

**Aus dem
Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie**

Direktor: Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt

**Pharmakologische Inhibition des Komplement-5a-Rezeptors bei
Antikörpertransfer-induzierter Epidermolysis bullosa acquisita**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von
Martti Klockemann
aus Kiel

Lübeck 2018

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.01.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin

I say: Neutrophils are not to blame. They do their job. - *Tamás Laskay*

GRK 1727, Jour Fixe, 12.01.16

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
Liste der im Text verwendeten Abkürzungen:	8
1 Einleitung und Fragestellung.....	11
1.1 Aufbau und Funktion humaner Haut	11
1.2 Blasenbildende Autoimmundermatosen	12
1.3 Epidermolysis bullosa acquisita	14
1.3.1 Pathogenese.....	15
1.3.2 Therapie	17
1.4 Das Anaphylatoxin C5a als wichtige Komponente des Komplementsystems.....	18
1.4.1 Inhibition des Komplementsystems – ein vielversprechender Therapieansatz	21
1.4.2 W-54011, ein spezifischer Antagonist des Komplement-5a-Rezeptors 1.....	22
1.4.3 A8 ^{Δ71-73} als Antagonist der Komplement-5a-Rezeptoren 1 und 2	22
1.5 Zwei-Photonen-Mikroskopie.....	23
1.6 Ziele der Arbeit.....	25
2 Methoden.....	27
2.1 Tierversuche.....	27
2.2 Antikörpertransfer-induziertes Mausmodell für Epidermolysis bullosa acquisita	27
2.2.1 Isolierung von Immunglobulin G aus Kaninchenserum.....	29
2.2.2 Affinitätsaufreinigung spezifischer Antikörper gegen murines Kollagen Typ VIIc ...	30
2.2.3 Fluoreszenzmarkierung des aufgereinigten Antikörpers	31
2.2.4 Testung der Bindekapazität des spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpers	32
2.3 Visualisierung der Neutrophilenextravasation mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie	32
2.4 Isolation muriner neutrophiler Granulozyten.....	34
2.5 Quantifizierung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus murinen neutrophilen Granulozyten.....	35
2.6 Histologische Analysen.....	36
2.6.1 Histochemische Färbung von Gewebeschnitten und mikroskopische Analyse	36
2.6.2 Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten und mikroskopische Analyse	37
2.7 Quantifizierung der betroffenen Körperoberfläche und statistische Analysen.....	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Der aufgereinigte Antikörper bindet an der dermo-epidermalen Junctionszone	39
3.2 Passiver Antikörpertransfer verursacht Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita bei Mäusen.....	40

3.2.1	An Gewebeschnitten von Ohren sind Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita nachweisbar	41
3.2.2	An Gewebeschnitten betroffener Ohren lagert sich die Komplementkomponente 3 an der dermo-epidermalen Junktionszone ab	43
3.3	Die pharmakologische Blockade des Komplement-5a-Rezeptors 1 verbessert das Krankheitsbild nicht	44
3.4	Kombinierte pharmakologische Blockade der Komplement-5a-Rezeptoren 1 und 2 verbessert das Krankheitsbild nicht	45
3.5	Die kombinierte Blockade der Komplement-5a-Rezeptoren 1 und 2 reduziert für einen kurzen Zeitraum die Extravasation neutrophiler Granulozyten	48
3.6	Nur A8 ^{Δ71-73} zeigt <i>in vitro</i> Effekte, C5a-vermittelte Signale zu inhibieren	51
4	Diskussion.....	56
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	56
4.2	Potentielle strukturelle Fehlerquellen	56
4.2.1	Wirksamkeit der verwendeten Pharmaka	56
4.2.2	Frühere Versuchsergebnisse – Artefakte eines fehlerhaften Mausmodells?	58
4.2.3	Differenzen in den verwendeten Mausstämmen	60
4.3	Limitationen	61
4.4	Pathogenesemodell unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse	62
4.4.1	Die Expression von Fcγ-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten ist notwendig, um das Krankheitsbild der Epidermolysis bullosa acquisita auszulösen.....	62
4.4.2	Es bestehen Interaktionen zwischen Komplementsystem und Fcγ-Rezeptor vermittelten Signalen	63
4.4.3	Komplement-5a-Wirkungen sind nur in der Frühphase Immunkomplex-vermittelter Entzündungsreaktionen relevant	64
4.4.4	Hypothetischer Ablauf der dermalen Entzündungsreaktion bei experimenteller Epidermolysis bullosa acquisita	65
4.4.5	Interleukin-1β ist für die Aufrechterhaltung der dermalen Entzündungsreaktion verantwortlich	66
4.4.6	Das Anaphylatoxin C5a als Kickoff-Molekül für einen chronisch-inflammatorischen Teufelskreis	67
4.4.7	Potentielle Zielmoleküle zur Behandlung der Epidermolysis bullosa acquisita	69
4.5	Ausblick	70
5	Literaturverzeichnis.....	72
6	Anhänge	79
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	79
6.2	Verwendete Materialien	80
6.2.1	Geräte.....	80
6.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	81

6.2.3	Reagenzien	81
6.2.4	Pharmazeutika und Narkotika.....	82
6.2.5	Software	83
6.2.6	Puffer und Lösungen	83
6.2.6.1	Puffer zur Isolation der anti-mCOL7c-IgG	83
6.2.6.2	Puffer für ROS Release Assay	84
6.2.6.3	Anästhesien	84
6.2.7	Belegungspläne der 96-Well-Platten für ROS Release Assay	85
6.2.7.1	Vergleiche der Neutrophilen von C57Bl/6- und LysM-eGFP-Mäusen.....	85
6.2.7.2	C5a-Testung sowie Einfluss der Pharmaka auf C5a-Freisetzung.....	86
7	Danksagungen	87
8	Eigenständigkeitserklärung	89
9	Lebenslauf	90

Zusammenfassung

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine Autoimmunerkrankung der Haut, die durch das Vorliegen von Antikörpern gegen Kollagen Typ VII gekennzeichnet ist. Betroffene entwickeln Blasen und Erosionen an der Haut. Unbehandelt nimmt die Krankheit einen schweren Verlauf und kann tödlich enden. Die standardmäßige Behandlung erfolgt zurzeit mit unspezifischen Immunsuppressiva. Oft werden systemische Kortikosteroide eingesetzt. Diese Therapie ist jedoch nicht immer wirksam und außerdem von starken Nebenwirkungen behaftet, weshalb die Entwicklung spezifischerer Therapieformen dringend notwendig ist.

In den letzten Jahren konnten mittels verschiedener Mausmodelle zahlreiche für das Entstehen der Krankheit wichtige Zellen und Moleküle identifiziert werden. Unter anderem fielen neutrophile Granulozyten und die Komplementkomponente C5a ins Auge. Da letztgenannte ein starker Signalgeber für neutrophile Granulozyten ist, wurde vermutet, dass C5a für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Haut verantwortlich sei. Die pharmakologische Blockade der C5a-vermittelten Signale sollte daher vor Ausprägung der Krankheit schützen.

In dieser Arbeit wird der Nachweis erbracht, dass die pharmakologische Blockade des C5a-Rezeptors keinen effektiven Schutz vor der Krankheitsausprägung der EBA darstellt. Mittels aufwendiger Visualisierungsexperimente wird festgestellt, dass diese Blockade nur in den ersten Stunden nach Krankheitsinduktion einen Effekt hat. Anhand der Ergebnisse wird, eingebettet in aktuelle Forschungsarbeiten, ein Modell der Pathogenese entwickelt, welches C5a nur zu Beginn der dermalen Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle zuweist.

Liste der im Text verwendeten Abkürzungen:

°C	Grad Celsius
A8 ^{Δ71-73}	Peptidischer C5aR- und C5L2-Antagonist
aHUS	Atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
ANCA	Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper
Betr.	Betroffene
BP180	Bullöses Pemphigoid-Antigen II
BP230	Bullöses Pemphigoid-Antigen I
BSA	Bovines Serum-Albumin
C1q	Komplementkomponente 1q
C3	Komplementkomponente 3
C5	Komplementkomponente 5
C5a	Komplementkomponente 5a
C5aR	Komplement-5a-Rezeptor 1 (identisch mit CD88)
C5b	Komplementkomponente 5b
C5L2	Komplement-5a-Rezeptor 2
CD18	Cluster of differentiation 18
CD19	Cluster of differentiation 19
CD3e	Cluster of differentiation 3e
CD88	Cluster of differentiation 88 (identisch mit C5aR)
CL-Medium	Chlorid-Medium
CXCL1	Chemokin-Ligand 1
CXCL2	Chemokin-Ligand 2
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DEJ	Dermo-epidermale Junktionszone
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
Fab-Teil	"Fragment antigen binding", eine Antikörperregion
FBS	Fetales bovines Serum
Fcγ-Rezeptor	Rezeptor, der den Fc-Teil von IgG bindet
Fc-Teil	"Fragment crystallisable", eine weitere Antikörperregion
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein
h	Stunden
HBSS	Hank's balanced salt solution
HE	Hämatoxilin-Eosin
HLA-D2	Haupt-Histokompatibilitätskomplex Klasse II Haplotyp DR2
Hz	Hertz
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IgA	Immunglobulin Klasse A

IgG	Immunglobulin Klasse G
IL-1	Interleukin-1
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IVIG	Intravenöses Immunglobulin G
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LTB4	Leukotrien B4
LysM-Promoter	Lysozym-M-Promoter
m ²	Quadratmeter
M	Molar
MAC	Membrane attack complex
MACS	Magnetic activated cell sorting
mCol7c	Murines Kollagen Typ VII, Fragment C
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
N	Neutrophile Granulozyten
NaCl	Natriumchlorid
NADPH-Oxidase	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Oxidase
NaOH	Natriumhydroxid
NC16A	Nicht-Kollagene Domäne 16A
NC1-Domäne	Nicht-Kollagene Domäne 1
NC2-Domäne	Nicht-Kollagene Domäne 2
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMT	Photomultiplier
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
RLU	Relative Lumineszenzeinheiten
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
s	Sekunden
SHG-Signal	Second harmonic generation-Signal
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
W-54011	Niedermolekularer C5aR-Antagonist
μ g	Mikrogramm

μl
μm

Mikroliter
Mikrometer

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Aufbau und Funktion humaner Haut

Die Haut ist das flächenmäßig größte Organ des menschlichen Körpers. Mit einer Oberfläche von 1,4–2 m² und einem Gewicht von 10-20 kg (Reißig und Salvetter, 2014) bedeckt sie den gesamten Körper und schließt diesen nach außen ab. Ihr fallen zahlreiche lebensnotwendige Funktionen zu, sodass großflächige Störungen der Integrität der Haut zu lebensbedrohlichen Zuständen führen können.

Die wohl offensichtlichste Funktion der Haut ist ihre Barrierefunktion gegenüber der Umwelt – der kompakte Aufbau der Epidermis bietet einen Schutz vor Fremdkörpern, durch die Sekretion antimikrobieller Peptide werden potentielle Pathogene schon außerhalb des Körpers wirksam bekämpft. Die mechanische Stabilität der Haut schützt bei Stößen, Kratzern und Schnitten. Verschiedenste Sensoren der Haut sind für die Aufnahme von Reizen verantwortlich, auch zu diesem Zweck ist die Haut fast überall von feinen Haaren bedeckt. Das Aufrechterhalten des inneren Milieus stellt eine weitere wichtige Funktion der Haut dar. Man darf also ohne Zweifel behaupten, dass die Haut ein komplexes, für den Körper lebensnotwendiges Organ ist. Um die einzelnen Funktionen der Haut verstehen und nachvollziehen zu können, ist ein kurzer Einblick in den Aufbau ebendieser vonnöten.

Humane Haut besteht aus drei Schichten: der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und der Unterhaut (Subkutis). Einen Überblick über den Aufbau vermittelt Abbildung 1.

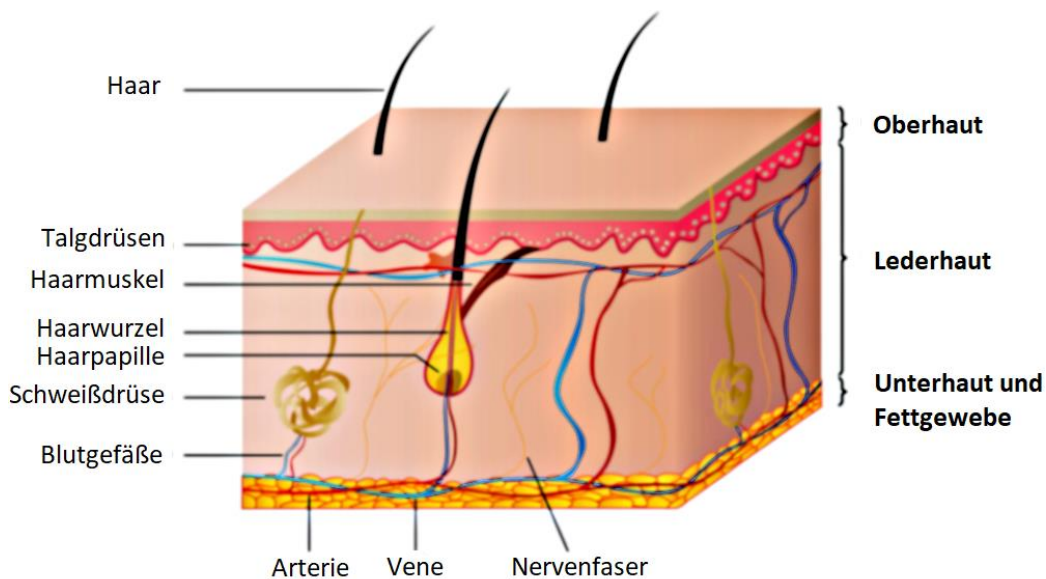


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Haut. Man erkennt deutlich die Anordnung von Ober-, Leder- und Unterhaut. Zwischen Ober- und Lederhaut ist als rote Linie die Basalmembran dargestellt. (©bilderzweig. Fotolia.com, 14.06.2016)

Nach außen hin bildet die Epidermis als mehrschichtig verhorntes Plattenepithel die äußerste Barriere gegenüber auf den Körper einwirkender Umwelteinflüsse. In einem Zyklus ständiger Erneuerung werden in der Tiefe der Epidermis, an der Basalmembran, neue Zellen gebildet, die aufgrund ihres hohen Gehalts an Keratin als Keratinozyten bezeichnet werden. Diese Zellen werden im Laufe ihres Lebens von in der Tiefe neu gebildeten Zellen immer weiter nach außen gedrängt. Auf ihrem Weg differenzieren sie sich und verlieren Wasser, der Zellkern zersetzt sich. Am Ende sterben die Zellen ab. Die äußersten, je nach Hautregion 25-100 Zellschichten (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015) bilden das Stratum corneum – eine kompakte Schicht abgestorbener Keratinozyten, die eine solide, nicht schmerzempfindliche Barriere zur Umwelt bildet. Unter der Epidermis liegt die Basalmembran, eine Schicht verschiedener Faser- und Verbindungsproteine, an denen die Basalzellen der Epidermis über Hemidesmosomen verankert sind. Von unten sind die Kollagenfasern der Dermis über Ankerfibrillen, hauptsächlich Kollagen Typ VII, mit der Basalmembran verbunden. Sie bildet so eine solide Basis für die Epidermis und stellt außerdem sicher, dass auf die Epidermis einwirkende Scherkräfte an die Kollagenfasern der darunterliegenden Dermis übertragen werden.

Unter der Basalmembran liegt die Dermis, welche sich wiederum in zwei Schichten einteilen lässt. Der direkt an die Basalmembran anschließende Teil wird als Stratum papillare bezeichnet und besteht hauptsächlich aus locker gepacktem Kollagen Typ I und III, darüber hinaus finden sich hier zahlreiche elastische Fasern. Die tiefere Schicht der Dermis, welche auch den Übergang zur Subkutis bildet, wird als Stratum reticulare bezeichnet und besteht zum Großteil aus Kollagen Typ I, welches enger gepackt ist als im Stratum papillare. Die gesamte Dermis ist von Blutgefäßen und Nervenfasern durchsetzt.

Das Stratum reticulare geht schließlich in die Subkutis über, einer regional sehr unterschiedlich stark ausgeprägten Schicht von Adipozyten, die je nach Körperregion verschiedene Aufgaben erfüllen können. An einigen Regionen auftretendes braunes Fettgewebe dient der Thermogenese. Auch unter der Fußsohle ist das subkutane Fettgewebe hochspezialisiert, strukturiert als kleine Druckpolster dient es hier der Stoßdämpfung beim Auftreten.

1.2 Blasenbildende Autoimmundermatosen

Der Körper beherbergt mit dem Immunsystem einen hocheffektiven Mechanismus zur Erkennung und Bekämpfung von Fremdkörpern. Auf eine genaue Beschreibung dieser Mechanismen muss hier verzichtet werden, es sei lediglich erwähnt, dass in seltenen Fällen auch körpereigene Strukturen von diesen Mechanismen als fremd erkannt und in der Folge bekämpft werden. Dieser Vorgang wird als Toleranzverlust bezeichnet. Wenn dies passiert, entstehen chronische, oft schwerwiegende

Krankheitsbilder, die als Autoimmunkrankheiten bezeichnet werden und danach klassifiziert werden, welche Strukturen vom Immunsystem angegriffen werden. Die Gründe, warum der Körper eigene Strukturen als fremd erkennt, sind noch nicht hinlänglich bekannt. Man vermutet jedoch, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Takai, 2002).

