheint [78–80]. In MS, zum Beispiel, wurde eine reduzierte Anzahl an Tregs, als auch ein Funktionsverlust festgestellt [78,91]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ebenfalls in T1D Tregs funktionelle Defizite aufweisen. So ist hier zwar die Anzahl an Tregs in Patienten vergleichbar mit der Anzahl an Tregs in Kontrollprobanden, jedoch konnte gezeigt werden, dass isolierte Tregs von an T1D erkrankten Personen eine signifikant geringere Hemmung der T Zellproliferation aufweisen als isolierte Tregs aus gesunden Probanden [92]. In SLE wiederherum gibt es zum Teil widersprüchliche Berichte [82]: Die meisten Studien haben eine verringerte oder normale Häufigkeit von Tregs bei SLE festgestellt [83], obwohl andere Studien auch eine erhöhte Anzahl gezeigt haben [42]. Es scheint jedoch, dass die Zahl der Tregs während aktiver Krankheitsschübe [84,85] und bei aktiven pädiatrischen SLE-Patienten verringert ist, wobei eine umgekehrte Korrelation zwischen Tregs und Krankheitsaktivität sowie Autoantikörperspiegeln besteht [86]. Funktionell ist die Suppressionskapazität von Tregs bei Patienten mit aktivem SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit inaktivem SLE reduziert [87,88]. In Mausmodellen des SLE kann ein Mangel an Tregs zum Verlust der Selbsttoleranz und zur Entwicklung einer Lupus-ähnlichen Erkrankung beitragen [89], während der adoptive Transfer von Tregs das Fortschreiten der Nierenerkrankung verlangsamt und die Sterblichkeit von Mäusen verringern kann. Lupus-anfällige Mäuse haben dabei eine geringere Häufigkeit von Tregs im Vergleich zu nicht-autoimmunen Stämmen [90]. In Bezug auf PDs sind die Daten über Tregs zum Teil jedoch widersprüchlich und vornehmlich deskriptiv [164,194–197]. Um die Rolle der Tregs in der Effektorphase der EBA besser zu verstehen, wurde daher zunächst untersucht, wie sich der Anteil der Tregs in dem hier verwendeten Ak-EBA-Mausmodell allgemein verhält und anschließend Co-Kultivierungsversuche mit T Effektorzellen und Neutrophilen durchgeführt, um die Suppressionsfähigkeit der Tregs aus den EBA-Mausmodellen *in vitro* zu untersuchen.

Um der Frage zunächst bezüglich der Anzahl der Tregs in der Effektorphase der EBA nachzugehen, wurden im Ak-EBA-Mausmodell in den sekundären lymphatischen Organen Milz und mesenterialen Lymphknoten, sowie in Blut und Haut der Anteil der Tregs zunächst mittels Durchflusszytometrie zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung erfasst. Die Induktion der EBA im Ak-induzierten Mausmodell erfolgte mittels wiederholter intra-peritonealer Injektion des spezifischen mCOL7^{C-GST} IgGs. Als Kontrolle diente eine Gruppe von Mäusen, welche die gleiche Menge an NR IgG injiziert bekamen.

Vor Induktion der EBA lag der Anteil an Tregs an CD4⁺ T Zellen in Milz, mesenterialen Lymphknoten und Haut bei jeweils etwa fünf Prozent und im Blut bei einem Prozent. Für die sekundären

lymphatischen Organen und dem Blut waren die Werte damit vergleichbar mit bereits bestehenden Daten aus gesunden Mäusen, wobei der Treg-Anteil im Blut eher im unteren Bereich lag [285,286]. Hingegen liegt laut Literatur der Treg-Anteil an CD4+ T Zellen in der Haut gesunder Mäuse zwischen 20-60 % [133]. Die große Diskrepanz zwischen den hier beobachteten Werten und die in der Literatur beschriebenen, beruhen wahrscheinlich auf die Verwendung eines unterschiedlichen Hautverdaus zur Gewinnung der Einzelpopulationen. So haben wir, zum Beispiel bei uns im Labor, verschiedene Protokolle betreffend des Hautverdaus für Durchflusszytometrie getestet und die Einzelpopulationen auf verschiedenen Marker im Durchflusszytometer gemessen. Alleine der Anteil an lebenden Zellen variierte hier zwischen den Protokollen stark: mit etwa 80 % lebenden Zellen in dem Hautverdauprotokoll, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, bis gerade Mal 30 – 50 % in den anderen Protokollen. Damit unterschieden sich auch die Anteile der unterschiedlich betrachteten Marker zwischen den Protokollen stark (Daten nicht gezeigt). Das hier verwendete Protokoll wurde wegen der hohen Zell-Viabilität ausgewählt. Wie hoch der Anteil der lebenden Zellen nach dem Hautverdaus in der Literatur war, ist nicht ersichtlich [133]. Jedoch ist davon auszugehen, dass alleine durch diesen Effekt auch ein anderer Anteil an Tregs gemessen wurde.

Über die Zeit wiesen die Positivgruppe und die Kontrollgruppe in Blut und sekundären lymphatischen Organen vergleichbare Anteile von Tregs an CD4+ T Zellen auf. Wobei in der Milz der Anteil etwa gleichbleibend zum Anteil vor Injektion der Antikörper war, aber sich in Blut und mesenterialen Lymphknoten zum Ende jeweils etwa verdoppelte hatte. Dieser Anstieg an Tregs in Blut und Lymphknoten in beiden Gruppen könnte dabei durch sogenannte „IgG Tregitopes“ verursacht worden sein. Groot et al. [287] entdeckten hoch konservierte T Zell-Epitope in der schweren Kette (Fc) des IgG und konnten zeigen, dass diese in der Lage sind die Expansion von natürliche Tregs durch spezifische Aktivierung derselben zu induzieren [287,288]. In beiden Gruppen ist IgG injiziert worden, welches sich zwischen den Gruppen nur in der variablen Region des IgGs (Fab) unterscheiden sollte. Daher könnten die Fc-Teile der IgGs eine vergleichbare Wirkung in der Positivgruppe und der Kontrollgruppe auslösen. Zusätzlich darf nicht vergessen werden, dass sich alleine durch die Injektion von artfremden IgG sich eine Immunantwort bildet. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Immunantwort, unter anderem, die T Zellen vor allem in den Lymphknoten proliferieren lässt [260]. Ob diese auch Tregs umfasst, wurde in der Publikation nicht untersucht, jedoch ist es nicht auszuschließen.

Bezüglich der Tregs in der Haut blieb in der Kontrollgruppe der Anteil der Tregs relativ konstant und stieg in der Positivgruppe auf einem zweieinhalb-fachen höheren Wert als zu Beginn. Dieser Trend stimmt mit allgemeinen Beobachtungen über das Verhalten von Tregs in entzündeter Haut überein: wenn keine Entzündung in der Haut vorliegt, sind die meisten Tregs statisch. Aber nach Auslösung einer Entzündung konnte beobachtet werden, dass eine hohe Anzahl an Tregs in hochdynamischen Clustern in der Nähe von Haarfollikeln in die obere Dermis einwandern [289]. Auch hier konnte in immunhistochemischen Färbungen läsionaler Haut vor allem in der oberen Dermis Tregs detektiert werden. Im Vergleich von gesunder Haut zu läsionaler Haut war der Treg-Anteil in den immunhistochemischen Färbungen signifikant, in der Durchflusszytometrie jedoch wurde nur ein Trend festgestellt. Jedoch ergaben sich die Daten für die Durchflusszytometrie aus lediglich drei Proben. Durch Erhöhung der Anzahl ist daher davon auszugehen, dass auch hier ein signifikanter

Unterschied gemessen werden könnte. Ein Grund für die höhere Standardabweichung betreffend der läSIONalen Haut nach Durchflusszytometrie könnte sein, dass für die Messung der Tregs wegen des notwendigen Hautverdaus so viel läSIONale Haut, wie möglich entnommen wurde. Daher wurden auch Hautareale in unterschiedlichen Stadien der Entzündung zusammengeführt. Wendler [209] konnte zeigen, dass zum Beispiel in Haut mit einer beginnenden Entzündung die Treg Anzahl im Vergleich zu nicht-läSIONaler Haut noch nicht verändert ist, diese aber in Laufe der Entzündung steigt und erst wieder bei Heilung langsam abnimmt. Durch diese Mischung der unterschiedlichen Stadien könnte daher der Mittelwert des Treg-Anteils gesenkt worden sein. Hingegen wurde für die immunhistochemische Färbung der Tregs in läSIONaler Haut (wie auch für alle weiteren Immunfärbungen der unterschiedlichen Marker) nur das mittlere Stadium der Entzündung (offene Wunde bzw. Verkrustung derselben) verwendet und mit der nicht-läSIONalen Haut verglichen. Des Weiteren wurde in der Durchflusszytometrie der Anteil der Tregs an CD4+ T Zellen und in der Immunhistochemie die Anzahl an Tregs erfasst. Trotz allem zeigen beide Methoden, dass die Tregs in Laufe der Effektorphase der EBA in die entzündete Haut einwandern. Der erhöhte Anteil an Tregs in läSIONaler Haut in Vergleich zu gesunder Haut und der gleichbleibende Anteil in den weiter untersuchten Organen spricht daher gegen eine Verringerung der Anzahl an Tregs in der EBA. Es muss jedoch beachtet werden, dass hier im Ak-EBA-Mausmodell nur die Effektorphase der EBA nachgebildet wird und nicht die komplette Autoimmunerkrankung mit Verlust der Eigentoleranz gegen Col7 und der Bildung eigener Autoantikörper. Dafür müsste die Treg Anzahl bzw. der Anteil in läSIONaler Haut im Ag-EBA-Mausmodell betrachtet werden. Wenn aber auch in diesem Modell der Treg-Anteil in läSIONaler Haut steigen sollte und sich das auch auf den Menschen übertragen lassen sollte, würde sich die EBA in diesem Aspekt anderen PD ähneln, da zum Beispiel in Psoriasis und atopischer Dermatitis eine Erhöhung der Treg-Anzahl in entzündeter Haut gefunden werden konnte [194]. In Bezug auf Daten in BP-Patienten ist die Aussage schwierig, da in derzeitigen Studien, die die Treg-Anzahl untersuchten, keine Alter-angepasste Kontrollgruppe hatten: hier wurde zwar eine gleichbleibende Anzahl an Tregs in läSIONaler Haut in BP-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden, aber die Patienten waren im Mittel auch etwa 40 Jahre älter als die Kontrollprobanden [195]. Es gibt zwar Daten, die zeigen, dass sich in älteren Menschen die Treg-Anzahl nicht signifikant ändert [290], aber trotz allem sollte für eine besser Aussagekraft die Treg-Anzahl in BP-Patienten zu einer Alters-angepassten Kontrollgruppe verglichen werden.

Es konnte nun ein Anstieg der Tregs in entzündeter Haut im Ak-EBA-Mausmodell im Vergleich zur gesunden Haut beobachtet werden, aber ebenso eine Erhöhung der Anzahl an Effektorzellen, wie zum Beispiel, Neutrophile und allgemein T Zellen. Dies zeigt, dass trotz der erhöhten Anzahl an Tregs, es zu keiner Unterdrückung der Effektorphase im Ak-EBA-Mausmodell kommt. Um daher einen möglichen Funktionsverlust der Tregs in EBA zu untersuchen, wurden Co-Kultivierungsexperimente mit isolierten Tregs aus EBA-induzierten Mäusen bzw. unbehandelten Kontrollmäusen als Kontrollen mit isolierten T Effektorzellen oder Neutrophilen aus ebenfalls unbehandelten Mäusen durchgeführt. Es wurden zu einem Tregs aus dem Ak-EBA-Mausmodell isoliert, um zu testen, ob schon allein die Effektorphase der EBA einen Einfluss auf die Suppressionsfähigkeit der Tregs hat. Des Weiteren wurden ebenfalls Tregs aus dem Ag-EBA-Mausmodell isoliert, welches den gesamten Krankheitsverlauf mit Toleranzverlust

und Bildung eigener Autoantikörper mit anschließender Effektorphase und zum Teil auch Abheilung der Läsionen umfasst [202].

Einer der Zellarten, die Tregs in der Lage in ihrer Proliferation zu hemmen, sind T Effektorzellen [225]. Diese Suppression kann dabei über Zell-Zell-Kontakt [291] oder auch über immunsuppressive Zytokine erfolgen. Um daher die allgemeine Suppressionsfähigkeit von Tregs zu bewerten, gehört es schon zum Standard, die hemmende Wirkung der Tregs auf die Proliferation der T Effektorzellen zu erfassen [225]. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass T Effektorzellen in der EBA ebenfalls eine Rolle spielen könnten: eine direkte Beteiligung an Th Zellen konnte zwar noch nicht nachgewiesen werden [164]. Dennoch scheinen sie eine entscheidende Rolle bei der Antikörperproduktion und Aufrechterhaltung der Autoimmunreaktion in bullösen autoimmunen Dermatosen zu haben [165,192]. Es konnte auch schon gezeigt werden, dass Th17 Zellen häufiger in der Haut von BP Patienten zu finden sind als in gesunden Kontrollpersonen [292]. Und auch in anderen Autoimmunerkrankungen ist die Beteiligung an Th bekannt [293]. Daher deckte das Experiment gleich zwei Aspekte ab: (i) die Testung, ob in der experimentellen EBA die Tregs einen Funktionsverlust bezüglich ihrer Suppressionsfähigkeit erleiden und (ii) ob dadurch eventuell T Effektorzellen stärker proliferieren und expandieren und damit zum Fortschreiten der Erkrankung mitbeitragen könnten.

In den Versuchen erbrachten die Kontrollen und die Co-Kultivierung der stimulierten T Effektorzellen mit isolierten Tregs aus unbehandelten Mäusen in beiden Mauslinien (C57BL/6 für Ak-EBA und B6.S für Ag-EBA) das erwartete Ergebnis: unstimulierte T Effektorzellen zeigten keine bzw. kaum Proliferation über die Zeit, während stimulierte T Effektorzellen innerhalb dieser Zeit stark proliferierten. Wurden nun ebenfalls isolierte aktivierte Tregs aus unbehandelten Mäusen hinzugegeben, wurde die Proliferation der T Effektorzellen signifikant gehemmt. Anders sah es bei Co-Kultivierung mit isolierten Tregs aus Ak-EBA-Mäusen aus: hier zeigten die Tregs überhaupt keine suppressiven Eigenschaften mehr auf die Proliferation der T Effektorzellen auf und waren damit in Hinblick auf ihre Suppressionsfähigkeit gegenüber T Effektorzellen unwirksam. Im Gegensatz dazu wiesen Tregs aus dem Ag-EBA-Mausmodell nur eine etwas schwächere Suppressionsfähigkeit als Tregs aus unbehandelten Mäusen auf. Dies könnte darin liegen, dass im Ag-EBA-Mausmodell eventuell vermehrt Antigen-spezifische Tregs vorliegen, welche insgesamt in ihrer spezifischen Suppressionsfähigkeit wirksamer sind als polyklonale Tregs [294,295]. Diese würden damit den Funktionsverlust der Suppressionsfähigkeit der polyklonalen Tregs, wie es in den isolierten Tregs aus der Ak-EBA der Fall ist, kompensieren. Interessanterweise zeigten Tregs aus B6.S Mäusen, welche nach Immunisierung nicht erkrankten, eine deutlich höhere Hemmung der Proliferationsrate der T Effektorzellen als selbst Tregs aus unbehandelten Mäusen. Warum etwa ein Drittel der Mäuse im Ag-EBA-Mausmodell nicht erkranken, ist noch nicht bekannt. Aber die hohe Suppressionsfähigkeit der Tregs gibt eventuell einen wichtigen Mitgrund dafür, dass kein klinisches Krankheitsbild in diesen speziellen Mäusen ausgebildet wird. Eventuell bilden diese Mäuse auch vermehrt Antigen-spezifische Tregs als an EBA erkrankte Mäuse und weisen damit eine höhere suppressionsfähige Treg-Population auf. Weitere Versuche und vor allem Untersuchungen dieser Mäuse sind hierfür jedoch notwendig.

Nach derzeitigem Wissen gehören Neutrophile zu den Hauptakteuren in der Effektorphase der EBA: nach Bindung an die Fc-Domäne der Immunkomplexe und ihrer Aktivierung führen ihre freigesetzten Mediatoren zu der EBA-typischen entzündlichen Gewebsschäden und der Bildung der Blasen [161,162]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Depletion der Neutrophilen zu einem vollständigen Fehlen einer experimentellen EBA führt [181]. Die Interaktionen von Tregs mit Neutrophilen ist insgesamt noch wenig erforscht [296]. Bieber et al. [164] konnten zeigen, dass das Fehlen von Tregs in DREG-Mäusen sich direkt auf die Anzahl der Neutrophilen in läSIONALER Haut in PD auswirkt und eine direkte Interaktion von Tregs mit Neutrophilen die CD18 Expression auf mit Immunkomplex-stimulierten Neutrophile herunterregulierte. CD18 ist die allgemeine β -2-Untereinheit von vier verschiedenen β 2-Integrinen, darunter Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1 (LFA-1; CD11a/CD18), Makrophagen-1 (Mac-1; CD11b/CD18), Integrin α X β 2 (CD11c/CD18) und Integrin D β 2 (CD11d/CD18) [297]. Unter physiologischen Bedingungen exprimieren zirkulierende Neutrophile LFA-1, Mac-1 und CD11d/CD18 [297,298]. Es wurde schon *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass Immunkomplex-stimulierte Neutrophile CD18 für ihre Adhäsion an Zielstrukturen benötigen. Des Weiteren verhinderte eine Hemmung der neutrophilen Adhäsion Gewebsschäden in experimenteller EBA [227]. Außerdem wiesen CD18-defiziente Mäuse eine verringerte Rekrutierung von Neutrophilen in die entzündete Dermis auf und waren resistent gegenüber der experimentellen EBA [181,299].

Wie erwartet, regulierten hier Immunkomplex-stimulierte Neutrophile in Gegensatz zu unstimulierten Neutrophilen die CD18 Expression auf ihrer Zelloberfläche hoch. Zusätzlich konnten, wie schon beschrieben [164], isolierte Tregs aus unbehandelten Mäusen aus beiden Mauslinien die CD18 Expression auf Neutrophilen herunterregulieren. Im Gegensatz dazu wiesen isolierte Tregs aus Ak-EBA-Mäusen eine deutlich geringere Suppressionsfähigkeit in Bezug auf die CD18 Expression in Neutrophilen auf. Tregs aus Ag-EBA-Mäusen zeigten gar keine Hemmung der CD18 Expression mehr auf. Dies bedeutet, dass in experimenteller EBA, Neutrophile durch die abgeschwächte bzw. nicht vorhandene Hemmung an CD18 durch Tregs vermehrt in die Haut einwandern und an die gebildeten Immunkomplexe binden können. Dies wiederherum führt zu einer verstärkten Gewebsschädigung und einem erhöhten Krankheitsgrad. Tregs aus den nicht-erkrankten immunisierten B6.S Mäusen waren in ihrer Wirkung in diesem Versuch nicht von den Tregs aus erkrankten immunisierten Mäusen zu unterscheiden. Dies lässt die Schlussfolgerung nahe, dass die Mechanismen, wie Tregs T Effektorzellen in ihrer Proliferation und die CD18 Expression auf Neutrophile supprimieren unterschiedlich sind.

Insgesamt konnte anhand der hier durchgeführten Co-Kultivierungsexperimente gezeigt werden, dass Tregs in experimenteller EBA, zumindest *in vitro*, einen Funktionsverlust in Bezug auf ihrer Suppressionsfähigkeit von T Effektorzellen und Neutrophilen erfahren. Dies bestätigt auch die vorhergehenden Ergebnisse, da der Anteil an Tregs in lymphatischen Organen unverändert und in läSIONALER Haut erhöht war, aber ohne Tregs die Erkrankung signifikant verschlimmert werden würde [164]. Ein Funktionsverlust konnte in Bezug auf PD auch schon in PV-Patienten nachgewiesen werden [197]. Warum genau die Tregs in experimenteller EBA oder auch in anderen Autoimmunerkrankungen einen Funktionsverlust erleiden, ist nicht genau bekannt. Eine Idee ist, dass zum Beispiel die

proinflammatorischen Zytokinen IL-6, IL-1 und IL-21 ein Milieu schaffen, das die Treg-Entwicklung und -Funktion einschränkt, indem die Expression von FoxP3 von Tregs gesenkt wird. Zusätzlich soll die Umwandlung von Tregs in Th-ähnliche Zellen begünstigt werden, was das Gleichgewicht zwischen Immunregulation und Entzündung in Richtung Entzündung verschieben könnte [300,301]. So konnte gezeigt werden, dass unter den Autoimmunbedingungen des Diabetes ein erheblicher Prozentsatz der Zellen eine instabile Expression von FoxP3 in entzündeten Geweben aufweist. Diese "exFoxP3" T Zellen sezernierten entzündungsfördernde Zytokine, erwarben einen aktivierten Gedächtnisphänotyp und waren in der Lage, nach adoptivem Transfer einen schnell einsetzenden Diabetes auszulösen [302]. Im Hinblick auf die Umwandlung von Tregs in Th Zellen ist die am besten beschriebene Th-ähnliche Treg-Untergruppe bei Autoimmunität bislang Th1-ähnlichen Tregs. Diese charakterisieren sich mit einer hochregulierten Expression des Transkriptionsfaktors Tbet, der Chemokine CCR5 und CXCR3, einer stabilen FoxP3-Expression, aufgrund einer hochgradig demethylierten TSDR-Region, und einer erhöhten Produktion an IFN- γ . Eine erhöhte Häufigkeit dieser Th1-ähnlichen Tregs wurde in der Peripherie von Mausmodellen und bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel T1D [303,304] und MS [304,305] beobachtet. Nach einer Behandlung mit IFN- β konnte die Zahl der IFN- γ -sezernierenden Th1-ähnlichen Tregs bei Personen mit MS aber auf ein physiologisches Niveau wieder herunterreguliert werden [306,307]. Eine Neutralisierung von IL-12 hingegen führte sogar zu einer Einschränkung ihrer Bildung [303,308]. Die zweite Th-ähnliche Treg-Untergruppe, die sich bei Autoimmunkrankheiten bilden kann, sind Th17-ähnliche Tregs. Insbesondere die Identifizierung einer erhöhten Anzahl von IL-17+FoxP3+ Tregs in der Synovialis von Personen mit aktiver rheumatoider Arthritis legt nahe, dass plastische FoxP3+ Tregs zur Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beitragen [309]. Außerdem wurden IL-17A+FoxP3+CD4+ Zellen in Hautläsionen von Patienten mit schwerer Psoriasis [310] beobachtet. Die Ergebnisse bezüglich der Th17-ähnlichen Treg-Suppressionsfunktion, die aus Patienten mit rheumatoider Arthritis isoliert wurden, sind jedoch recht widersprüchlich, je nachdem, wo die Tregs isoliert wurden. Obwohl hohe Frequenzen von IL-17-produzierenden Tregs im peripheren Blut von Patienten mit rheumatoider Arthritis vorhanden waren, waren diese Zellen in der Lage, die T Zellproliferation in vitro zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu verloren Tregs, die aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis isoliert wurden, ihre unterdrückende Funktion [311]. Ein wichtiger Punkt bleibt daher der Mangel an spezifischen Markern, mit denen sich nicht nur Tregs von T Effektorzellen, sondern auch von den verschiedenen Untergruppen der Tregs besser unterscheiden lassen. Da es verschiedene Arten von Tregs gibt, die ein unterschiedliches Transkriptionsprogramm annehmen, das auf die spezifische Mikroumgebung zugeschnitten ist, braucht es genetische und epigenetische Ansätze, um ein umfassendes Profil der Tregs in jedem Kontext erstellen zu können [307].

5.4 Adoptiver Treg Transfer bewirkt Veränderungen in zellulären Signalwegen unter anderem betreffend der Zellproliferation und Wundheilung in läSIONALER HAUT

Der funktionelle Phänotyp einer jeden zellulären Einheit wird weitgehend durch die ihr zugrunde liegende Genexpression bestimmt. RNA ist für die biologischen Prozesse in den Zellen und die Zell-Zell-Kommunikation von wesentlicher Bedeutung und liefert wichtige Informationen, die direkt mit dem Phänotyp der Zelle zusammenhängen. Folglich stellt das Transkriptom ein Abbild der aktuellen biologischen Pfade und Prozesse im untersuchten Material dar. Sequenzierungstechnologien haben sich als leistungsstarke Instrumente zur Untersuchung genomischer Merkmale erwiesen und wichtige Erkenntnisse in verschiedenen Forschungs- und klinischen Bereichen geliefert [312,313]. Um Einblicke in den Mechanismus zu erhalten, wie der adoptive Treg Transfer die klinische Ausbildung der EBA hemmt, wurden aus läSIONALER HAUT der Positivgruppe und der 10^6 Treg Transfer-Gruppe, sowie aus nicht-läSIONALER HAUT unbehandelter C57BL/6 Mäuse totale RNA isoliert und sequenziert.

Es zeigte sich, dass die Expression von 429 Genen in läSIONALER HAUT der 10^6 Treg Transfer-Gruppe in Vergleich zur Genexpression in läSIONALER HAUT der Positivgruppe unterschiedlich war. Vor allem Gene innerhalb zellulärer Signalwege betreffend der Mitose-(M) Phase des Zellzyklus, des Proteintransports vom und zum Golgi, sowie der MAPK-Familie Signalkaskaden waren herunterreguliert. So spielen zum Beispiel MAPK-Familie Signalkaskaden eine wichtige Rolle in komplexen zellulären Prozessen, wie der Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Transformation und Apoptose von Zellen [314]. Ebenso zeigt die Hochregulierung der Gene der M Phase eine erhöhte Zellteilungsaktivität an und der erhöhte intra-zelluläre Proteintransport die Bereitstellung der, für eine Proliferation notwendige, zellulären Baustoffe [315]. Dies weist insgesamt auf eine erhöhte Proliferation in läSIONALER HAUT der Positivgruppe hin, als in läSIONALER HAUT von Mäusen, welche Tregs adoptiv transferiert bekamen. Hingegen zeigte sich eine Hochregulierung von Genen innerhalb der zellulären Signalwege der Degradation der extra-zellulären Matrix, wie auch der TP53 Regulation. Die extra-zelluläre Matrix ist eine hochdynamische Struktur, die ständig einem Umbauprozess unterliegt, bei dem Komponenten abgelagert, abgebaut oder anderweitig verändert werden. Die Dynamik der extra-zellulären Matrix ist für die Umstrukturierung der Gewebestruktur unverzichtbar. Dabei ist der Umbau ein wichtiger Mechanismus für Prozesse, wie zum Beispiel der Wundheilung [316]. TP53 wiederherum codiert für den Tumorsuppressor p53, welcher eine bedeutende Rolle in zahlreichen zellulären Antworten besitzt. So mitreguliert p53 den Zellzyklus-Stopp, die Apoptose, Seneszenz und den Stoffwechsel. Neben diesen bekannten Funktionen von p53 gibt es immer mehr Belege dafür, dass p53 auch angeborene und adaptive Immunreaktionen reguliert. So ist p53 in der Lage das angeborene Immunsystem durch sezernierende Faktoren zu beeinflussen, die zum Beispiel die Makrophagenfunktion modulieren können, um eine pro-inflammatorischen Reaktion zu unterdrücken [317]. Dies zeigt, dass in läSIONALER HAUT von Mäusen, welche mittels adoptiven Treg Transfer therapiert worden sind, verstärkt Wundheilung stattfand und daher auch insgesamt weniger Läsionen am Endtag des Versuches zu finden waren als in nicht-therapierten Mäusen. Zusätzlich waren zelluläre Signalwege verstärkt, welche Entzündungsprozesse mit modulieren und unterdrücken können.