Zur Gruppe der Autoimmunkrankheiten gehören auch die blasenbildenden Autoimmundermatosen, eine Gruppe schwerwiegender Erkrankungen der Haut, die gemeinsam haben, dass im Rahmen einer Autoimmunreaktion Antikörper gegen bestimmte Strukturproteine der Haut gebildet werden. Nach ihrer Bildung binden diese Antikörper an ihre Zielproteine, sodass diese ihre Funktion nicht mehr erfüllen können. Im Falle der blasenbildenden Autoimmundermatosen werden solche Proteine attackiert, die für den Zusammenhalt der einzelnen Hautkomponenten verantwortlich sind. Können diese ihre Funktion nicht mehr erfüllen, lösen sich die unterschiedlichen Hautschichten voneinander, makroskopisch kommt es zur Blasenbildung.

Die Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen lässt sich weiter in Pemphigus- und Pemphigoid-Erkrankungen unterteilen. Bei Ersteren kommt es zu Blasenbildung innerhalb der Epidermis. Die häufigsten Varianten sind hier der Pemphigus vulgaris und der Pemphigus foliaceus (Chams-Davatchi et al., 2005). Bei den Pemphigoid-Erkrankungen findet die Spaltbildung an der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) zwischen Dermis und Epidermis statt. Mit Abstand häufigstes Krankheitsbild ist hier das bullöse Pemphigoid (Bertram et al., 2009), seltenere Varianten sind die lineare IgA-Dermatose und die Epidermolysis bullosa acquisita. Eine Übersicht über verschiedene Ziel-Antigene bei blasenbildenden Autoimmundermatosen und deren Funktion an der DEJ bietet Abbildung 2.

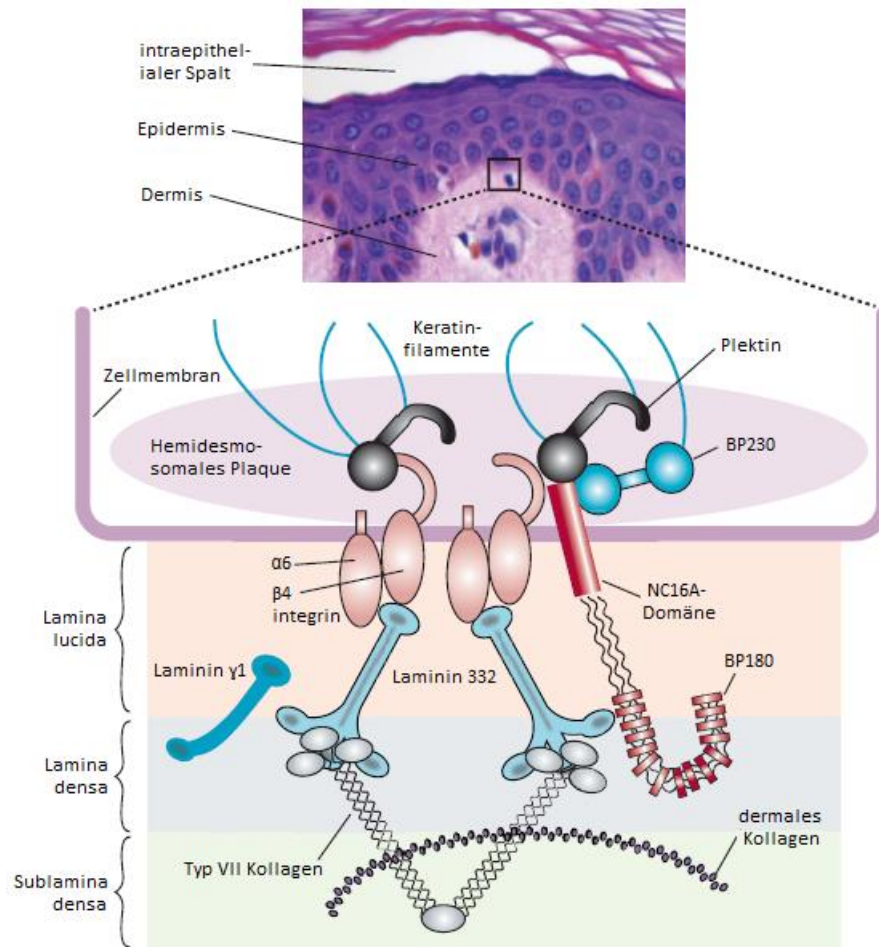


Abbildung 2: Antigene bei blasenbildenden Autoimmundermatosen. Man erkennt deutlich die Ankerfunktion von Kollagen Typ VII, dem Antigen bei Epidermolysis bullosa acquisita. Antikörper gegen BP 230 oder die NC16A-Domäne von BP180 lösen das bullöse Pemphigoid aus. Laminin γ 1 ist das Antigen beim Anti-p200/Laminin γ 1-Pemphigoid, beim Schleimhautpemphigoid ist das Antigen meist Laminin 332 (modifiziert nach Schmidt und Zillikens, 2013).

1.3 Epidermolysis bullosa acquisita

Nach obenstehender Klassifikation gehört die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) zu den Pemphigoid-Erkrankungen. Mit einer Inzidenz von 0,2 - 0,5 Neuerkrankungen pro 1 Millionen (Mio.) Einwohner pro Jahr (Bernard et al., 1995; Bertram et al., 2009) nimmt sie hier numerisch im Vergleich zum bullösen Pemphigoid [Inzidenz: 13,4 pro 1 Mio. Einwohner pro Jahr (Bertram et al., 2009)] eine untergeordnete Rolle ein. Da es sich um eine chronische Krankheit handelt, wird die Prävalenz höher geschätzt, hierzu sind jedoch keine Daten verfügbar. Im Durchschnitt setzt die Krankheit im Alter von 47 Lebensjahren ein (Ludwig, 2013), es sind jedoch auch Fälle bei Kindern und Jugendlichen beschrieben worden (Baican et al., 2013; Liszewski et al., 2015). Das Vorliegen des Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Klasse II-Haplotyps DR2 (HLA-DR2) erhöht das Risiko, zu erkranken (Gammon et al., 1988). Man vermutet jedoch, dass es auch außerhalb dieses Genlokus Gene gibt, die die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen. So waren in einer großen

Patientenkohorte von EBA-Patienten schwarzhäutige Menschen afrikanischen Ursprungs deutlich überrepräsentiert, diese waren bei Erkrankungsbeginn darüber hinaus jünger als Vergleichspatienten aus den Niederlanden und Korea (Zumelzu et al., 2011; Ludwig, 2013).

Klinisch lassen sich zwei Formen der EBA voneinander differenzieren. Etwa ein Drittel aller Patienten entwickelt die noninflammatorische, oft auch als mechanobullös oder klassisch bezeichnete Variante des Krankheitsbildes. Hier kommt es zu Hautläsionen und Bildung von straffen Blasen, ohne dass dieser Vorgang von einer kutanen Entzündung begleitet wird. Oft ist auch die orale Mukosa betroffen. Bei den anderen zwei Dritteln aller Patienten manifestiert sich die Krankheit als inflammatorische Variante, bei der die Hautläsionen von einer kutanen Entzündungsreaktion begleitet werden. Hier kommt es neben der Bildung straffer Blasen, die teilweise einreißen, zu Hautrötungen und Juckreiz der betroffenen Regionen (Kim et al., 2011; Ludwig, 2013).

1.3.1 Pathogenese

Die Pathogenese der EBA ist noch nicht vollständig verstanden – auch diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Teilaspekt dieses Prozesses. Nach der ersten Fallbeschreibung eines EBA-Patienten (Elliott, 1895) dauerte es mehr als 75 Jahre, bis erste diagnostische Kriterien festgelegt wurden (Roeningk, 1971). Das Antigen war zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt, die Diagnose beruhte auf einer negativen Familienanamnese und dem Ausschluss anderer blasenbildender Autoimmundermatosen. Nach heutigem Forschungsstand beginnt der Krankheitsverlauf mit dem Toleranzverlust des Immunsystems für Kollagen Typ VII, welches an der DEJ als molekulare Brücke zwischen dermalen und epidermalen Strukturen fungiert. In der Folge werden vom Körper Antikörper, vorwiegend Immunglobulin G (IgG), gebildet. Diese richten sich insbesondere gegen die nicht-kollagene Domäne 1 (NC1) des Kollagens Typ VII, seltener werden auch Epitope innerhalb der nicht-kollagenen Domäne 2 (NC2) oder der tripelhelikalen kollagenen Domäne in der Mitte des Proteins erkannt (Ishii et al., 2004; Ishii et al., 2009).

Nach Bindung der Antikörper an das Kollagen Typ VII entsteht an der DEJ unter anderem durch Aktivierung des Komplementsystems ein proinflammatorisches Milieu, in der Folge werden neutrophile Granulozyten aus den dermalen Blutgefäßen rekrutiert. Sowohl die komplette Depletion neutrophiler Granulozyten als auch die Depletion von Cluster of differentiation 18 (CD18), einem Adhäsionsfaktor, der für die Extravasation neutrophiler Granulozyten aus den Blutgefäßen ins Gewebe notwendig ist, verhindern das Entstehen von Blasenbildung bei Versuchstieren komplett (Chiriac et al., 2007). Wichtig ist hier zu erwähnen, dass die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten wohl über das „fragment crystallisable“ (Fc-Teil) der Antikörper

moduliert wird, da die Injektion von Antigen-bindenden Antikörperfragmenten (Fab-Teil) im Tierversuch nicht ausreicht, um Blasenbildung auszulösen (Sitaru et al., 2005). Es wird vermutet, dass für diesen Rekrutierungsprozess maßgeblich aktive Komponenten des Komplementsystems verantwortlich sind – dieses System kann über die gewebegebundenen Antikörper aktiviert werden. In Gewebeschnitten erkrankter Mäuse ist die Komplementkomponente 5 (C5) an der DEJ nachweisbar, darüber hinaus sind C5-Knockout-Mäuse vor der Ausprägung der Krankheit geschützt (Sitaru et al., 2005). In einem weitergehenden Versuch konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es ausreicht, den alternativen Weg der Komplementaktivierung zu blockieren, um Mäuse vor dem Krankheitsbefall zu schützen. Die Blockade des klassischen Weges der Komplementaktivierung führt zwar zu einem im Verlauf signifikant weniger ausgeprägtem Phänotyp, kann die Entstehung der Krankheit aber nicht komplett verhindern (Mihai et al., 2007). Im Gewebe setzen die aktivierten neutrophilen Granulozyten dann verschiedene Stoffe frei, die die Integrität der Haut stören und so für die Blasenbildung verantwortlich zu sein scheinen. Neben der Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase), die für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich ist, konnte nachgewiesen werden, dass auch Gelatinase B und Elastase notwendig sind, um Blasenbildung auszulösen (Shimanovich et al., 2004; Chiriac et al., 2007).

Neben den oben beschriebenen Mechanismen sind noch zahlreiche weitere Moleküle und Zellen in die Pathogenese involviert, deren Einordnung sich auf zeitlicher und räumlicher Ebene jedoch als äußerst schwierig erweist. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass auch die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und IL-6, der Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF) und die Chemokin-Liganden 1 und 2 (CXCL1; CXCL2) eine Rolle in der EBA-Pathogenese spielen (Ludwig, 2013).

Nach heutigem Kenntnisstand kommt es also nach Toleranzverlust gegenüber Kollagen Typ VII zur Antikörperbildung gegen dieses Molekül. Die Bindung der Antikörper an der DEJ führt zur, vermutlich Komplement-vermittelten, Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Haut. Die Freisetzung von ROS und verschiedenen Proteasen aus diesen Zellen ist dann für die Blasenbildung und Gewebeschädigung verantwortlich. Abbildung 3 gibt einen Überblick über dieses Modell der Pathogenese.

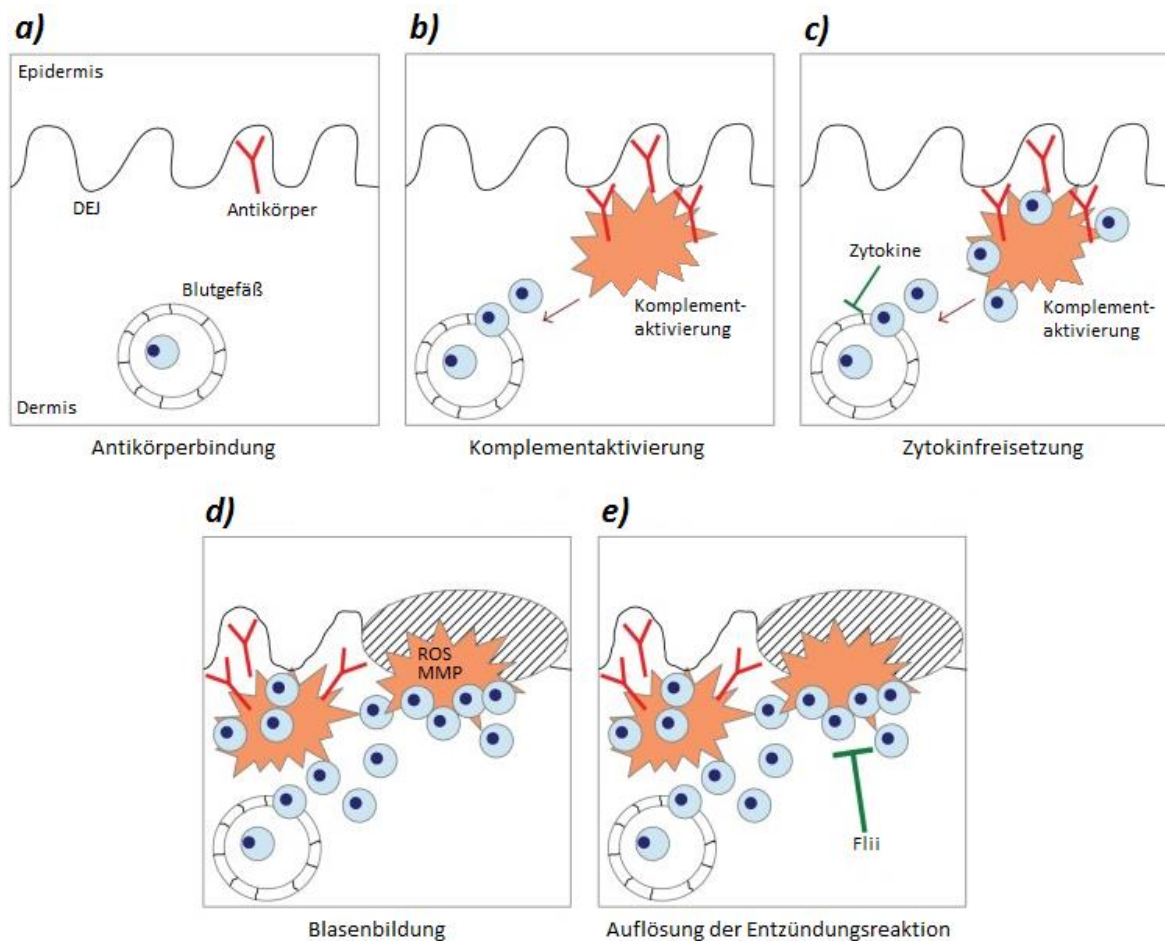


Abbildung 3: Pathogenese der Gewebeschädigung bei experimenteller Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Antikörperbindung an die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ) (a) führt zur lokalen Aktivierung des Komplementsystems (b). Spaltprodukte des Komplementsystems, darunter C5a, vermitteln die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus den Blutgefäßen in das Gewebe der Dermis. Noch nicht näher definierte Zellen setzen in der Folge Zytokine frei, die teils pro-, teils antiinflammatorische Effekte haben (c). Die eigentliche Blasenbildung wird hauptsächlich durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) vermittelt, welche von Neutrophilen freigesetzt werden (d). Für das Abklingen der Entzündungsreaktion scheint unter anderem Flightless-1 (Flii) von Bedeutung zu sein (e) (modifiziert nach Ludwig, 2013).

1.3.2 Therapie

Die Therapie der EBA gestaltet sich, wie bei vielen Autoimmunkrankheiten, ausgesprochen schwierig. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung sind keine kontrolliert-randomisierten Studien verfügbar. Die meisten Patienten werden mit einem oralen Kortikosteroid (0,5-1,5 Milligramm (mg) / Kilogramm (kg) pro Tag) behandelt (Ishii et al., 2010), zur Dosisreduktion wird oft ein Immunsuppressivum (meist Azathioprin oder Methotrexat) parallel verabreicht. Einen vielversprechenden Therapieansatz stellt darüber hinaus Kolchizin dar (Megahed und Scharffetter-Kochanek, 1994), welches auch in Monotherapie eine gute Wirksamkeit zeigte. Allen diesen klassischen Therapiemethoden ist gemein, dass durch die sehr unspezifischen Wirkungen der Medikamente teils starke Nebenwirkungen auftreten. Deren negative Folgen überlagern im Empfinden der Patienten oft die durch den Therapieerfolg erzielten Erfolge.