5.4 Adoptiver Treg Transfer bewirkt Veränderungen in zellulären Signalwegen unter anderem betreffend der Zellproliferation und Wundheilung in läSIONALER HAUT

Neben der unterschiedlichen Regulation dieser zahlreichen Gene für die oben genannten Signalwege konnte speziell auch die Hochregulierung von *Ccr4* und die Herunterregulierung von *Cxcl12* festgestellt werden. CCR4 wird von zahlreichen Immunzellen, insbesondere unterschiedlichen T Zellpopulationen exprimiert [318]. Jedoch vor allem in die Haut einwandernde Tregs sind durch die Expression des CCR4 definiert und auf dessen Expression angewiesen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass ohne CCR4 Tregs deutlich schlechter in der Lage sind sich in der Haut anzureichern [319,320]. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der erhöhten Anzahl an Tregs in läSIONALER HAUT nach adoptiven Transfer: da die Tregs für das Einwandern in die Haut CCR4 exprimieren müssen, sind die in der Haut sich befindenden Tregs wahrscheinlich alle zum großen Teil CCR4+. Dies könnte ebenfalls in vertiefenden Experimenten weiterverfolgt werden.

CXCL12 ist ein wichtiges Chemokin, welches eine entscheidende Rolle in vielen homöostatischen Prozessen wie Neurogenese, Embryogenese, Angiogenese, Lymphopoese sowie Entzündungsprozessen spielt. Der Rezeptor für dieses Chemokin ist zu einem CXCR4. Die Bedeutung dieses Rezeptors und damit auch CXCL12 wird durch die Entdeckung einer ständig wachsenden Zahl von Zelltypen unterstrichen, die ihn auf ihrer Oberflächenmembran exprimieren. Darunter sind die meisten Leukozyten-Untergruppen, hämatopoetische Vorläufer- und Stammzellen, die im Blutkreislauf zu finden sind, sowie Zellen der lymphatischen Organe wie Knochenmark, Thymus und Lymphknoten [321]. Für diese Arbeit interessant: auch Neutrophile exprimieren CXCR4 und reagieren damit auf CXCL12 [322]. So ist eine Bindung von CXCL12 an CXCR4 ein wichtiges Zurückhaltesignal für die Freisetzung von Neutrophilen in den Blutkreislauf aus hämatopoetischen Geweben. Aber ebenso verhindert dieses Signal auch die Auswanderung von Neutrophilen aus entzündeten Gewebe [323].

Im Einklang mit der geringeren Expression an *Cxcl12*, der Expression von CXCR4 auf Neutrophilen und dem geringeren Vorkommen dieser Zellen in läSIONALER HAUT mit transferierten Tregs behandelten Mäuse, konnte in diesen Mäusen eine Herunterregulierung der MAPK-Familie Signalkaskaden festgestellt werden. So konnte schon gezeigt werden, dass eine Aktivierung über CXCR4 in eine Signaltransduktion über, wenn nicht auch ausschließlich, p38 MAPK führt und dieser Signaltransduktionsweg die Migration der Neutrophile mit beeinflusst [324,325]. Eine Blockierung des p38 MAPK Signalweges verhindert sogar Chemotaxis von Neutrophile [326]. Zwar haben MAPK-Signaltransduktionswege auch eine Bedeutung in Tregs, wie die Generierung von peripheren Tregs in Geweben, jedoch scheinen sie keine Rolle in der Suppressionsfähigkeit der Tregs zu spielen [327]. Da in diesem Fall durch den Transfer auch nicht unbedingt neue periphere Tregs in der Haut gebildet werden mussten, könnte die geringere MAPK-Signaltransduktion auch davon mitbeeinflusst worden sein.

Zusammengefasst heißt das, dass durch den adoptiven Transfer der Tregs nicht nur vermehrt Wundheilung und eine verstärkte Unterdrückung entzündlicher Prozesse stattfand, sondern auch insgesamt weniger Neutrophile, dank der Herunterregulierung von CD18 durch die Tregs und dem geringeren Vorhandensein an Thrombozyten, in die Haut einwanderten. Zusätzlich konnten die eingewanderten Neutrophile auch leichter auf Grund der geringeren Konzentration an CXCL12 wieder aus der Haut auswandern. Ob die geringere Expression an CXCL12 ein direkter oder indirekter Effekt

5.4 Adoptiver Treg Transfer bewirkt Veränderungen in zellulären Signalwegen unter anderem betreffend der Zellproliferation und Wundheilung in läsionaler Haut

des adoptiven Transfers war, müsste jedoch noch untersucht werden. So könnten zum Beispiel Tregs CXCL12-exprimierenden Zellen supprimiert haben oder der geringere Entzündungsgrad dank der Tregs könnte zur Folge haben, dass weniger CXCL12 der entsprechenden Zellen exprimiert wurden.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Insgesamt konnte in dieser Arbeit die Rolle der Tregs in der Effektorphase der EBA genauer untersucht werden. Zunächst scheint die Regulation der Tregs in dieser Autoimmunerkrankung nicht auf Grund einer geringeren Zellzahl verloren zu gehen, sondern über einen Funktionsverlust der Suppressionsfähigkeit von Effektorzellen. So konnte gezeigt werden, dass isolierte Tregs aus EBA-induzierten Mäusen *in vitro* T Effektorzellen in ihrer Proliferationsrate signifikant geringer hemmen und die CD18 Expression auf Neutrophilen ebenso signifikant weniger herunterreguliert wird. Interessanterweise besaßen Tregs aus Ag-EBA-Mäusen, welche keinen klinischen Phänotyp ausbildeten, einen signifikant höheren Suppressionseffekt auf T Effektorzellen. Dies deutet auf eine weitere wichtige allgemeine Funktion der Tregs auf eine Ausbildung der EBA hin. Weitere Experimente dieser Mäuse betreffend sind noch notwendig, aber möglicherweise spiegelt sich diese erhöhte Suppressionsfähigkeit der Tregs auch genomisch wider und lässt in Zukunft schon im Vorhinein bestimmen, ob sich eine experimentelle EBA induzieren lässt oder nicht. Ebenso besteht die Frage, ob diese Mäuse auf Grund ihrer Tregs auch vor weiteren Autoimmunerkrankungen geschützt sind. Zusätzlich muss anschließend im Menschen getestet werden, ob sich die gewonnenen Erkenntnisse aus der Maus übertragen lassen.

Des Weiteren wurden zwei Therapieansätze mit Tregs im Ak-EBA-Mausmodell als mögliche Behandlungsoptionen der Effektorphase der EBA getestet: eine auf IL-2 basierende Expansion der endogenen Tregs mittels niedrig-dosiertem IL-2 oder einem IL-2 Antigen-/Antikörperkomplexes bzw. ein präventiver adoptiver Transfer von Tregs. Die auf IL-2 basierende Therapie konnte den klinischen Phänotyp der EBA nicht verbessern, da anscheinend kein optimales Behandlungsschema gefunden werden konnte. Eine niedrige Konzentration des IL-2 Antikörperkomplexes konnte keine stabile Expansion der Treg-Population bewirken und eine höhere Gabe des Komplexes bewirkte neben der Expansion der Tregs ebenfalls eine Erhöhung von weiteren Effektorzellen. Dies hatte zur Folge, dass das Verhältnis von Tregs zu Effektorzellen weiterhin ungünstig für die Tregs stand und sich die EBA letztendlich verschlimmerte. Durch mögliche Änderungen des Therapieplans, wie längere Gabe der niedrigeren Konzentration des IL-2 Antikörperkomplexes oder einer Anpassung des niedrig-dosiertem IL-2 könnte dies gegebenenfalls noch geändert werden. Ebenfalls wäre es möglich Rapamycin zusätzlich zum IL-2 Antikörperkomplex mit zu verabreichen, welches bewiesenermaßen die Proliferation von T Effektorzellen inhibiert, aber gleichzeitig auch die Expansion an Tregs langanhaltend verstärkt [256].

Der adoptive Treg Transfer hingegen zeigte eine erfolgreiche Unterdrückung des klinischen Phänotyps. Weitere Versuche ergaben, dass zwar die Autoantikörperbindung und Komplementaktivierung nicht beeinträchtigt wurde, die injizierten Tregs jedoch bevorzugt in die Haut einwanderten und dort wirkten. Zusätzlich konnte im Blut die Anzahl an Eosinophilen und Thrombozyten signifikant reduziert werden. Den größten Effekt zeigte sich jedoch auf die Neutrophile, den Haupteffektorzellen der Ak-EBA: behandelte Mäuse wiesen signifikant weniger Neutrophile in läsionaler Haut auf als eine positive

Kontrollgruppe, was im Einklang mit den Erhobenen *in vitro* Daten steht. Ebenso konnte mittels RNA-Sequenzierung ein signifikanter Rückgang der CXCL12 Expression in der Haut nachgewiesen werden, ein Chemokin das mitverantwortlich für den Rückhalt der Neutrophile im entzündeten Gewebe ist [323]. Zusätzlich wurden ebenfalls MAPK-Signaltransduktionswege, welche auch die Chemotaxis der Neutrophilen positiv regulieren [324,325], in dieser Gruppe in läsionaler Haut herunterreguliert, sowie zelluläre Signalwege, die eine Proliferation der Zelle bewirken. Hingegen wurden Signalwege betreffend der Reparatur der extra-zellulären Matrix hochreguliert, wie auch die Regulation von TP53, welches in der Lage ist, pro-inflammatorische Reaktionen durch Modulation des angeborenen Immunsystems zu unterdrücken [317]. Die Effektorphase der Ak-EBA wurde also möglicherweise durch die Störung der Migration der Neutrophilen und der Hemmung der Proliferation der T Effektorzellen in die Haut dank des adoptiven Treg Transfers erfolgreich inhibiert. Zusätzlich wurde die Wundheilung gefördert und die Bildung eines pro-inflammatorisches Milieus gehemmt. Ob diese Therapieoption jedoch auch bei einer schon ausgeprägten EBA funktionieren würde, ist noch offen. Auch wäre diese Behandlungsmethode wahrscheinlich deutlich schwieriger in Patienten zu etablieren als eine auf niedrig-dosierten IL-2 bzw. IL-2 Antikörperkomplexen beruhende Treg-Therapie. Das größte Problem würde wahrscheinlich sein, dass zum einen ja autologe Tregs transferiert werden müssten, welche jedoch auf Grund ihres zuvor gegangenen Funktionsverlusts zunächst selbst „therapiert“ werden müssten. Dies wurde jedoch auch schon erfolgreich gelöst indem zum Beispiel isolierte Tregs zunächst in einer Kombination aus Rapamycin und IL-2 *ex vivo* expandiert worden sind und anschließend durch gleichzeitige subkutane Gabe an IL-2 i.v. adoptiv transferiert worden sind [258]. Insgesamt stellt der adoptive Treg Transfer eine interessante Option zur Behandlung der EBA und weiterer Autoimmunerkrankungen dar.

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei PD Dr. Katja Bieber und Prof. Dr. Ralf Ludwig für die Ermöglichung der Bearbeitung dieses Projektes und deren kontinuierlichen Unterstützung und Motivation während meiner Doktorarbeit bedanken. Mein Dank geht besonders an Katja Bieber für die fantastische Betreuung, Unterstützung bei der Planung und Auswertung von Versuchen und ihre immerwährende Bereitschaft mich an besonders langen Versuchstagen auch experimentell zu unterstützen.

Ebenso möchte ich der ehemaligen Klinischen Forschungsgruppe CRU303 für die Finanzierung des Projekts danken und dem ehemaligen Graduiertenkolleg 1727 für meine Assoziation und damit die Ermöglichung eines regen Austausches mit weiteren PhD-Studenten. Im diesen Rahmen möchte ich mich auch bei PD Dr. Kathrin Kalies für ihre Rolle als Mentorin bedanken.

Prof. Dr. Gabriela Riemekasten aus der Klinik der Rheumatologie und klinischen Immunologie möchte ich für die Ermöglichung der Messung der Blutproben zur Erstellung des differentiellen Blubildes danken. Ebenso ihrer ehemaligen PhD Studentin Laurence Johannson für die Einarbeitung in das scil vet ABC-Plus.

Mein Dank geht ebenso an Dr. Artem Vorobyev für die Unterstützung und Auswertung der Daten der RNA-Sequenzierung ohne dessen und Katja Bieber's Hilfe, diese so nicht vorliegen würden. Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Diana Scheppan und Dr. Sören Dräger für ihre Hilfe bei den Mausversuchen, so dass diese verblindet stattfinden konnten. Dann auch Danke an alle TAs der AG Ludwig: Alexandra Wobig, Astrid Fischer, Daniela Rieck und Claudia Kauderer, für deren großartigen technischen Unterstützung, sowie an Sadegh Mousavi für die Bereitstellung der Blutwerte unbehandelter Mäuse.

Ein ganz großer Dank geht an meine Masterstudenten-Mädels: Diana Wortmann, Sophia Johannisson, Priscilla Mordey und Laura Wendler, die immer bereit waren bei großen Versuchen bei der Probenvorbereitung zu helfen.

Im Ganzen möchte ich mich bei der gesamten AG Ludwig für die tolle Zeit und das großartige Arbeitsklima bedanken durch die auch die schwierigsten Zeiten gut und gefühlt schnell umgingen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich immer emotional unterstützt haben und immer ein offenes Ohr während meiner ganzen Doktorarbeit hatten.

Literaturverzeichnis

- [1] J.S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, H.L. Kim, An introduction to immunology and immunopathology, *Allergy Asthma Clin Immunol.* 14 (2018) 49.
- [2] K. Murphy, C. Weaver, *Janeway Immunologie*, 9th ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018.
- [3] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Control of adaptive immunity by the innate immune system, *Nat Immunol.* 16 (2015) 343–353.
- [4] P.W. Dempsey, S.A. Vaidya, G. Cheng, The Art of War: Innate and adaptive immune responses, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 2604–2621.
- [5] M. Romo, D. Pérez-Martínez, C. Castillo Ferrer, Innate immunity in vertebrates: an overview, *Immunology.* 148 (2016) 125–139.
- [6] K.D. Stone, C. Prussin, D.D. Metcalfe, IgE, mast cells, basophils, and eosinophils, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125 (2010) S73–S80.
- [7] S.E. Turvey, D.H. Broide, Innate immunity, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125 (2010) S24–S32.
- [8] F.A. Bonilla, H.C. Oettgen, Adaptive immunity, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125 (2010) S33–S40.
- [9] D.D. Chaplin, Overview of the immune response, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125 (2010) S3–S23.
- [10] P. Kidd, Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease, *Alternative Medicine Review.* 8 (2003) 223–246.
- [11] S. Crotty, Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}), *Annu. Rev. Immunol.* 29 (2011) 621–663.
- [12] F. Sallusto, A. Lanzavecchia, Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: Functional modules for tailored immunity: Highlights, *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 2076–2082.
- [13] A.N. Theofilopoulos, D.H. Kono, R. Baccala, The multiple pathways to autoimmunity, *Nat Immunol.* 18 (2017) 716–724.
- [14] K. Bieber, J.E. Hundt, X. Yu, M. Ehlers, F. Petersen, C.M. Karsten, J. Köhl, K. Kridin, K. Kalies, A. Kasprick, S. Goletz, J.Y. Humrich, R.A. Manz, A. Kunstner, C.M. Hammers, R. Akbarzadeh, H. Busch, C.D. Sadik, T. Lange, H. Grasshoff, A.M. Hackel, J. Erdmann, I. König, W. Raasch, M. Becker, A. Kerstein-Stähle, P. Lamprecht, G. Riemekasten, E. Schmidt, R.J. Ludwig, Autoimmune pre-disease, *Autoimmunity Reviews.* 22 (2023) 103236.
- [15] M.D. Rosenblum, K.A. Remedios, A.K. Abbas, Mechanisms of human autoimmunity, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 2228–2233.
- [16] J. Aaltonen, P. Björnes, J. Perheentupa, N. Horelli-Kuitunen, A. Palotie, L. Peltonen, Y.S. Lee, F. Francis, S. Henning, C. Thiel, H. Leharach, M. Yaspo, An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains, *Nat Genet.* 17 (1997) 399–403.
- [17] C.L. Bennett, J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, H.D. Ochs, The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3, *Nat Genet.* 27 (2001) 20–21.
- [18] K.H.G. Mills, TLR-dependent T cell activation in autoimmunity, *Nat Rev Immunol.* 11 (2011) 807–822.
- [19] B. Serafini, B. Rosicarelli, D. Franciotta, R. Magliozzi, R. Reynolds, P. Cinque, L. Andreoni, P. Trivedi, M. Salvetti, A. Faggioni, F. Aloisi, Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain, *Journal of Experimental Medicine.* 204 (2007) 2899–2912.
- [20] J. Ochoa-Repáraz, D.W. Mielcarz, L.E. Ditrio, A.R. Burroughs, S. Begum-Haque, S. Dasgupta, D.L. Kasper, L.H. Kasper, Central Nervous System Demyelinating Disease Protection by the Human Commensal *Bacteroides fragilis* Depends on Polysaccharide A Expression, *The Journal of Immunology.* 185 (2010) 4101–4108.

- [21] Y. Belkaid, T.W. Hand, Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation, *Cell*. 157 (2014) 121–141.
- [22] A. Kuhn, J. Wenzel, H. Weyd, Photosensitivity, Apoptosis, and Cytokines in the Pathogenesis of Lupus Erythematosus: a Critical Review, *Clinic Rev Allerg Immunol*. 47 (2014) 148–162.
- [23] C. Tsigalou, N. Vallianou, M. Dalamaga, Autoantibody Production in Obesity: Is There Evidence for a Link Between Obesity and Autoimmunity?, *Curr Obes Rep*. 9 (2020) 245–254.
- [24] S. Yurasov, H. Wardemann, J. Hammersen, M. Tsuiji, E. Meffre, V. Pascual, M.C. Nussenzweig, Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus, *Journal of Experimental Medicine*. 201 (2005) 703–711.
- [25] J.A. Bluestone, Q. Tang, C.E. Sedwick, T Regulatory Cells in Autoimmune Diabetes: Past Challenges, Future Prospects, *J Clin Immunol*. 28 (2008) 677–684.
- [26] L. Steinman, J.T. Merrill, I.B. McInnes, M. Peakman, Optimization of current and future therapy for autoimmune diseases, *Nat Med*. 18 (2012) 59–65.
- [27] B. Arellano, D.J. Graber, C.L. Sentman, Regulatory T Cell-based Therapies for Autoimmunity, *Discov. Med*. 22 (2017) 73–80.
- [28] H. von Boehmer, C. Daniel, Therapeutic opportunities for manipulating TReg cells in autoimmunity and cancer, *Nat Rev Drug Discov*. 12 (2013) 51–63.
- [29] J. Shimizu, S. Yamazaki, S. Sakaguchi, Induction of Tumor Immunity by Removing CD25+CD4+ T Cells: A Common Basis Between Tumor Immunity and Autoimmunity, *The Journal of Immunology*. 163 (1999) 5211–5218.
- [30] Y. Belkaid, B.T. Rouse, Natural regulatory T cells in infectious disease, *Nat Immunol*. 6 (2005) 353–360.
- [31] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25), *The Journal of Immunology*. 155 (1995) 1151–1164.
- [32] M. Asano, M. Toda, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation., *Journal of Experimental Medicine*. 184 (1996) 387–396.
- [33] R.K. Gershon, K. Kondo, Cell Interactions in the Induction of Tolerance: The Role of Thymic Lymphocytes, *Immunology*. 18 (1970) 723–738.
- [34] T.A. Chatila, F. Blaeser, N. Ho, H.M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, A.M. Bowcock, JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome, *J. Clin. Invest*. 106 (2000) R75–R81.
- [35] M.E. Brunkow, E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paepfer, L.B. Clark, S.-A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, F. Ramsdell, Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse, *Nat Genet*. 27 (2001) 68–73.
- [36] J.D. Fontenot, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat Immunol*. 4 (2003) 330–336.
- [37] S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor *Foxp3*, *Science*. 299 (2003) 1057–1061.
- [38] S.F. Ziegler, FOXP3: Of Mice and Men, *Annu. Rev. Immunol*. 24 (2006) 209–226.
- [39] K.H.G. Mills, Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?, *Nat Rev Immunol*. 4 (2004) 841–855.
- [40] M. Grazia Roncarolo, S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, M.K. Levings, Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans, *Immunological Reviews*. 212 (2006) 28–50.
- [41] A.M.C. Faria, H.L. Weiner, Oral tolerance, *Immunol Rev*. 206 (2005) 232–259.
- [42] E.V. Lourenço, A. La Cava, Natural regulatory T cells in autoimmunity, *Autoimmunity*. 44 (2011) 33–42.
- [43] W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, S.M. Wahl, Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3, *Journal of Experimental Medicine*. 198 (2003) 1875–1886.

- [44] S.G. Zheng, J.H. Wang, J.D. Gray, H. Soucier, D.A. Horwitz, Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25- Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10, *The Journal of Immunology*. 172 (2004) 5213–5221.
- [45] C. Baecher-Allan, J.A. Brown, G.J. Freeman, D.A. Hafler, CD4+CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood, *The Journal of Immunology*. 167 (2001) 1245–1253.
- [46] J.A. Bluestone, A.K. Abbas, Natural versus adaptive regulatory T cells, *Nature Reviews Immunology*. 3 (2003) 253–258.
- [47] S.E. Allan, S.Q. Crome, N.K. Crellin, L. Passerini, T.S. Steiner, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo, M.K. Levings, Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production, *International Immunology*. 19 (2007) 345–354.
- [48] M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov, S. Sakaguchi, Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor, *Immunity*. 30 (2009) 899–911.
- [49] N. Ohkura, Y. Kitagawa, S. Sakaguchi, Development and Maintenance of Regulatory T cells, *Immunity*. 38 (2013) 414–423.
- [50] S. Floess, J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.-D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, J. Huehn, Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells, *PLoS Biol*. 5 (2007) e38.
- [51] N. Ohkura, M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H.J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai, S. Sakaguchi, T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development, *Immunity*. 37 (2012) 785–799.
- [52] C. Schmidl, M. Klug, T.J. Boeld, R. Andreesen, P. Hoffmann, M. Edinger, M. Rehli, Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity, *Genome Res*. 19 (2009) 1165–1174.
- [53] G. Wei, L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T.-Y. Roh, W.T. Watford, D.E. Schones, W. Peng, H. Sun, W.E. Paul, J.J. O’Shea, K. Zhao, Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4+ T Cells, *Immunity*. 30 (2009) 155–167.
- [54] A.L. Cava, Natural Tregs and autoimmunity, *Front Biosci*. Volume (2009) 333.
- [55] W. Liu, A.L. Putnam, Z. Xu-yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B.F. de St. Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, J.A. Bluestone, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells, *Journal of Experimental Medicine*. 203 (2006) 1701–1711.
- [56] K. Wing, S. Sakaguchi, Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity, *Nat Immunol*. 11 (2010) 7–13.
- [57] I. Apostolou, A. Sarukhan, L. Klein, H. von Boehmer, Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen, *Nat Immunol*. 3 (2002) 756–763.
- [58] S.J. Bensinger, A. Bandeira, M.S. Jordan, A.J. Caton, T.M. Laufer, Major Histocompatibility Complex Class II-positive Cortical Epithelium Mediates the Selection of CD4 α 25 α Immunoregulatory T Cells, *J. Exp. Med*. 194 (2001) 427–438.
- [59] D. Olivares-Villagómez, Y. Wang, J.J. Lafaille, Regulatory CD4 α T Cells Expressing Endogenous T Cell Receptor Chains Protect Myelin Basic Protein-specific Transgenic Mice from Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis, *J. Exp. Med*. 188 (1998) 1883–1894.
- [60] S.G. Zheng, The Critical Role of TGF- β 1 in the Development of Induced Foxp3+ Regulatory T Cells, *Int J Clin Exp Med*. 1 (2008) 192–202.
- [61] B. Salomon, D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, J.A. Bluestone, B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes, *Immunity*. 12 (2000) 431–440.
- [62] X. Tai, M. Cowan, L. Feigenbaum, A. Singer, CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nat Immunol*. 6 (2005) 152–162.

- [63] A. Sharma, D. Rudra, Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis, *Front. Immunol.* 9 (2018) 883.
- [64] M. Feuerer, L. Herrero, D. Cipolletta, A. Naaz, J. Wong, A. Nayer, J. Lee, A.B. Goldfine, C. Benoist, S. Shoelson, D. Mathis, Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters, *Nat Med.* 15 (2009) 930–939.
- [65] D. Burzyn, W. Kuswanto, D. Kolodin, J.L. Shadrach, M. Cerletti, Y. Jang, E. Sefik, T.G. Tan, A.J. Wagers, C. Benoist, D. Mathis, A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair, *Cell.* 155 (2013) 1282–1295.
- [66] S.N. Mueller, L.K. Mackay, Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence, *Nat Rev Immunol.* 16 (2016) 79–89.
- [67] A. Laurence, C.M. Tato, T.S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R.B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E.M. Shevach, J.J. O’Shea, Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation, *Immunity.* 26 (2007) 371–381.
- [68] T.R. Malek, A.L. Bayer, Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2, *Nat Rev Immunol.* 4 (2004) 665–674.
- [69] A.A. Caudy, S.T. Reddy, T. Chatila, J.P. Atkinson, J.W. Verbsky, CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked–like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 119 (2007) 482–487.
- [70] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Regulatory T Cells and Immune Tolerance, *Cell.* 133 (2008) 775–787.
- [71] E.M. Shevach, CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers, *Nat Rev Immunol.* 2 (2002) 389–400.
- [72] W.J. Grossman, J.W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J.P. Atkinson, T.J. Ley, Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death, *Immunity.* 21 (2004) 589–601.
- [73] H.W. Lim, P. Hillsamer, A.H. Banham, C.H. Kim, Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4+CD25+ Regulatory T Cells, *The Journal of Immunology.* 175 (2005) 4180–4183.
- [74] S. Sakaguchi, Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 531–562.
- [75] D.A.A. Vignali, L.W. Collison, C.J. Workman, How regulatory T cells work, *Nat Rev Immunol.* 8 (2008) 523–532.
- [76] E.M. Shevach, Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression, *Immunity.* 30 (2009) 636–645.
- [77] P. Putheti, A. Pettersson, M. Soderstrom, H. Link, Y.M. Huang, Circulating CD4 + CD25 + T Regulatory Cells Are Not Altered in Multiple Sclerosis and Unaffected by Disease-Modulating Drugs, *J Clin Immunol.* 24 (2004) 155–161.
- [78] V. Viglietta, C. Baecher-Allan, H.L. Weiner, D.A. Hafler, Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis, *Journal of Experimental Medicine.* 199 (2004) 971–979.
- [79] K. Venken, N. Hellings, T. Broekmans, K. Hensen, J.-L. Rummens, P. Stinissen, Natural Naive CD4+CD25+CD127low Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression, *The Journal of Immunology.* 180 (2008) 6411–6420.
- [80] M.R. Ehrenstein, J.G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D.A. Isenberg, C. Mauri, Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy, *Journal of Experimental Medicine.* 200 (2004) 277–285.
- [81] S.A. Long, J.H. Buckner, CD4+FOXP3+ T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game, *The Journal of Immunology.* 187 (2011) 2061–2066.
- [82] A. Kuhn, S. Beissert, P.H. Krammer, CD4+CD25+ regulatory T cells in human lupus erythematosus, *Arch Dermatol Res.* 301 (2009) 71–81.
- [83] A. La Cava, Tregs are regulated by cytokines: Implications for autoimmunity, *Autoimmunity Reviews.* 8 (2008) 83–87.