In den letzten Jahren gab es vielfache Ansätze, spezifischere und von weniger Nebenwirkungen behaftete Therapiemethoden zu entwickeln. Getestet wurden diese zu Großteilen an therapierefraktären EBA-Patienten. Besonders vielversprechend erscheint hier die kontinuierliche intravenöse Applikation hoher Dosen Immunglobulin G (IVIG), die in einer kleinen Kohorte therapierefraktärer EBA-Patienten zur deutlichen Besserung des Krankheitsbildes bei nur geringen Nebenwirkungen führte (Ahmed und Gürcan, 2012). Auch Dapson wird häufig in Kombinationstherapie angewendet (Kim et al., 2011). Sein Nutzen als Monotherapie ist jedoch nur für einen einzelnen Fall publiziert (Hughes und Callen, 2001). Weiterhin rückte Rituximab in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus, da es bei anderen blasenbildenden Autoimmundermatosen erfolgreich eingesetzt wurde (Joly et al., 2007). Auch bei der EBA scheint dieses Medikament eine Therapiealternative darzustellen, die kleine Fallzahl und die Tatsache, dass es meist in Kombination mit anderen Arzneien verwendet wurde, erlaubt aber keine finale Aussage über seine Wirksamkeit. Selbiges gilt auch für den Ansatz, zirkulierende Autoantikörper mittels Immunoabsorption aus dem Serum zu entfernen (Ludwig, 2013).

1.4 Das Anaphylatoxin C5a als wichtige Komponente des Komplementsystems

Das Komplementsystem ist als Teil des angeborenen Immunsystems zu verstehen, dessen Aufgabe es ist, den Körper durch verschiedene Funktionen bei der Fremdkörperabwehr zu unterstützen. Molekular handelt es sich um eine Enzymkaskade, die durch verschiedene Stimuli (Aktivierungswege) aktiviert wird und dessen Spaltprodukte vielfältige Abwehrfunktionen wahrnehmen. Gängigerweise unterscheidet man zwischen dem klassischen, dem alternativen und dem Lektinweg der Komplementaktivierung. Alle drei Arten der Aktivierung führen letztlich dazu, dass das System seine drei Hauptfunktionen erfüllen kann – die Opsonisierung von Fremdkörpern, deren Bekämpfung durch Bildung des Membran attack complex (MAC) und die Rekrutierung von Entzündungszellen über die Freisetzung von Anaphylatoxinen (Murphy et al., 2014).

Auf eine genaue Darstellung der verschiedenen Aktivierungswege muss hier verzichtet werden. Letztlich münden alle in einer gemeinsamen Endstrecke, in der die Komplementkomponente 5 (C5) in ihre Spaltprodukte C5a und C5b gespalten wird. Während der Faktor C5b im weiteren Verlauf wichtig für die Bildung des MAC ist und so der Lyse von Bakterien dient, ist C5a als Anaphylatoxin für die Rekrutierung von Entzündungszellen von extremer Wichtigkeit. Einen Überblick über Aktivierungs- und Effektormechanismen des Komplementsystems bietet Abbildung 4.

Das Komplementsystem

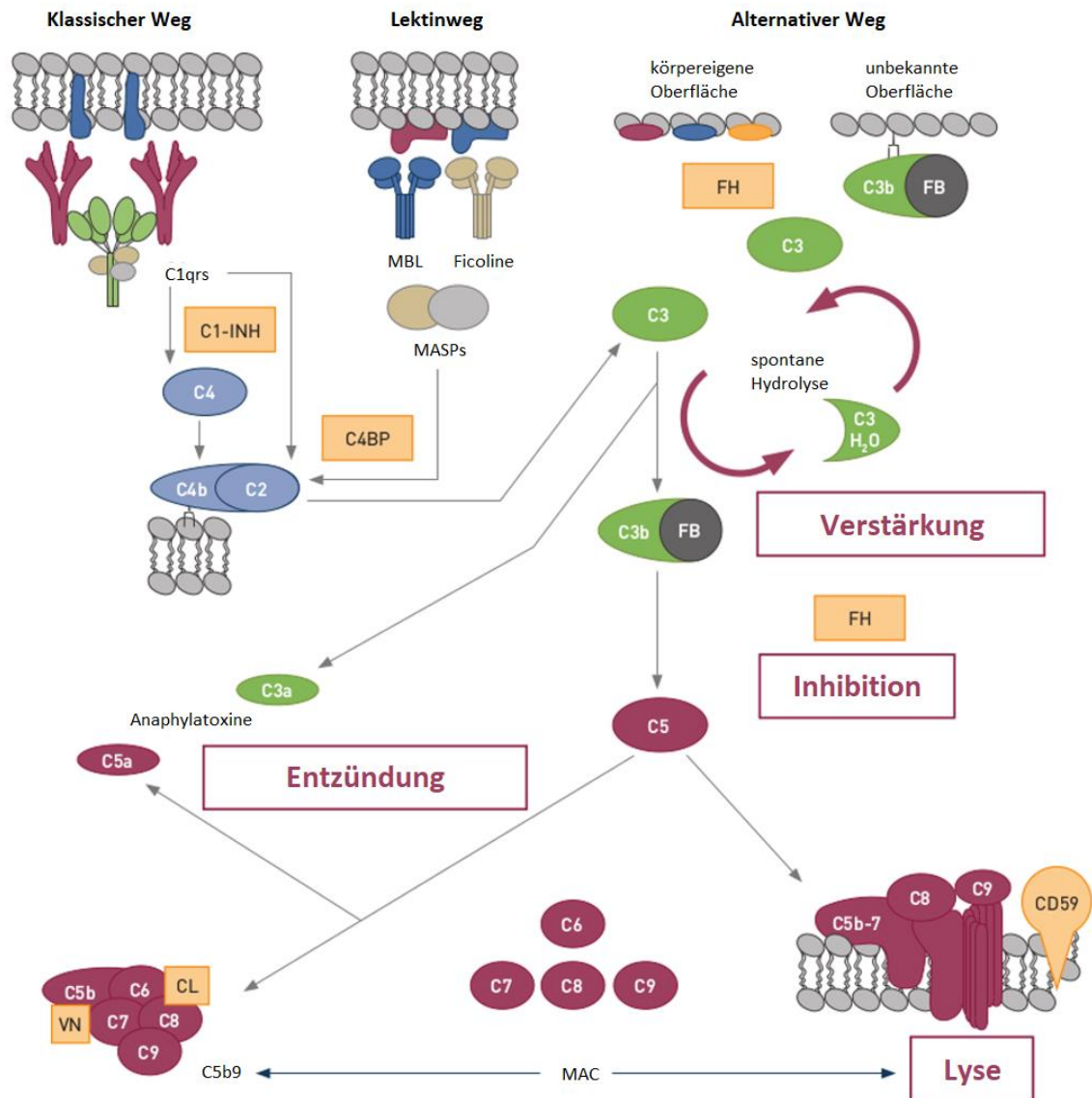


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Komplementsystems. Beim klassischen und beim Lektinweg induziert die Aktivierung von Serinproteasen [C1qrs bzw. Mannose-assoziierte Serinproteasen (MASPs)] die Spaltung von C2 in C2a und C2b und von C4 in C4a und C4b (nicht dargestellt). C2a und C4b bilden einen Komplex (C4b2a) der in der Lage ist, C3 in C3a und C3b zu spalten. C3a fungiert als Anaphylatoxin, während sich C3b an den Komplex anlagert und so zur Bildung von C4b2a3b, der C5-Konvertase des klassischen und des Lektinweges, führt. Der alternative Weg beginnt mit der spontanen Hydrolyse von C3. C3b induziert die Spaltung von frei im Serum vorkommenden Faktor B in Ba und Bb, C3b und Bb bilden einen Komplex, der weitere C3-Moleküle spalten kann. Lagert sich an diesen Komplex ein weiteres C3b-Fragment an, entsteht die C5-Konvertase des alternativen Weges (C3bBb3b). Die C5-Konvertasen spalten dann C5 in C5a und C5b. Während sich C5b an Zellmembranen anlagert und durch Rekrutierung weiterer Komplementfaktoren (C6-C9) zur Bildung des Membrane attac complex (MAC) führt, ist C5a ein stark wirksames Anaphylatoxin (modifiziert nach Lappegård et al., 2015).

C5a ist ein 74 Aminosäuren langes Glykoprotein, das durch die C5-Konvertase (die wiederum aus anderen Komplementproteinen zusammengesetzt ist) aus dem 1676 Aminosäuren langem C5-Peptid abgespalten wird (Carney et al., 1991). Analog werden auch aus den Komplementfaktoren

C3 und C4 die Peptide C3a und C4a abgespalten, diese haben als Anaphylatoxine jedoch eine deutlich schwächere Potenz als C5a (Murphy et al., 2014). Im Plasma wird C5a durch die Carboxypeptidase B schnell am C-Terminus desarginiert, wodurch es einen großen Teil seiner Potenz verliert. Insbesondere die Fähigkeit, an den Komplement-5-a-Rezeptor 1 (C5aR) zu binden, wird stark eingeschränkt (Higginbottom et al., 2005).

Die biologischen Funktionen von C5a sind äußerst vielfältig und noch nicht zur Gänze verstanden. Besonders auf neutrophile Granulozyten, in geringerem Umfang auch auf Makrophagen und Monozyten, wirkt es stark chemotaktisch (Marder et al., 1985). Bei neutrophilen Granulozyten kann es die Freisetzung granulärer Enzyme hervorrufen. Darüber hinaus verstärkt es die Phagozytoseaktivität und den Sauerstoffverbrauch dieser Zellen. Auf diese Art triggert es den „oxidativen Burst“, welcher zur Freisetzung von ROS führt (Guo and Ward, 2005). Weiter sind vasodilatatorische Wirkungen bekannt (Schumacher et al., 1991). Darüber hinaus kann es die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten verstärken (Guo et al., 2002). Der Nachweis, dass C5a auf neutrophile Granulozyten eine antiapoptotische Wirkung entfaltet (Perianayagam et al., 2002), bestätigt noch einmal, dass es sich um ein Molekül mit stark proinflammatorischen Wirkungen handelt.

C5a entfaltet den Großteil seiner Wirkungen über Bindung an einen heptahelikalen, G-Proteingekoppelten Rezeptor (C5aR; CD88) (Gerard und Gerard, 1991). Schon früh wurde die Expression dieses Rezeptors auf Zellen der myeloiden Linie (Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten) nachgewiesen (Chenoweth and Hugli, 1978; Gerard et al., 1989; Werfel et al., 1992). Später wurde der Rezeptor auch auf nichtmyeloiden Zellen der Lunge und Leber entdeckt (Haviland et al., 1995). Neben C5aR fungiert noch ein weiteres Molekül als Rezeptor für C5a: C5L2, ein nicht-G-Proteingekoppelter Rezeptor (Okinaga et al., 2003), dessen Funktion noch unklar und Bestandteil heftiger Diskussionen ist. Während einige Gruppen ihn als regulatorischen Rezeptor für die über C5aR vermittelten Effekte betrachten, postulieren andere auch für C5L2 proinflammatorische Funktionen (Li et al., 2013).

Betrachtet man die einzelnen Funktionen des Anaphylatoxins C5a gesammelt, entsteht das Bild eines Moleküls, das eine zentrale Rolle in der Genese und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen einnimmt. Die Inhibition der Wirkungen dieses Moleküls ist demzufolge ein vielversprechender Ansatz, die Symptome verschiedenster Erkrankungen zu verbessern – darunter auch die inflammatorische Variante der EBA.

1.4.1 Inhibition des Komplementsystems – ein vielversprechender Therapieansatz

Aufgrund der in Kapitel 1.4 beschriebenen vielfältigen Wirkungen des Komplementsystems ist es nur logisch, dass die pharmazeutische Forschung sich der Fragestellung angenommen hat, auf welchem Wege man diese Wirkmechanismen unterbinden kann. Bisher ist mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Eculizumab jedoch nur ein Wirkstoff zugelassen, der in das Komplementsystem eingreift. Dessen Zulassung ist auf zwei seltene Erkrankungen beschränkt: der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) und des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS) (Lappegård et al., 2015). Zahlreiche Berichte, in denen Eculizumab in anderen Kontexten erfolgreich angewendet wurde (Johnson und Leca, 2015; Misawa, 2015; Salvadori, 2015), legen jedoch nahe, dass die Inhibition des Komplementsystems weit mehr Potential birgt.

Ruft man sich den kaskadenartigen Ablauf der Komplementaktivierung in Erinnerung, wird schnell klar, dass sich zur Komplementinhibition viele Zielmoleküle anbieten. Wie bei jeder pharmakologischen Therapie sollte jedoch eine möglichst spezifische, jeweils auf die krankheitsauslösenden Faktoren beschränkte Therapie angestrebt werden, um Nebenwirkungen zu vermeiden. Eculizumab entfaltet seine Wirkung durch Bindung an C5 – somit wird die Spaltung dieses Moleküls verhindert, weder C5a noch C5b entstehen. Da C5b essentieller Teil des MAC ist, kann dieser in der Folge nicht gebildet werden. Besonders wichtig scheint der MAC zur Bekämpfung von Neisserien zu sein – Patienten, die mit Eculizumab behandelt werden, haben ein erhöhtes Risiko für Neisserieninfektionen und müssen daher vor Beginn der Behandlung geimpft werden (McKeage, 2011).

In der Pathogenese der EBA ist die Rolle des Komplementsystems bereits recht gut eingegrenzt: Die Tatsache, dass C5-Knockout Mäuse keine Krankheitszeichen entwickeln (Sitaru et al., 2005) wies erstmals darauf hin, dass die Aktivierung terminaler Komplementkomponenten zur Krankheitsentwicklung nötig ist. Neonatale Mäuse entwickeln nur dann Blasen, wenn Ihnen zusätzlich zum pathogenen Antikörper IL-8 und C5a injiziert werden (Sitaru et al., 2005). Darüber hinaus konnte der wichtige Nachweis erbracht werden, dass C6-defiziente Mäuse nicht vor der Krankheit geschützt sind und demzufolge die Bildung des MAC (und damit höchstwahrscheinlich auch C5b) für die Pathogenese irrelevant zu sein scheinen (Mihai et al., nicht publizierte Daten). Diese Erkenntnis rückte erstmals C5a als entscheidendes Molekül des Komplementsystems in den Fokus der Forschung. Inzwischen konnte diese Vermutung dadurch untermauert werden, dass C5aR-Knockout-Mäuse ein stark reduziertes Krankheitsbild entwickeln (Karsten et al., 2012).

Verschiedene natürlich vorkommende Peptidasen (z.B. die C5a-Peptidase von A-Streptokokken oder eine Cystein-Protease von *Entamoeba histolytica*) bieten die Möglichkeit, C5a direkt zu

inhibieren (Reed et al., 1995; Kagawa et al., 2009). In der aktuellen Forschung nehmen Moleküle, die an C5aR binden und so C5a-vermittelte Wirkungen blockieren sollen, jedoch eine weit prominentere Rolle ein. So wurde zum Beispiel der C5aR-Antagonist CCX168 bereits bei Patienten mit Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) -assoziiierter renaler Vaskulitis klinisch getestet (Jayne et al., 2014). Der peptidische C5aR-Antagonist PMX-53 wurde, wenn auch erfolglos, bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eingesetzt (Vergunst et al., 2007). Zwei andere in dieser Arbeit verwendete C5aR-Antagonisten werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.4.2 W-54011, ein spezifischer Antagonist des Komplement-5a-Rezeptors 1

Der kleine, nichtpeptidische Antagonist W-54011 wurde 2002 durch Screening einer großen Molekülbibliothek als solcher identifiziert (Sumichika et al., 2002). Durch anschließende chemische Modifikation konnte die inhibitorische Potenz erhöht werden. Schon in der Erstpublikation wurde die Fähigkeit, durch rekombinantes humanes C5a induzierten Kalziumeinstrom bei humanen neutrophilen Granulozyten inhibieren zu können, belegt. An murinen neutrophilen Granulozyten konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden, was 2005 über speziesabhängige Unterschiede im molekularen Aufbau der C5a-Rezeptoren erklärt werden konnte (Waters et al., 2005). Trotz dieses Nachweises war W-54011 jedoch in der Lage, in einem *in vitro* Assay die intrinsische Aktivität des C5aR-Rezeptors auf murinen dendritischen Zellen zu inhibieren (Peng et al., 2009), weshalb er auch in einem Review weiter als Kandidat für die Nutzung an Mausmodellen gehandelt wurde (Woodruff et al., 2011). Inzwischen wurde er erfolgreich bei einem murinen Pankreatitismodell eingesetzt und erwies sich dort sogar im Vergleich zu einem peptidischen Antagonisten als effektiver (Sendler et al., 2015).

1.4.3 A8^{Δ71-73} als Antagonist der Komplement-5a-Rezeptoren 1 und 2

Im Gegensatz zu W-54011 ist A8^{Δ71-73} ein peptidischer Antagonist. Die Entwicklung dieses Moleküls beruht auf der Erkenntnis, dass für die Signaltransduktion am Rezeptor das C-terminale Oktapeptid von C5a von besonderer Relevanz ist (Kawai et al., 1991). Mittels Phagen-Display wurde aufbauend auf diesem Befund ein Peptid mit einem mutierten C-Terminus identifiziert, das an C5aR bindet, die Signaltransduktion jedoch auf Höhe des G-Proteins unterbindet. In *in-vitro*-Versuchen wurde für dieses Peptid (A8^{Δ71-73}) nachgewiesen, dass es C5a-vermittelten Kalziumeinstrom bei murinen Makrophagen unterbinden kann. Interessanterweise konnte sogar *in vivo* nachgewiesen werden, dass A8^{Δ71-73} in der Lage ist, die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Bauchhöhle nach dort ausgelöster Entzündungsreaktion signifikant zu reduzieren. Wichtig ist hier die Feststellung, dass der Inhibitor dafür intravenös (i.v.) injiziert werden musste (Heller et al., 1999a). Als einziger aller bekannten C5aR-Antagonisten ist für A8^{Δ71-73} nachgewiesen, dass er auch an C5L2 bindet (Otto et al., 2004). Seit Entwicklung wurde der Inhibitor in verschiedenen Krankheitsmodellen an Mäusen

erfolgreich eingesetzt, unter anderem im Kontext des allergischen Asthmas (Karp et al., 2000) oder Nierentransplantationen (Lewis et al., 2008). Abbildung 5 stellt schematisch die Effekte der Rezeptorblockade mittels $A8^{\Delta 71-73}$ dar.

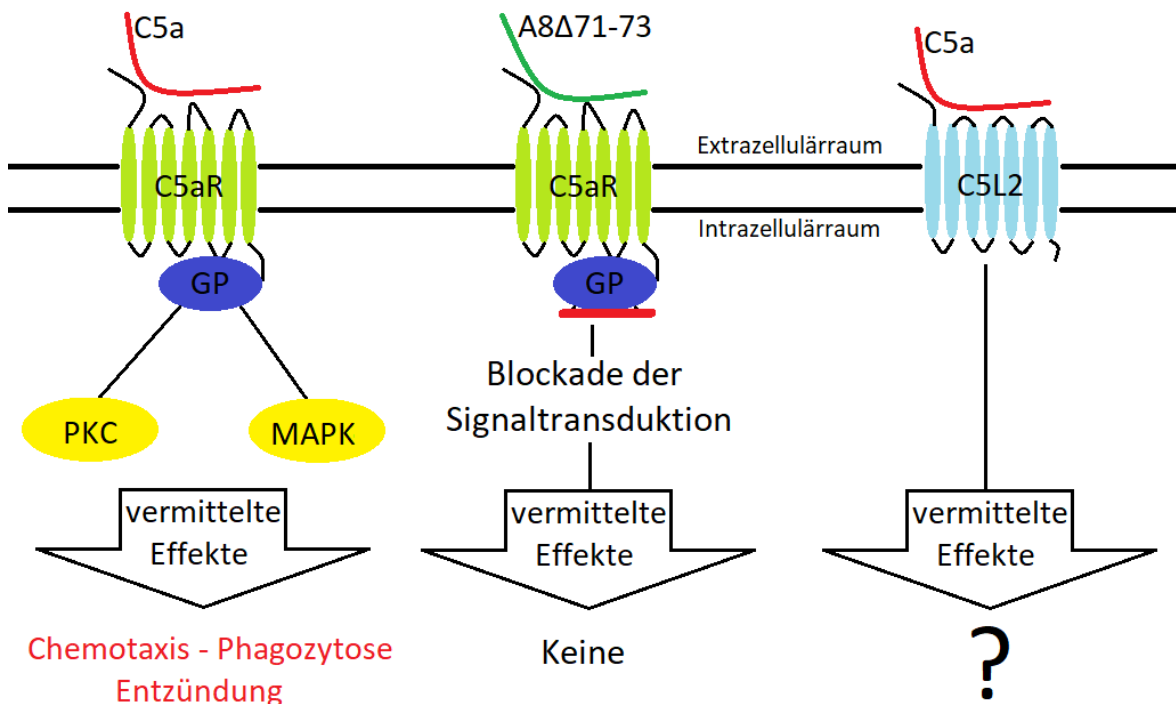


Abbildung 5: Schematische Darstellung der C5aR-Blockade. Physiologische Bindung von C5a an C5aR mit folgender Signaltransduktion (links). Der peptidische Antagonist $A8^{\Delta 71-73}$ bindet an C5aR, blockiert die Signaltransduktion aber auf Höhe des gekoppelten G-Proteins. Proinflammatorische Effektorfunktionen werden so nicht vermittelt (Mitte). Welche Funktionen über den zweiten bekannten C5a-Rezeptor, C5L2, vermittelt werden, ist Bestandteil kontroverser wissenschaftlicher Diskussionen. $A8^{\Delta 71-73}$ bindet jedoch auch an diesen Rezeptor (rechts). GP: G-Protein, PKC: Proteinkinase C, MAPK: Mitogen-activated-Protein-Kinase

1.5 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren, was erstmals 1990 beschrieben (Denk et al., 1990) und seitdem in zahlreichen Arbeiten zum Einsatz gekommen ist. Wie bei der normalen Fluoreszenzmikroskopie werden Fluorophore der zu untersuchenden Probe mittels Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, woraufhin diese von einem Grundzustand in einen Zustand höherer Erregung übergehen (Abbildung 6). Durch das Zurückfallen in den Grundzustand werden Photonen freigesetzt, die dann detektiert werden können. Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie wird die Energie der Anregungsphotonen so gewählt, dass das Treffen eines

Photons auf den Fluorophor nicht ausreicht, um diesen anzuregen – eine Anregung findet erst statt, wenn zwei Photonen zur selben Zeit auf denselben Fluorophor treffen.

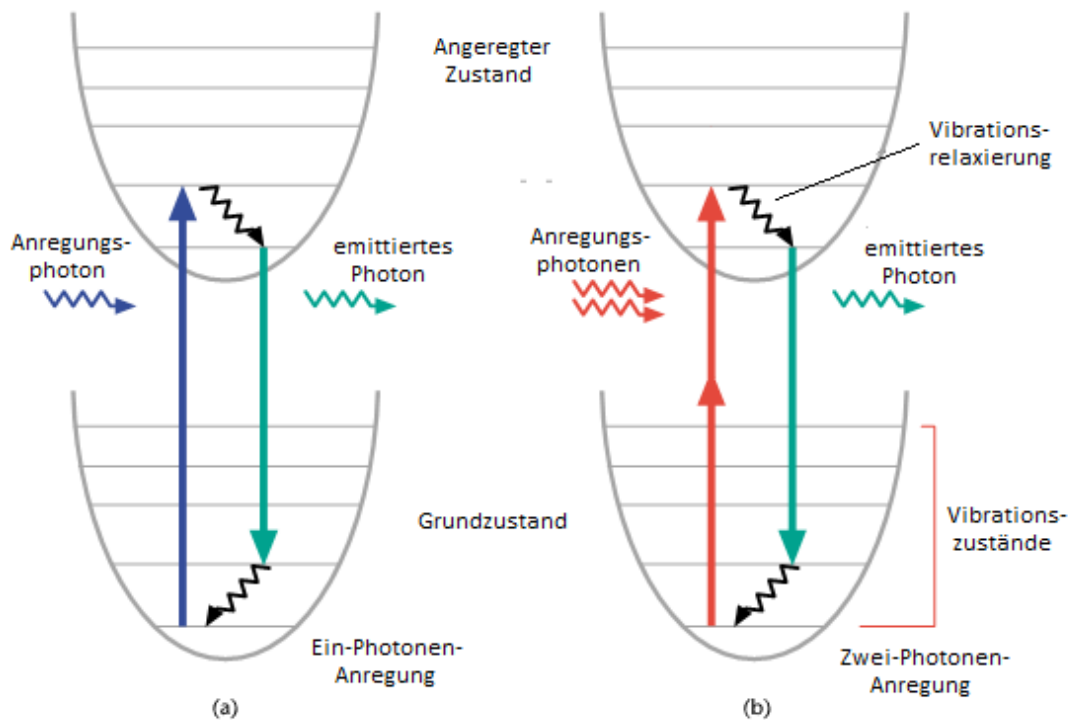


Abbildung 6: Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung von Ein- (a) und Zwei- (b) Photonen-Anregung. In beiden Fällen werden Fluorophore aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt, der auch als erster Elektronenanregungszustand bezeichnet wird. Nach vibrierender Relaxation fallen die Fluorophore auf ihr ursprüngliches Energielevel zurück und setzen hierbei ein Photon frei. Nach erneuter Vibrationsrelaxation erreichen sie wieder ihren Grundzustand (modifiziert nach So, 2002).

Dies bietet zahlreiche Vorteile: Da zur Anregung Licht geringerer Energie ausreicht, kann die Wellenlänge erhöht werden, was ein tieferes Eindringen (bis 1 mm) in Gewebeproben erlaubt (Theer et al., 2003). Die geringere Energie der eingesetzten Lichtstrahlen hat den weiteren Vorteil, dass es im Vergleich zur konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zu wesentlich geringeren laserinduzierten Gewebeschäden bei der Probe kommt. Ein dritter Vorteil besteht in der hohen dreidimensionalen Auflösung der erhaltenen Bilder, da nur dort ein Fluoreszenzsignal entstehen kann, wo zwei Photonen gleichzeitig auf einen Fluorophor treffen – also im sehr eng begrenzten Fokus der Lichtstrahlen (Xu et al., 1996). Zur Mikroskopie der Haut ist diese Methode darüber hinaus besonders geeignet, da dermales Kollagen durch seine Struktur bedingt nach Anregung ein *second harmonic generation*-Signal (SHG) emittiert (Zipfel et al., 2003). Es kann so ohne vorherige Fluoreszenzmarkierung gut dargestellt werden, was eine klare Abgrenzung zwischen Epidermis, Dermis und Subkutis erlaubt (Kabashima und Egawa, 2014).

Für die Visualisierungsversuche in dieser Arbeit wurden Lysozym-M - enhanced green fluorescent protein (LysM-eGFP) Mäuse verwendet. Dieser im Jahr 2000 erstmalig beschriebene, transgene

Mausstamm exprimiert unter dem Lysozym-M-Promoter der myeloiden Zelllinie das enhanced green fluorescent protein (eGFP). Besonders stark wird das Protein bei diesen Mäusen in neutrophilen Granulozyten, zu einem geringeren Grad auch in Makrophagen exprimiert (Faust et al., 2000). Da diese Mäuse nun selektiv in den genannten Zellen starke grüne Fluorophore beherbergen, lassen sich mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie Wanderungsbewegungen dieser Zellen gut darstellen.

Um darüber hinaus die Lokalisierung und Bindungskapazität des injizierten anti-murines Kollagen Typ VIIc-(anti-mCOL7c) Antikörpers darstellen zu können, wurde dieser vorher mit einem roten Fluorophor markiert. Insgesamt konnten also mittels drei verschiedener Detektionskanäle das dermale Kollagen, neutrophile Granulozyten sowie der injizierte Antikörper visualisiert werden. Anschließend wurden die erhaltenen Informationen in dreidimensionale Bilder übersetzt.

1.6 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit hat zum Ziel, die Rolle des Anaphylatoxins C5a in der Pathogenese der EBA auf zeitlicher und räumlicher Ebene genauer einzuordnen. Die bereits recht sichere Erkenntnis, dass C5a in der Pathogenese der EBA eine tragende Rolle spielt, soll durch Untersuchungen zum genauen Zeitpunkt und Ort dieser Wirkungen präzisiert werden. Darüber hinaus wird getestet, ob durch pharmakologische Blockade von C5a-Rezeptoren das Krankheitsbild verbessert bzw. die Krankheitsausprägung verhindert werden kann. Die erfolgreichen Versuche an genetisch veränderten Tieren legen nahe, dass dieses Molekül im Verlaufe der Pathogenese eine zentrale Rolle einnimmt. Der Versuch, die Wirkungen von C5a pharmakologisch zu unterbinden, stellt daher den logischen nächsten Schritt dar, um langfristig zu prüfen, ob eine solche Therapie auch am Menschen zur Behandlung der EBA und anderer blasenbildender Autoimmundermatosen eine geeignete Therapieform sein kann. Vermutet wird, dass durch pharmakologische Blockade des C5a-Rezeptors die Krankheitsausprägung im EBA-Mausmodell verbessert werden kann und dieser Effekt dadurch erreicht wird, dass weniger neutrophile Granulozyten in die Dermis rekrutiert werden (Abbildung 7).

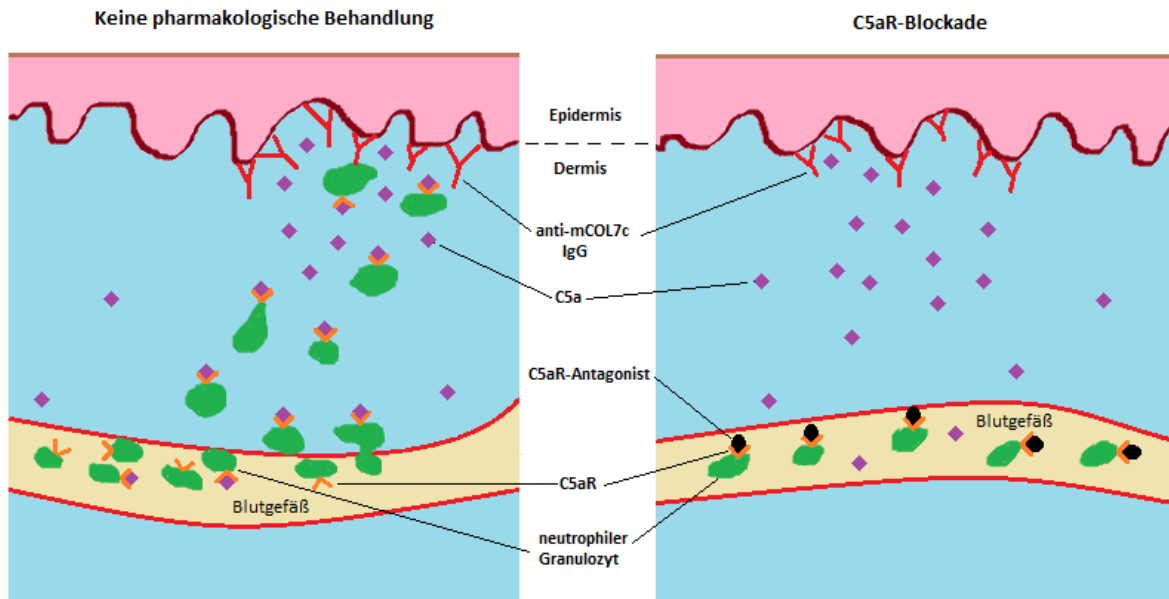


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Komplement-5a-Rezeptor-1 (C5aR)- Blockade. Durch die Bindung von Antikörpern (anti-mCOL7c IgG) an Kollagen Typ VII wird das Komplementsystem aktiviert, auch die Komplementkomponente 5a (C5a) wird freigesetzt. Durch Bindung an C5aR, der vorwiegend von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, werden diese Zellen aus den Blutgefäßen ins Gewebe rekrutiert, wo sie dann die eigentlichen Krankheitssymptome hervorrufen. Die pharmakologische Blockade unterbindet diesen Rekrutierungsmechanismus, sodass die zur Krankheitsentstehung notwendigen Neutrophilen (grün dargestellt) im Gewebe der Dermis nicht mehr in nennenswerter Anzahl vorliegen.

2 Methoden

2.1 Tierversuche

Alle Tierexperimente wurden vom Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Auftragsnummer 5|2 – 1|11). Die Erlaubnis zur Durchführung tierexperimenteller Arbeiten wurde durch Absolvierung eines Tierschutzkurses der Universität zu Lübeck erlangt. Alle Mäuse wurden in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gezüchtet. C57Bl/6-Mäuse wurden ursprünglich von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) erworben, LysM-eGFP – Mäuse wurden ursprünglich von Dr. Graf (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg), Hamburg, zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Mäuse wurden in pathogenfreier Umgebung bei einem 12-Stunden Licht-Dunkel-Zyklus in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten. Es bestand stets unbeschränkter Zugang zu Wasser und Standardfutter.

2.2 Antikörpertransfer-induziertes Mausmodell für Epidermolysis bullosa acquisita

Bei diesem Krankheitsmodell werden Mäusen Antikörper injiziert, die sich spezifisch gegen die NC1-Domäne von Kollagen Typ VII richten. Die Antikörper werden durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Proteinfragment mCOL7c gewonnen. Aus den Seren immunisierter Kaninchen werden in einem ersten Schritt alle IgG isoliert. Anschließend werden aus diesem IgG-Cocktail nur solche IgG, die sich spezifisch gegen mCOL7c richten, isoliert. In dieser Arbeit wurden die aufgereinigten Antikörper darüber hinaus fluoreszenzmarkiert, um die Bindung ebendieser mit verschiedenen mikroskopischen Techniken nachweisen zu können. Nach dieser Affinitätsaufreinigung und Markierung werden die IgG Mäusen injiziert, die daraufhin das Krankheitsbild der EBA entwickeln. Einen Überblick über den Arbeitsablauf des Antikörpertransfer-induzierten Mausmodells für EBA bietet Abbildung 8.