- [84] M. Miyara, Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, D. Nochy, P. Debré, J.-C. Piette, G. Gorochov, Global Natural Regulatory T Cell Depletion in Active Systemic Lupus Erythematosus, *The Journal of Immunology*. 175 (2005) 8392–8400.
- [85] S. Mellor-Pita, Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 65 (2006) 553–554.
- [86] J.-H. Lee, L.-C. Wang, Y.-T. Lin, Y.-H. Yang, D.-T. Lin, B.-L. Chiang, Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus, *Immunology*. 117 (2006) 280–286.
- [87] X. Valencia, C. Yarboro, G. Illei, P.E. Lipsky, Deficient CD4⁺CD25^{high} T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus, *J Immunol*. 178 (2007) 2579–2588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2579>.
- [88] M. Bonelli, A. Savitskaya, K. von Dalwigk, C.W. Steiner, D. Aletaha, J.S. Smolen, C. Scheinecker, Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), *International Immunology*. 20 (2008) 861–868.
- [89] D. Wolf, K. Hochegger, A.M. Wolf, H.F. Rumpold, G. Gastl, H. Tilg, G. Mayer, E. Gunsilius, A.R. Rosenkranz, CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Inhibit Experimental Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis in Mice, *JASN*. 16 (2005) 1360–1370.
- [90] K.J. Scalapino, Q. Tang, J.A. Bluestone, M.L. Bonyhadi, D.I. Daikh, Suppression of Disease in New Zealand Black/New Zealand White Lupus-Prone Mice by Adoptive Transfer of Ex Vivo Expanded Regulatory T Cells, *The Journal of Immunology*. 177 (2006) 1451–1459.
- [91] G. Matarese, P.B. Carrieri, A. La Cava, F. Perna, V. Sanna, V. De Rosa, D. Aufiero, S. Fontana, S. Zappacosta, Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 5150–5155.
- [92] S. Lindley, C.M. Dayan, A. Bishop, B.O. Roep, M. Peakman, T.I.M. Tree, Defective Suppressor Function in CD4⁺CD25⁺ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes, *Diabetes*. 54 (2005) 92–99.
- [93] A.K. Abbas, E. Trotta, D. R. Simeonov, A. Marson, J.A. Bluestone, Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects, *Sci. Immunol*. 3 (2018) eaat1482.
- [94] Q. Tang, Therapeutic Window of Interleukin-2 for Autoimmune Diseases, *Diabetes*. 64 (2015) 1912–1913.
- [95] J. Koreth, K. Matsuoka, H.T. Kim, S.M. McDonough, B. Bindra, E.P. Alyea, P. Armand, C. Cutler, V.T. Ho, N.S. Treister, D.C. Bienfang, S. Prasad, D. Tzachanis, R.M. Joyce, D.E. Avigan, J.H. Antin, J. Ritz, R.J. Soiffer, Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease, *N Engl J Med*. 365 (2011) 2055–2066.
- [96] S. Saadoun, M. Rosenzweig, F. Joly, A. Six, F. Carrat, V. Thibault, D. Sene, P. Cacoub, D. Klatzmann, Regulatory T-Cell Responses to Low-Dose Interleukin-2 in HCV-Induced Vasculitis, *N Engl J Med*. 365 (2011) 2067–2077.
- [97] A. Hartemann, G. Bensimon, C.A. Payan, S. Jacqueminet, O. Bourron, N. Nicolas, M. Fonfrede, M. Rosenzweig, C. Bernard, D. Klatzmann, Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 1 (2013) 295–305.
- [98] M. Rosenzweig, G. Churlaud, R. Mallone, A. Six, N. Dérian, W. Chaara, R. Lorenzon, S.A. Long, J.H. Buckner, G. Afonso, H.-P. Pham, A. Hartemann, A. Yu, A. Pugliese, T.R. Malek, D. Klatzmann, Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients, *Journal of Autoimmunity*. 58 (2015) 48–58.
- [99] J. He, X. Zhang, Y. Wei, X. Sun, Y. Chen, J. Deng, Y. Jin, Y. Gan, X. Hu, R. Jia, C. Xu, Z. Hou, Y.A. Leong, L. Zhu, J. Feng, Y. An, Y. Jia, C. Li, X. Liu, H. Ye, L. Ren, R. Li, H. Yao, Y. Li, S. Chen, X. Zhang, Y. Su, J. Guo, N. Shen, E.F. Morand, D. Yu, Z. Li, Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4⁺ T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus, *Nat Med*. 22 (2016) 991–993.
- [100] J.A. Todd, M. Evangelou, A.J. Cutler, M.L. Pekalski, N.M. Walker, H.E. Stevens, L. Porter, D.J. Smyth, D.B. Rainbow, R.C. Ferreira, L. Esposito, K.M.D. Hunter, K. Loudon, K. Irons, J.H. Yang, C.J.M. Bell, H. Schuilenburg, J. Heywood, B. Challis, S. Neupane, P. Clarke, G. Coleman, S. Dawson, D. Goymer, K. Anselmiova, J. Kennet, J. Brown, S.L. Caddy, J. Lu, J. Greatorex, I. Goodfellow, C.

- Wallace, T.I. Tree, M. Evans, A.P. Mander, S. Bond, L.S. Wicker, F. Waldron-Lynch, Regulatory T Cell Responses in Participants with Type 1 Diabetes after a Single Dose of Interleukin-2: A Non-Randomised, Open Label, Adaptive Dose-Finding Trial, *PLoS Med.* 13 (2016) e1002139.
- [101] J.T. Sockolovsky, E. Trotta, G. Parisi, L. Picton, L.L. Su, A.C. Le, A. Chhabra, S.L. Silveria, B.M. George, I.C. King, M.R. Tiffany, K. Jude, L.V. Sibener, D. Baker, J.A. Shizuru, A. Ribas, J.A. Bluestone, K.C. Garcia, Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes, *Science.* 359 (2018) 1037–1042.
- [102] E. Trotta, P.H. Bessette, S.L. Silveria, L.K. Ely, K.M. Jude, D.T. Le, C.R. Holst, A. Coyle, M. Potempa, L.L. Lanier, K.C. Garcia, N.K. Crellin, I.J. Rondon, J.A. Bluestone, A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism, *Nat Med.* 24 (2018) 1005–1014.
- [103] D.F. McDermott, The application of high-dose interleukin-2 for metastatic renal cell carcinoma, *Med Oncol.* 26 (2009) 13–17.
- [104] B.M. Hall, N.W. Pearce, K.E. Gurley, S.E. Dorsch, Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action., *Journal of Experimental Medicine.* 171 (1990) 141–157.
- [105] P.J. Eggenhuizen, B.H. Ng, J.D. Ooi, Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases, *IJMS.* 21 (2020) 7015.
- [106] N. Marek-Trzonkowska, M. Myśliwiec, A. Dobyszek, M. Grabowska, I. Derkowska, J. Juścińska, R. Owczuk, A. Szadkowska, P. Witkowski, W. Młynarski, P. Jarosz-Chobot, A. Bossowski, J. Siebert, P. Trzonkowski, Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets — Results of one year follow-up, *Clinical Immunology.* 153 (2014) 23–30.
- [107] J.A. Bluestone, J.H. Buckner, M. Fitch, S.E. Gitelman, S. Gupta, M.K. Hellerstein, K.C. Herold, A. Lares, M.R. Lee, K. Li, W. Liu, S.A. Long, L.M. Masiello, V. Nguyen, A.L. Putnam, M. Rieck, P.H. Sayre, Q. Tang, Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells, *Sci. Transl. Med.* 7 (2015).
- [108] L.M.R. Ferreira, Y.D. Muller, J.A. Bluestone, Q. Tang, Next-generation regulatory T cell therapy, *Nat Rev Drug Discov.* 18 (2019) 749–769.
- [109] A.W. Thomson, H.R. Turnquist, G. Raimondi, Immunoregulatory functions of mTOR inhibition, *Nat Rev Immunol.* 9 (2009) 324–337.
- [110] W.-I. Yeh, H.R. Seay, B. Newby, A.L. Posgai, F.B. Moniz, A. Michels, C.E. Mathews, J.A. Bluestone, T.M. Brusko, Avidity and Bystander Suppressive Capacity of Human Regulatory T Cells Expressing De Novo Autoreactive T-Cell Receptors in Type 1 Diabetes, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1313.
- [111] C. Scotta, G. Fanelli, S.J. Hoong, M. Romano, E.N. Lamperti, M. Sukthankar, G. Guggino, H. Fazekasova, K. Ratnasothy, P.D. Becker, B. Afzali, R.I. Lechler, G. Lombardi, Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells, *Haematologica.* 101 (2016) 91–100.
- [112] P. Ovaere, S. Lippens, P. Vandenamee, W. Declercq, The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis, *Trends in Biochemical Sciences.* 34 (2009) 453–463.
- [113] Y.-C. Hsu, L. Li, E. Fuchs, Emerging interactions between skin stem cells and their niches, *Nat Med.* 20 (2014) 847–856.
- [114] A.V. Nguyen, A.M. Soulika, The Dynamics of the Skin's Immune System, *IJMS.* 20 (2019) 1811.
- [115] E.A. Shirshin, Y.I. Gurfinkel, A.V. Priezhev, V.V. Fadeev, J. Lademann, M.E. Darvin, Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization, *Sci Rep.* 7 (2017) 1171.
- [116] D.T. Woodley, Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis, *Dermatologic Clinics.* 35 (2017) 95–100.
- [117] R. Wong, S. Geyer, W. Weninger, J.-C. Guimberteau, J.K. Wong, The dynamic anatomy and patterning of skin, *Exp Dermatol.* 25 (2016) 92–98.
- [118] T.T. Tran, Y. Yamamoto, S. Gesta, C.R. Kahn, Beneficial Effects of Subcutaneous Fat Transplantation on Metabolism, *Cell Metabolism.* 7 (2008) 410–420.

- [119] M. Rodrigues, N. Kosaric, C.A. Bonham, G.C. Gurtner, Wound Healing: A Cellular Perspective, *Physiological Reviews*. 99 (2019) 665–706.
- [120] R.R. Driskell, C.A.B. Jahoda, C.-M. Chuong, F.M. Watt, V. Horsley, Defining dermal adipose tissue, *Exp Dermatol*. 23 (2014) 629–631.
- [121] G. Cildir, S.C. Akincilar, V. Tergaonkar, Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage, *Trends in Molecular Medicine*. 19 (2013) 487–500.
- [122] M. Pasparakis, I. Haase, F.O. Nestle, Mechanisms regulating skin immunity and inflammation, *Nat Rev Immunol*. 14 (2014) 289–301.
- [123] L. Rittié, Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals, *J. Cell Commun. Signal*. 10 (2016) 103–120.
- [124] V.W. Wong, M. Sorkin, J.P. Glotzbach, M.T. Longaker, G.C. Gurtner, Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011 (2011) 1–8.
- [125] A. Elbe, T-Cell receptor $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in rat and human skin — are they equivalent?, *Seminars in Immunology*. 8 (1996) 341–349.
- [126] J. Mestas, C.C.W. Hughes, Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology, *The Journal of Immunology*. 172 (2004) 2731–2738.
- [127] M. Nihal, D. Mikkola, G.S. Wood, Detection of Clonally Restricted Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements in Normal and Lesional Skin, *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2 (2000) 5–10.
- [128] S.A. Geherin, S.R. Fintushel, M.H. Lee, R.P. Wilson, R.T. Patel, C. Alt, A.J. Young, J.B. Hay, G.F. Debes, The Skin, a Novel Niche for Recirculating B Cells, *The Journal of Immunology*. 188 (2012) 6027–6035.
- [129] I.U. Egbuniwe, S.N. Karagiannis, F.O. Nestle, K.E. Lacy, Revisiting the role of B cells in skin immune surveillance, *Trends in Immunology*. 36 (2015) 102–111.
- [130] D. Simon, S. Hösl, G. Kostylina, N. Yawalkar, H.-U. Simon, Anti-CD20 (rituximab) treatment improves atopic eczema, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 121 (2008) 122–128.
- [131] R. Lafyatis, E. Kissin, M. York, G. Farina, K. Viger, M.J. Fritzler, P.A. Merkel, R.W. Simms, B cell depletion with rituximab in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis, *Arthritis Rheum*. 60 (2009) 578–583.
- [132] B. Geiger, J. Wenzel, M. Hantschke, I. Haase, S. Ständer, E. Von Stebut, Resolving lesions in human cutaneous leishmaniasis predominantly harbour chemokine receptor CXCR3-positive T helper 1/T cytotoxic type 1 cells: Th1 cells in human cutaneous leishmaniasis, *British Journal of Dermatology*. 162 (2010) 870–874.
- [133] T.C. Scharschmidt, K.S. Vasquez, H.-A. Truong, S.V. Gearty, M.L. Pauli, A. Nosbaum, I.K. Gratz, M. Otto, J.J. Moon, J. Liese, A.K. Abbas, M.A. Fischbach, M.D. Rosenblum, A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes, *Immunity*. 43 (2015) 1011–1021.
- [134] R. Sanchez Rodriguez, M.L. Pauli, I.M. Neuhaus, S.S. Yu, S.T. Arron, H.W. Harris, S.H.-Y. Yang, B.A. Anthony, F.M. Sverdrup, E. Krow-Lucal, T.C. MacKenzie, D.S. Johnson, E.H. Meyer, A. Löhr, A. Hsu, J. Koo, W. Liao, R. Gupta, M.G. Debbaneh, D. Butler, M. Huynh, E.C. Levin, A. Leon, W.Y. Hoffman, M.H. McGrath, M.D. Alvarado, C.H. Ludwig, H.-A. Truong, M.M. Maurano, I.K. Gratz, A.K. Abbas, M.D. Rosenblum, Memory regulatory T cells reside in human skin, *J. Clin. Invest*. 124 (2014) 1027–1036.
- [135] N. Ali, B. Zirak, R.S. Rodriguez, M.L. Pauli, H.-A. Truong, K. Lai, R. Ahn, K. Corbin, M.M. Lowe, T.C. Scharschmidt, K. Taravati, M.R. Tan, R.R. Ricardo-Gonzalez, A. Nosbaum, M. Bertolini, W. Liao, F.O. Nestle, R. Paus, G. Cotsarelis, A.K. Abbas, M.D. Rosenblum, Regulatory T Cells in Skin Facilitate Epithelial Stem Cell Differentiation, *Cell*. 169 (2017) 1119–1129.e11.
- [136] A. Nosbaum, N. Prevel, H.-A. Truong, P. Mehta, M. Ettinger, T.C. Scharschmidt, N.H. Ali, M.L. Pauli, A.K. Abbas, M.D. Rosenblum, Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing, *The Journal of Immunology*. 196 (2016) 2010–2014.
- [137] M.D. Rosenblum, I.K. Gratz, J.S. Paw, K. Lee, A. Marshak-Rothstein, A.K. Abbas, Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues, *Nature*. 480 (2011) 538–542.

- [138] S. Yang, N. Fujikado, D. Kolodin, C. Benoist, D. Mathis, Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance, *Science*. 348 (2015) 589–594.
- [139] E. Schmidt, D. Zillikens, Pemphigoid diseases, *The Lancet*. 381 (2013) 320–332.
- [140] M. Kasperkiewicz, C.T. Ellebrecht, H. Takahashi, J. Yamagami, D. Zillikens, A.S. Payne, M. Amagai, Pemphigus, *Nat Rev Dis Primers*. 3 (2017) 17026.
- [141] N. van Beek, D. Zillikens, E. Schmidt, Bullous Autoimmune Dermatoses, *Deutsches Ärzteblatt international*. (2021). <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.m2021.0136> (accessed January 19, 2023).
- [142] K. Bieber, A.L. Ernst, S. Tukaj, M.M. Holtsche, E. Schmidt, D. Zillikens, R.J. Ludwig, M. Kasperkiewicz, Analysis of serum markers of cellular immune activation in patients with bullous pemphigoid, *Exp Dermatol*. 26 (2017) 1248–1252.
- [143] M. Witte, H. Koga, T. Hashimoto, R.J. Ludwig, K. Bieber, Discovering potential drug-targets for personalized treatment of autoimmune disorders - what we learn from epidermolysis bullosa acquisita, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 20 (2016) 985–998.
- [144] P. Bernard, Incidence and Distribution of Subepidermal Autoimmune Bullous Skin Diseases in Three French Regions, *Arch Dermatol*. 131 (1995) 48.
- [145] D. Zillikens, Incidence of Autoimmune Subepidermal Blistering Dermatoses in a Region of Central Germany, *Arch Dermatol*. 131 (1995).
- [146] S.N. Wong, S.H. Chua, Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Centre, Singapore: a 2-year review, *Br J Dermatol*. 147 (2002) 476–480.
- [147] A. Nanda, R. Dvorak, K. Al-Saeed, H. Al-Sabah, Q.A. Alsaleh, Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait, *International Journal of Dermatology*. 43 (2004) 876–881.
- [148] F. Hübner, A. Recke, D. Zillikens, R. Linder, E. Schmidt, Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany, *Journal of Investigative Dermatology*. 136 (2016) 2495–2498.
- [149] F. Caux, G. Kirtschig, F. Lemarchand-Venencie, P. -Y. Venencie, T. Hoang-Xuan, H. Robin, L. Dubertret, C. Prost, IgA-epidermolysis bullosa acquisita in a child resulting in blindness, *British Journal of Dermatology*. 137 (1997) 270–275.
- [150] F.X. Trigo-Guzmán, A. Conti, V. Aoki, C.W. Maruta, C.G. Santi, C.M.R. Silva, B. Gontijo, D.T. Woodley, E.A. Rivitti, Epidermolysis Bullosa Acquisita in Childhood, *The Journal of Dermatology*. 30 (2003) 226–229.
- [151] A.V. Marzano, E. Cozzani, D. Fanoni, O. De Pità, C. Vassallo, E. Berti, A. Parodi, C. Crosti, M. Cugno, Diagnosis and disease severity assessment of epidermolysis bullosa acquisita by ELISA for anti-type VII collagen autoantibodies: an Italian multicentre study: ELISA for anti-type VII collagen autoantibodies in EBA, *British Journal of Dermatology*. 168 (2013) 80–84.
- [152] S. Kim, J. Kim, Y. Kim, Epidermolysis Bullosa Acquisita: A Retrospective Clinical Analysis of 30 Cases, *Acta Derm Venerol*. 91 (2011) 307–312.
- [153] C. Prost-Squarcioni, F. Caux, E. Schmidt, M.F. Jonkman, S. Vassileva, S.C. Kim, P. Iranzo, M. Daneshpazhooh, J. Terra, J. Bauer, J. Fairley, R. Hall, M. Hertl, J.S. Lehman, B. Marinovic, A. Patsatsi, D. Zillikens, the International Bullous Diseases Group, V. Werth, D.T. Woodley, D.F. Murrell, International Bullous Diseases Group: consensus on diagnostic criteria for epidermolysis bullosa acquisita, *Br J Dermatol*. 179 (2018) 30–41.
- [154] W.R. Gammon, R.A. Briggaman, D.T. Woodley, P.W. Heald, C.E. Wheeler, Jr., Epidermolysis bullosa acquisita—a pemphigoid-like disease, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 11 (1984) 820–832.
- [155] W.R. Gammon, E.R. Heise, W.A. Burke, J.-D. Fine, D.T. Woodley, R.A. Briggaman, Increased Frequency of HLA-DR2 in Patients with Autoantibodies to Epidermolysis Bullosa Acquisita Antigen: Evidence that the Expression of Autoimmunity to Type VII Collagen is HLA Class II Allele Associated, 91 (1988) 228–233.
- [156] C. Zumelzu, C. Le Roux-Villet, P. Loiseau, M. Busson, M. Heller, F. Aucouturier, V. Pendaries, N. Lièvre, F. Pascal, M.-D. Brette, S. Doan, D. Charron, F. Caux, L. Laroche, A. Petit, C. Prost-Squarcioni, Black Patients of African Descent and HLA-DRB1*15:03 Frequency Overrepresented in Epidermolysis Bullosa Acquisita, *Journal of Investigative Dermatology*. 131 (2011) 2386–2393.

- [157] K. Kridin, D. Kneiber, E.H. Kowalski, M. Valdebran, K.T. Amber, Epidermolysis bullosa acquisita: A comprehensive review, *Autoimmunity Reviews*. 18 (2019) 786–795.
- [158] R.J. Ludwig, Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *ISRN Dermatology*. 2013 (2013) 1–25.
- [159] H. Koga, C. Prost-Squarcioni, H. Iwata, M.F. Jonkman, R.J. Ludwig, K. Bieber, Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update, *Front. Med*. 5 (2019) 362.
- [160] R.J. Ludwig, D. Zillikens, Pathogenesis of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *Dermatologic Clinics*. 29 (2011) 493–501.
- [161] J.H. Kim, S.-C. Kim, Epidermolysis bullosa acquisita, *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 27 (2013) 1204–1213.
- [162] M. Kasperkiewicz, C.D. Sadik, K. Bieber, S.M. Ibrahim, R.A. Manz, E. Schmidt, D. Zillikens, R.J. Ludwig, Epidermolysis Bullosa Acquisita: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Options, *Journal of Investigative Dermatology*. 136 (2016) 24–33.
- [163] K. Bieber, M. Witte, S. Sun, J.E. Hundt, K. Kalies, S. Dräger, A. Kasprick, T. Twelkmeyer, R.A. Manz, P. König, J. Köhl, D. Zillikens, R.J. Ludwig, T cells mediate autoantibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita, *Sci Rep*. 6 (2016) 38357.
- [164] K. Bieber, S. Sun, M. Witte, A. Kasprick, F. Beltsiou, M. Behnen, T. Laskay, F.S. Schulze, E. Pippi, N. Reichhelm, R. Pagel, D. Zillikens, E. Schmidt, T. Sparwasser, K. Kalies, R.J. Ludwig, Regulatory T Cells Suppress Inflammation and Blistering in Pemphigoid Diseases, *Front. Immunol*. 8 (2017) 1628.
- [165] H. Iwata, K. Bieber, B. Tiburzy, N. Chrobok, K. Kalies, A. Shimizu, S. Leineweber, A. Ishiko, A. Vorobyev, D. Zillikens, J. Köhl, J. Westermann, K. Seeger, R. Manz, R.J. Ludwig, B Cells, Dendritic Cells, and Macrophages Are Required To Induce an Autoreactive CD4 Helper T Cell Response in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *The Journal of Immunology*. 191 (2013) 2978–2988.
- [166] M. Hirose, A. Kasprick, F. Beltsiou, K.S. Dieckhoff, F.S. Schulze, U.K.J.S.R.L. Samavedam, J.E. Hundt, H.H. Pas, M.F. Jonkman, E. Schmidt, K. Kalies, D. Zillikens, R.J. Ludwig, K. Bieber, Reduced Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita After Anti-TNF Treatment, *Mol Med*. 22 (2016) 918–926.
- [167] D. Miyamoto, J.O. Gordilho, C.G. Santi, A.M. Porro, Epidermolysis bullosa acquisita, *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 97 (2022) 409–423.
- [168] K. Kridin, C. Ahn, W.C. Huang, A. Ansari, N. Sami, Treatment Update of Autoimmune Blistering Diseases, *Dermatologic Clinics*. 37 (2019) 215–228.
- [169] C. Prost-Squarcioni, S. Ingen-Housz-Oro, P. Joly, P. Bernard, C. Bedane, Recommandations des centres de référence des maladies bulleuses auto-immunes pour le diagnostic et la prise en charge de l'épidermolyse bulleuse acquise, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 138 (2011) 274–279.
- [170] C.G. Santi, A.C. Gripp, A.M. Roselino, D.S. Mello, J.O. Gordilho, P.F. de Marsillac, A.M. Porro, Consensus on the treatment of autoimmune bullous dermatoses: bullous pemphigoid, mucous membrane pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita - Brazilian Society of Dermatology, *An. Bras. Dermatol*. 94 (2019) 33–47.
- [171] H. Ujiie, H. Iwata, J. Yamagami, T. Nakama, Y. Aoyama, S. Ikeda, N. Ishii, K. Iwatsuki, M. Kurosawa, D. Sawamura, A. Tanikawa, D. Tsuruta, W. Nishie, W. Fujimoto, M. Amagai, H. Shimizu, Committee for Guidelines for the Management of Pemphigoid Diseases (Including Epidermolysis Bullosa Acquisita), Japanese guidelines for the management of pemphigoid (including epidermolysis bullosa acquisita), *J Dermatol*. 46 (2019) 1102–1135.
- [172] P.M. Patel, V.A. Jones, T.N. Murray, K.T. Amber, A Review Comparing International Guidelines for the Management of Bullous Pemphigoid, Pemphigoid Gestationis, Mucous Membrane Pemphigoid, and Epidermolysis Bullosa Acquisita, *Am J Clin Dermatol*. 21 (2020) 557–565.
- [173] K.B. Gordon, L.S. Chan, D.T. Woodley, Treatment of refractory epidermolysis bullosa acquisita with extracorporeal photochemotherapy, *British Journal of Dermatology*. 136 (1997) 415–420.

- [174] C. Callot-Mellot, C. Bodemer, F. Caux, I. Bourgault-Villada, S. Fraitag, G. Goudié, M. Heller, Y. de Prost, C. Prost, Epidermolysis Bullosa Acquisita in Childhood, *Arch Dermatol.* 133 (1997) 1122–1126.
- [175] S. Edwards, S.H. Wakelin, F. Wojnarowska, R.A. Marsden, G. Kirtschig, B. Bhogal, M.M. Black, Bullous Pemphigoid and Epidermolysis Bullosa Acquisita: Presentation, Prognosis, and Immunopathology in 11 Children, *Pediatric Dermatology.* 15 (1998) 184–190.
- [176] W. Nishie, Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: An autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII, *Journal of Dermatological Science.* 73 (2014) 179–186.
- [177] R.J. Ludwig, Signalling and targeted therapy of inflammatory cells in epidermolysis bullosa acquisita, *Exp Dermatol.* 26 (2017) 1179–1186.
- [178] H. Koga, A. Recke, G. Vidarsson, H.H. Pas, M.F. Jonkman, T. Hashimoto, A. Kasprick, S. Ghorbanalipour, H. Tenor, D. Zillikens, R.J. Ludwig, PDE4 Inhibition as Potential Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *Journal of Investigative Dermatology.* 136 (2016) 2211–2220.
- [179] C. Sitaru, S. Mihai, C. Otto, M.T. Chiriac, I. Hausser, B. Dotterweich, H. Saito, C. Rose, A. Ishiko, D. Zillikens, Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 870–878.
- [180] S. Mihai, M.T. Chiriac, K. Takahashi, J.M. Thurman, V.M. Holers, D. Zillikens, M. Botto, C. Sitaru, The Alternative Pathway of Complement Activation Is Critical for Blister Induction in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *The Journal of Immunology.* 178 (2007) 6514–6521.
- [181] M. Chiriac, J. Roesler, K. Sindrilaru, K. Scharffetter-Kochanek, D. Zillikens, J. Sitaru, NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage, *J. Pathol.* 212 (2007) i–i.
- [182] U.K.S.R.L. Samavedam, H. Iwata, S. Müller, F.S. Schulze, A. Recke, E. Schmidt, D. Zillikens, R.J. Ludwig, GM-CSF Modulates Autoantibody Production and Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *The Journal of Immunology.* 192 (2014) 559–571.
- [183] U.K.S.R.L. Samavedam, K. Kalies, J. Scheller, H. Sadeghi, Y. Gupta, M.F. Jonkman, E. Schmidt, J. Westermann, D. Zillikens, S. Rose-John, R.J. Ludwig, Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction, *Journal of Autoimmunity.* 40 (2013) 74–85.
- [184] S. Tukaj, K. Bieber, K. Kleszczyński, M. Witte, R. Cames, K. Kalies, D. Zillikens, R.J. Ludwig, T.W. Fischer, M. Kasperkiewicz, Topically Applied Hsp90 Blocker 17AAG Inhibits Autoantibody-Mediated Blister-Inducing Cutaneous Inflammation, *Journal of Investigative Dermatology.* 137 (2017) 341–349.
- [185] M. Hirose, L. Brandolini, D. Zimmer, J. Götz, J. Westermann, M. Allegretti, A. Moriconi, A. Recke, D. Zillikens, K. Kalies, R.J. Ludwig, The Allosteric CXCR1/2 Inhibitor DF2156A Improves Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J Genet Syndr Gene Ther.* s3 (2013). <https://www.omicsonline.org/the-allosteric-cxcr1-inhibitor-df2156a-improves-experimental-epidermolysis-bullosa-acquisita-2157-7412.S3-005.php?aid=12819> (accessed January 19, 2023).
- [186] A. Sesarman, A.G. Sitaru, F. Olaru, D. Zillikens, C. Sitaru, Neonatal Fc receptor deficiency protects from tissue injury in experimental epidermolysis bullosa acquisita, *J Mol Med.* 86 (2008) 951–959.
- [187] K. Bieber, S. Sun, N. Ishii, M. Kasperkiewicz, E. Schmidt, M. Hirose, J. Westermann, X. Yu, D. Zillikens, R.J. Ludwig, Animal models for autoimmune bullous dermatoses: Animal models for autoimmune skin blistering diseases, *Experimental Dermatology.* 19 (2010) 2–11.
- [188] D.T. Woodley, C. Chang, P. Saadat, R. Ram, Z. Liu, M. Chen, Evidence that Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Pathogenic and Responsible for the Clinical, Histological, and Immunological Features of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *J Invest Dermatol.* 124 (2005) 958–964.
- [189] D.T. Woodley, R. Ram, A. Doostan, P. Bandyopadhyay, Y. Huang, J. Remington, Y. Hou, D.R. Keene, Z. Liu, M. Chen, Induction of Epidermolysis Bullosa Acquisita in Mice by Passive Transfer of Autoantibodies from Patients, *Journal of Investigative Dermatology.* 126 (2006) 1323–1330.

- [190] C. Sitaru, M.T. Chiriac, S. Mihai, J. Büning, A. Gebert, A. Ishiko, D. Zillikens, Induction of Complement-Fixing Autoantibodies against Type VII Collagen Results in Subepidermal Blistering in Mice, *The Journal of Immunology*. 177 (2006) 3461–3468.
- [191] R.J. Ludwig, A. Recke, K. Bieber, S. Müller, A. de C. Marques, D. Banczyk, M. Hirose, M. Kasperkiewicz, N. Ishii, E. Schmidt, J. Westermann, D. Zillikens, S.M. Ibrahim, Generation of Antibodies of Distinct Subclasses and Specificity Is Linked to H2s in an Active Mouse Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *Journal of Investigative Dermatology*. 131 (2011) 167–176.
- [192] C.M. Hammers, K. Bieber, K. Kalies, D. Banczyk, C.T. Ellebrecht, S.M. Ibrahim, D. Zillikens, R.J. Ludwig, J. Westermann, Complement-Fixing Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Induced in Th1-Polarized Lymph Nodes of Epidermolysis Bullosa Acquisita-Susceptible Mice, *The Journal of Immunology*. 187 (2011) 5043–5050.
- [193] S. Leineweber, S. Schönig, K. Seeger, Insight into interactions of the von-Willebrand-factor-A-like domain 2 with the FNIII-like domain 9 of collagen VII by NMR and SPR, *FEBS Letters*. 585 (2011) 1748–1752.
- [194] P. Quaglino, E. Antiga, A. Comessatti, M. Caproni, T. Nardò, R. Ponti, M. Novelli, S. Osella-Abate, P. Fabbri, M.G. Bernengo, Circulating CD4+ CD25brightFOXP3+ regulatory T-cells are significantly reduced in bullous pemphigoid patients, *Arch Dermatol Res*. 304 (2012) 639–645.
- [195] E. Antiga, P. Quaglino, W. Volpi, I. Pierini, E. Del Bianco, B. Bianchi, M. Novelli, P. Savoia, M.G. Bernengo, P. Fabbri, M. Caproni, Regulatory T cells in skin lesions and blood of patients with bullous pemphigoid, *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 28 (2014) 222–230.
- [196] M. Arakawa, T. Dainichi, N. Ishii, T. Hamada, T. Karashima, T. Nakama, S. Yasumoto, D. Tsuruta, T. Hashimoto, Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid: Letter to the Editor, *Experimental Dermatology*. 20 (2011) 1022–1024.
- [197] A. Rensing-Ehl, B. Gaus, L. Bruckner-Tuderman, S.F. Martin, Frequency, function and CLA expression of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in bullous pemphigoid, *Experimental Dermatology*. 16 (2007) 13–21.
- [198] R.J. Ludwig, K. Vanhoorelbeke, F. Leyboldt, Z. Kaya, K. Bieber, S.M. McLachlan, L. Komorowski, J. Luo, O. Cabral-Marques, C.M. Hammers, J.M. Lindstrom, P. Lamprecht, A. Fischer, G. Riemekasten, C. Tersteeg, P. Sondermann, B. Rapoport, K.-P. Wandinger, C. Probst, A. El Beidaq, E. Schmidt, A. Verkman, R.A. Manz, F. Nimmerjahn, Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology, *Front. Immunol*. 8 (2017) 603.
- [199] M. Kuczma, R. Podolsky, N. Garge, D. Daniely, R. Pacholczyk, L. Ignatowicz, P. Kraj, Foxp3-deficient regulatory T cells do not revert into conventional effector CD4+ T cells but constitute a unique cell subset, *J Immunol*. 183 (2009) 3731–3741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800601>.
- [200] M. Kuczma, I. Pawlikowska, M. Kopij, R. Podolsky, G.A. Rempala, P. Kraj, TCR repertoire and Foxp3 expression define functionally distinct subsets of CD4+ Treg cells, *J Immunol*. 183 (2009) 3118–3129.
- [201] A. Kasprick, K. Bieber, R.J. Ludwig, Drug Discovery for Pemphigoid Diseases, *Current Protocols in Pharmacology*. 84 (2019) e55.
- [202] K. Bieber, H. Koga, W. Nishie, In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases, *Exp Dermatol*. 26 (2017) 1163–1170.
- [203] A. El Beidaq, C.W.M. Link, K. Hofmann, B. Frehse, K. Hartmann, K. Bieber, S.F. Martin, R.J. Ludwig, R.A. Manz, In Vivo Expansion of Endogenous Regulatory T Cell Populations Induces Long-Term Suppression of Contact Hypersensitivity, *The Journal of Immunology*. 197 (2016) 1567–1576.
- [204] O. Boyman, M. Kovar, M.P. Rubinstein, C.D. Surh, J. Sprent, Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes, *Science*. 311 (2006) 1924–1927.
- [205] Y. Grinberg-Bleyer, A. Baeyens, S. You, R. Elhage, G. Fourcade, S. Gregoire, N. Cagnard, W. Carpentier, Q. Tang, J. Bluestone, L. Chatenoud, D. Klatzmann, B.L. Salomon, E. Piaggio, IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells, *Journal of Experimental Medicine*. 207 (2010) 1871–1878.
- [206] N. Groß, K. Bieber, R. Ludwig, Analysis of FoxP3+ regulatory T cells from mouse dorsal skin, Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie; Universität zu Lübeck, n.d.

- https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/fc26b16f4e3f52931839c9590fa05148f51b3b91/Gross_2020.pdf (accessed January 10, 2023).
- [207] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, A. Nalbant, Flow cytometry: basic principles and applications, *Critical Reviews in Biotechnology*. 37 (2017) 163–176.
- [208] A. Vorobyev, R.J. Ludwig, E. Schmidt, Clinical features and diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita, *Expert Review of Clinical Immunology*. 13 (2017) 157–169.
- [209] L. Wendler, Histologische und Kinom Aktivitätsprofil Analyse aus Hautläsionen bei Epidermolysis bullosa acquisita, Masterarbeit im Rahmen des Studiengangs Molecular Life Science, Universität zu Lübeck, 2022.
- [210] A. Untergasser, RNAprep - Trizol combined with Columns, Untergasser's Lab. (2008). http://www.untergasser.de/lab/protocols/rna_prep_comb_trizol_v1_0.htm (accessed January 10, 2023).
- [211] C. Liu, D. Chu, K. Kalantar-Zadeh, J. George, H.A. Young, G. Liu, Cytokines: From Clinical Significance to Quantification, *Advanced Science*. 8 (2021) 2004433.
- [212] J. Lee, B. Lozano-Ruiz, F.M. Yang, D.D. Fan, L. Shen, J.M. González-Navajas, The Multifaceted Role of Th1, Th9, and Th17 Cells in Immune Checkpoint Inhibition Therapy, *Frontiers in Immunology*. 12 (2021).
- [213] J.-M. Zhang, J. An, Cytokines, Inflammation and Pain, *Int Anesthesiol Clin*. 45 (2007) 27–37.
- [214] K.V. Sawant, K.M. Poluri, A.K. Dutta, K.M. Sepuru, A. Troshkina, R.P. Garofalo, K. Rajarathnam, Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions, *Sci Rep*. 6 (2016) 33123.
- [215] E. Khodaeiani, A. Fakhrjou, M. Amirnia, S. Babaei-nezhad, F. Taghvamanesh, E. Razzagh-Karimi, H. Alikhah, Immunohistochemical Evaluation of p53 and Ki67 Expression in Skin Epithelial Tumors, *Indian J Dermatol*. 58 (2013) 181–187.
- [216] J.M. Austyn, S. Gordon, F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage, *Eur J Immunol*. 11 (1981) 805–815.
- [217] A. Dos Anjos Cassado, F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen, *Results Probl Cell Differ*. 62 (2017) 161–179.
- [218] A.J. McKnight, S. Gordon, The EGF-TM7 family: unusual structures at the leukocyte surface, *J Leukoc Biol*. 63 (1998) 271–280.
- [219] P.Y. Lee, J.-X. Wang, E. Parisini, C.C. Dascher, P.A. Nigrovic, Ly6 family proteins in neutrophil biology, *J Leukoc Biol*. 94 (2013) 585–594.
- [220] T.J. Fleming, M.L. Fleming, T.R. Malek, Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family, *J Immunol*. 151 (1993) 2399–2408.
- [221] R. Chetty, K. Gatter, CD3: Structure, function, and role of immunostaining in clinical practice, *The Journal of Pathology*. 173 (1994) 303–307.
- [222] A.W. Ho, T.S. Kupper, T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders, *Nat Rev Immunol*. 19 (2019) 490–502.
- [223] D. Chaussabel, V. Pascual, J. Banchereau, Assessing the human immune system through blood transcriptomics, *BMC Biology*. 8 (2010) 84.
- [224] C. Castro, M. Gourley, Diagnostic Testing and Interpretation of Tests for Autoimmunity, *J Allergy Clin Immunol*. 125 (2010) S238–S247.
- [225] A. Schmidt, N. Oberle, P.H. Krammer, Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression, *Frontiers in Immunology*. 3 (2012).
- [226] A. Trickett, Y.L. Kwan, T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads, *J Immunol Methods*. 275 (2003) 251–255.
- [227] X. Yu, R. Akbarzadeh, M. Pieper, T. Scholzen, S. Gehrig, C. Schultz, D. Zillikens, P. König, F. Petersen, Neutrophil Adhesion Is a Prerequisite for Antibody-Mediated Proteolytic Tissue Damage in Experimental Models of Epidermolysis Bullosa Acquisita, *Journal of Investigative Dermatology*. 138 (2018) 1990–1998.

- [228] Y. Chen, A.T.L. Lun, G.K. Smyth, From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline, *F1000Res.* 5 (2016) 1438.
- [229] M.B. Atkins, M.T. Lotze, J.P. Dutcher, R.I. Fisher, G. Weiss, K. Margolin, J. Abrams, M. Sznol, D. Parkinson, M. Hawkins, C. Paradise, L. Kunkel, S.A. Rosenberg, High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993, *Journal of Clinical Oncology.* (2016).
- [230] J.A. Klapper, S.G. Downey, F.O. Smith, J.C. Yang, M.S. Hughes, U.S. Kammula, R.M. Sherry, R.E. Royal, S.M. Steinberg, S. Rosenberg, High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: A retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006, *Cancer.* 113 (2008) 293–301.
- [231] D. Klatzmann, A.K. Abbas, The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases, *Nat Rev Immunol.* 15 (2015) 283–294. <https://doi.org/10.1038/nri3823>.
- [232] A. Yu, L. Zhu, N.H. Altman, T.R. Malek, A low IL-2R signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells, *Immunity.* 30 (2009) 204–217.
- [233] J. Tomala, P. Weberova, B. Tomalova, Z.J. Zakostelska, L. Sivak, J. Kovarova, M. Kovar, IL-2/JES6-1 mAb complexes dramatically increase sensitivity to LPS through IFN- γ production by CD25+Foxp3- T cells, *ELife.* 10 (2021).
- [234] J. Tomala, H. Chmelova, T. Mrkvan, B. Rihova, M. Kovar, In Vivo Expansion of Activated Naive CD8+ T Cells and NK Cells Driven by Complexes of IL-2 and Anti-IL-2 Monoclonal Antibody As Novel Approach of Cancer Immunotherapy, *J Immunol.* 183 (2009) 4904–4912.
- [235] J.B. Spangler, J. Tomala, V.C. Luca, K.M. Jude, S. Dong, A.M. Ring, P. Votavova, M. Pepper, M. Kovar, K.C. Garcia, Antibodies to Interleukin-2 elicit selective T cell subset potentiation through distinct conformational mechanisms, *Immunity.* 42 (2015) 815.
- [236] H. Graßhoff, S. Comdühr, L.R. Monne, A. Müller, P. Lamprecht, G. Riemekasten, J.Y. Humrich, Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases, *Front. Immunol.* 12 (2021).
- [237] T.R. Mosmann, T. Yokota, R. Kastelein, S.M. Zurawski, N. Arai, Y. Takebe, Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4), *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).* 138 (1987).
- [238] K.E. Webster, S. Walters, R.E. Kohler, T. Mrkvan, O. Boyman, C.D. Surh, S.T. Grey, J. Sprent, In vivo expansion of T reg cells with IL-2–mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression, *The Journal of Experimental Medicine.* 206 (2009) 751.
- [239] M. Kondo, D.C. Scherer, T. Miyamoto, A.G. King, K. Akashi, K. Sugamura, I.L. Weissman, Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines, *Nature.* 407 (2000).
- [240] E. Sato, S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.-T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, K. Odunsi, Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102 (2005) 18538.
- [241] R. Khattry, T. Cox, S.-A. Yasayko, F. Ramsdell, An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells, *Nat Immunol.* 4 (2003) 337–342.
- [242] X. Zhu, G. Meng, B.L. Dickinson, X. Li, E. Mizoguchi, L. Miao, Y. Wang, C. Robert, B. Wu, P.D. Smith, W.I. Lencer, R.S. Blumberg, MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor for IgG Is Functionally Expressed in Monocytes, Intestinal Macrophages, and Dendritic Cells, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).* 166 (2001) 3266.
- [243] E.A. Jones, T.A. Waldmann, The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat, *Journal of Clinical Investigation.* 51 (1972) 2916.
- [244] D. Abrahamson, R. Rodewald, Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor-mediated transport of IgG across the newborn rat intestine, *The Journal of Cell Biology.* 91 (1981) 270.

- [245] Ahouse, C. Hagerman, P. Mittal, D. Gilbert, N. Copeland, N. Jenkins, N. Simister, Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC, *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 151 (1993).
- [246] E. Israel, V. Patel, S. Taylor, A. Marshak-Rothstein, N. Simister, Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice, *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 154 (1995).
- [247] W.L. Havran, J.M. Jameson, Epidermal T Cells and Wound Healing, *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 184 (2010) 5423.
- [248] A. Toulon, L. Breton, K.R. Taylor, M. Tenenhaus, D. Bhavsar, C. Lanigan, R. Rudolph, J. Jameson, W.L. Havran, A role for human skin-resident T cells in wound healing, *The Journal of Experimental Medicine*. 206 (2009) 743.
- [249] N.S. Fay, E.C. Larson, J.M. Jameson, Chronic Inflammation and $\gamma\delta$ T Cells, *Frontiers in Immunology*. 7 (2016).
- [250] U. Laggner, P.D. Meglio, G.K. Perera, C. Hundhausen, K.E. Lacy, N. Ali, C.H. Smith, A.C. Hayday, B.J. Nickoloff, F.O. Nestle, Identification of a novel pro-inflammatory human skin-homing $V\gamma 9V\delta 2$ T cell subset with a potential role in psoriasis, *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 187 (2011) 2783.
- [251] Y. Tokura, P. Phadungsaksawasdi, K. Kurihara, T. Fujiyama, T. Honda, Pathophysiology of Skin Resident Memory T Cells, *Frontiers in Immunology*. 11 (2021).
- [252] J. X, C. Ra, L. L, W. Aj, F. Rc, K. Ts, Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity, *Nature*. 483 (2012).
- [253] L.K. Mackay, A. Rahimpour, J.Z. Ma, N. Collins, A.T. Stock, M.-L. Hafon, J. Vega-Ramos, P. Lauzurica, S.N. Mueller, T. Stefanovic, D.C. Tschärke, W.R. Heath, M. Inouye, F.R. Carbone, T. Gebhardt, The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin, *Nat Immunol*. 14 (2013) 1294–1301.
- [254] S.N. Mueller, A. Zaid, F.R. Carbone, Tissue-Resident T Cells: Dynamic Players in Skin Immunity, *Frontiers in Immunology*. 5 (2014).
- [255] A. Zaid, L.K. Mackay, A. Rahimpour, A. Braun, M. Veldhoen, F.R. Carbone, J.H. Manton, W.R. Heath, S.N. Mueller, Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111 (2014) 5307–5312.
- [256] M. Battaglia, A. Stabilini, M. Roncarolo, Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells, *Blood*. 105 (2005) 4743–4748.
- [257] J.N. Clough, O.S. Omer, S. Tasker, G.M. Lord, P.M. Irving, Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances, *Gut*. 69 (2020) 942–952.
- [258] S.S. Duffy, B.A. Keating, G. Moalem-Taylor, Adoptive Transfer of Regulatory T Cells as a Promising Immunotherapy for the Treatment of Multiple Sclerosis, *Frontiers in Neuroscience*. 13 (2019).
- [259] P. Wang, S.G. Zheng, Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 6 (2013) 2668.
- [260] M. Niebuhr, M. Kasperkiewicz, S. Maass, E. Hauenschild, K. Bieber, R.J. Ludwig, J. Westermann, K. Kalies, Evidence for a contributory role of a xenogeneic immune response in experimental epidermolysis bullosa acquisita, *Experimental Dermatology*. 26 (2017) 1207–1213.
- [261] H.S. Chaudhry, M.R. Kasarla, Microcytic Hypochromic Anemia, in: *StatPearls* [Internet], StatPearls Publishing, 2022.
- [262] E. Martin, I. Mauer, U. Malzahn, P.U. Heuschmann, M. Goebeler, S. Benoit, Comorbid diseases among bullous pemphigoid patients in Germany: new insights from a case-control study, *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 20 (2022) 798–805.
- [263] G. Yilmaz, H. Shaikh, Normochromic Normocytic Anemia, in: *StatPearls* [Internet], StatPearls Publishing, 2023.
- [264] E.N. Rifaioğlu, B.B. Sen, Ö. Ekiz, A.C. Dogramaci, Mean platelet volume and eosinophilia relationship in patients with bullous pemphigoid, *Platelets*. (2014).
- [265] S.A. Shah, C.P. Page, S.C. Pitchford, Platelet–Eosinophil Interactions As a Potential Therapeutic Target in Allergic Inflammation and Asthma, *Frontiers in Medicine*. 4 (2017).

- [266] A.S. Benton, N. Kumar, J. Lerner, A. Wiles, M. Foerster, S.J. Teach, R.J. Freishtat, Airway Platelet Activation is Associated with Airway Eosinophilic Inflammation in Asthma, *Journal of Investigative Medicine*. 58 (2010) 987.
- [267] A. Lellouch-Tubiana, J. Lefort, M. Simon, A. Pfister, B. Vargaftig, Eosinophil recruitment into guinea pig lungs after PAF-acether and allergen administration. Modulation by prostacyclin, platelet depletion, and selective antagonists, *The American Review of Respiratory Disease*. 137
- [268] M. Braga, C. Quecchia, E. Cavallucci, L. Di Giampaolo, C. Schiavone, C. Petrarca, M. Di Gioacchino, T regulatory cells in allergy, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 24 (2011).
- [269] K. Adel-Patient, S. Wavrin, H. Bernard, N. Meziti, S. Ah-Leung, J.-M. Wal, Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine β -lactoglobulin, *Allergy*. 66 (2011) 1312–1321.
- [270] N.L. Diny, N.R. Rose, D. Čiháková, Eosinophils in Autoimmune Diseases, *Frontiers in Immunology*. 8 (2017).
- [271] X. Liu, C. Gorzelanny, S.W. Schneider, Platelets in Skin Autoimmune Diseases, *Front. Immunol*. 10 (2019).
- [272] K. Moore, A. O'Garra, R. Malefyt, P. Vieira, T. Mosmann, Interleukin-10, *Annual Review of Immunology*. 11 (1993) 165–190.
- [273] D. Jankovic, D.G. Kugler, A. Sher, IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation, *Mucosal Immunology*. 3 (2010) 239.
- [274] L. Huitema, T. Phillips, V. Alexeev, O. Igoucheva, Immunological mechanisms underlying progression of chronic wounds in recessive dystrophic epidermolysis bullosa, *Experimental Dermatology*. 30 (2021) 1724–1733.
- [275] L. Huitema, T. Phillips, V. Alexeev, M. Tomic-Canic, I. Pastar, O. Igoucheva, Intracellular escape strategies of *Staphylococcus aureus* in persistent cutaneous infections, *Experimental Dermatology*. 30 (2021) 1428.
- [276] D. Childs, A. Murthy, Overview of Wound Healing and Management, *The Surgical Clinics of North America*. 97 (2017).
- [277] M.M. Tiemessen, A.L. Jagger, H.G. Evans, M.J.C. van Herwijnen, S. John, L.S. Taams, CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (2007) 19446.
- [278] T. Hirai, S.K. Whitley, D.H. Kaplan, Migration and Function of Memory CD8+ T Cells in Skin, *J Invest Dermatol*. 140 (2020) 748–755.
- [279] M.O. Li, Y.Y. Wan, R.A. Flavell, T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation, *Immunity*. 26 (2007) 579–591.
- [280] P. Baeten, L. Van Zeebroeck, M. Kleinewietfeld, N. Hellings, B. Broux, Improving the Efficacy of Regulatory T Cell Therapy, *Clinic Rev Allerg Immunol*. 62 (2022) 363–381.
- [281] N. Marek, M. Bieniaszewska, A. Krzystyniak, J. Juścińska, J. Myśliwska, P. Witkowski, A. Hellmann, P. Trzonkowski, The Time is Crucial for Ex Vivo Expansion of T Regulatory Cells for Therapy, *Cell Transplant*. 20 (2011) 1747–1758.
- [282] M. Rossetti, R. Spreafico, S. Saidin, C. Chua, M. Moshref, J.Y. Leong, Y.K. Tan, J. Thumboo, J. van Loosdregt, S. Albani, Ex Vivo–Expanded but Not In Vitro–Induced Human Regulatory T Cells Are Candidates for Cell Therapy in Autoimmune Diseases Thanks to Stable Demethylation of the FOXP3 Regulatory T Cell–Specific Demethylated Region, *The Journal of Immunology*. 194 (2015) 113–124.
- [283] N. Safinia, T. Vaikunthanathan, H. Fraser, S. Thirkell, K. Lowe, L. Blackmore, G. Whitehouse, M. Martinez-Llordella, W. Jassem, A. Sanchez-Fueyo, R.I. Lechler, G. Lombardi, Successful expansion of functional and stable regulatory T cells for immunotherapy in liver transplantation, *Oncotarget*. 7 (2016) 7563–7577.
- [284] P. Baeten, N. Hellings, B. Broux, In Vitro Tailoring of Regulatory T Cells Prior to Cell Therapy, *Trends in Molecular Medicine*. 26 (2020) 1059–1060.