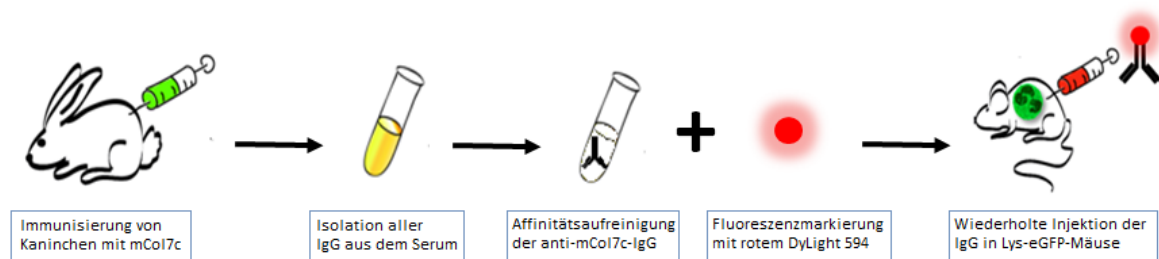


Abbildung 8: Antikörpertransfer-induziertes Epidermolysis bullosa acquisita-Mausmodell. Nach Immunisierung von Kaninchen mit einem Fragment des murinen Kollagen Typ VII (mCOL7c), werden die Seren dieser Kaninchen gewonnen (Firma Eurogentec GmbH, Belgien). Nach einem zweistufigen Aufreinigungsverfahren wird der gewonnene anti-mCol7c-Antikörper mit einem roten Fluorophor (DyLight 594) markiert. Anschließend erfolgt die Injektion in Mäuse.

Insgesamt wurden 2 Tierexperimente durchgeführt. In einem ersten Versuch wurden bei Mäusen wie oben beschrieben das Krankheitsbild der EBA ausgelöst, mittels täglicher intraperitonealer (i.p.) Injektion von W-54011, eines Antagonisten des C5aR, wurde der Einfluss der über diesen Rezeptor vermittelten Signalwege evaluiert (Abbildung 9). Als Dosis wurden 10 Mikrogramm (μg) / Injektion [entspricht bei einem Mausgewicht von 20 Gramm (g) 500 μg /Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG)] gewählt. Der Kontrollgruppe wurden 100 Mikroliter (μl) 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespritzt, was dem Lösungsmittel des Rezeptorblockers entspricht. Um sicherzustellen, dass auch in der Frühphase der Entzündungsreaktion ausreichend hohe Wirkkonzentrationen vorliegen, wurde die Behandlung bereits 2 Tage vor Krankheitsinduktion begonnen. An Tag 0 und 2 des Versuches wurden jeweils 250 μg der anti-mCOL7c-IgG injiziert, deren Produktion in 2.2.1 – 2.2.4 beschrieben wird. An Tag 4, 8 und 12 wurde, wie in 2.8 beschrieben, die Krankheitsausprägung statistisch erfasst. Anschließend wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation unter Narkose getötet und Gewebeproben der Ohren entnommen.

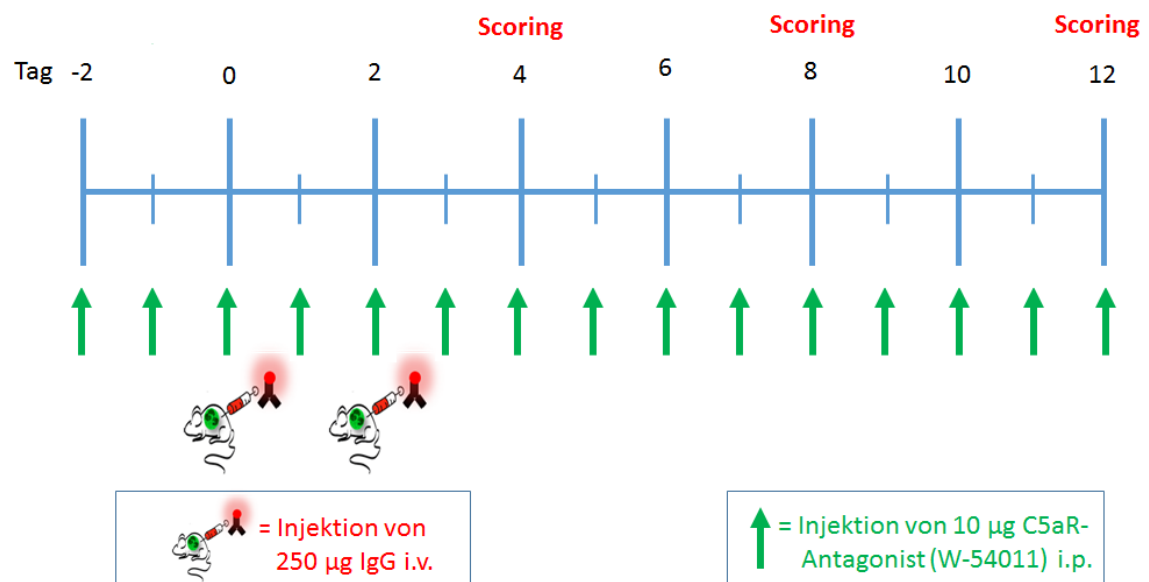


Abbildung 9: Struktur des Experimentes W-54011. Bereits zwei Tage vor Krankheitsinduktion beginnt die Behandlung mit dem C5aR-Antagonisten W-54011 in einer Dosierung von ca. 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG. An Tag 0 und 2 werden 250 μg anti-mCol7c-IgG injiziert, der C5a-Antagonist wird weiter täglich injiziert. An Tag 4, 8 und 12 wird die Krankheitsausprägung beurteilt, an Tag 12 werden die Mäuse getötet und Gewebeproben entnommen.

In einem zweiten Versuch wurde der Einfluss von C5aR und C5L2 untersucht. Da in diesem Versuch die Extravasation neutrophiler Granulozyten visualisiert wurde, wurde der Versuch an hierfür geeigneten LysM-eGFP-Mäusen vorgenommen (siehe Absatz 1.5). Das Krankheitsbild der EBA wurde wie oben beschrieben ausgelöst. Gleichzeitig mit der Krankheitsinduktion begann die Behandlung mit A8 $^{\Delta 71-73}$. Dieser Antagonist wurde alle 12 Stunden in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Anders als im Versuch mit W-54011 wurde auf eine Vorbehandlung mit A8 $^{\Delta 71-73}$ verzichtet. Dieses Vorgehen hatte zwei Gründe: Erstens sollte zur Erhebung eines Basiswertes der Anzahl

neutrophiler Granulozyten eine Visualisierung an gesunden, nicht vorbehandelten Tieren möglichst kurz vor Versuchsbeginn erfolgen. Darüber hinaus betrachteten wir aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Antagonisten eine Behandlung mehrere Tage oder Stunden vor Beginn der Krankheitsinduktion als nicht zielführend. Kontrolltieren wurde PBS injiziert, was dem Lösungsmittel des Antagonisten entspricht. Diese Behandlung wurde für 4 Tage fortgeführt. Bereits zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden die Ohren der Mäuse ein erstes Mal visualisiert, wie in 2.3 beschrieben wird. An Tag 1 und 3 des Versuches folgten dann erneute Visualisierungen. An Tag 4, 8 und 12 wurde die Krankheitsausprägung statistisch erfasst, bevor die Tiere an Tag 12 durch zervikale Dislokation unter Narkose getötet wurden. Auch in diesem Versuch wurden Gewebeproben der Ohren entnommen. Abbildung 10 zeigt schematisch den Ablauf des Experimentes.

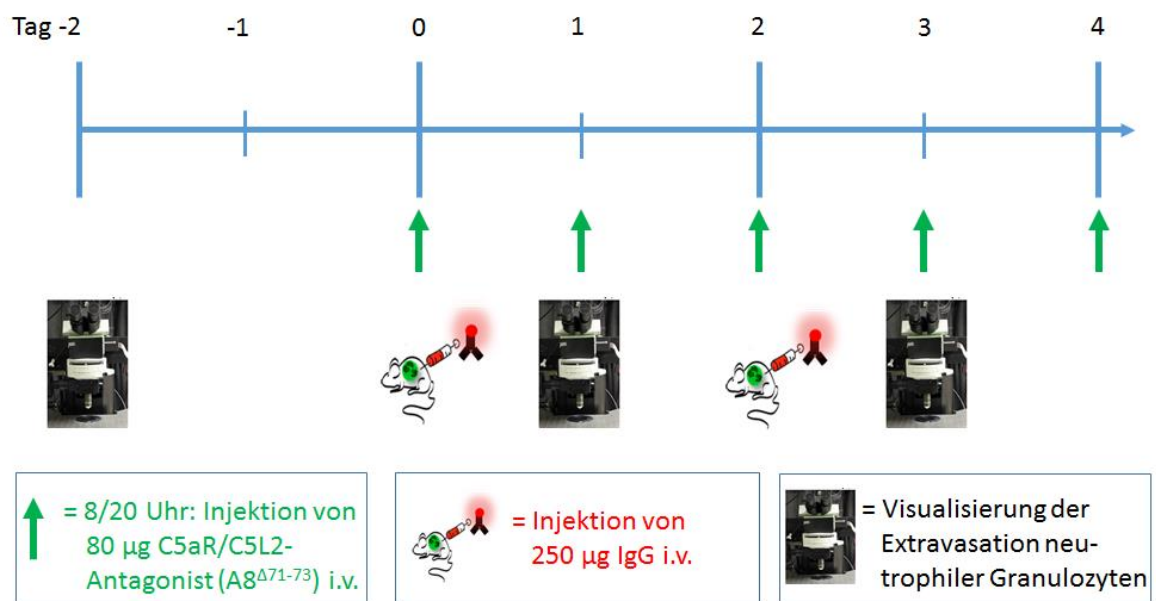


Abbildung 10: Struktur des Experimentes $A8^{\Delta 71-73}$. Zwei Tage vor Krankheitsinduktion wird die Extravasation neutrophiler Granulozyten im gesunden Mausohr mittels 2-Photonen-Mikroskopie beurteilt. Parallel zur Krankheitsinduktion wird mit der Behandlung mit dem C5aR-Antagonisten $A8^{\Delta 71-73}$ begonnen. An Tag 1 und 3 wird die Extravasation erneut beurteilt. Die Behandlung mit $A8^{\Delta 71-73}$ wird bis einschließlich Tag 4 alle 12 Stunden vorgenommen. An Tag 4, 8 und 12 wird die Krankheitsausprägung erfasst, an Tag 12 werden die Mäuse getötet und Gewebeproben entnommen (Tag 5-12 nicht dargestellt).

2.2.1 Isolierung von Immunglobulin G aus Kaninchenserum

Aus den Seren immunisierter Kaninchen wurden durch Protein G-Chromatographie alle IgG isoliert. Nach dem Auftauen der Seren bei 4 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) wurden diese auf eine Protein-G - Chromatographiesäule gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit PBS gewaschen, bis der Durchfluss bei 280 Nanometer (nm) eine Extinktion von $< 0,05$ aufwies. Dann wurde das an die Matrix gebundene IgG mit Glycinpuffer eluiert, bis die gemessene Extinktion des Durchflusses $< 0,01$ war. Um die IgG nur

möglichst kurze Zeit einem sauren pH-Wert auszusetzen, wurden in die Sammelgefäße je 4 Tropfen 1 Molar (M) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Base vorgelegt. Nach Abschluss des Eluierens wurde der pH-Wert der Lösungen mit 1 M TRIS-Base auf 7,2 eingestellt. Die Säule wurde anschließend mit PBS gewaschen, bis die Extinktion des Durchflusses $< 0,00$ war. Durch Waschen mit 50 ml 1 M Natriumchlorid (NaCl) und 50 ml PBS wurde die Säule regeneriert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde ein letzter Waschschrift mit 75 ml 20 % Ethanol durchgeführt. Die zu einem Drittel mit Ethanol gefüllte Säule wurde dann bei 4 °C gelagert.

Die erhaltene IgG-Lösung wurde in Amicon® Ultra-15 Zentrifugierfiltereinheiten [30 Kilodalton (kDA)] überführt und 35 Minuten (min) bei 4000 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 4 °C zentrifugiert. Zu der im Filter verbliebenen Lösung wurde wieder IgG-Lösung hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Dies wurde solange wiederholt, bis die gesamte IgG-Lösung aufgebraucht war. Anschließend wurden die Filtereinheiten je zweimal mit PBS aufgefüllt und bei denselben Parametern zentrifugiert. Nach diesem Pufferwechsel von Glycin zu PBS wurde photometrisch die Konzentration der IgG-Lösung bestimmt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert, bis mit der spezifischen Aufreinigung fortgefahren wurde.

2.2.2 Affinitätsaufreinigung spezifischer Antikörper gegen murines Kollagen Typ VIII

Zur Affinitätsaufreinigung der IgG-Lösung wurde eine Chromatographiesäule verwendet, deren Matrix mit mCOL7c, also dem Antigen der zu gewinnenden Antikörper, beschichtet war. Diese Säule wurde mit 20 ml PBS gewaschen, bevor die wie in 2.2.1 beschriebene erhaltene IgG-Lösung auf die Säule gegeben wurde. Nach Inkubation auf dem Schüttler über Nacht bei 4 °C wurde am Folgetag der Durchfluss gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml Tritonpuffer und anschließend mit PBS gewaschen, bis die Extinktion des Durchflusses bei 280 nm $< 0,01$ war. In ein 50 ml Falconröhrchen wurden nun 3 Tropfen 1 M TRIS-Base vorgelegt. Anschließend wurde die Säule mit auf 4 °C temperierten Glycinpuffer befüllt und so die Ziel-Antikörper eluiert. Dieser Vorgang wurde so lange fortgesetzt, bis die Extinktion des Durchflusses $< 0,05$ war. Der Durchfluss wurde in dem zuvor mit TRIS-Base vorbereitetem Falconröhrchen gesammelt, um den sauren pH-Wert des Glycinpuffers schnell zu neutralisieren und so ein schonenderes Milieu für die Antikörper zu kreieren. Nach Abschluss des Eluierens wurde der pH-Wert der erhaltenen Antikörperlösung mit 1 M TRIS-Base auf 7,2 eingestellt und das Röhrchen bei 4 °C gelagert. Die Säule wurde anschließend mit Glycinpuffer gewaschen, bis die Extinktion des Durchflusses $< 0,01$ war. Durch Waschschriffe mit je 20 ml 20 Millimolar (mM) TRIS Puffer, 20 mM TRIS + 0,5 M NaCl Puffer, 20 mM TRIS Puffer und schließlich PBS wurde die Säule regeneriert.

Anders als bei der unspezifischen IgG-Aufreinigung wurde der Durchfluss der IgG-Lösung wie oben beschrieben nicht nach der ersten Inkubation auf der Säule verworfen, sondern erneut gesammelt. Diese Lösung wurde nach Abschluss des ersten Aufreinigungszyklus erneut auf die Säule gegeben und für 30 min bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. In der Folge wurde ein zweiter Aufreinigungszyklus vorgenommen, der methodisch dem zuvor beschriebenen Ersten gleich war. Die IgG-Lösung wurde erneut gesammelt, sodass nach dem zweiten ein dritter Aufreinigungszyklus vorgenommen werden konnte, der methodisch dem Zweiten gleich war. Erst nach diesem Zyklus wurde die nun noch übrig gebliebene Lösung verworfen. Auf diese Weise wurde versucht, aus der isolierten unspezifischen IgG-Lösung möglichst alle spezifischen Antikörper zu extrahieren. Nach dem letzten Aufreinigungszyklus wurde die Säule mit 30 ml 20 % Ethanol gewaschen. Die zu einem Drittel mit Ethanol gefüllte Säule wurde dann bei 4 °C gelagert.

Die durch die Aufreinigung erhaltene IgG-Lösung wurde in Amicon® Ultra-15 Zentrifugierfiltereinheiten (30 kDA) überführt und 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zu der im Filter verbliebenen Lösung wurde wieder IgG-Lösung hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Dies wurde solange wiederholt, bis die gesamte IgG-Lösung aufgebraucht war. Anschließend wurden die Filtereinheiten, die nun bereits jeweils aufkonzentrierte IgG-Lösung enthielten, mit PBS aufgefüllt und 10 min bei denselben Parametern zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde noch einmal mit PBS aufgefüllt, nun aber 15 min zentrifugiert. Nach diesem Pufferwechsel von Glycin zu PBS wurde der Inhalt aller Filtereinheiten in eine Einheit überführt und diese solange zentrifugiert, bis 1,5 ml Lösung im Filter verblieben. Von dieser Lösung wurde nun photometrisch die Konzentration gemessen. Je nach Bedarf wurde nun durch weiteres Zentrifugieren bzw. Verdünnen mit PBS die Konzentration der Lösung auf 2 mg/ml eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert, bis mit der Fluoreszenzmarkierung der Antikörper fortgefahren wurde.