- [285] M. Vaeth, Y.-H. Wang, M. Eckstein, J. Yang, G.J. Silverman, R.S. Lacruz, K. Kannan, S. Feske, Tissue resident and follicular Treg cell differentiation is regulated by CRAC channels, *Nat Commun.* 10 (2019) 1183.
- [286] G.J. Godoy, D.A. Paira, C. Olivera, M.L. Breser, L.R. Sanchez, R.D. Motrich, V.E. Rivero, Differences in T regulatory cells between mouse strains frequently used in immunological research, *Immunology Letters.* 223 (2020) 17–25.
- [287] A.S.D. Groot, L. Moise, J.A. McMurry, E. Wambre, L.V. Overtvelt, P. Moingeon, D.W. Scott, W. Martin, Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc–derived peptide “Tregitopes,” *Blood.* 112 (2008) 3303.
- [288] L.P. Cousens, N. Najafian, F. Mingozzi, W. Elyaman, B. Mazer, L. Moise, T.J. Messitt, Y. Su, M. Sayegh, K. High, S.J. Khoury, D.W. Scott, A.S. De Groot, In Vitro and In Vivo Studies of IgG-derived Treg Epitopes (Tregitopes): A Promising New Tool for Tolerance Induction and Treatment of Autoimmunity, *J Clin Immunol.* 33 (2013) 43–49.
- [289] M.U. Norman, Z. Chow, S.L. Snelgrove, P. Prakongtham, M.J. Hickey, Dynamic Regulation of the Molecular Mechanisms of Regulatory T Cell Migration in Inflamed Skin, *Front Immunol.* 12 (2021) 655499.
- [290] H. Ka, K. Hr, K. I, Aging and human CD4(+) regulatory T cells, *Mechanisms of Ageing and Development.* 130 (2009).
- [291] A.M. Thornton, E.M. Shevach, CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production, *The Journal of Experimental Medicine.* 188 (1998) 287.
- [292] M. Arakawa, T. Dainichi, N. Ishii, T. Hamada, T. Karashima, T. Nakama, S. Yasumoto, D. Tsuruta, T. Hashimoto, Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid, *Exp Dermatol.* 20 (2011) 1022–1024.
- [293] A. Cope, H. Schulze-Koops, M. Aringer, The central role of T cells in rheumatoid arthritis, *Clinical and Experimental Rheumatology.* 25 (2007).
- [294] C. Selck, M. Dominguez-Villar, Antigen-Specific Regulatory T Cell Therapy in Autoimmune Diseases and Transplantation, *Front. Immunol.* 12 (2021).
- [295] Q. Tang, K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, J.A. Bluestone, In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes, *J Exp Med.* 199 (2004) 1455–1465.
- [296] E.B. Okeke, J.E. Uzonna, The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells, *Frontiers in Immunology.* 10 (2019).
- [297] M.A. Arnaout, Biology and structure of leukocyte $\beta 2$ integrins and their role in inflammation, *F1000Res.* 5 (2016) 2433.
- [298] Y. Miyazaki, A. Vieira-de-Abreu, E. Harris, A. Shah, A. Weyrich, H. Castro-Faria-Neto, G. Zimmerman, Integrin $\alpha D\beta 2$ (CD11d/CD18) is expressed by human circulating and tissue myeloid leukocytes and mediates inflammatory signaling, *PloS One.* 9 (2014).
- [299] J.P. Mizgerd, H. Kubo, G.J. Kutkoski, S.D. Bhagwan, K. Scharffetter-Kochanek, A.L. Beaudet, C.M. Doerschuk, Neutrophil Emigration in the Skin, Lungs, and Peritoneum: Different Requirements for CD11/CD18 Revealed by CD18-deficient Mice, *The Journal of Experimental Medicine.* 186 (1997) 1357.
- [300] S. Leung, X. Liu, L. Fang, X. Chen, T. Guo, J. Zhang, The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease, *Cellular and Molecular Immunology.* 7 (2010) 182.
- [301] X.O. Yang, R. Nurieva, G.J. Martinez, H.S. Kang, Y. Chung, B.P. Pappu, B. Shah, S.H. Chang, K.S. Schluns, S.S. Watowich, X.-H. Feng, A.M. Jetten, C. Dong, Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs, *Immunity.* 29 (2008) 44.
- [302] X. Zhou, S. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martínez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, J.A. Bluestone, Foxp3 instability leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo, *Nat Immunol.* 10 (2009) 1000–1007.

- [303] S.A. McClymont, A.L. Putnam, M.R. Lee, J.H. Esensten, W. Liu, M.A. Hulme, U. Hoffmüller, U. Baron, S. Olek, J.A. Bluestone, T.M. Brusko, Plasticity of Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes, *J Immunol.* 186 (2011) 3918–3926.
- [304] W. Du, Y.-W. Shen, W.-H. Lee, D. Wang, S. Paz, F. Kandeel, C.-P. Liu, Foxp3⁺ Treg Expanded from Patients with Established Diabetes Reduce Helios Expression while Retaining Normal Function Compared to Healthy Individuals, *PLoS One.* 8 (2013) e56209.
- [305] A. Kitz, M. de Marcken, A. Gautron, M. Mitrovic, D.A. Hafler, M. Dominguez-Villar, AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease, *EMBO Rep.* 17 (2016) 1169–1183.
- [306] N. Rakebrandt, K. Littringer, N. Joller, Regulatory T cells: balancing protection versus pathology, *Swiss Med Wkly.* 146 (2016) w14343.
- [307] A. Hatzioannou, A. Boumpas, M. Papadopoulou, I. Papafragkos, A. Varveri, T. Alissafi, P. Verginis, Regulatory T Cells in Autoimmunity and Cancer: A Duplicitous Lifestyle, *Front Immunol.* 12 (2021) 731947.
- [308] S. Piconese, E. Timperi, V. Barnaba, ‘Hardcore’ OX40⁺ immunosuppressive regulatory T cells in hepatic cirrhosis and cancer, *Oncoimmunology.* 3 (2014) e29257.
- [309] N. Komatsu, K. Okamoto, S. Sawa, T. Nakashima, M. Oh-hora, T. Kodama, S. Tanaka, J.A. Bluestone, H. Takayanagi, Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis, *Nat Med.* 20 (2014) 62–68.
- [310] H.J. Bovenschen, P.C. van de Kerkhof, P.E. van Erp, R. Woestenenk, I. Joosten, H.J.P.M. Koenen, Foxp3⁺ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin, *J Invest Dermatol.* 131 (2011) 1853–1860.
- [311] T. Wang, X. Sun, J. Zhao, J. Zhang, H. Zhu, C. Li, N. Gao, Y. Jia, D. Xu, F.-P. Huang, N. Li, L. Lu, Z.-G. Li, Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood, *Ann Rheum Dis.* 74 (2015) 1293–1301.
- [312] Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder, RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nat Rev Genet.* 10 (2009) 57–63.
- [313] J.-C. Hegenbarth, G. Lezcoche, L.J. De Windt, M. Stoll, Perspectives on Bulk-Tissue RNA Sequencing and Single-Cell RNA Sequencing for Cardiac Transcriptomics, *Frontiers in Molecular Medicine.* 2 (2022).
- [314] W. Zhang, H.T. Liu, MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, *Cell Res.* 12 (2002) 9–18.
- [315] J. Zhu, C.B. Thompson, Metabolic regulation of cell growth and proliferation, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20 (2019) 436–450.
- [316] P. Lu, K. Takai, V.M. Weaver, Z. Werb, Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 (2011) a005058.
- [317] D. Shi, P. Jiang, A Different Facet of p53 Function: Regulation of Immunity and Inflammation During Tumor Development, *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 9 (2021).
- [318] O. Yoshie, K. Matsushima, CCR4 and its ligands: from bench to bedside, *Int Immunol.* 27 (2015) 11–20.
- [319] B.D. Sather, P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowicz, J.D. Fontenot, A.Y. Rudensky, D.J. Campbell, Altering the distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease, *The Journal of Experimental Medicine.* 204 (2007) 1335.
- [320] N. Ali, M.D. Rosenblum, Regulatory T cells in skin, *Immunology.* 152 (2017) 372–381.
- [321] R. Janssens, S. Struyf, P. Proost, The unique structural and functional features of CXCL12, *Cellular and Molecular Immunology.* 15 (2018) 299.
- [322] K.J. Eash, J.M. Means, D.W. White, D.C. Link, CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions, *Blood.* 113 (2009) 4711.
- [323] H.M. Isles, K.D. Herman, A.L. Robertson, C.A. Loynes, L.R. Prince, P.M. Elks, S.A. Renshaw, The CXCL12/CXCR4 Signaling Axis Retains Neutrophils at Inflammatory Sites in Zebrafish, *Frontiers in Immunology.* 10 (2019).

- [324] S. Cambier, M. Gouwy, P. Proost, The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention, *Cell Mol Immunol.* 20 (2023) 217–251.
- [325] X. Liu, B. Ma, A.B. Malik, H. Tang, T. Yang, B. Sun, G. Wang, R.D. Minshall, Y. Li, Y. Zhao, R.D. Ye, J. Xu, Bidirectional Regulation of Neutrophil Migration by MAP Kinases, *Nature Immunology.* 13 (2012) 457.
- [326] D. Kim, C.L. Haynes, The Role of p38 MAPK in Neutrophil Functions: Single Cell Chemotaxis and Surface Marker Expression, *The Analyst.* 138 (2013).
- [327] S. Huber, J. Schrader, G. Fritz, K. Presser, S. Schmitt, A. Waisman, S. Lüth, M. Blessing, J. Herkel, C. Schramm, P38 MAP Kinase Signaling Is Required for the Conversion of CD4+CD25– T Cells into iTreg, *PLoS ONE.* 3 (2008).

Anhang

Tab. A1: Belastungstabelle der Mäuse des Therapieversuches mit niedrigdosiertem IL-2 bzw. IL-2-Antikörperkomplexes im Ak-EBA-Mausmodell. Auflistung der Einordnung der einzelnen Mäuse in ihrer jeweiligen Gruppe, ihrer ID, Geschlechts und der zugehörigen Mauslinie mit ihrem Gewicht vor Beginn des Versuches und am Ende des Versuches, der mit EBA prozentualen betroffenen Körperoberfläche am Endtag, sowie die gesamte Endbelastung am Ende des Versuches. Dabei ergibt eine Endbelastung zwischen 1-10 eine geringe, zwischen 11-20 eine mittlere und eine über 20 eine schwere Gesamtbelastung.

Experimental-Gruppe	Maus-ID	Geschlecht	Mauslinie	Anfangsgewicht (g)	Endgewicht (g)	EBA-Wert am Endtag (%)	Endbelastung
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	93600	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	20	20	9,68	7
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	92970	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	24	20	3,93	13
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	93613	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	21	20	7,79	8
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	93603	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	22	18	3,44	13
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	92194	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	21	20	2,14	4
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	92180	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	23	20	5,47	17
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	92191	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	25	22	6,85	17
1 µg IL-2 / 5 µg mAb IL-2	92182	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	28	26	6,18	12
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	92969	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	24	22	5,59	12
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	92198	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	20	20	5,90	7
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	93612	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	19	18	7,64	12
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	93605	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	19	20	5,27	7
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	93602	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	21	20	5,34	8
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	92193	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	15	16	7,80	7
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	92185	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	22	22	6,27	7
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	92190	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	26	24	5,98	12
1,5 µg IL-2 / 50 µg mAb IL-2	92183	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	29	26	6,14	12
Proleukin S (25.000 IU)	92197	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	22	20	6,86	12
Proleukin S (25.000 IU)	92195	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	23	22	3,21	4
Proleukin S (25.000 IU)	93606	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	21	21	0,10	1

Proleukin S (25.000 IU)	92968	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	27	26	5,34	8
Proleukin S (25.000 IU)	92192	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	21	18	3,23	13
Proleukin S (25.000 IU)	92188	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	23	22	2,22	4
Proleukin S (25.000 IU)	92184	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	23	22	5,43	8
Proleukin S (25.000 IU)	92181	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	26	22	6,01	17
Proleukin S (25.000 IU)	92179	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	23	22	1,56	8
PBS	93607	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	24	20	3,34	11
PBS	93598	f	B6-Foxp3-GFP (+/+)	20	20	5,62	5
PBS	92967	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	28	26	5,00	10
PBS	93601	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	21	20	3,70	4
PBS	92196	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	24	22	4,56	8
PBS	93604	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	22	20	3,58	8
PBS	92189	f	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	21	20	1,67	4
PBS	92187	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	32	28	4,09	13
PBS	92186	m	B6-Foxp3-GFP (+/tg)	28	26	5,57	12

Tab. A2: Belastungstabelle der Mäuse des Therapieversuches mit adoptiven Treg Transfer im Ak-EBA-Mausmodell. Auflistung der Einordnung der einzelnen Mäuse in ihrer jeweiligen Gruppe, ihrer ID, Geschlechts und der zugehörigen Mauslinie mit ihrem Gewicht vor Beginn des Versuches und am Ende des Versuches, der mit EBA prozentualen betroffenen Körperoberfläche am Endtag, sowie die gesamte Endbelastung am Ende des Versuches. Dabei ergibt eine Endbelastung zwischen 1-10 eine geringe, zwischen 11-20 eine mittlere und eine über 20 eine schwere Gesamtbelastung.

Experimental-Gruppe	Maus-ID	Geschlecht	Mauslinie	Anfangsgewicht (g)	Endgewicht (g)	EBA-Wert am Endtag (%)	Endbelastung
1x10 ⁶ Tregs	97183	f	B6-Foxp3-GFP (+/+)	26	24	0,70	7
1x10 ⁶ Tregs	97994	f	B6-Foxp3-GFP (+/+)	22	21	5,66	7
1x10 ⁶ Tregs	97197	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	32	30	0,80	8
1x10 ⁶ Tregs	101430	f	C57BL/6J_AG Ludwig	23	20	2,42	17
1x10 ⁶ Tregs	101424	f	C57BL/6J_AG Ludwig	23	23	2,62	2
1x10 ⁶ Tregs	101426	m	C57BL/6J_AG Ludwig	30	25	2,90	17
1x10 ⁶ Tregs	103000	m	C57BL/6J_AG Ludwig	23	21	4,81	12

1x106 Tregs	102920	m	C57BL/6J_AG Ludwig	23	22	2,05	8
1x106 Tregs	102916	m	C57BL/6J_AG Ludwig	30	25	2,56	17
0,5x106 Tregs	97182	f	B6-Foxp3-GFP (+/+)	27	25	2,08	7
0,5x106 Tregs	97179	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	28	27	5,22	11
0,5x106 Tregs	97196	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	29	29	1,66	1
0,5x106 Tregs	101431	f	C57BL/6J_AG Ludwig	22	22	3,92	2
0,5x106 Tregs	101425	f	C57BL/6J_AG Ludwig	16	19	4,83	2
0,5x106 Tregs	101427	m	C57BL/6J_AG Ludwig	27	23	1,18	17
0,5x106 Tregs	103001	m	C57BL/6J_AG Ludwig	22	21	3,56	8
0,5x106 Tregs	102921	m	C57BL/6J_AG Ludwig	16	21	2,88	7
0,5x106 Tregs	102917	m	C57BL/6J_AG Ludwig	27	23	2,58	17
0,2x106 Tregs	97184	f	B6-Foxp3-GFP (+/+)	24	24	1,12	1
0,2x106 Tregs	97178	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	33	27	9,13	17
0,2x106 Tregs	97194	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	33	29	2,65	13
0,2x106 Tregs	101434	f	C57BL/6J_AG Ludwig	21	22	3,63	2
0,2x106 Tregs	101428	f	C57BL/6J_AG Ludwig	23	22	1,08	3
0,2x106 Tregs	101432	m	C57BL/6J_AG Ludwig	26	22	0,10	17
0,2x106 Tregs	103002	m	C57BL/6J_AG Ludwig	21	21	3,31	7
0,2x106 Tregs	102922	m	C57BL/6J_AG Ludwig	23	21	5,06	16
0,2x106 Tregs	102918	m	C57BL/6J_AG Ludwig	26	23	3,69	17
PBS	97185	f	B6-Foxp3-GFP (+/+)	22	19	3,92	13
PBS	97181	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	30	25	2,75	17
PBS	97190	m	B6-Foxp3-GFP (+/+)	33	27	4,29	13
PBS	101435	f	C57BL/6J_AG Ludwig	22	21	5,55	7
PBS	101429	f	C57BL/6J_AG Ludwig	20	21	5,11	7
PBS	101433	m	C57BL/6J_AG Ludwig	28	23	4,43	31
PBS	103003	m	C57BL/6J_AG Ludwig	22	20	5,78	16

PBS	102923	m	C57BL/6J_AG Ludwig	20	20	7,22	11
PBS	102919	m	C57BL/6J_AG Ludwig	28	25	0,40	16

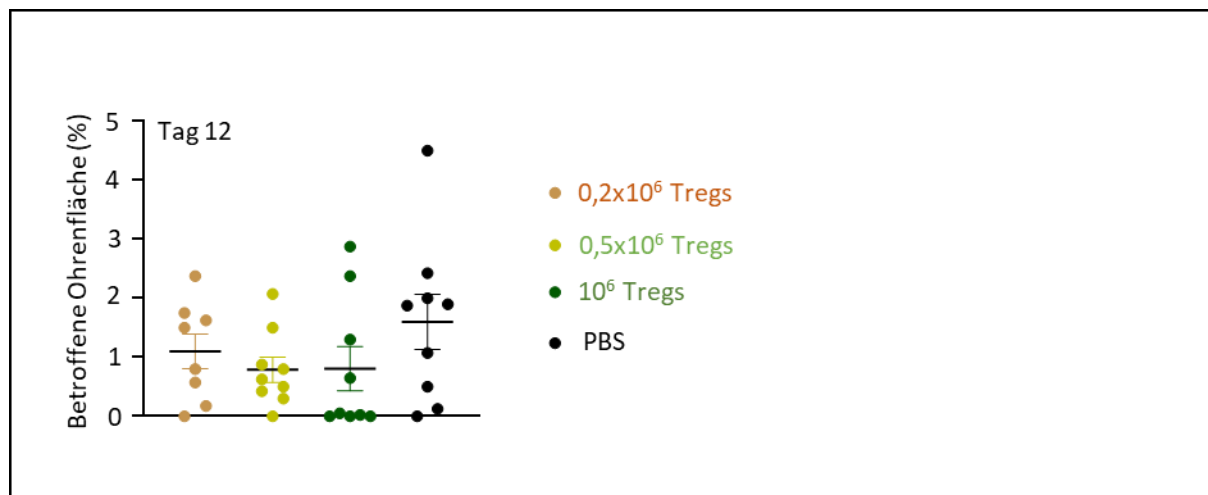


Abb. A1: Kein Unterschied des EBA-Scores der Ohren der nach adoptiven Treg Transfer zur Positivkontrolle an Tag Zwölf. Abbildung der mit EBA betroffenen prozentualen Fläche der Ohren der einzelnen Therapiegruppen (0,2x10⁶, 0,5x10⁶ und 10⁶Tregs) und der Positivgruppe (PBS) an Tag Zwölf (Endtag des Versuches) nach erstmaliger Injektion des mCOL7^{c-GST} IgGs zur Induktion der Ak-EBA. Es ergab sich kein statistischer Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Ak-EBA: Antikörpertransfer-induzierte *Epidermolysis bullosa acquisita*.

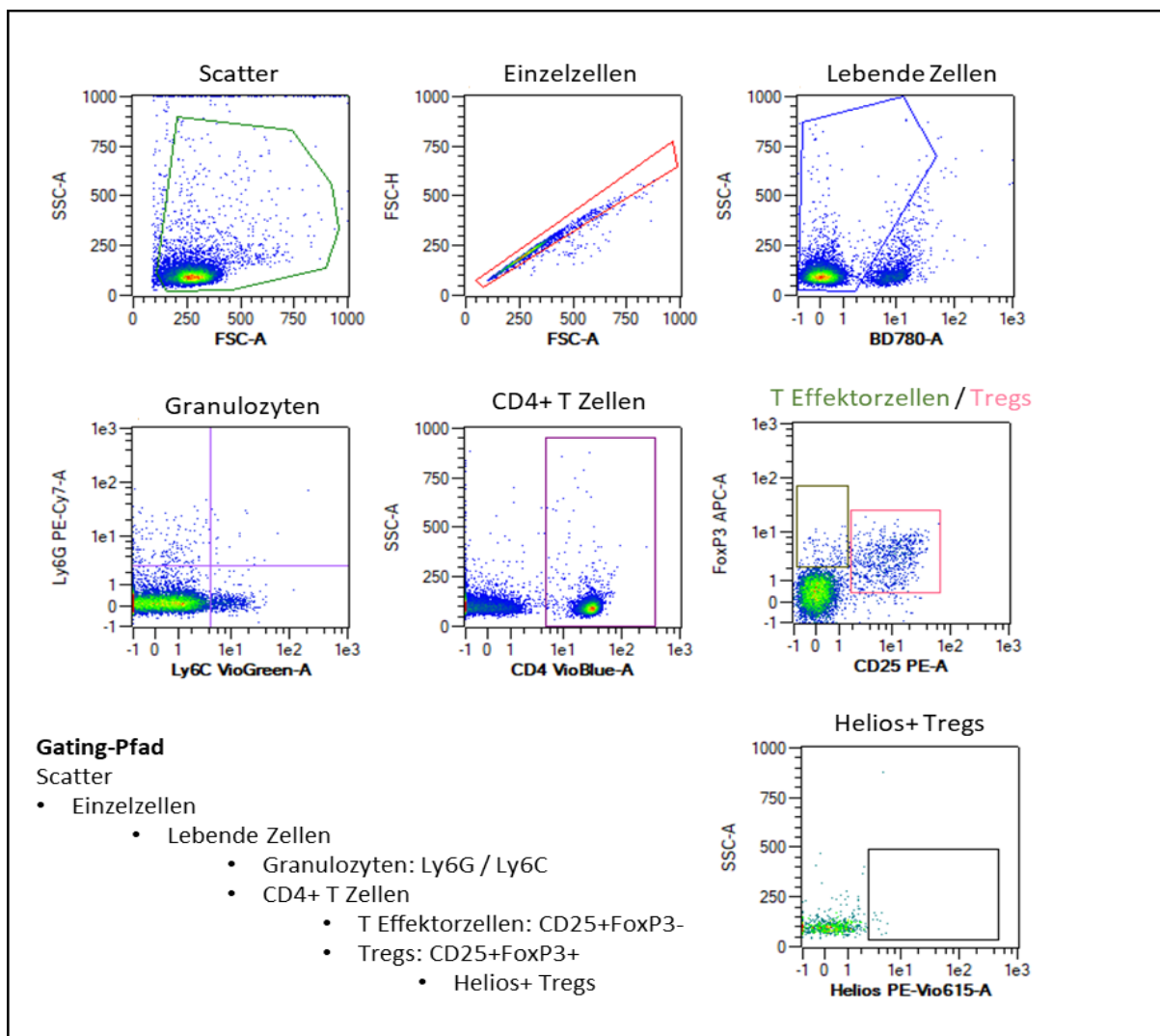


Abb. A2: Gating-Strategie des durchflusszytomtrischen Panels für die Identifikation von Tregs und Granulozyten am Beispiel einer Probe vom mesenterialen Lymphknoten. Für die Erfassung von Tregs und Granulozyten wurden Zellen aus Blut, mesenterialen Lymphknoten, Milz und lässionaler Haut von den Therapiegruppen (10^6 transferierte Tregs, $1 \mu\text{g}$ IL-2 / $5 \mu\text{g}$ anti-IL-2 mAk; $1,5 \mu\text{g}$ IL-2 / $50 \mu\text{g}$ anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der jeweiligen Positivkontrolle (PBS) am Durchflusszytomteter gemessen. Die Zellen wurden zunächst in einem FSC-A und SSC-A Plot betrachtet und gegatet (Scatter). Im Scatter liegende Zellen wurden mittels eines FSC-A gegen FSC-H Plot auf Einzelzellen gegatet und anschließend mit einem fixierbaren Lebend-Todfarbstoff (BD780-A) auf tote Zellen gefärbt. Nur lebende Zellen (negatives Signal für BD780) wurden anschließend einmal auf Ly6G PE-Cy7-A und Ly6C VioGreen-A für Granulozyten und auf CD4 VioBlue-A für T Zellen gegatet. Von den CD4+ Zellen wurden mittels einer Gegenüberstellung von CD25 PE-A und FoxP3 APC-A T Effektorzellen (CD25+FoxP3-) und Tregs (CD25+FoxP3+) voneinander unterschieden. Tregs wurden zuletzt noch in einem SSC-A – Helios PE-Vio615-A Plot auf eine positive Helios-Expression untersucht. A: *area* (Fläche); H: *height* (Höhe).

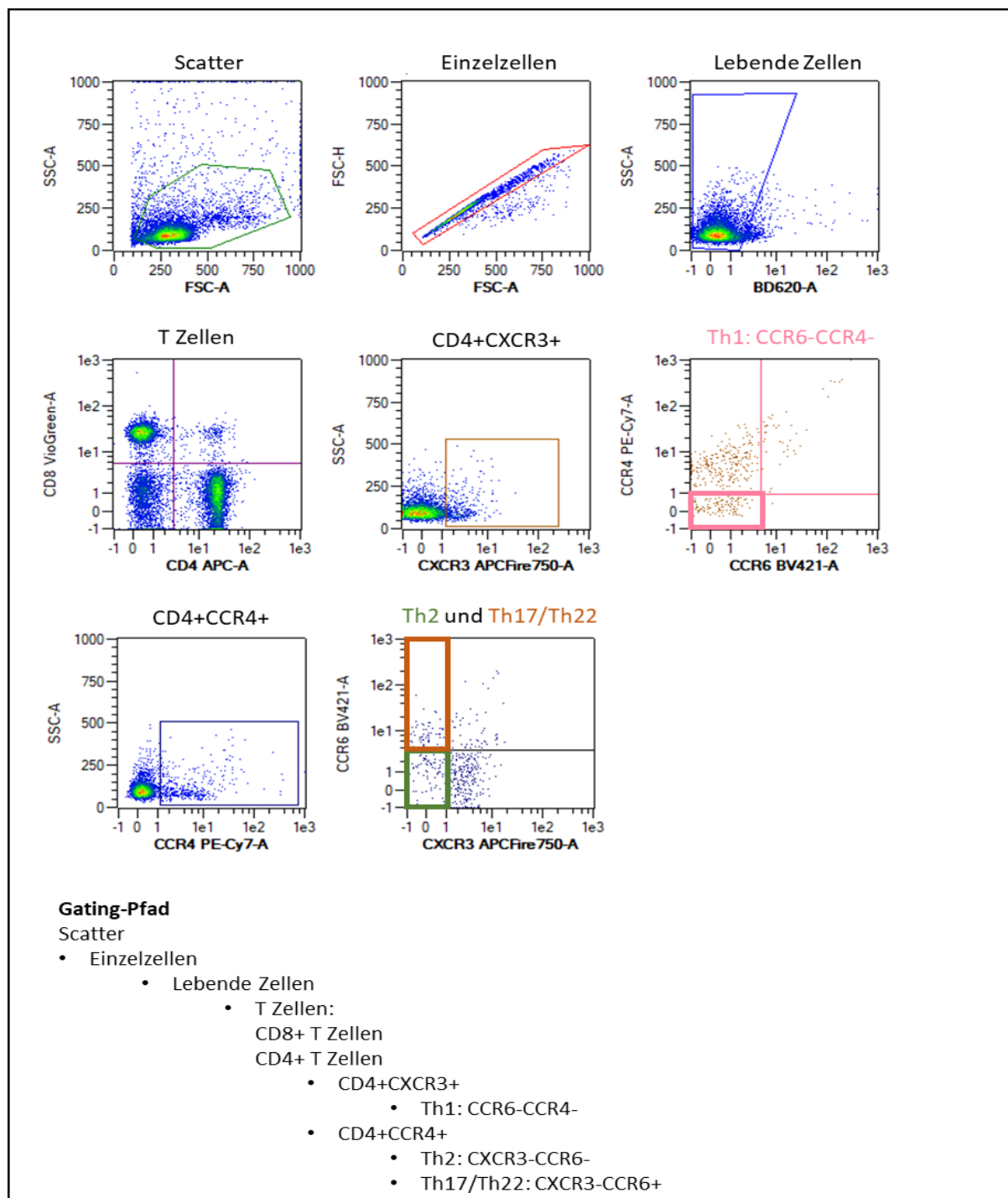


Abb. A3: Beispiel des Gatings der T Helferzellen (Th) Klassen an einer Probe von einem mesenterialen Lymphknoten. Zur Analyse der Th Zellen wurden Zellen aus Blut, mesenterialen Lymphknoten, Milz und lässionaler Haut von den Therapiegruppen (10^6 transferierte Tregs, $1 \mu\text{g}$ IL-2 / $5 \mu\text{g}$ anti-IL-2 mAk; $1,5 \mu\text{g}$ IL-2 / $50 \mu\text{g}$ anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der jeweiligen Positivkontrolle (PBS) am Durchflusszytometer gemessen. Die Zellen wurden zunächst in einem FSC-A und SSC-A Plot betrachtet und gegatet (Scatter). Im Scatter liegende Zellen wurden mittels eines FSC-A gegen FSC-H Plot auf Einzelzellen gegatet und anschließend mit einem fixierbaren Lebend-Todfarbstoff (BD620-A) auf tote Zellen gefärbt. Nur lebende Zellen (negatives Signal für BD620) wurden anschließend auf CD8+ und CD4+ T Zellen in einem CD4 APC-A und CD8 VioGreen-A Plot gegatet. CD4+ T Zellen wurden entweder auf CXCR3+ (SSC-A vs CXCR3 APCFire 750-A) bzw. CCR4+ (SSC-A vs CCR4 PE-Cy7-A) Zellen gegatet. Vom ersten Gate wurden Th1 Zellen mittels eines CCR6 BV421-A und CCR4 PE-Cy7-A Plot (Th1 für beide Marker negativ) und vom zweiten Gate wurden in einem CCR6 BV421-A und CXCR3 APCFire 750-A Plot einmal Th2 Zellen (CXCR3-CCR6-) und Th17/Th22 Zellen (CXCR3-CCR6+) erfasst. A: *area* (Fläche); H: *height* (Höhe). Th: T Helferzelle.

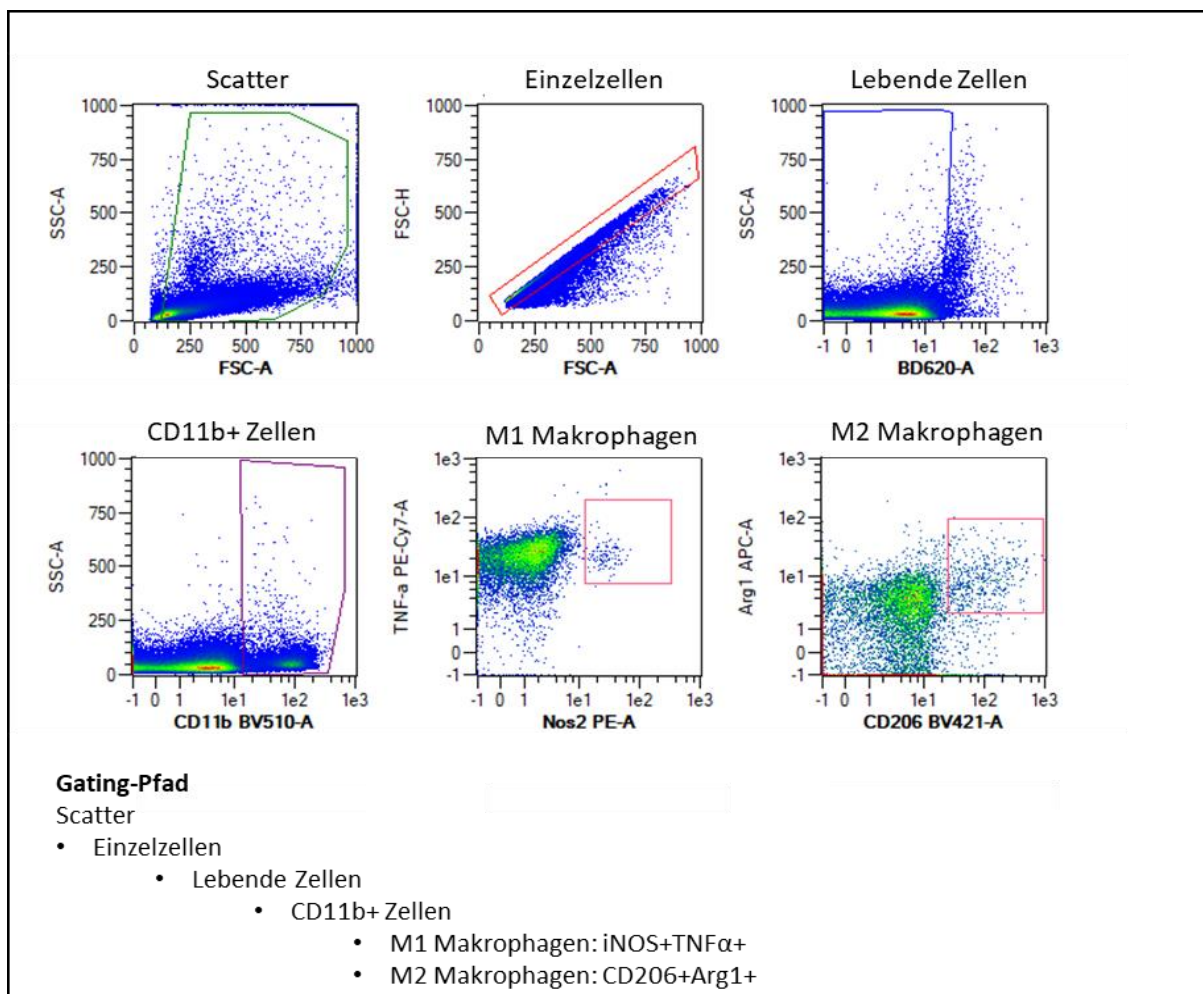


Abb. A4: Gating-Reihenfolge für die Erfassung von M1 und M2 Makrophagen mittel Durchflusszytometrie am Beispiel einer Probe aus der Milz. Makrophagen aus Blut, mesenterialen Lymphknoten, Milz und läsionaler Haut von den Therapiegruppen (10^6 transferierte Tregs, 1 μ g IL-2 / 5 μ g anti-IL-2 mAk; 1,5 μ g IL-2 / 50 μ g anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der jeweiligen Positivkontrolle (PBS) wurden am Durchflusszytometer gemessen. Die Zellen wurden zunächst in einem FSC-A und SSC-A Plot betrachtet und gegatet (Scatter). Im Scatter liegende Zellen wurden mittels eines FSC-A gegen FSC-H Plot auf Einzelzellen gegatet und anschließend mit einem fixierbaren Lebend-Todfarbstoff (BD620-A) auf tote Zellen gefärbt. Nur lebende Zellen (negatives Signal für BD620) wurden anschließend in einem SSC-A – CD11b BV510-A Plot auf CD11b+ Zellen gegatet. Zur Unterscheidung von M1 und M2 Makrophagen wurden CD11b+ Zellen einmal in einem Nos2 PE-A (iNOS) vs TNF- α PE-Cy7-A Plot (M1 positiv für beide Marker) und in einem CD206 BV421-A vs Arg1 APC-A Plot (M2 positiv für beide Marker) betrachtet. A: *area* (Fläche); H: *height* (Höhe). M: Makrophagenpopulation.

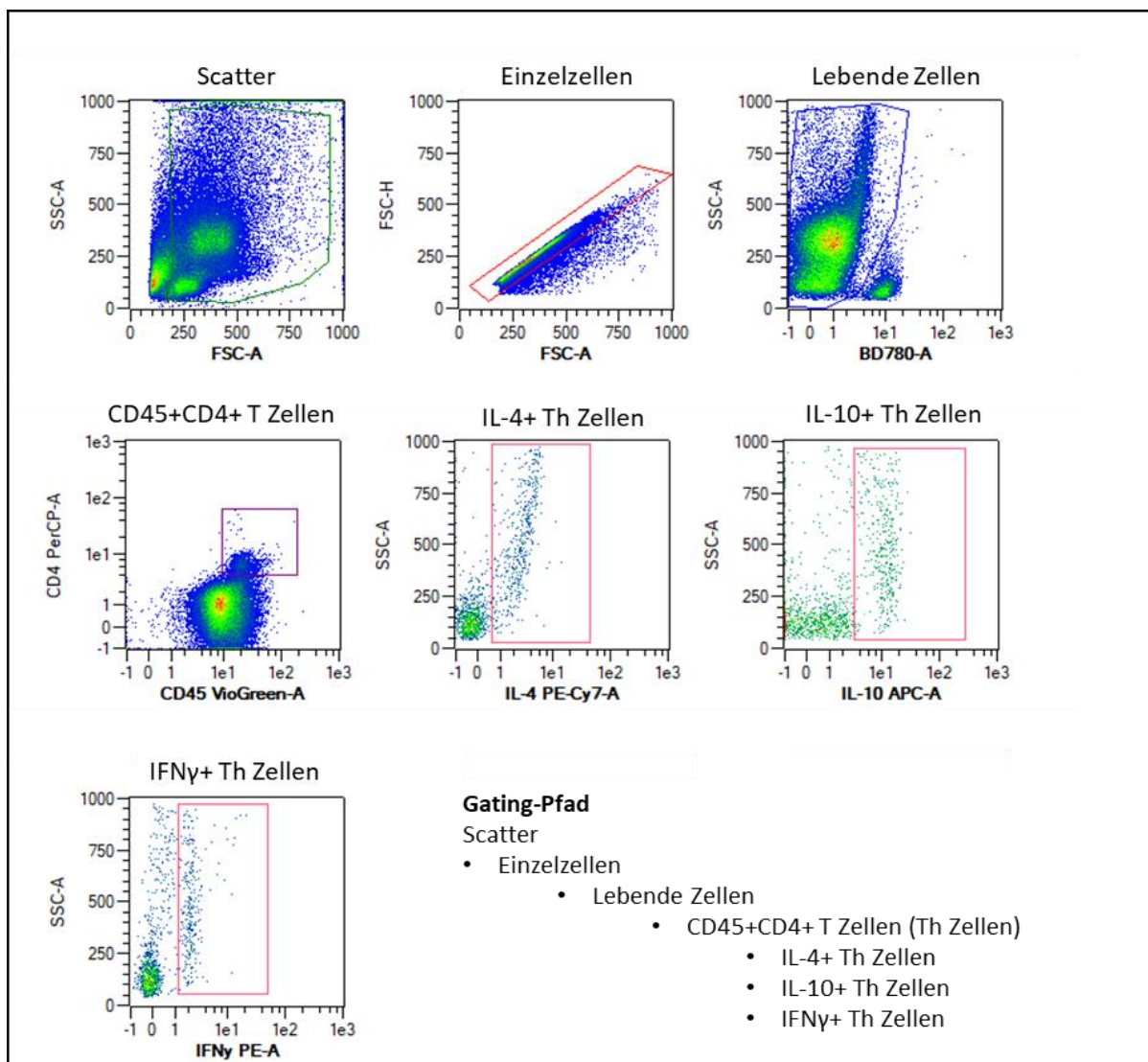


Abb. A5: Gating-Strategie des durchflusszytometrische Panels für die Messung der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN γ innerhalb von CD4+ T Zellen am Beispiel einer Blutprobe. IL-4-, IL-10- und IFN- γ -produzierende CD4+ T Zellen aus Blut, mesenterialen Lymphknoten, Milz und läSIONALER Haut von den Therapiegruppen (10^6 transferierte Tregs, 1 μ g IL-2 / 5 μ g anti-IL-2 mAk; 1,5 μ g IL-2 / 50 μ g anti-IL-2 mAk und 25.000 IU Proleukin S) und der jeweiligen Positivkontrolle (PBS) wurden am Durchflusszytomter gemessen. Die Zellen wurden zunächst in einem FSC-A und SSC-A Plot betrachtet und gegatet (Scatter). Im Scatter liegende Zellen wurden mittels eines FSC-A gegen FSC-H Plot auf Einzelzellen gegatet und anschließend mit einem fixierbaren Lebend-Todfarbstoff (BD780-A) auf tote Zellen gefärbt. Nur lebende Zellen (negatives Signal für BD780) wurden anschließend auf CD45+CD4+ T zellen (CD45 VioGreen-A vs CD4 PerCP-A Plot) gegatet. Von diesen Zellen ausgehend wurde jeweils auf die positiven Signale der jeweiligen Zytokine (IL-4 PE-Cy7-A, IL-10 APC-A und IFN- γ PE-A jeweils gegen SSC-A) gegatet, um die Zytokin produzierenden CD4+ T Zellen zu erfassen. A: *area* (Fläche); H: *height* (Höhe). IL: Interleukin; INF: Interferon.

Tab. A3: Liste der signifikant veränderten Gene der sequenzierten totalen RNA aus Haut. Auflistung der 429 veränderten Gene aus läsionaler Haut nicht-behandelter und mit 10^6 adoptiv transferierten Tregs behandelten Mäuse aus dem Ak-EBA-Mausmodell und aus gesunder Haut unbehauelter Mäuse, welche in beiden Vergleichen zwischen läsionaler nicht-behandelter Mäuse und nicht-läsionaler Haut gesunder Mäuse, sowie zwischen beiden Gruppen der läsionalen Häuten signifikant in ihrer Expression verändert waren.

Genname	Base-Mean	log2FoldChange		p-Wert		angepasster p-Wert	
		läsional vs nicht-läsional	10^6 Tregs vs läsional	läsional vs nicht-läsional	10^6 Tregs vs läsional	läsional vs nicht-läsional	10^6 Tregs vs läsional
Ryr1	1,15E+04	-7,50E+00	-2,15E+01	1,06E-07	5,15E-24	2,64E-06	8,43E-20
Draxin	1,19E+02	6,52E+00	-4,22E+00	2,49E-48	2,61E-23	4,08E-44	2,13E-19
Fibin	3,94E+02	3,08E+00	-2,86E+00	4,16E-14	3,20E-10	4,66E-12	3,75E-07
Il1r1	1,06E+03	1,29E+00	-2,11E+00	1,11E-05	4,64E-10	1,57E-04	4,22E-07
Lpin1	2,04E+02	-1,61E+00	-7,82E+00	2,47E-03	3,20E-09	1,46E-02	2,49E-06
Rdh10	3,57E+02	1,70E+00	-1,33E+00	5,12E-14	3,01E-08	5,59E-12	1,82E-05
Unc93a	1,27E+01	2,68E+00	-6,76E+00	5,40E-06	3,98E-08	8,50E-05	2,19E-05
Ptgfrn	2,19E+03	7,78E-01	-1,54E+00	1,18E-03	4,27E-08	8,06E-03	2,19E-05
Scoc	4,73E+01	-1,10E+00	-6,37E+00	7,72E-03	1,16E-07	3,53E-02	5,28E-05
Pcsk5	6,39E+02	4,18E+00	-3,45E+00	2,76E-12	1,28E-07	2,09E-10	5,39E-05
Atp1b2	1,50E+02	-2,60E+00	-6,61E+00	1,28E-05	1,56E-07	1,78E-04	6,09E-05
Saa1	7,96E+01	6,78E+00	-5,20E+00	6,26E-13	1,66E-07	5,54E-11	6,31E-05
Tbx5	1,29E+01	2,24E+00	-6,63E+00	4,16E-04	3,55E-07	3,44E-03	1,21E-04
Chl1	1,11E+03	-1,55E+00	-1,53E+00	4,33E-08	5,33E-07	1,19E-06	1,68E-04
Rtn4r12	2,94E+01	2,20E+00	-4,45E+00	2,08E-04	6,39E-07	1,93E-03	1,97E-04
Slc38a4	2,87E+02	-1,33E+00	-7,55E+00	2,02E-02	7,69E-07	7,43E-02	2,21E-04
Tbx18	1,05E+02	2,91E+00	-2,16E+00	6,10E-12	9,34E-07	4,32E-10	2,55E-04
Emilin1	5,24E+02	3,29E+00	-2,20E+00	9,35E-14	1,17E-06	9,56E-12	3,04E-04
Slit3	6,85E+02	1,25E+00	-1,79E+00	1,32E-04	1,15E-06	1,32E-03	3,04E-04
Flg2	1,41E+03	-3,55E+00	-6,51E+00	5,18E-05	1,50E-06	5,96E-04	3,77E-04
Col12a1	1,91E+03	5,24E+00	-2,83E+00	1,92E-19	1,93E-06	6,42E-17	4,64E-04
Nosip	2,42E+01	-8,92E-01	-5,51E+00	2,27E-02	2,65E-06	8,08E-02	5,86E-04
Angptl2	1,61E+03	1,14E+00	-1,66E+00	3,25E-04	2,81E-06	2,79E-03	6,14E-04
Kdelr2	1,30E+03	1,17E+00	-8,02E-01	3,89E-11	3,44E-06	2,25E-09	7,04E-04
Ikbip	3,95E+02	1,84E+00	-1,80E+00	9,36E-07	4,55E-06	1,86E-05	8,77E-04
Creb3l2	7,52E+02	6,88E-01	-1,33E+00	6,59E-03	5,27E-06	3,13E-02	1,00E-03
Vasn	7,61E+02	6,78E-01	-1,34E+00	8,44E-03	6,37E-06	3,78E-02	1,13E-03
Cdk5rap2	1,87E+02	6,74E-01	-1,33E+00	8,41E-03	7,32E-06	3,77E-02	1,26E-03
Srp14	4,56E+01	2,23E+00	-5,02E+00	1,73E-03	8,93E-06	1,10E-02	1,49E-03
Crtap	9,76E+02	1,04E+00	-6,60E-01	1,79E-11	9,24E-06	1,11E-09	1,53E-03
Selenof	2,83E+03	8,46E-01	-7,29E-01	7,68E-07	1,12E-05	1,56E-05	1,79E-03
Mdk	2,24E+01	1,54E+00	-6,74E+00	1,56E-02	1,20E-05	6,09E-02	1,86E-03
Bpnt2	1,39E+03	-6,59E-01	-7,62E-01	1,74E-04	1,31E-05	1,65E-03	1,94E-03
Scn2a	6,63E+01	-1,24E+00	-5,66E+00	1,92E-02	1,49E-05	7,18E-02	2,11E-03
Slc16a2	3,48E+02	6,47E-01	-1,49E+00	2,31E-02	1,48E-05	8,19E-02	2,11E-03
Ckap4	2,19E+03	2,03E+00	-1,24E+00	7,58E-12	1,63E-05	5,24E-10	2,25E-03
Mageh1	1,27E+02	8,90E-01	-1,23E+00	8,16E-04	1,94E-05	5,97E-03	2,63E-03
Pkd2	9,85E+02	1,18E+00	-1,19E+00	1,97E-05	2,06E-05	2,61E-04	2,74E-03

Sulf1	1,23E+02	1,60E+00	-2,63E+00	1,39E-03	2,44E-05	9,21E-03	3,14E-03
Col24a1	1,12E+02	3,61E+00	-1,98E+00	1,22E-12	2,98E-05	9,85E-11	3,69E-03
Cxcl12	3,11E+03	2,13E+00	-2,24E+00	2,74E-05	3,07E-05	3,46E-04	3,75E-03
Meox1	8,59E+01	1,84E+00	-1,83E+00	1,70E-05	3,40E-05	2,29E-04	4,00E-03
Ssr1	2,52E+03	9,23E-01	-7,31E-01	9,07E-07	3,68E-05	1,80E-05	4,27E-03
P3h1	5,16E+02	2,45E+00	-1,08E+00	9,30E-18	3,72E-05	2,21E-15	4,29E-03
Prokr2	2,92E+01	7,00E+00	-2,69E+00	2,72E-12	4,21E-05	2,07E-10	4,79E-03
Sele	1,05E+02	2,54E+00	-3,71E+00	4,89E-04	4,59E-05	3,92E-03	5,01E-03
Daam1	7,19E+01	-1,46E+00	-5,12E+00	1,17E-02	4,99E-05	4,86E-02	5,26E-03
Pdgfra	4,01E+01	4,30E+00	-6,56E+00	4,66E-04	5,72E-05	3,77E-03	5,75E-03
Nat8	7,17E+00	3,05E+00	-5,02E+00	5,22E-04	6,51E-05	4,13E-03	6,20E-03
Hhip1	2,87E+02	5,41E+00	-1,73E+00	1,71E-25	6,71E-05	2,16E-22	6,35E-03
Mxra8	1,64E+03	1,79E+00	-1,39E+00	1,65E-06	7,28E-05	3,04E-05	6,78E-03
Sfrp2	9,11E+02	2,97E+00	-3,04E+00	4,20E-05	7,34E-05	5,02E-04	6,79E-03
Adamts12	2,65E+02	2,76E+00	-1,57E+00	3,56E-10	7,44E-05	1,63E-08	6,83E-03
Man2a1	1,43E+03	1,03E+00	-1,21E+00	7,49E-04	7,84E-05	5,56E-03	7,09E-03
Slc39a14	2,43E+01	1,90E+00	-3,63E+00	2,66E-03	8,70E-05	1,55E-02	7,74E-03
Brinp3	2,92E+01	5,13E+00	-4,35E+00	3,41E-06	8,80E-05	5,68E-05	7,79E-03
Loxl3	2,53E+02	2,97E+00	-1,70E+00	2,05E-09	1,05E-04	7,86E-08	8,90E-03
Zfp956	2,87E+01	-1,13E+00	-4,27E+00	2,28E-02	1,09E-04	8,12E-02	9,07E-03
Ptx3	2,27E+02	1,44E+00	-2,30E+00	3,91E-03	1,11E-04	2,10E-02	9,17E-03
Tmem94	5,89E+01	-1,62E+00	-4,44E+00	7,37E-03	1,14E-04	3,41E-02	9,29E-03
Kcnn1	2,74E+01	-1,16E+00	-4,17E+00	1,99E-02	1,20E-04	7,35E-02	9,61E-03
Tram2	2,89E+02	1,12E+00	-8,70E-01	6,79E-06	1,30E-04	1,02E-04	1,01E-02
Pde11a	1,72E+01	3,04E+00	-2,16E+00	1,07E-06	1,42E-04	2,09E-05	1,06E-02
Col4a1	5,05E+03	1,98E+00	-1,41E+00	1,52E-06	1,42E-04	2,84E-05	1,06E-02
Park7	7,50E+01	-1,07E+00	-2,76E+00	2,24E-02	1,43E-04	8,02E-02	1,07E-02
Thy1	2,26E+03	1,43E+00	-1,08E+00	7,34E-06	1,70E-04	1,10E-04	1,23E-02
Srpx2	7,98E+01	2,14E+00	-3,10E+00	2,01E-03	1,91E-04	1,23E-02	1,33E-02
Inpp5b	6,54E+02	-7,92E-01	-7,08E-01	1,29E-04	1,94E-04	1,30E-03	1,34E-02
Mmrn2	2,75E+02	1,38E+00	-1,40E+00	4,98E-04	1,96E-04	3,97E-03	1,35E-02
Cyyr1	2,25E+02	1,07E+00	-1,44E+00	4,76E-03	2,00E-04	2,45E-02	1,36E-02
Ecr4	1,97E+01	2,09E+00	-2,11E+00	1,89E-04	2,09E-04	1,77E-03	1,40E-02
Sema7a	6,67E+02	2,16E+00	-7,93E-01	2,28E-17	2,12E-04	5,11E-15	1,40E-02
Prg4	8,36E+02	3,42E+00	-3,69E+00	4,44E-04	2,16E-04	3,63E-03	1,42E-02
Plvap	1,47E+03	2,18E+00	-1,32E+00	2,36E-07	2,36E-04	5,43E-06	1,52E-02
Gnai1	1,00E+03	-1,06E+00	-6,56E-01	1,38E-07	2,35E-04	3,38E-06	1,52E-02
Pigk	6,28E+02	6,25E-01	-9,17E-01	1,42E-02	2,61E-04	5,69E-02	1,67E-02
Plekhg4	7,25E+01	5,74E+00	-1,68E+00	1,35E-18	2,84E-04	3,95E-16	1,76E-02
Nptxr	1,40E+02	1,14E+00	-9,94E-01	1,73E-04	2,97E-04	1,64E-03	1,81E-02
Hs2st1	5,01E+02	6,30E-01	-7,13E-01	3,42E-03	3,19E-04	1,89E-02	1,91E-02
Htr1b	3,87E+01	3,28E+00	-2,00E+00	1,97E-06	3,42E-04	3,53E-05	2,01E-02
Erg	8,55E+00	1,47E+00	-3,75E+00	1,96E-02	3,51E-04	7,28E-02	2,04E-02
Hspd1-ps4	4,16E+01	-2,14E+00	-3,02E+00	1,09E-04	3,59E-04	1,14E-03	2,08E-02
Erlin2	8,38E+02	-6,34E-01	-5,36E-01	9,48E-05	3,60E-04	1,00E-03	2,08E-02
Necap1	3,39E+02	4,87E-01	-5,26E-01	1,92E-03	3,61E-04	1,19E-02	2,08E-02
Rtn4rl1	1,72E+02	-7,03E-01	-1,08E+00	1,88E-02	3,84E-04	7,06E-02	2,18E-02