2.2.3 Fluoreszenzmarkierung des aufgereinigten Antikörpers

Die aus 2.2.2 erhaltene spezifische IgG-Lösung wurde in einen Zellulose-Dialysierschlauch gegeben. Dieser Schlauch wurde über Nacht in 5 Liter (l) auf 4 °C gekühlten Boratpuffer gehängt. Nach diesem Pufferwechsel von PBS zu Boratpuffer konnte am nächsten Tag die eigentliche Markierungsreaktion stattfinden. Der Dialysierschlauch wurde aus dem Boratpuffer entnommen, je 500 µl der enthaltenen Antikörperlösung wurden dann mit je 65 µg DyLight 594 gemischt und 1 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen mit den nun markierten Antikörpern wieder in einen Dialysierschlauch gegeben. Wie zuvor beschrieben fand nun ein Rücktransfer der Antikörper von Boratpuffer zu PBS statt. Die markierten Antikörper wurden anschließend bis zur Benutzung bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Testung der Bindekapazität des spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpers

Zum Testen der Bindekapazität der aufgereinigten und fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden 6 µm dicke Gefrierschnitte von Ohren gesunder C57Bl/6 – Mäuse aufgetaut. Die Schnitte wurden mit einem DAKO-Fettstift umkreist, anschließend wurden 100 µl der zu testenden IgG-Lösung in einer Konzentration von 20 µg/ml auf die Gewebeschnitte gegeben. Nach einer Stunde Inkubation in einer Feuchtkammer wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Die Bindung an die dermo-epidermale Junktionszone wurde anschließend mithilfe des Keyence BZ 9000 – Mikroskops analysiert.

2.3 Visualisierung der Neutrophilenextravasation mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die zu untersuchende Maus wurde mittels i.p.-Injektion von 400 µl einer klassischen Tripelnarkose (50 µl Fentanyl, 400 µl Medetomidinhydrochlorid und 800 µl Midazolam verdünnt in 3,5 ml steriler Ringerlösung) in Narkose gelegt. Vor der ersten Visualisierung wurde das Ohr mithilfe einer Schere und Enthaarungscreme enthaart. Die Maus wurde anschließend bäuchlings auf eine Wärmeplatte gelegt, welche eine Temperatur von 39 °C hatte. Ein Metallblock wurde neben dem Kopf der Maus mittels doppelseitigem Klebeband auf der Wärmeplatte fixiert. Der Block wurde anschließend auch auf der Oberseite mit doppelseitigem Klebeband präpariert. Das zu untersuchende Mausohr wurde auf den Metallblock geklebt. Etwaige Unebenheiten im aufgeklebten Ohrabschnitt wurden mithilfe einer Pinzette ausgestrichen. Anschließend wurde das Ohr durch dreimaliges Bestreichen mit der Pinzette mechanisch irritiert. Auf das Ohr wurde dann ein Tropfen Vidisic-Augensalbe gegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass in der Salbe keine Luftblasen eingeschlossen waren. Ein Deckgläschen wurde auf die Augensalbe gelegt und mit Tape an der Wärmeplatte befestigt. Auf das Deckgläschen wurde anschließend erneut luftblasenfrei ein Tropfen Vidisic-Augensalbe aufgetragen.

Für die Visualisierung wurde ein TrimScope II, ausgerüstet mit 2 MaiTai-Lasern und einem XLUMPLFL 20x W/0.95-Objektiv, verwendet (Abbildung 10). Das Ohr wurde unter dem Objektiv platziert und das Objektiv in die oberste Vidisic-Schicht eingetaucht. Zur Anregung sowohl des SHG-Signals des dermalen Kollagens Typ I als auch des eGFPs in den neutrophilen Granulozyten wurde ein Laser auf eine Wellenlänge von 900 nm eingestellt. Der zweite Laser wurde zur Anregung des DyLight 594 – also des fluoreszenzmarkierten Antikörpers - auf eine Wellenlänge von 740 nm eingestellt. Beide Laser wurden an jedem Versuchstag mehrfach manuell mithilfe zweier Spiegel justiert. Die emittierten Lichtsignale wurden mithilfe dreier Photomultiplier (PMT) gemessen. Ein PMT amplifizierte alle Signale mit Wellenlängen von 425 – 495 nm und diente so zur Darstellung des SHG-Signals des Kollagen Typ I. Durch Amplifikation aller Signale zwischen 495 - 560 nm wurde das eGFP und somit die neutrophilen Granulozyten detektiert. Die Detektion der Signale mit

Wellenlängen zwischen 560 – 594 nm erlaubte die Darstellung des DyLight 594 und somit des fluoreszenzmarkierten Antikörpers.

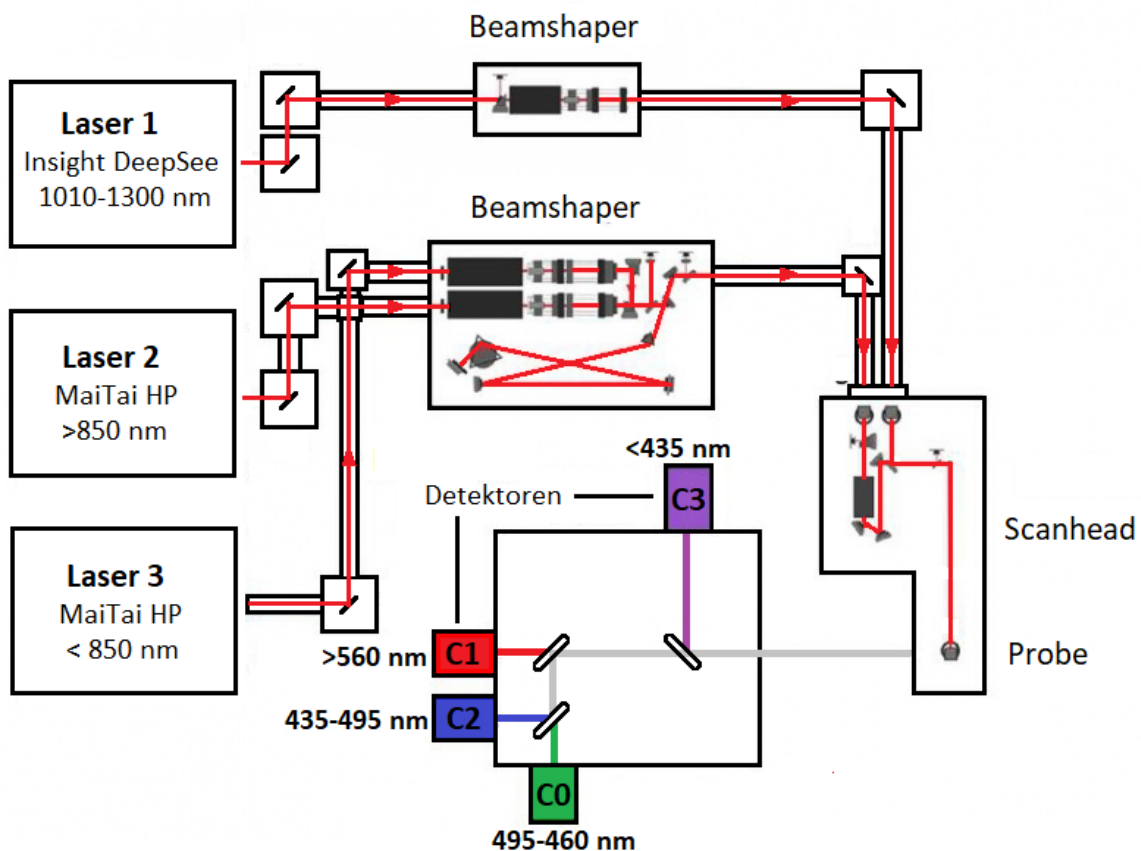


Abbildung 11: Schematischer Aufbau des Zwei-Photonen-Mikroskops. 3 verschiedene Laser können Licht unterschiedlicher Wellenlängen generieren. Über manuell einstellbare Spiegelsysteme werden die generierten Lichtstrahlen auf die Probe gelenkt, Beamshaper und Scanhead dienen der Modulation und Fokussierung der Lichtstrahlen. Von der Probe emittierte Photonen werden mittels wellenlängenspezifischer Photomultiplier registriert und amplifiziert. Die so erhaltenen Signale werden computergestützt in ein Bild übersetzt.

Durch Nutzung der ImSpector-Software wurden standardisierte Messparameter angewendet. Von jedem Mausohr wurden an jedem Visualisierungstag sieben Bildserien aufgenommen. Eine Bildserie bestand aus 46 250 x 250 μm großen Bildern, die im vertikalen Abstand von 2 μm aufgenommen wurden. Vor Aufnahme jeder Bildserie wurde durch Orientierung durch das Kollagen Typ I-Signal sowie durch das DyLight 594-Signal die Lage der DEJ bestimmt. Die Bildserien wurden dann derart aufgenommen, dass das erste Bild 20 μm oberhalb der DEJ aufgenommen wurde, das letzte 70 μm unterhalb. Jedes Bild bestand aus 520 x 520 Pixeln, aufgenommen wurde mit einer Frequenz von 400 Hertz (Hz) und einer Line Average von 3.

Nach Aufnahme wurden die Daten in msr.-Dateien konvertiert und mittels Imaris-Software ausgewertet. Hierbei wurden hell leuchtende Zellen als neutrophile Granulozyten, wenig Leuchtende als Makrophagen klassifiziert. Anhand der Form konnten ausgewanderte Zellen von solchen in Blutgefäßen differenziert werden. Ausgewanderte neutrophile Granulozyten wurden

gezählt, darüber hinaus wurde erhoben, wie viele dieser Zellen sich in unmittelbarer Nähe (16 µm) zur DEJ befanden.

2.4 Isolation muriner neutrophiler Granulozyten

Zur Gewinnung muriner neutrophiler Granulozyten wurden sowohl C57Bl/6- als auch LysM-eGFP-Mäuse durch zervikale Dislokation unter Narkose getötet. Operativ wurden die Femora sowie die Tibiae beider Hinterbeine entnommen und in Hank's balanced salt solution (HBSS) prep bei 4 °C zwischengelagert. Nach Abschluss der Operation wurden mit einer Schere die jeweiligen Gelenkköpfe der Knochen angeschnitten, um einen Zugang zur Markhöhle zu erhalten. Mithilfe einer 26 ½ G-Nadel wurde das Knochenmark jedes Knochens mit HBSS prep in ein 50 ml Falconröhrchen ausgespült. Die so isolierten Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 1400 rpm und 4 °C für 4 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in 6 ml 0,2 % NaCl resuspendiert, um enthaltene Erythrozyten zu lysieren. Nach 30 Sekunden (s) wurden 14 ml 1,4 % NaCl zugegeben, um die Lyse zu stoppen. Nach Zugabe von 10 ml HBSS prep folgte ein weiterer Waschschrift bei den zuvor genannten Parametern. Das erhaltene Zellpellet wurde in 4 ml HBSS prep resuspendiert und die Suspension durch ein Zellsieb in ein weiteres Falconröhrchen überführt. Das Zellsieb wurde anschließend mit 1 ml HBSS prep gespült.

Durch Mischen von 2,8 ml Percoll, 1,9 ml HBSS und 310 µl zehnfach konzentriertem PBS wurde eine 62 %ige Percoll-Lösung hergestellt. 5 ml dieser Lösung wurden in ein 15 ml – Falconröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 5 ml Zellsuspension überschichtet. Anschließend wurde das Röhrchen ohne Bremse bei 2000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Zellring, der sich im Gradienten abgesetzt hatte, zusammen mit dem Überstand verworfen, das wolkige Pellet am Grunde des Röhrchens wurde in 1 ml HBSS resuspendiert. Nun wurden die Zelllösungen beider Mausbeine gepoolt, 10 µl dieser Lösung wurden entnommen und mit 90 µl Trypanblau gemischt. Mithilfe des Olympus-Mikroskops und einer Neubauer-Zählkammer wurde nun die Zellzahl in der gewonnenen Lösung bestimmt.

Währenddessen wurden die Zelllösungen mit Magnetic activated cell sorting (MACS)-Puffer auf 6 ml aufgefüllt und durch Zentrifugation bei 1400 rpm und 4 °C für 5 min gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Pro 10⁷ Zellen wurden nun 10 µl Cluster of differentiation (CD) 3e-phycoerythrin (PE) sowie CD19-PE hinzugegeben - diese Antikörper binden an murine T – bzw. B- Lymphozyten. Die Lösung wurde 10 min bei 4 °C inkubiert, anschließend wurden 2 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen hinzugefügt. Nach einem Waschschrift bei 1400 rpm und 4 °C für 7 min wurde das erhaltene Zellpellet in 80 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Pro 10⁷ Zellen wurden 20 µl anti-PE-Microbeads hinzugefügt, um die durch die zuvor

hinzugefügten Antikörper gebundenen Zellen magnetisch zu markieren. Diese Lösung wurde 15 min bei 4 °C inkubiert, anschließend wurden 2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen hinzugefügt und die Zellen erneut durch Zentrifugation bei den zuvor genannten Parametern gewaschen. Währenddessen wurde die MACS-MS-Säule in den MACS-Multistand gestellt und mit 1 ml MACS-Puffer equilibriert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und die Lösung auf die MACS-Säule gegeben. Magnetisch markierte Zellen (T- und B-Lymphozyten) wurden so aus der Lösung entfernt. Die Säule wurde mit 1 ml MACS-Puffer nachgespült. Der Durchfluss wurde erneut durch Zentrifugation bei oben genannten Parametern gewaschen. Nach Resuspension in 1 ml Chlorid (CL)-Medium wurde wie oben beschrieben die Zellzahl der erhaltenen Lösung bestimmt. Durch Verdünnen mit CL-Medium wurde die Konzentration der Zelllösung auf 5×10^6 /ml eingestellt, die Lösung wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

2.5 Quantifizierung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus murinen neutrophilen Granulozyten

Vor Durchführung des Versuches zur Quantifizierung der ROS-Freisetzung muriner neutrophiler Granulozyten (ROS Release Assay) wurde ein Belegungsplan für eine 96-Well Platte erstellt. Neben den Zellen und den zu untersuchenden Reagenzien wurden die Wells auch mit Immunkomplexen (Antigen: mCol7c, Antikörper: anti-mCol7c-IgG) belegt, um die Realbedingungen der EBA möglichst genau nachzuempfinden. Stets wurde darauf geachtet, geeignete Kontrolluntersuchungen durchzuführen.

Nach dem zuvor aufgestelltem Belegungsplan wurde die 96-Well Maxisorb-Platte bereits am Vortag des Versuches mit mCol7c beschichtet. Hierzu wurde für jedes zu beschichtende Well 1 µg mCol7c in 100 µl Beschichtungspuffer verdünnt und 100 µl dieser Lösung in die zu beschichtenden Wells gegeben. Nach einstündiger Inkubation der Platte bei 4 °C auf dem Schüttler wurde die Platte dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. In jedes mit Antigen beschichtete Well wurde anschließend 200 µl Blockpuffer gegeben, um so die Bindung der weiteren, später hinzugefügten Reagenzien an die Platte zu verhindern. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Am Versuchstag wurde die Platte zuerst erneut dreimal wie oben beschrieben gewaschen. Für jedes Well, in dem Immunkomplexe vorgesehen waren, wurde nun 0,2 µg anti-mCol7c-IgG in 100 µl Blockpuffer verdünnt und je 100 µl dieser Lösung in die betreffenden Wells gegeben. Um die finale Messung der Lumineszenz nicht zu beeinflussen, wurde hier nicht-fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C auf dem Schüttler wurde die Platte erneut dreimal gewaschen, es folgte ein Waschschrift mit 100 µl CL-Medium pro Well. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl CL-Medium vorgelegt.

Die vorbereiteten Zelllösungen wurden mit den zu testenden Reagenzien versetzt. Als Negativkontrolle wurden jeweils Wells mitgeführt, in denen nur Medium, jedoch keine Zellen vorlagen. Zur Positivkontrolle wurden einzelne Wells neben Zelllösung mit 100 µl einer Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)-Lösung versetzt (0,2 µg/ml, zuvor aus 20 µg/ml Stammlösung mit CL-Medium 1/100 verdünnt). Um intrinsische Effekte der beiden Rezeptorblocker W-54011 und A8^{Δ71-73} auszuschließen, wurden diese in zwei Konzentrationen (10 und 1 µg/ml), jeweils mit und ohne Immunkomplexen, getestet. Um die inhibitorische Potenz der Rezeptorblocker zu evaluieren wurde zum ansonsten gleichartigen Versuchsaufbau rekombinantes murines C5a in drei verschiedenen Konzentrationen [100, 10 und 1 Nanogramm (ng)/ml] hinzugefügt. In diesem Versuch wurden zuerst die Rezeptorblocker zur Zelllösung hinzugegeben, erst nach 15-minütiger Inkubation wurde das C5a hinzugefügt. Von den so vorbereiteten Zelllösungen wurden jeweils 100 µl (entsprechend 5x10⁵ Zellen) in die vorgesehenen Wells gegeben.