Ubd	3,04E+01	1,76E+00	-2,50E+00	4,42E-03	4,11E-04	2,30E-02	2,27E-02
Cnm3	4,45E+01	-2,27E+00	-3,15E+00	8,25E-04	4,14E-04	6,03E-03	2,28E-02
Fam13c	1,41E+02	8,31E-01	-1,09E+00	9,40E-03	4,30E-04	4,10E-02	2,29E-02
Pros1	1,20E+03	1,30E+00	-1,07E+00	2,12E-04	4,30E-04	1,96E-03	2,29E-02
Ehd3	2,25E+02	1,29E+00	-9,43E-01	4,05E-05	4,32E-04	4,87E-04	2,29E-02
Derl2	7,51E+02	2,88E-01	-4,54E-01	2,65E-02	4,46E-04	9,07E-02	2,33E-02
Clec14a	1,47E+02	2,39E+00	-1,20E+00	5,32E-08	4,64E-04	1,43E-06	2,37E-02
Six4	1,19E+02	-3,60E+00	-2,31E+00	9,88E-09	4,84E-04	3,29E-07	2,42E-02
Pdcd4	2,86E+01	-1,34E+00	-2,44E+00	3,54E-03	5,18E-04	1,94E-02	2,54E-02
Col5a3	2,81E+03	2,20E+00	-1,02E+00	6,11E-09	5,43E-04	2,13E-07	2,60E-02
Ccdc113	4,52E+01	-1,83E+00	-1,38E+00	6,76E-06	5,67E-04	1,02E-04	2,68E-02
Fbln2	4,36E+03	3,15E+00	-1,25E+00	3,70E-10	5,76E-04	1,69E-08	2,69E-02
Epdr1	5,48E+02	-2,09E+00	-9,68E-01	2,94E-09	5,73E-04	1,11E-07	2,69E-02
Dram1	5,88E+02	8,67E-01	-1,23E+00	1,97E-02	6,31E-04	7,30E-02	2,85E-02
Snrnp27	9,90E+00	-9,51E-01	-2,55E+00	2,86E-02	6,37E-04	9,58E-02	2,86E-02
Adamts5	1,03E+03	5,90E-01	-8,60E-01	2,73E-02	6,39E-04	9,26E-02	2,86E-02
Aimp2	1,75E+02	-1,97E+00	-1,69E+00	3,48E-04	6,44E-04	2,95E-03	2,86E-02
6230400D17Rik	3,13E+01	-1,02E+00	-1,81E+00	1,66E-02	6,48E-04	6,38E-02	2,87E-02
Trpc3	5,52E+01	1,69E+00	-1,89E+00	3,93E-03	6,85E-04	2,10E-02	2,91E-02
Dnajc10	8,18E+02	6,83E-01	-6,18E-01	1,14E-03	7,01E-04	7,83E-03	2,96E-02
Fzd4	1,07E+03	-1,71E+00	-1,01E+00	6,06E-06	7,13E-04	9,39E-05	3,00E-02
Flt4	1,16E+02	1,95E+00	-1,03E+00	1,25E-06	7,49E-04	2,38E-05	3,10E-02
Chsy1	5,03E+02	2,89E+00	-8,88E-01	1,34E-15	7,89E-04	1,93E-13	3,20E-02
Chst2	1,33E+02	2,22E+00	-7,09E-01	2,34E-15	8,09E-04	3,27E-13	3,26E-02
Aplnr	4,16E+02	3,20E+00	-1,32E+00	5,01E-08	8,38E-04	1,35E-06	3,36E-02
Pls3	2,01E+03	1,05E+00	-6,12E-01	2,86E-06	8,51E-04	4,86E-05	3,39E-02
Dnm1	2,17E+02	1,88E+00	-1,13E+00	3,30E-05	8,63E-04	4,09E-04	3,39E-02
Plat	5,47E+02	2,18E+00	-1,10E+00	1,50E-06	8,61E-04	2,80E-05	3,39E-02
Gm16278	1,55E+01	-1,75E+00	-2,29E+00	1,35E-03	8,85E-04	8,99E-03	3,45E-02
Vmn2r89	1,91E+01	1,92E+00	-1,55E+00	7,74E-04	9,04E-04	5,70E-03	3,49E-02
Car4	1,95E+02	1,47E+00	-1,99E+00	1,20E-02	9,32E-04	4,98E-02	3,54E-02
Sparcl1	1,42E+03	1,11E+00	-9,25E-01	1,32E-03	1,01E-03	8,87E-03	3,72E-02
Hpx	3,77E+01	3,61E+00	-1,52E+00	1,13E-06	1,06E-03	2,18E-05	3,85E-02
Myct1	1,44E+02	1,88E+00	-1,11E+00	5,94E-05	1,10E-03	6,69E-04	3,93E-02
Gpx7	3,37E+02	2,50E+00	-8,50E-01	7,14E-12	1,10E-03	4,99E-10	3,93E-02
Ntrk2	4,22E+02	-1,18E+00	-1,31E+00	1,02E-02	1,11E-03	4,38E-02	3,94E-02
Il1rl1	1,18E+03	5,97E+00	-1,70E+00	8,95E-11	1,16E-03	4,62E-09	4,07E-02
Heg1	8,52E+02	8,40E-01	-9,44E-01	1,31E-02	1,19E-03	5,34E-02	4,13E-02
Rnf39	1,83E+01	-2,65E+00	-1,93E+00	2,79E-06	1,27E-03	4,77E-05	4,36E-02
Thbs2	3,54E+03	1,68E+00	-1,03E+00	1,79E-04	1,33E-03	1,69E-03	4,50E-02
Laptm4b	1,00E+03	-1,45E+00	-7,64E-01	4,89E-06	1,35E-03	7,79E-05	4,51E-02
Ola1	3,20E+02	-5,14E-01	-6,75E-01	3,02E-02	1,34E-03	9,97E-02	4,51E-02
Fgf23	7,33E+00	3,82E+00	-2,28E+00	9,01E-04	1,39E-03	6,46E-03	4,60E-02
Plod1	1,77E+01	1,43E+00	-1,65E+00	1,05E-02	1,40E-03	4,45E-02	4,60E-02
Tomt	1,06E+01	1,07E+00	-1,37E+00	1,85E-02	1,41E-03	6,97E-02	4,60E-02
Slc39a13	5,37E+02	2,09E+00	-7,13E-01	1,54E-11	1,40E-03	9,75E-10	4,60E-02
Fut11	3,34E+02	6,59E-01	-4,83E-01	1,37E-04	1,42E-03	1,36E-03	4,62E-02

Pacsin3	7,35E+02	-1,67E+00	-1,18E+00	1,06E-03	1,48E-03	7,40E-03	4,74E-02
Timp1	2,68E+03	6,38E+00	-1,66E+00	1,97E-10	1,51E-03	9,50E-09	4,78E-02
Akr1a1	3,30E+02	2,09E+00	-1,21E+00	2,63E-04	1,54E-03	2,33E-03	4,88E-02
Pde4a	2,88E+01	-1,58E+00	-1,84E+00	3,55E-03	1,58E-03	1,94E-02	4,94E-02
Tmem18	2,95E+02	-4,35E-01	-5,62E-01	3,02E-02	1,58E-03	9,97E-02	4,94E-02
F2r	3,87E+02	1,57E+00	-8,90E-01	9,20E-05	1,66E-03	9,77E-04	5,09E-02
Ednra	2,31E+02	2,09E+00	-8,86E-01	7,98E-07	1,71E-03	1,61E-05	5,19E-02
Chsy3	2,85E+01	2,57E+00	-1,16E+00	2,38E-05	1,77E-03	3,08E-04	5,28E-02
Lrrc8a	4,55E+02	4,44E-01	-5,10E-01	1,73E-02	1,80E-03	6,60E-02	5,31E-02
Avpr1a	7,48E+01	1,30E+00	-8,99E-01	1,03E-03	1,87E-03	7,20E-03	5,43E-02
Gja5	8,84E+01	1,34E+00	-1,35E+00	1,30E-02	1,91E-03	5,28E-02	5,52E-02
Mccc2	2,07E+02	-2,44E+00	-9,80E-01	9,81E-07	2,03E-03	1,93E-05	5,75E-02
Vma21	6,51E+02	-5,63E-01	-4,81E-01	1,74E-03	2,04E-03	1,10E-02	5,76E-02
Cdh5	8,92E+02	1,39E+00	-1,00E+00	2,71E-03	2,05E-03	1,57E-02	5,76E-02
Dnm3os	7,70E+02	4,36E+00	-9,03E-01	2,10E-17	2,05E-03	4,77E-15	5,76E-02
Colq	2,90E+01	-1,08E+00	-1,52E+00	2,44E-02	2,21E-03	8,53E-02	6,06E-02
Dnah2os	5,13E+00	1,08E+00	-1,45E+00	2,14E-02	2,24E-03	7,73E-02	6,13E-02
Kirrel	6,10E+02	1,62E+00	-8,16E-01	4,90E-05	2,25E-03	5,68E-04	6,14E-02
Vwa1	5,82E+02	1,18E+00	-6,33E-01	3,11E-05	2,26E-03	3,88E-04	6,14E-02
Igfbp7	3,14E+03	2,02E+00	-7,74E-01	1,91E-07	2,27E-03	4,50E-06	6,15E-02
Col6a4	7,22E+00	1,47E+00	-1,75E+00	2,09E-02	2,31E-03	7,61E-02	6,20E-02
Tnc	1,27E+03	4,61E+00	-1,62E+00	5,30E-05	2,31E-03	6,06E-04	6,20E-02
Crispld2	1,69E+03	3,41E+00	-9,25E-01	8,03E-10	2,41E-03	3,37E-08	6,33E-02
Gdnf	1,64E+02	-6,10E-01	-6,68E-01	2,15E-02	2,42E-03	7,76E-02	6,34E-02
Dcn	3,88E+03	1,24E+00	-8,69E-01	2,63E-03	2,45E-03	1,53E-02	6,40E-02
Glycam1	1,30E+01	6,74E+00	-1,64E+00	2,50E-06	2,60E-03	4,33E-05	6,65E-02
Tmem120b	1,22E+01	-1,03E+00	-1,40E+00	1,58E-02	2,63E-03	6,16E-02	6,69E-02
P3h2	3,88E+02	-1,39E+00	-5,78E-01	1,23E-07	2,63E-03	3,01E-06	6,69E-02
Pof1b	3,08E+03	-1,18E+00	-5,59E-01	3,08E-06	2,71E-03	5,20E-05	6,84E-02
Rasgef1a	3,74E+01	1,50E+00	-9,09E-01	1,23E-03	2,73E-03	8,37E-03	6,87E-02
Efemp1	2,54E+02	-9,10E-01	-7,73E-01	8,18E-03	2,78E-03	3,69E-02	6,93E-02
Kif3c	1,94E+02	-1,05E+00	-8,94E-01	1,07E-02	2,79E-03	4,52E-02	6,94E-02
Gm8281	5,39E+00	1,76E+00	-1,52E+00	8,79E-03	2,86E-03	3,90E-02	7,06E-02
Slc2a10	7,41E+01	1,85E+00	-8,76E-01	1,42E-04	2,90E-03	1,40E-03	7,14E-02
Wnt2	2,94E+01	-2,47E+00	-1,44E+00	5,69E-04	2,93E-03	4,44E-03	7,16E-02
Rftn1	2,60E+02	1,26E+00	-8,44E-01	2,92E-03	2,95E-03	1,67E-02	7,20E-02
Svep1	4,40E+02	1,30E+00	-8,28E-01	1,89E-03	2,96E-03	1,17E-02	7,22E-02
Madcam1	4,42E+00	3,86E+00	-1,55E+00	7,56E-04	2,99E-03	5,60E-03	7,23E-02
Smarcd3	1,90E+02	-1,26E+00	-7,47E-01	5,75E-04	2,99E-03	4,48E-03	7,23E-02
Grb10	4,48E+02	1,17E+00	-9,01E-01	8,53E-03	3,04E-03	3,80E-02	7,32E-02
Sgcd	4,57E+01	-1,11E+00	-7,80E-01	1,49E-03	3,04E-03	9,69E-03	7,32E-02
Tmem47	2,66E+02	1,11E+00	-8,08E-01	5,79E-03	3,25E-03	2,83E-02	7,63E-02
Smarcad1	2,79E+02	5,01E-01	-4,74E-01	8,93E-03	3,27E-03	3,95E-02	7,64E-02
Cyp7b1	1,05E+02	3,47E+00	-9,34E-01	2,51E-07	3,36E-03	5,75E-06	7,80E-02
Fermt2	3,82E+01	-3,14E+00	-1,33E+00	7,15E-05	3,41E-03	7,84E-04	7,81E-02
B3gnt3	1,68E+02	1,80E+00	-7,20E-01	6,15E-06	3,41E-03	9,49E-05	7,81E-02
Lamc1	8,04E+02	1,42E+00	-6,13E-01	5,11E-06	3,43E-03	8,09E-05	7,86E-02

Tmem176b	3,39E+02	7,06E-01	-6,72E-01	1,94E-02	3,47E-03	7,21E-02	7,90E-02
Sema3a	1,04E+02	2,97E+00	-8,42E-01	1,74E-07	3,58E-03	4,13E-06	8,06E-02
Mrc2	1,29E+03	1,65E+00	-6,31E-01	8,76E-07	3,64E-03	1,75E-05	8,17E-02
Dkk3	1,06E+03	2,74E+00	-6,69E-01	1,38E-12	3,66E-03	1,09E-10	8,21E-02
Htr2a	2,13E+01	2,43E+00	-1,06E+00	6,85E-04	3,76E-03	5,18E-03	8,28E-02
Foxk1	9,88E+02	-6,71E-01	-3,90E-01	9,35E-06	3,78E-03	1,36E-04	8,31E-02
Sync	1,26E+02	-5,89E+00	-1,20E+00	5,27E-16	3,84E-03	8,22E-14	8,41E-02
Tmem179	1,73E+01	-1,92E+00	-1,23E+00	2,20E-03	3,92E-03	1,32E-02	8,55E-02
Plaat1	1,81E+01	-2,01E+00	-1,20E+00	1,69E-03	4,11E-03	1,07E-02	8,79E-02
Gm11843	8,29E+00	1,90E+00	-1,18E+00	5,51E-03	4,17E-03	2,73E-02	8,86E-02
Myo7a	3,53E+02	2,66E+00	-6,57E-01	1,75E-11	4,17E-03	1,09E-09	8,86E-02
She	7,54E+01	1,14E+00	-7,59E-01	5,28E-03	4,19E-03	2,65E-02	8,86E-02
Spats2l	2,26E+02	2,86E+00	-7,32E-01	3,65E-09	4,22E-03	1,33E-07	8,90E-02
Ccn4	3,89E+02	5,78E+00	-8,15E-01	1,85E-18	4,27E-03	5,31E-16	8,91E-02
Tmigd1	7,04E+01	9,99E-01	-7,96E-01	1,65E-02	4,25E-03	6,35E-02	8,91E-02
Csnk2a1	2,54E+03	-6,83E-01	-3,79E-01	6,11E-06	4,40E-03	9,45E-05	9,09E-02
Xirp2	4,12E+03	-9,20E+00	-1,24E+00	1,25E-13	4,42E-03	1,27E-11	9,10E-02
Spsb1	3,40E+02	1,06E+00	-5,97E-01	6,12E-04	4,44E-03	4,71E-03	9,12E-02
Slc39a1	1,49E+03	6,64E-01	-4,44E-01	6,12E-04	4,52E-03	4,71E-03	9,24E-02
H2-M2	6,23E+01	-3,68E+00	-1,12E+00	4,74E-07	4,55E-03	1,02E-05	9,27E-02
Tie1	5,89E+02	2,25E+00	-6,39E-01	4,81E-09	4,54E-03	1,72E-07	9,27E-02
Cd38	2,86E+02	2,30E+00	-7,68E-01	1,31E-05	4,59E-03	1,82E-04	9,31E-02
Saa2	1,76E+01	6,96E+00	-1,21E+00	3,82E-06	4,66E-03	6,26E-05	9,39E-02
Lvrn	2,37E+02	9,72E-01	-6,79E-01	6,88E-03	4,71E-03	3,23E-02	9,41E-02
Tmed3	1,61E+03	6,15E-01	-5,20E-01	1,08E-02	4,71E-03	4,57E-02	9,41E-02
Aebp1	4,28E+03	1,12E+00	-6,70E-01	2,79E-03	4,94E-03	1,61E-02	9,66E-02
Rfc1	1,66E+02	-9,16E+00	1,04E+01	5,11E-15	4,84E-17	6,48E-13	1,58E-13
Rps12-ps3	2,38E+03	-1,15E+01	2,53E+01	1,82E-06	4,33E-17	3,29E-05	1,58E-13
Gripap1	1,22E+03	7,13E-01	1,25E+00	2,58E-05	8,17E-11	3,30E-04	1,22E-07
Lmbr1	1,83E+01	-1,85E+01	1,97E+01	3,25E-11	1,04E-10	1,94E-09	1,42E-07
Serpina3b	3,40E+02	-4,10E+00	5,45E+00	4,01E-08	1,25E-10	1,11E-06	1,58E-07
Lamb3	5,47E+02	-2,26E+01	2,33E+01	3,43E-11	4,23E-10	2,02E-09	4,14E-07
Hhatl	1,62E+01	-1,92E+01	1,92E+01	1,28E-11	6,61E-10	8,29E-10	5,70E-07
Actn3	1,58E+04	-1,08E+01	8,00E+00	3,02E-18	1,68E-09	7,97E-16	1,37E-06
Elovl3	1,91E+01	-1,79E+01	1,93E+01	2,20E-08	4,59E-08	6,61E-07	2,28E-05
Prkaa1	6,08E+01	-2,05E+01	1,99E+01	1,70E-09	8,35E-08	6,63E-08	4,02E-05
Myoz1	6,41E+03	-9,23E+00	5,54E+00	6,52E-21	1,22E-07	2,67E-18	5,39E-05
Tmod4	4,58E+02	-6,12E+00	4,57E+00	2,46E-14	1,47E-07	2,86E-12	5,87E-05
Gm5914	2,49E+01	9,58E-01	2,64E+00	1,64E-02	1,72E-07	6,32E-02	6,31E-05
Supt4a	9,83E+01	7,81E-01	1,18E+00	5,54E-04	7,59E-07	4,34E-03	2,21E-04
Pvalb	2,48E+04	-1,18E+01	7,04E+00	7,66E-17	8,80E-07	1,57E-14	2,44E-04
Cep57	2,12E+02	8,14E-01	1,09E+00	1,64E-04	1,72E-06	1,57E-03	4,28E-04
Usp3	7,34E+02	3,77E-01	5,87E-01	1,95E-03	1,82E-06	1,20E-02	4,44E-04
Frg2f1	1,84E+01	-1,31E+00	2,81E+00	3,62E-03	2,13E-06	1,97E-02	4,77E-04
Tnni2	3,51E+04	-8,36E+00	4,22E+00	1,98E-22	2,93E-06	1,30E-19	6,23E-04
Trmt10a	1,55E+01	-2,03E+00	4,25E+00	1,66E-03	3,41E-06	1,06E-02	7,04E-04
Ckm	5,01E+04	-9,91E+00	6,87E+00	5,08E-12	3,42E-06	3,71E-10	7,04E-04

Dhrs7c	6,05E+02	-9,92E+00	6,88E+00	4,13E-11	4,08E-06	2,33E-09	8,14E-04
Lrrc30	2,75E+02	-1,06E+01	6,91E+00	6,80E-12	4,31E-06	4,78E-10	8,40E-04
Gm21750	7,69E+01	1,07E+00	1,80E+00	2,63E-03	6,13E-06	1,53E-02	1,12E-03
Skint7	5,26E+02	-5,44E+00	2,42E+00	4,66E-23	6,62E-06	3,63E-20	1,16E-03
Cox6a2	4,18E+03	-8,76E+00	5,28E+00	5,27E-14	8,95E-06	5,71E-12	1,49E-03
Wnk2	9,55E+02	-4,06E+00	1,50E+00	2,28E-29	1,04E-05	6,23E-26	1,69E-03
Myo18b	7,72E+02	-6,09E+00	3,37E+00	9,39E-16	1,14E-05	1,40E-13	1,79E-03
4930426D05Rik	1,68E+01	-4,51E+00	6,25E+00	1,94E-04	1,20E-05	1,81E-03	1,86E-03
Pgam2	5,55E+03	-8,09E+00	4,40E+00	1,98E-16	1,23E-05	3,44E-14	1,88E-03
Obscn	6,00E+03	-8,80E+00	4,44E+00	2,34E-18	1,31E-05	6,50E-16	1,94E-03
Scd3	2,94E+02	-3,39E+00	4,97E+00	2,36E-04	1,36E-05	2,13E-03	1,98E-03
Smtnl1	9,88E+02	-1,01E+01	4,86E+00	2,02E-17	1,74E-05	4,66E-15	2,40E-03
Ccr4	1,75E+02	-5,82E+00	1,94E+00	4,86E-32	1,82E-05	1,99E-28	2,48E-03
Fastkd3	3,59E+01	-6,51E+00	6,22E+00	5,56E-06	2,37E-05	8,74E-05	3,08E-03
Paqr7	7,82E+02	-2,14E+00	1,58E+00	2,47E-08	2,50E-05	7,34E-07	3,17E-03
A930001C03Rik	2,95E+01	-9,03E-01	1,78E+00	1,11E-02	2,72E-05	4,67E-02	3,43E-03
Nctc1	4,74E+02	-9,01E+00	5,26E+00	9,14E-12	2,74E-05	6,23E-10	3,43E-03
Smim6	2,55E+01	-2,94E+00	2,31E+00	2,50E-07	3,06E-05	5,72E-06	3,75E-03
Yrdc	5,37E+01	-1,65E+00	1,85E+00	1,09E-04	3,18E-05	1,13E-03	3,80E-03
Cacna1s	2,48E+03	-7,36E+00	4,77E+00	2,19E-10	3,33E-05	1,05E-08	3,95E-03
Tcap	9,06E+03	-7,58E+00	4,60E+00	1,57E-11	3,44E-05	9,85E-10	4,02E-03
Tnnt3	3,93E+04	-8,70E+00	4,26E+00	5,11E-16	3,93E-05	8,04E-14	4,50E-03
Cir1	5,99E+02	-5,93E-01	5,90E-01	8,19E-05	4,41E-05	8,81E-04	4,94E-03
Capn3	1,28E+02	-5,66E+00	2,37E+00	1,03E-18	4,53E-05	3,07E-16	5,01E-03
Cacng6	5,20E+02	-1,01E+01	4,44E+00	3,41E-16	4,77E-05	5,64E-14	5,17E-03
Art4	2,03E+02	-3,01E+00	1,17E+00	1,76E-21	4,93E-05	9,01E-19	5,26E-03
Cbs	1,60E+02	-2,61E+00	3,66E+00	4,51E-04	5,01E-05	3,68E-03	5,26E-03
Cox8b	1,64E+03	-7,40E+00	3,95E+00	6,11E-13	5,60E-05	5,44E-11	5,67E-03
Fitm1	8,09E+02	-8,85E+00	4,30E+00	1,82E-14	5,62E-05	2,18E-12	5,67E-03
Gm15823	6,00E+01	9,64E-01	1,93E+00	1,66E-02	5,96E-05	6,41E-02	5,95E-03
Tmem53	3,05E+01	-1,38E+00	3,94E+00	1,71E-02	6,00E-05	6,54E-02	5,95E-03
Klhl12	1,68E+02	-2,08E+00	2,13E+00	6,49E-05	6,26E-05	7,22E-04	6,10E-03
Sytl1	1,94E+03	-1,17E+00	1,06E+00	2,40E-05	6,89E-05	3,10E-04	6,48E-03
Alox12e	2,83E+03	-5,31E+00	2,05E+00	3,38E-19	7,29E-05	1,11E-16	6,78E-03
Pds5a	7,69E+01	-6,67E+00	6,22E+00	3,19E-05	7,74E-05	3,98E-04	7,03E-03
Ampd1	4,29E+02	-5,60E+00	2,22E+00	5,62E-18	8,45E-05	1,44E-15	7,60E-03
Ank1	2,46E+03	-9,01E+00	3,39E+00	4,57E-21	8,52E-05	1,97E-18	7,62E-03
Gata3	4,13E+03	-3,00E+00	1,61E+00	1,55E-10	9,62E-05	7,66E-09	8,42E-03
Ckmt2	2,68E+03	-1,33E+01	5,26E+00	6,56E-14	9,68E-05	6,93E-12	8,42E-03
Mgat5b	6,70E+01	-1,09E+00	1,88E+00	9,34E-03	1,04E-04	4,08E-02	8,89E-03
Cbarp	8,42E+02	-1,12E+00	8,69E-01	4,67E-06	1,06E-04	7,48E-05	8,97E-03
Pik3ip1	3,04E+01	-1,96E+00	1,52E+00	5,26E-06	1,09E-04	8,29E-05	9,07E-03
Catsper4	3,07E+01	-3,28E+00	1,90E+00	1,16E-08	1,17E-04	3,76E-07	9,44E-03
Pfn4	8,42E+00	-1,80E+00	4,16E+00	1,08E-02	1,23E-04	4,55E-02	9,81E-03
Lrrc61	3,48E+02	-2,62E+00	1,05E+00	1,49E-16	1,39E-04	2,74E-14	1,05E-02
Gm26550	3,89E+01	-1,19E+00	1,40E+00	1,45E-03	1,39E-04	9,51E-03	1,05E-02
Tnnc2	4,15E+04	-9,54E+00	4,00E+00	2,37E-14	1,39E-04	2,77E-12	1,05E-02

Vgll2	2,32E+02	-1,04E+01	4,53E+00	2,24E-11	1,44E-04	1,35E-09	1,07E-02
2310002L09Rik	4,57E+02	-9,21E+00	3,99E+00	1,33E-12	1,51E-04	1,07E-10	1,11E-02
Atox1	2,55E+03	7,15E-01	5,73E-01	1,69E-05	1,73E-04	2,28E-04	1,24E-02
Efs	9,39E+02	-1,61E+00	9,72E-01	5,98E-08	1,78E-04	1,59E-06	1,26E-02
Dsg1c	7,70E+01	-2,22E+00	1,13E+00	4,21E-10	2,00E-04	1,88E-08	1,36E-02
Gal3st3	4,41E+01	1,06E+00	1,41E+00	6,42E-03	2,08E-04	3,07E-02	1,40E-02
Itgb1bp2	7,36E+02	-6,61E+00	2,13E+00	7,94E-20	2,09E-04	2,89E-17	1,40E-02
Tmprss4	2,70E+02	-8,70E-01	1,53E+00	2,05E-02	2,17E-04	7,52E-02	1,43E-02
Dennd2d	1,65E+02	-8,44E-01	8,47E-01	7,95E-04	2,45E-04	5,84E-03	1,57E-02
Fam120b	2,34E+02	-2,21E+00	9,97E-01	1,61E-11	2,64E-04	1,01E-09	1,68E-02
Sdr42e1	5,94E+02	-1,09E+00	1,07E+00	7,22E-04	2,85E-04	5,40E-03	1,76E-02
Gan	3,11E+03	-1,83E+00	9,88E-01	1,78E-08	2,91E-04	5,40E-07	1,79E-02
Nme3	2,70E+02	-1,00E+00	8,83E-01	2,34E-04	2,99E-04	2,12E-03	1,81E-02
Gm47283	2,09E+04	1,08E+00	1,58E+00	1,04E-02	3,16E-04	4,42E-02	1,90E-02
Zfp52	2,62E+01	-4,41E+00	4,15E+00	5,87E-04	3,21E-04	4,56E-03	1,91E-02
Alpk3	9,94E+02	-7,74E+00	2,33E+00	8,55E-19	3,36E-04	2,69E-16	1,99E-02
Acta1	1,51E+05	-8,94E+00	3,09E+00	2,47E-13	3,87E-04	2,38E-11	2,18E-02
Gdpd2	1,69E+03	-2,99E+00	9,45E-01	8,85E-19	3,91E-04	2,73E-16	2,20E-02
Cyb5r2	4,17E+01	-6,19E+00	2,73E+00	1,69E-08	4,05E-04	5,21E-07	2,25E-02
Arhgap40	3,68E+02	-1,10E+00	1,22E+00	3,22E-03	4,18E-04	1,80E-02	2,29E-02
Sgca	3,25E+02	-8,14E+00	2,80E+00	8,29E-13	4,20E-04	7,07E-11	2,29E-02
Gm15934	5,86E+00	-3,10E+00	3,21E+00	1,45E-03	4,35E-04	9,51E-03	2,30E-02
Rbck1	1,64E+03	-6,06E-01	4,85E-01	4,67E-05	4,45E-04	5,45E-04	2,33E-02
Tmem52	4,12E+02	-7,37E+00	2,65E+00	4,07E-12	4,42E-04	3,01E-10	2,33E-02
H1f10	3,18E+02	1,02E+00	1,29E+00	8,36E-03	4,60E-04	3,75E-02	2,37E-02
Cnm1	1,42E+01	-8,91E-01	1,38E+00	2,39E-02	4,66E-04	8,41E-02	2,37E-02
Fabp3	1,30E+03	-7,28E+00	2,07E+00	6,91E-18	4,68E-04	1,71E-15	2,37E-02
Gm13490	1,81E+01	-5,76E+00	3,32E+00	2,30E-05	4,69E-04	2,98E-04	2,37E-02
Il18	1,86E+02	5,83E-01	7,53E-01	1,37E-02	4,81E-04	5,53E-02	2,42E-02
9330162012Rik	1,08E+02	-1,33E+00	1,05E+00	1,95E-04	5,02E-04	1,82E-03	2,48E-02
Dpf3	3,72E+01	-4,73E+00	1,82E+00	4,03E-10	5,06E-04	1,81E-08	2,49E-02
Serpina3j	1,45E+02	-1,71E+00	2,20E+00	4,94E-03	5,28E-04	2,52E-02	2,56E-02
Myom2	5,94E+03	-9,57E+00	2,14E+00	3,38E-25	5,36E-04	3,68E-22	2,58E-02
Zfp316	2,21E+02	-1,22E+00	1,06E+00	6,87E-04	5,62E-04	5,19E-03	2,68E-02
Nmrk2	3,06E+02	-1,12E+01	2,69E+00	5,95E-17	6,14E-04	1,26E-14	2,78E-02
Pde4dip	2,86E+03	-6,04E+00	1,44E+00	1,68E-21	6,38E-04	8,85E-19	2,86E-02
Vmn2r102	5,04E+01	1,41E+00	1,49E+00	4,91E-03	6,43E-04	2,51E-02	2,86E-02
Lurap1	1,10E+02	-1,15E+00	1,69E+00	1,64E-02	6,50E-04	6,33E-02	2,87E-02
Odf3l2	8,20E+01	-8,12E+00	3,12E+00	4,55E-07	6,51E-04	9,80E-06	2,87E-02
Xirp1	2,34E+03	-8,75E+00	2,37E+00	1,20E-15	6,60E-04	1,75E-13	2,88E-02
Gm21833	5,67E+01	2,98E+00	1,06E+00	9,25E-10	6,68E-04	3,84E-08	2,88E-02
Apobec2	4,38E+03	-9,76E+00	2,47E+00	7,93E-17	6,68E-04	1,58E-14	2,88E-02
Zfp35	2,66E+02	-5,33E-01	6,18E-01	9,05E-03	6,77E-04	3,98E-02	2,90E-02
Slc1a1	1,25E+02	-3,50E+00	1,28E+00	2,72E-10	7,31E-04	1,28E-08	3,06E-02
Cdc42bpg	3,26E+03	-1,36E+00	6,78E-01	6,66E-08	7,52E-04	1,75E-06	3,10E-02
5830418P13Rik	2,13E+01	-6,88E+00	2,50E+00	2,69E-08	7,52E-04	7,93E-07	3,10E-02
Rasgrp1	3,17E+01	-5,35E+00	2,76E+00	4,63E-05	7,67E-04	5,42E-04	3,15E-02

Zxda	1,98E+01	-4,21E+00	2,97E+00	7,23E-04	7,75E-04	5,40E-03	3,17E-02
Gm11532	2,53E+01	-2,83E+00	2,33E+00	9,69E-04	7,84E-04	6,86E-03	3,20E-02
Rdm1	3,87E+02	-1,68E+00	7,72E-01	1,58E-08	7,97E-04	4,93E-07	3,23E-02
Gm6058	1,05E+02	1,99E+00	1,93E+00	2,97E-03	8,19E-04	1,69E-02	3,29E-02
Atcayos	4,56E+02	-6,85E+00	1,90E+00	9,61E-14	8,29E-04	9,77E-12	3,33E-02
Parva	3,78E+01	6,68E-01	9,05E-01	2,91E-02	8,54E-04	9,71E-02	3,39E-02
Abhd3	6,15E+01	-1,28E+00	9,72E-01	3,45E-04	8,63E-04	2,93E-03	3,39E-02
Sptbn4	4,09E+01	8,93E-01	1,06E+00	1,56E-02	8,99E-04	6,09E-02	3,49E-02
Gm8584	8,58E+00	-1,83E+00	2,54E+00	1,18E-02	9,03E-04	4,92E-02	3,49E-02
Cfap74	6,32E+00	-2,81E+00	2,58E+00	2,81E-03	9,12E-04	1,61E-02	3,51E-02
Mstn	9,64E+02	-1,04E+01	2,27E+00	1,45E-16	9,20E-04	2,70E-14	3,52E-02
Angel1	3,08E+02	-1,50E+00	7,68E-01	5,49E-07	9,31E-04	1,15E-05	3,54E-02
Plekh3	6,68E+02	-1,09E+00	7,51E-01	1,19E-04	9,74E-04	1,22E-03	3,65E-02
Mesp2	7,47E+01	-3,68E+00	1,16E+00	1,56E-11	9,73E-04	9,84E-10	3,65E-02
Des	2,27E+04	-5,88E+00	1,72E+00	1,77E-11	9,81E-04	1,10E-09	3,67E-02
Fam110b	5,66E+01	-3,13E+00	2,40E+00	1,24E-03	9,96E-04	8,38E-03	3,70E-02
Asb11	4,96E+02	-6,54E+00	1,32E+00	1,04E-22	1,01E-03	7,74E-20	3,72E-02
1700001O22Rik	4,20E+01	-1,14E+00	7,42E-01	4,99E-05	1,02E-03	5,76E-04	3,73E-02
Eml4	6,12E+01	-4,96E+00	2,73E+00	5,20E-04	1,07E-03	4,12E-03	3,86E-02
Me3	2,04E+02	-4,87E+00	1,35E+00	2,66E-12	1,08E-03	2,03E-10	3,89E-02
Gabpb2	9,86E+01	-2,00E+00	1,13E+00	2,06E-05	1,15E-03	2,70E-04	4,04E-02
Mocs2	3,80E+02	-5,54E-01	6,83E-01	2,11E-02	1,16E-03	7,66E-02	4,07E-02
Tspan8	1,21E+02	-9,06E+00	2,40E+00	1,18E-08	1,17E-03	3,80E-07	4,09E-02
Gabrp	2,07E+02	-4,32E+00	2,00E+00	2,89E-05	1,19E-03	3,64E-04	4,13E-02
Inafm1	1,07E+03	-9,23E-01	6,73E-01	3,37E-04	1,20E-03	2,87E-03	4,16E-02
Ppp1r12c	2,08E+03	4,37E-01	4,11E-01	1,40E-03	1,33E-03	9,28E-03	4,50E-02
Pygm	3,59E+02	-2,92E+00	1,17E+00	5,10E-07	1,33E-03	1,08E-05	4,50E-02
Fzd10os	1,36E+02	-1,10E+00	1,29E+00	1,70E-02	1,32E-03	6,51E-02	4,50E-02
Jsrp1	1,78E+03	-8,53E+00	2,15E+00	5,34E-10	1,33E-03	2,36E-08	4,50E-02
Sirt2	1,64E+03	-4,08E-01	5,07E-01	2,09E-02	1,36E-03	7,61E-02	4,54E-02
Fn3k	9,60E+01	-4,70E+00	1,49E+00	1,75E-08	1,36E-03	5,34E-07	4,54E-02
Cecr2	2,44E+02	-1,31E+00	6,62E-01	1,35E-06	1,43E-03	2,55E-05	4,62E-02
Gm13093	1,78E+01	-1,69E+00	1,39E+00	3,46E-03	1,43E-03	1,90E-02	4,62E-02
Cma1	1,80E+02	-1,98E+00	2,56E+00	1,30E-02	1,43E-03	5,30E-02	4,62E-02
Gm15635	2,46E+01	-2,89E+00	1,27E+00	1,09E-05	1,45E-03	1,55E-04	4,66E-02
Cnksr1	7,85E+02	-2,09E+00	6,08E-01	6,66E-16	1,50E-03	1,01E-13	4,78E-02
Prss53	3,39E+02	-2,33E+00	1,31E+00	2,30E-04	1,55E-03	2,09E-03	4,89E-02
Myadml2	5,63E+01	-7,08E+00	1,95E+00	8,52E-08	1,56E-03	2,17E-06	4,91E-02
Tmem229a	9,77E+01	-4,07E+00	1,20E+00	2,40E-09	1,57E-03	9,17E-08	4,93E-02
Trgc1	6,95E+01	-4,95E+00	1,15E+00	8,84E-14	1,58E-03	9,10E-12	4,94E-02
Smpx	4,43E+02	-8,04E+00	1,65E+00	3,68E-14	1,63E-03	4,16E-12	5,04E-02
Axin2	4,32E+02	-1,13E+00	7,15E-01	1,72E-04	1,65E-03	1,64E-03	5,07E-02
Zbtb16	6,65E+02	-4,76E+00	1,21E+00	8,70E-11	1,75E-03	4,51E-09	5,26E-02
Ppp1r3c	3,05E+03	-6,91E+00	1,33E+00	1,53E-16	1,77E-03	2,79E-14	5,28E-02
Pet100	6,71E+01	-5,91E-01	6,46E-01	1,74E-02	1,80E-03	6,64E-02	5,31E-02
Sult5a1	6,88E+02	-4,22E+00	1,15E+00	6,33E-10	1,79E-03	2,72E-08	5,31E-02
Acad10	1,46E+02	-1,65E+00	7,21E-01	5,30E-07	1,89E-03	1,12E-05	5,49E-02

Cables1	1,73E+02	-1,01E+00	7,48E-01	1,41E-03	1,90E-03	9,29E-03	5,51E-02
D7Ertd443e	1,74E+02	-4,59E+00	1,20E+00	1,53E-09	1,95E-03	6,09E-08	5,62E-02
Yjefn3	4,57E+01	-1,61E+00	1,27E+00	4,60E-03	1,96E-03	2,38E-02	5,63E-02
Abca2	8,26E+02	-9,08E-01	6,40E-01	6,84E-04	2,00E-03	5,18E-03	5,70E-02
Zfr2	1,89E+02	-1,38E+00	7,82E-01	1,12E-04	2,00E-03	1,16E-03	5,70E-02
Xpo4	1,10E+03	1,08E+00	1,02E+00	1,22E-02	2,00E-03	5,04E-02	5,70E-02
Npepps	4,47E+02	6,35E-01	5,36E-01	2,77E-03	2,04E-03	1,60E-02	5,76E-02
Ano9	1,79E+03	-2,52E+00	6,59E-01	5,06E-16	2,04E-03	8,04E-14	5,76E-02
Prmt9	1,61E+01	-1,14E+00	1,10E+00	1,47E-02	2,06E-03	5,83E-02	5,76E-02
Klhl32	5,49E+01	9,64E-01	1,02E+00	2,36E-02	2,07E-03	8,31E-02	5,79E-02
Pou2f3	1,14E+03	-2,34E+00	6,07E-01	6,18E-17	2,12E-03	1,30E-14	5,86E-02
Creld1	7,24E+02	-8,43E-01	6,93E-01	3,60E-03	2,12E-03	1,97E-02	5,86E-02
Ctxn3	2,07E+02	-1,02E+01	1,80E+00	9,17E-11	2,11E-03	4,70E-09	5,86E-02
Ell3	2,13E+02	-2,07E+00	8,38E-01	1,86E-06	2,31E-03	3,37E-05	6,20E-02
Ttn	2,00E+03	-9,79E+00	1,56E+00	1,60E-14	2,35E-03	1,94E-12	6,25E-02
Slc25a27	2,75E+02	-6,12E-01	6,16E-01	1,46E-02	2,39E-03	5,81E-02	6,31E-02
Srpk3	2,72E+02	-4,16E+00	1,27E+00	1,88E-06	2,40E-03	3,39E-05	6,32E-02
Tmem233	6,02E+02	-1,03E+01	1,48E+00	1,16E-16	2,42E-03	2,22E-14	6,34E-02
Myhas	2,25E+02	-6,60E+00	1,41E+00	1,59E-09	2,53E-03	6,30E-08	6,53E-02
Eps8l1	2,54E+03	-1,40E+00	7,35E-01	8,59E-05	2,55E-03	9,20E-04	6,58E-02
Gm15983	1,68E+02	1,37E+00	8,98E-01	2,24E-03	2,58E-03	1,34E-02	6,63E-02
Kremen2	1,81E+02	-1,36E+00	1,13E+00	1,03E-02	2,60E-03	4,39E-02	6,65E-02
Vps72	8,96E+02	-6,71E-01	4,58E-01	2,16E-04	2,69E-03	1,99E-03	6,81E-02
Acbd4	4,61E+02	-1,55E+00	8,08E-01	2,00E-04	2,77E-03	1,87E-03	6,92E-02
Grhl1	1,56E+03	-1,07E+00	5,20E-01	2,97E-06	2,77E-03	5,02E-05	6,93E-02
Rtn2	3,23E+03	-5,36E+00	1,04E+00	3,25E-12	2,86E-03	2,43E-10	7,06E-02
Ttll10	2,75E+01	-1,23E+00	1,29E+00	2,55E-02	2,91E-03	8,82E-02	7,14E-02
5430405H02Rik	3,76E+01	-1,24E+00	7,58E-01	1,05E-03	2,98E-03	7,33E-03	7,22E-02
Ciart	1,32E+02	1,22E+00	6,35E-01	8,87E-05	2,99E-03	9,48E-04	7,23E-02
Srrm4os	1,57E+01	-4,33E+00	1,43E+00	1,60E-04	3,02E-03	1,55E-03	7,29E-02
Tbc1d2b	1,07E+02	1,73E+00	1,21E+00	6,99E-03	3,12E-03	3,28E-02	7,40E-02
Mrln	1,52E+02	-7,96E+00	1,34E+00	3,69E-10	3,26E-03	1,69E-08	7,64E-02
Hs3st6	3,93E+02	-3,77E+00	7,96E-01	3,16E-13	3,38E-03	2,95E-11	7,80E-02
Mylk2	5,00E+03	-8,66E+00	1,24E+00	2,74E-14	3,39E-03	3,16E-12	7,80E-02
Limch1	1,63E+01	-5,42E+00	1,44E+00	7,79E-05	3,37E-03	8,46E-04	7,80E-02
Hrc	2,92E+03	-7,65E+00	1,15E+00	7,89E-14	3,49E-03	8,22E-12	7,93E-02
Nudt18	1,81E+02	-6,07E-01	6,23E-01	2,68E-02	3,52E-03	9,14E-02	7,97E-02
Trpv6	1,34E+02	-2,11E+00	8,55E-01	9,76E-05	3,67E-03	1,03E-03	8,21E-02
Septin1	1,24E+02	6,30E-01	6,13E-01	2,34E-02	3,74E-03	8,27E-02	8,28E-02
Tmem38a	3,76E+03	-5,90E+00	8,80E-01	3,44E-17	3,85E-03	7,52E-15	8,42E-02
Gm15541	4,54E+01	8,82E-01	6,98E-01	1,30E-02	4,06E-03	5,30E-02	8,75E-02
Liph	2,75E+02	-2,52E+00	8,08E-01	4,35E-06	4,07E-03	7,05E-05	8,76E-02
Tmem106c	8,31E+01	-1,27E+00	7,24E-01	1,45E-03	4,09E-03	9,51E-03	8,79E-02
Sgcg	1,37E+02	-9,29E+00	1,30E+00	6,81E-09	4,13E-03	2,35E-07	8,82E-02
Clstn3	9,33E+00	-1,48E+00	1,32E+00	2,75E-02	4,19E-03	9,30E-02	8,86E-02
Gng13	1,84E+01	-1,65E+00	1,22E+00	1,48E-02	4,27E-03	5,84E-02	8,91E-02
Sypl2	1,32E+03	-8,65E+00	9,23E-01	1,18E-24	4,38E-03	1,14E-21	9,06E-02

Lanc1	1,18E+03	-6,95E-01	4,81E-01	1,47E-03	4,48E-03	9,58E-03	9,20E-02
Runx3	5,52E+00	-1,33E+00	1,08E+00	2,42E-02	4,61E-03	8,47E-02	9,34E-02
Zic4	2,85E+01	-1,63E+00	1,19E+00	1,64E-02	4,61E-03	6,32E-02	9,34E-02
Mybpc2	1,29E+04	-8,84E+00	1,15E+00	3,92E-11	4,69E-03	2,26E-09	9,41E-02
Ces1d	5,79E+02	-3,99E+00	8,61E-01	9,79E-08	4,72E-03	2,46E-06	9,41E-02
Adh7	4,89E+02	-1,42E+00	6,46E-01	1,23E-04	4,74E-03	1,25E-03	9,42E-02
Cox8a	3,54E+03	3,75E-01	3,90E-01	1,57E-02	4,76E-03	6,14E-02	9,43E-02
Slc6a14	4,45E+02	-2,23E+00	5,23E-01	2,46E-15	4,76E-03	3,39E-13	9,43E-02
Dusp13	3,89E+02	-5,71E+00	7,19E-01	1,95E-27	4,77E-03	3,99E-24	9,44E-02
Cfap100	1,95E+01	-1,68E+00	9,59E-01	6,34E-03	4,79E-03	3,04E-02	9,47E-02
Ubald1	1,49E+03	-5,85E-01	4,07E-01	6,27E-04	4,85E-03	4,81E-03	9,56E-02
Gm16576	4,11E+01	-2,70E+00	7,00E-01	1,38E-08	4,90E-03	4,34E-07	9,63E-02
4930481B07Rik	8,59E+00	-1,09E+00	8,47E-01	2,51E-02	5,07E-03	8,71E-02	9,82E-02
Upk3b	4,86E+01	-7,04E+00	1,09E+00	6,06E-08	5,11E-03	1,61E-06	9,87E-02
Map1lc3a	3,41E+03	-1,37E+00	6,25E-01	1,61E-04	5,14E-03	1,55E-03	9,91E-02

Anlage 1: Kriterien zur Belastungsbewertung mit jeweiliger Punktevergabe jeder auftretenden Belastung für das Ak-EBA-Mausmodell. Angegeben sind die einzelnen Bewertungskriterien (Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Klinischer Befund und tiermodellabhängige Bewertung) mit der jeweiligen Punktevergabe bei Eintreten, nach der jeder Maus an Tag Null, Vier, Acht und Zwölf während des Ak-EBA-Mausmodells beurteilt wurde. Ab einer totalen Belastung von über 20 Punkten wurde der Versuch an der jeweiligen Maus abgebrochen.

Beobachtung	Punktewertung
I Körpergewicht	
- unbeeinflusst oder Anstieg	0
- Gewichtsreduktion <5% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments	1
- Gewichtsreduktion 5-10% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments	5
- Gewichtsreduktion 11-20% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments	10
- Gewichtsreduktion >20% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments	20
II Allgemeinzustand	
- Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend	0
- Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb; erhöhter Muskeltonus (Piloerektion)	1
- Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb, erhöhter Muskeltonus	5
- Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus	10
- Verkrampfungen, Lähmungen (Rumpfmuskulatur, Extremitäten); Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an	20
III Spontanverhalten	
- normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
- geringe Abweichungen vom Normalverhalten (leicht reduzierter Schwanztonus)	1
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik (Schwanztonus fehlend)	5
- Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypien; Koordinationsstörungen Hyperkinetik (auffälliges Kratzverhalten über 5 von 10 min)	10
- wiederholte Schmerzlauter beim Ergreifen; Selbstamputation (Autoaggression, Autotomie)	20

IV Klinischer Befund (Messungen von Temperatur und Atmung nur wenn Auffälligkeiten unter II und III beobachtet werden) - Temperatur, Atmung und Puls normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durchblutet - geringe Abweichungen von der Normalsituation - Temperaturabweichung 1 - 2°C, Atmung und Puls + 30% ¹ - Temperaturabweichung >2°C, Atmung/Puls +/- 50% ¹	0 1 10 20
V Tiermodellabhängige Bewertung (EBA und BP Modell) - Keine sichtbaren Läsionen - Betroffene Körperfläche unter 5 % - Betroffene Körperfläche zwischen 5-10 % - Betroffene Körperfläche zwischen 11-25 % - Betroffene Körperfläche über 25 %	0 1 5 10 20
Bewertung, Maßnahmen	Punktsumme
Belastungsgrad 0 = keine Belastung Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung; ggf. tierärztliche Versorgung einleiten (Analgesie) Belastungsgrad 3 = hochgradige Belastung; sofort Versuch am betroffenen Tier abbrechen und Tier einschläfern	0 1-9 10-19 20 oder höher

angelehnt an Kriterien der Stabsstelle Arbeitssicherheit, Tier- und Umweltschutz der Julius-Maximilians Universität Würzburg und Morton and Griffiths (Vet Rec. 1985 Apr 20; 116(16): 431-6)

Überwachungshäufigkeit im Beobachtungszeitraum:

Modell	Häufigkeit pro Woche
Antikörpertransfer-induzierte EBA	2x

Sonstiges :

Definitive Abbruchkriterien:

- Abnahme des Körpergewichtes um > 20% gegenüber Ausgangsgewicht, über mehr als 2 Tage andauernd²
- Tier fühlt sich kalt an; Beine und Bauchhaut bläulich-dunkel als Zeichen eines gestörten Kreislaufes
- Tier zittert ständig, hat Krämpfe, kann sich nicht koordiniert bewegen
- schwere Automutilation (Hautwunden, abgebissene Zehen etc.)
- flache, angestrengte Atmung

Anlage 2: Kriterien zur Belastungsbewertung mit jeweiliger Punktevergabe jeder auftretenden Belastung für das Ag-EBA-Mausmodell. Angegeben sind die einzelnen Bewertungskriterien (Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Klinischer Befund, Belastung durch Fußsohleninjektion und tiermodellabhängige Bewertung) mit der jeweiligen Punktevergabe bei Eintreten, nach der jeder Maus an den ersten drei Tagen und anschließend einmal die Woche während des Ag-EBA-Mausmodells beurteilt wurde. Ab einer totalen Belastung von über 20 Punkten wurde der Versuch an der jeweiligen Maus abgebrochen.

Beobachtung	Punktevergabe
I Körpergewicht - unbeeinflusst oder Anstieg - Gewichtsreduktion <5% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments - Gewichtsreduktion 5-10% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments - Gewichtsreduktion 11-20% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments - Gewichtsreduktion >20% im Vergleich zu Tag 0 des Experiments	0 1 5 10 20
II Allgemeinzustand - Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend - Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb; erhöhter Muskeltonus (Piloerektion) - Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb, erhöhter Muskeltonus - Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus - Verkrampfungen, Lähmungen (Rumpfmuskulatur, Extremitäten); Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an	0 1 5 10 20
III Spontanverhalten - normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) - geringe Abweichungen vom Normalverhalten (leicht reduzierter Schwanztonus) - ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik (Schwanztonus fehlend) - Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypien; Koordinationsstörungen Hyperkinetik (auffälliges Kratzverhalten über 5 von 10 min) - wiederholte Schmerzlaute beim Ergreifen; Selbstamputation (Autoaggression, Autotomie)	0 1 5 10 20
IV Klinischer Befund (Messungen von Temperatur und Atmung nur wenn Auffälligkeiten unter II und III beobachtet werden) - Temperatur, Atmung und Puls normal, Extremitäten warm, Schleimhäute gut durchblutet - geringe Abweichungen von der Normalsituation - Temperaturabweichung 1 - 2°C, Atmung und Puls + 30% ¹ - Temperaturabweichung >2°C, Atmung/Puls +/- 50% ¹	0 1 10 20
V Belastung durch Fußsohleninjektion - Normale Fußsohlendicke - Leichte Schwellung der Fußsohle, keine Beeinträchtigung beim Laufen - Schwellung der Fußsohle (mit Verkrustungen oder Rötung), leichte Gangveränderungen (hochhackiges Laufen), normale Motilität - Schwellung der Fußsohle (mit Verkrustungen oder Rötung), schmerzhaftes Gangveränderungen (hochhackiges Laufen, schmerzhaftes Laufen, verlangsamte Bewegung) - Schwellung der Fußsohle mit Verkrustungen, Hypokinetik, Tier wirkt apathisch	0 1 5 10 20
VI Tiermodellabhängige Bewertung (EBA und BP Modell)	

- Keine sichtbaren Läsionen	0
- Betroffene Körperfläche unter 5 %	1
- Betroffene Körperfläche zwischen 5-10 %	5
- Betroffene Körperfläche zwischen 11-25 %	10
- Betroffene Körperfläche über 25 %	20
Bewertung, Maßnahmen	Punktsumme
Belastungsgrad 0 = keine Belastung	0
Belastungsgrad 1 = geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten	1-9
Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung; ggf. tierärztliche Versorgung einleiten (Analgesie)	10-19
Belastungsgrad 3 = hochgradige Belastung; sofort Versuch am betroffenen Tier abbrechen und Tier einschläfern	20 oder höher

angelehnt an Kriterien der Stabsstelle Arbeitssicherheit, Tier- und Umweltschutz der Julius-Maximilians Universität Würzburg und Morton and Griffiths (Vet Rec. 1985 Apr 20; 116(16): 431-6)

Überwachungshäufigkeit im Beobachtungszeitraum:

Modell	Häufigkeit pro Woche
Immunisierungs-induzierte EBA	4h, 24h, 48h, 72h nach Immunisierung (danach 1x Woche)

Sonstiges :

Definitive Abbruchkriterien:

- Abnahme des Körpergewichtes um > 20% gegenüber Ausgangsgewicht, über mehr als 2 Tage andauernd²
- Tier fühlt sich kalt an; Beine und Bauchhaut bläulich-dunkel als Zeichen eines gestörten Kreislaufes
- Tier zittert ständig, hat Krämpfe, kann sich nicht koordiniert bewegen
- schwere Automutilation (Hautwunden, abgebissene Zehen etc.)
- flache, angestrengte Atmung