Als Farbstoff, dessen Lumineszenz schlussendlich gemessen wurde, diente Luminol, welches erst in Anwesenheit von ROS gespalten und somit aktiviert wird. 2,2 mg Luminol wurden in 8,8 µl 1 M Natriumhydroxid (NaOH) gelöst und mit 1,1 ml CL-Medium verdünnt. 10 µl dieser Lösung wurden anschließend in jedes Well gegeben. Die so vorbereitete Platte wurde in den infinite M200 Pro Reader gestellt und die Lumineszenz für 2 Stunden bei 37 °C gemessen. Pro Versuchsdurchlauf wurde jede Bestimmung in 2 Wells parallel durchgeführt. Die erhaltenen Datensätze wurden als Excel-Tabellen exportiert. Die in relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) angegebenen Einzelwerte eines jeden Wells wurden addiert. Aus den RLU-Werten der Parallelbestimmungen wurde anschließend jeweils der Mittelwert berechnet. Die so erhaltenen totalen RLU-Werte wurden mithilfe von Excel und Graphpad Prism als Balkendiagramme dargestellt und statistisch ausgewertet. Detaillierte Belegungspläne der 96-Well-Platten für diese Versuche finden sich im Anhang der Arbeit (6.2.7).

2.6 Histologische Analysen

Nach Tötung der Versuchsmäuse wurden Gewebeproben der Ohren entnommen. Von jeder Maus wurden Proben sowohl in TissueTek Cryomatrix als auch in Paraffin eingebettet. Mithilfe des Leica Cryostat wurden aus den Gefrierblöcken 6 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und bei -80 °C gelagert. Aus den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, diese wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.1 Histochemische Färbung von Gewebeschnitten und mikroskopische Analyse

Um Entzündungszeichen sowie Blasenbildung an den Gewebeproben der Versuchsmäuse nachweisen zu können, wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Hierzu wurden

die Schnitte durch ein 20-minütiges Bad in Xylol entparaffiniert, bevor sie durch jeweils kurzes Schwenken in einer absteigenden Alkoholreihe [Xylol (2x), 100 % Ethanol (2x), 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, A. dest.) rehydriert wurden. Nun wurden die Schnitte 5 min in Hämatoxylin gefärbt, eventuelle Farbüberschüsse wurden anschließend durch 5-minütiges Spülen unter Leitungswasser entfernt. Nach kurzen Schwenken in Essigsäurealkohol wurden die Schnitte erneut 5 min unter Leitungswasser gespült. Es folgte ein kurzes Schwenken in Ammoniakwasser, nach dem die Schnitte erneut 5 min unter Leitungswasser gespült wurden. So vorbereitet erfolgte nun für 45 s die Gegenfärbung in Eosin. Durch jeweils kurzes Schwenken in einer aufsteigenden Alkoholreihe [96 % Ethanol, 100 % Ethanol (2x), Xylol (3x)] wurden die Schnitte wieder dehydriert. Mithilfe eines Eindeckautomaten wurden die Schnitte dann mit Eukitt eingedeckt. Die Analyse der so erhaltenen Proben durch Hellfeldmikroskopie erfolgte anschließend mithilfe des Keyence – Mikroskops.

2.6.2 Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten und mikroskopische Analyse

Die angefertigten Gefrierschnitte wurden für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Insbesondere wurde die Ablagerung von C3 an der DEJ und damit die durch den injizierten Antikörper hervorgerufene Aktivierung des Komplementsystems in diesem Bereich der Haut überprüft.

Die Schnitte wurden aufgetaut, getrocknet und für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS wurden die Schnitte mit einem DAKO-Fettstift umrandet. Normales Ziegen Serum wurde 1:10 in PBS verdünnt. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung auf die Schnitte gegeben und die Objektträger für 10 min in der Feuchtkammer inkubiert.

Parallel wurde normales Ziegen Serum 1:50 in PBS verdünnt. Der Primärantikörper (Rat anti-mouse complement C3; Cedarlane, 1 mg/ml) sowie die Isotypenkontrolle für diesen (Rat IgG 2A, isotype control; Biolegend, 0,5 mg/ml) wurden 1:200 mit der vorher hergestellten 2 %igen Ziegen Serum-Lösung verdünnt. Von diesen Lösungen wurden nun jeweils 80 µl auf die Schnitte gegeben. Hierbei wurde so verfahren, dass pro Objektträger zwei Schnitte mit Primärantikörper und ein Schnitt mit der Isotypenkontrolle inkubiert wurde. Pro Charge wurde auf einem Objektträger anstelle der Isotypenkontrolle eine Negativkontrolle (nur PBS) angefertigt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer wurden die Schnitte erneut dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (Alexa 488 Goat anti-rat IgG, Invitrogen, 3 mg/ml) wurde 1:200 in der oben genannten 2 %igen Ziegen Serum-Lösung verdünnt. Von dieser Lösung wurden nun erneut je 80 µl auf die Schnitte gegeben. Nach 45-minütiger Feuchtkammerinkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte erneut dreimal je 5 min in PBS gewaschen. In der Folge wurde darauf geachtet, die Objektträger zum Schutz des Fluorophors möglichst dunkel zu lagern. Die

Schnitte wurden anschließend mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)-Fluoromount-G eingebettet und bei -20 °C gelagert. Mithilfe des Keyence-Mikroskops wurden die so gefärbten Schnitte analysiert.

2.7 Quantifizierung der betroffenen Körperoberfläche und statistische Analysen

Der Krankheitsbefall der Mäuse wurde in Prozent der Körperfläche erhoben, wobei Erytheme, Erosionen und Krusten als Befall angesehen wurden. Diese Abschätzung der relativen Körperoberfläche erfolgte anhand eines standardisierten, am Institut etablierten Rechenschlüssels für die einzelnen Körperteile der Maus. Die Untersuchungen zum Krankheitsbefall wurden darüber hinaus verblindet durchgeführt. Die dargestellten Messwerte für den ROS-Release ergeben sich aus der Aufsummierung der Lumineszenz-Intensitäten zu jedem einzelnen Messzeitpunkt (AUC).

Soweit nicht anders angegeben, werden die Daten als Mittelwerte dargestellt. Die Unterschiede innerhalb der Gruppen werden als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Abweichungen zwischen den Gruppen bei der Krankheitsausprägung, der Zahl der ausgewanderten neutrophilen Granulozyten sowie der Freisetzung von ROS wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert, da jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen wurden und sämtliche Daten nicht normalverteilt waren. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant erachtet. Zur statistischen Analyse sowie zur Erstellung der Diagramme wurde die Software GraphPad Prism 5 genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Der aufgereinigte Antikörper bindet an der dermo-epidermalen Junktionszone

Nach Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung wurden die erhaltenen Antikörper auf ihre Binfefähigkeit an die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) untersucht. Hierzu wurden Gefrierschnitte gesunder Mausohren verwendet. Die zu kontrollierende IgG-Lösung wurde 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt, sodass die Konzentrationen nun 20, 2 und 0,2 µg/ml betragen. Mikroskopisch war die Bindung des mit DyLight 594 rot markierten Antikörpers bei einer Belichtungszeit von 1/50 s eindeutig nachweisbar, eine Negativkontrolle, die mit PBS inkubiert wurde, wies kein rotes Fluoreszenzsignal auf (Abbildung 12). Auch bei höherer Verdünnung (2 bzw. 0,2 µg/ml) war die Bindung des Antikörpers noch gut nachweisbar, hier mussten dann aber längere Belichtungszeiten verwendet werden. Durch die Beobachtung, dass der aufgereinigte Antikörper an die DEJ bindet, ist davon auszugehen, dass er sein Zielantigen, Kollagen Typ VII, erkennt und spezifisch hieran bindet.

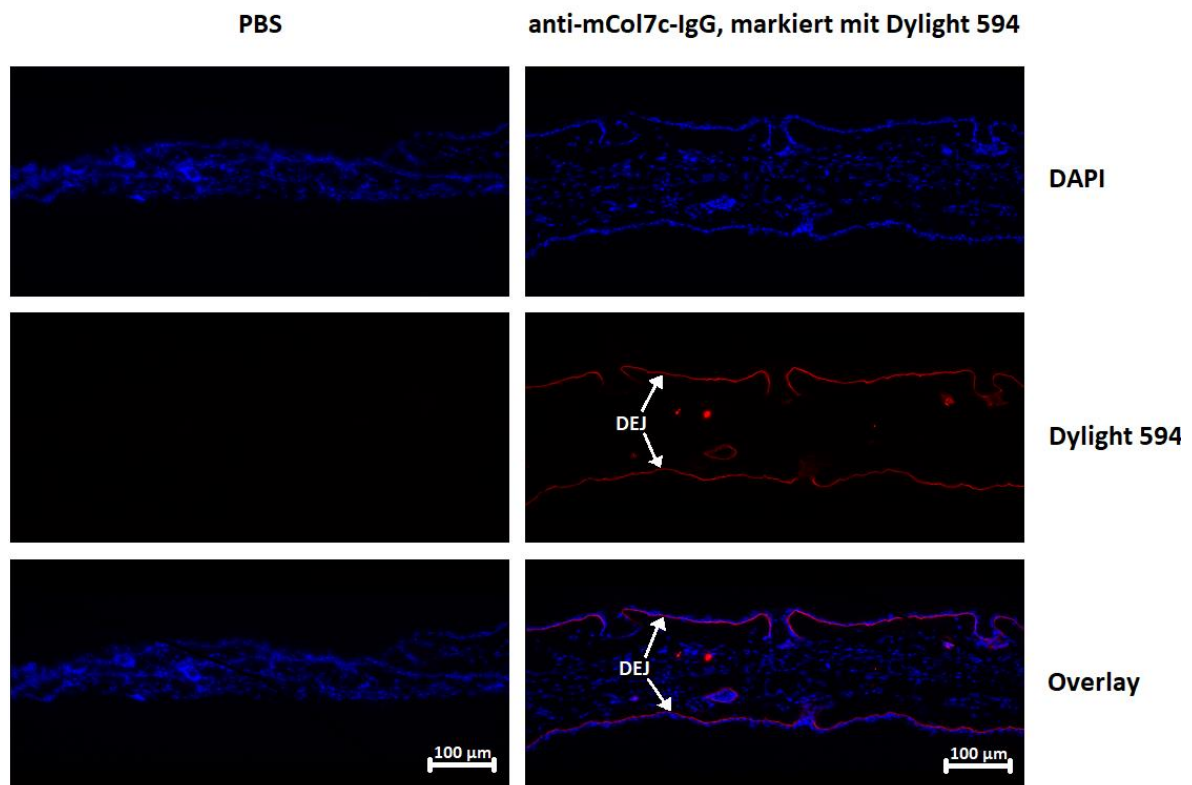


Abbildung 12: Testung der IgG-Bindekapazität. Am Querschnitt eines Mausohres erkennt man an der Ober- und Unterkante jeweils am Übergang vom zentralen Bindegewebe zur Epidermis rote, streifenförmige Ablagerungen. Es ist somit davon auszugehen, dass der mit DyLight 594 fluoreszenzmarkierte anti-mCol7c-Antikörper spezifisch sein Antigen an der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) bindet (weiße Pfeile). Auch im Overlay ist das rote Signal des an den Antikörper gekoppelten DyLight 594 gut zu erkennen. In der Negativprobe (PBS) ist kein rotes Signal detektierbar. Die Konzentration der Antikörperlösung betrug 20 µg/ml, die Belichtungszeit 1/50 s.

3.2 Passiver Antikörpertransfer verursacht Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita bei Mäusen

Die in dieser Arbeit verwendeten tierexperimentellen Verfahren sind bereits gut etabliert. Auch die Funktionsfähigkeit der Antikörper, welche mittels der von mir verwendeten Chromatographiesäule aufgereinigt wurden, wurde schon mehrfach in Vorversuchen getestet. Hierbei wurde sowohl Bindung an die DEJ als auch Pathogenität im Tierversuch nachgewiesen. Im Einklang mit dem Tierschutzgesetz wurde daher darauf verzichtet, erneut Tiere nur für die Pathogenitätstestung des Antikörpers zu verwenden. Um den Nachweis zu erbringen, dass der aufgereinigte Antikörper pathogen ist, wurde Versuch 1 (W-54011) zuerst an drei Tieren je Gruppe durchgeführt, die Kontrolltiere dieser ersten Versuchsgruppe dienten zeitgleich auch der Pathogenitätstestung des Antikörpers.

Bereits bei der ersten Untersuchung an Tag 4 nach IgG-Injektion waren Krankheitszeichen feststellbar, zu Beginn traten vorwiegend Schwellungen um die Augen und Haarverlust im Kopfbereich auf. An Tag 8 waren dann massive Läsionen insbesondere im Bereich des Kopfes sowie der Vorder- und Hinterbeine feststellbar, auch der Schwanzansatz war oft betroffen. Die Läsionen bedeckten im Durchschnitt ca. 5% der Körperoberfläche der Tiere. An Tag 12 ähnelte der Befund dem an Tag 8, einige der Läsionen begannen bereits langsam abzuheilen. Das Gewicht der Tiere änderte sich über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Abbildung 13).

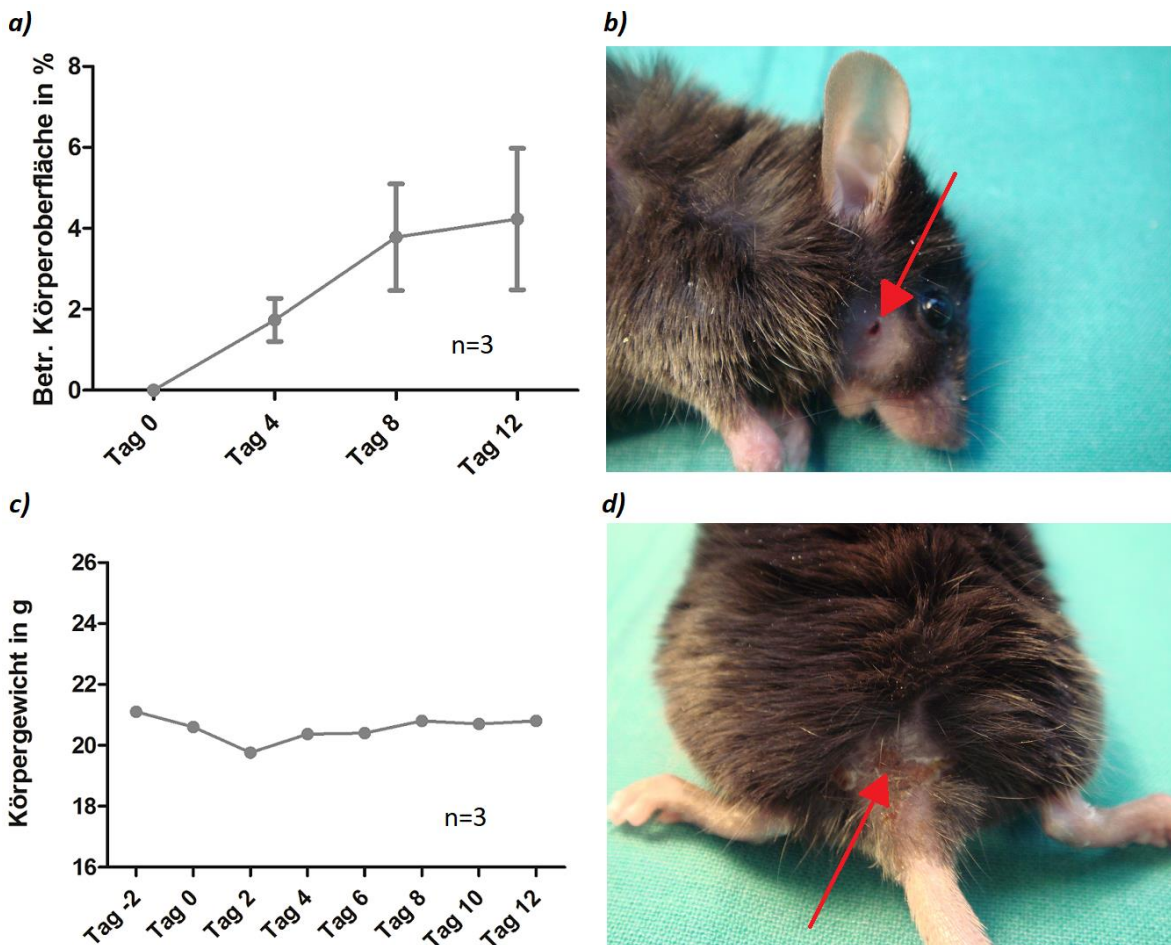


Abbildung 13: Passiver Antikörpertransfer löst bei Mäusen Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita aus. Es wurden jeweils an Tag 0 und 2 250 μg des Antikörpers i.v. injiziert, dessen Herstellung in 2.2 beschrieben wurde. In der Summe war ca. 5% der Körperoberfläche betroffen (a). Schon zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung an Tag 4 zeigten sich, betont im Kopfbereich, erste Hautläsionen [rote Pfeile in (b)], die sich über die nächsten 8 Tage auch über den Rumpf und die Beine ausbreiteten [rote Pfeile in (d)]. Gewichtsveränderungen waren nicht signifikant (c).

3.2.1 An Gewebeschnitten von Ohren sind Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita nachweisbar

An Tag 12 wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation unter Narkose getötet. Von den Ohren wurden Gewebeproben genommen, aus welchen sowohl Gefrier- als auch Paraffinschnitte hergestellt wurden. Die Paraffinschnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopisch beurteilt.

Bei makroskopischer Beurteilung der Versuchstiere fiel bereits eine unterschiedliche regionale Ausprägung der Blasenbildung auf. Bei fast allen Tieren zeigten sich die Ohren zumindest in Teilen betroffen, meist lagen gesunde und kranke Hautabschnitte nebeneinander vor. Bei wenigen Tieren schien das Ohr klinisch gesund, hier waren Hautläsionen dann betont an anderen Körperstellen aufgetreten. Die Unterschiede im makroskopischen Befund ließen sich auch mikroskopisch gut nachvollziehen. Die untersuchten Gewebeproben aus klinisch unauffälligen Hautabschnitten präsentierten sich auch histologisch unauffällig. Die Struktur der Haut war nicht beeinträchtigt, es

waren keine granulozytären Infiltrate zu erkennen, auch eine Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis war nicht nachzuweisen (Abbildung 14).

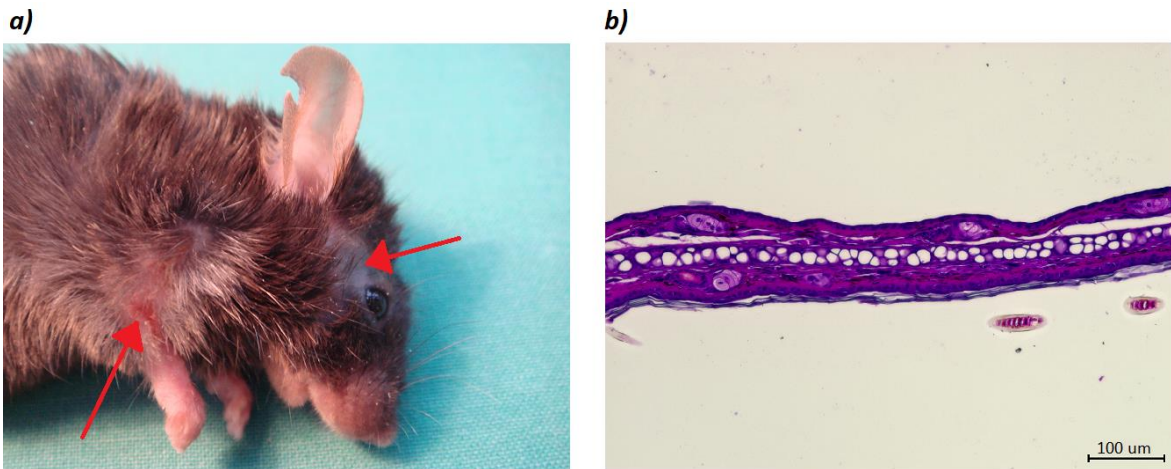


Abbildung 14: Makroskopisch gesunde Hautabschnitte zeigen auch mikroskopisch keine Auffälligkeiten. Bei der dargestellten Maus sind die Ohren nur gering von der Krankheit befallen, Läsionen treten betont an anderen Körperstellen auf [rote Pfeile in (a)]. Dem makroskopischen Befund entsprechend zeigen sich auch histologisch im Gewebeschnitt des Ohres keine Auffälligkeiten (b).

In Gewebeproben aus läsionalen Hautabschnitten ließen sich auch histologische Zeichen einer dermalen Entzündung nachweisen. Die Haut zeigte sich hier insgesamt stark verdickt mit massiven Zellinfiltraten im Bereich der Dermis. Über weite Strecken löste sich, passend zum klinischen Befund der Blasenbildung, die Epidermis von der Dermis ab. Es lässt sich also festhalten, dass der eingesetzte Antikörper zuverlässig in der Lage ist, eine dermale Entzündungsreaktion auszulösen. Hierbei sind fast regelhaft die Ohren der Tiere mitbetroffen. Das Ausmaß der Hautläsionen unterliegt regionalen Schwankungen, es liegen gesunde und läsionale Hautabschnitte nebeneinander vor. Makroskopischer und mikroskopischer Befund korrelieren zuverlässig.

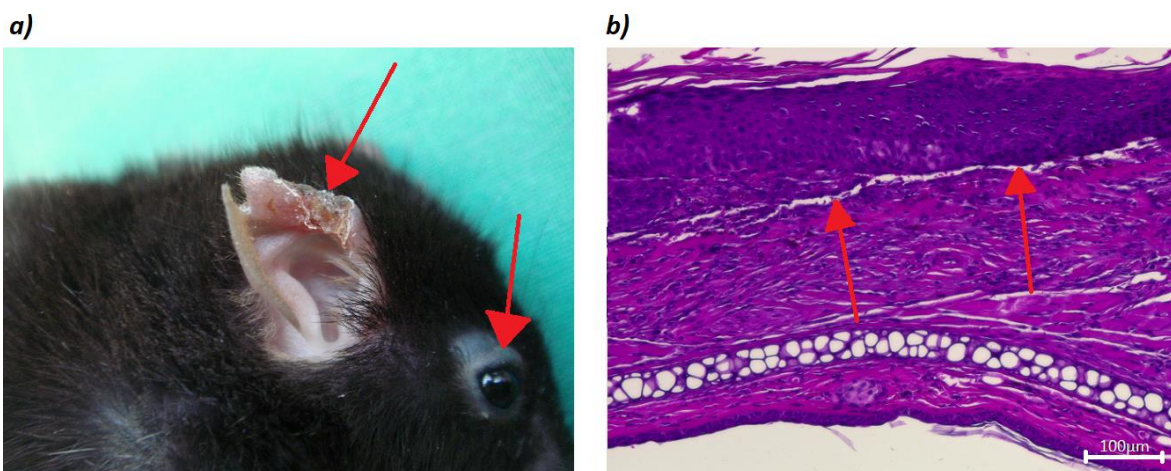


Abbildung 15: Makroskopische Läsionen lassen sich auch mikroskopisch nachweisen. Beim dargestellten Tier sind die Ohren massiv verkrustet, das Ohr ist gerötet und geschwollen [(rote Pfeile in (a))]. Mikroskopisch präsentieren sich Dermis und Epidermis stark verdickt, deutlich ist eine Spaltbildung zwischen diesen beiden Hautschichten zu erkennen [rote Pfeile in (b)].

3.2.2 An Gewebeschnitten betroffener Ohren lagert sich die Komplementkomponente 3 an der dermo-epidermalen Junktionszone ab

An weiteren Gewebeschnitten wurde eine Färbung zum Nachweis der Komplementkomponente 3 (C3) durchgeführt. Ist diese Komponente an bestimmten Regionen gehäuft nachweisbar, spricht dies für eine lokale Aktivierung des Komplementsystems an dieser Stelle.

Wie schon bei der HE-Färbung korrelierte der mikroskopische Befund mit dem Makroskopischen: An solchen Ohren, die bereits makroskopisch Krankheitszeichen zeigten, ließen sich mikroskopisch C3-Ablagerungen an der DEJ nachweisen (Abbildung 16). Es ist deutlich zu erkennen, dass die C3-Ablagerung genau dort auftritt, wo auch der injizierte Antikörper bereits gebunden hat, nämlich an der DEJ. Diese Beobachtung lässt aber noch nicht den kausalen Schluss zu, dass es durch die Antikörperbindung zur Aktivierung des Komplementsystems gekommen ist. Da zur Färbung ein Antikörper verwendet wurde, der sich gegen murines C3 richtet, wurden Kontrollfärbungen mit einer Isotypenkontrolle dieses Antikörpers vorgenommen. Diese blieben immer ohne Befund, sodass das Vorliegen von C3 an betroffenen Körperstellen als gesichert angenommen werden kann (nicht dargestellt).

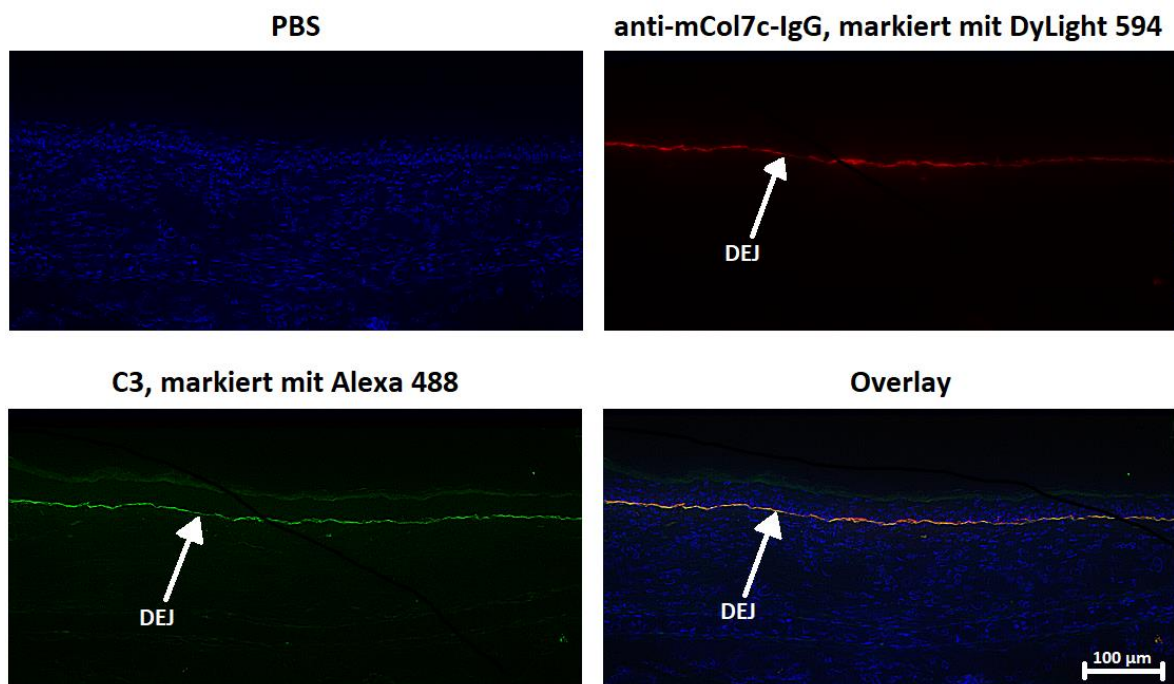


Abbildung 16: An der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) lagert sich die Komplementkomponente 3 (C3) ab. Der Antikörper (rotes Signal) hat spezifisch an die DEJ gebunden. Die C3-Färbung (grünes Signal) zeigt lineare Ablagerungen des Moleküls, die dem Bindungsmuster des Antikörpers sehr ähnlich sind. Im Overlay wird deutlich, dass sich auch C3 spezifisch an der DEJ abgelagert hat. Orte, an denen sich die beiden Signale überlappen, erscheinen gelblich.

Insgesamt lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass mit dem aufgereinigten Antikörper das Antikörpertransfer-induzierte EBA-Modell durchgeführt werden kann. Die in der Erstpublikation des Modells genannten Krankheitszeichen ließen sich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch gut nachweisen. Die Fluoreszenzmarkierung beeinträchtigt die pathogene Wirkung des Antikörpers nicht.

3.3 Die pharmakologische Blockade des Komplement-5a-Rezeptors 1 verbessert das Krankheitsbild nicht

Durch tägliche Injektion von 10 µg des niedermolekularen C5aR-Antagonisten W-54011 wurde getestet, ob die Wirkungen des Anaphylatoxins C5a, die in der Pathogenese der EBA relevant zu sein scheinen, mittels pharmakologischer Blockade seines Rezeptors aufgehoben werden können. Nach ähnlichem Protokoll konnte in unserer Gruppe schon erfolgreich nachgewiesen werden, dass die pharmakologische Blockade des Fcγ-Rezeptors IV mittels eines blockierenden, monoklonalen Antikörpers (9E9) dazu führt, dass behandelte Mäuse komplett vor der Krankheitsausprägung geschützt sind. Sollte bei Blockade des C5a-Rezeptors dasselbe eintreten, wäre dies ein bedeutender Schritt, da wie oben beschrieben schon zahlreiche C5a-Rezeptorantagonisten in klinischen Studien am Menschen zum Einsatz kommen.

Die Ergebnisse des Versuches waren jedoch zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich. Je 7 Tieren wurde täglich der Rezeptorantagonist, gelöst in 10% DMSO, intraperitoneal injiziert, 7 Kontrolltiere erhielten 10% DMSO in PBS. Die Untersuchungen zur Bestimmung der Krankheitsausprägung wurden verblindet vorgenommen. Schon bei der ersten Erhebung des Krankheitszustandes an Tag 4 konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden, die behandelte Gruppe zeigte eine minimal schwächere Krankheitsausprägung. An Tag 8 und 12 kehrte sich dieser Trend jedoch sogar um, die mit dem Rezeptorantagonisten behandelten Tiere zeigten leicht mehr Läsionen als unbehandelte Kontrolltiere. All diese Abweichungen zwischen den Gruppen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Das Körpergewicht der Tiere blieb über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen in einem engen Rahmen konstant (Abbildung 17).

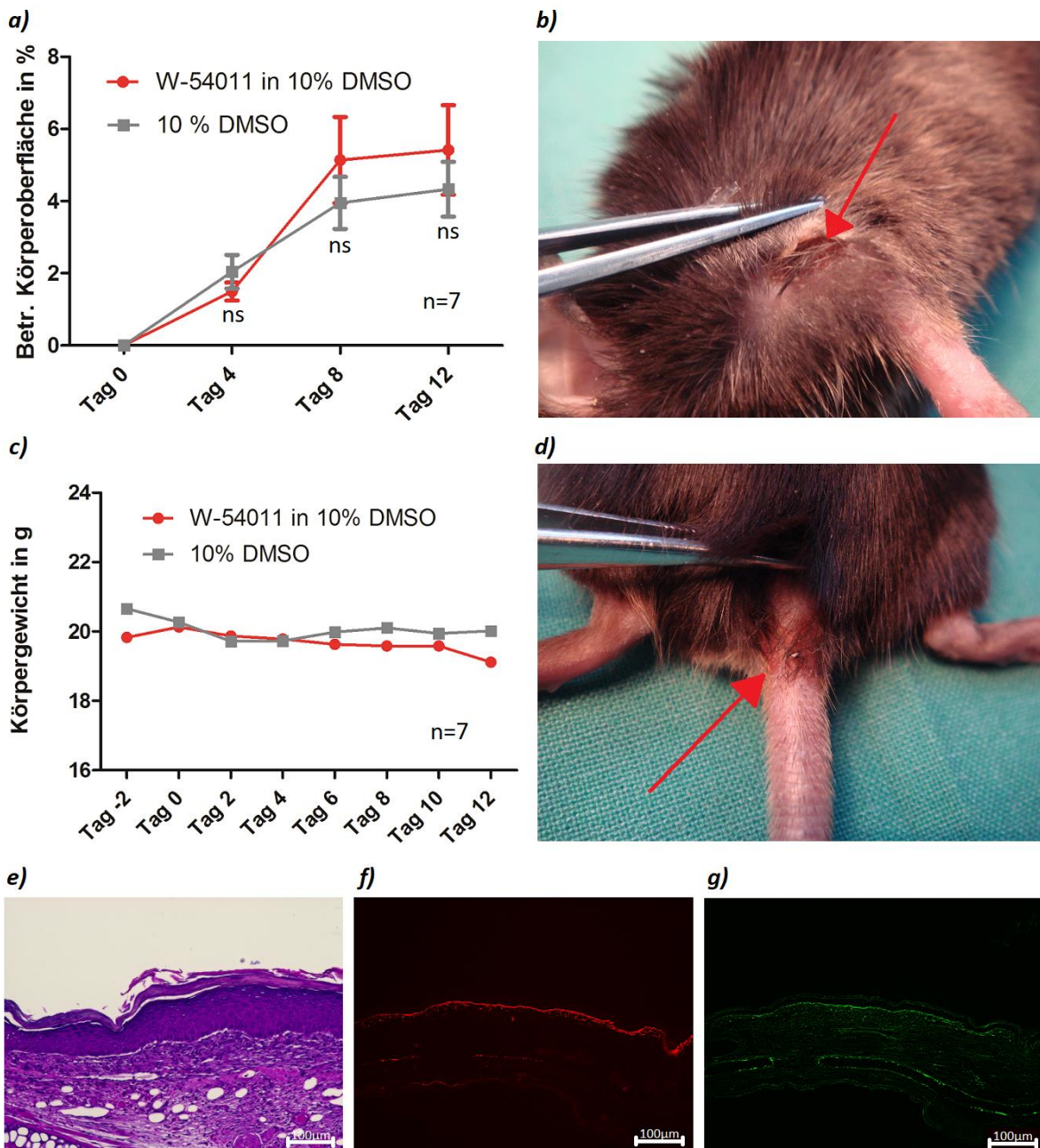


Abbildung 17: Behandlung mit dem Komplement-5a-Rezeptor (C5aR) -Antagonisten W-54011 verbessert das Krankheitsbild nicht (a). Sowohl Tiere der Kontrollgruppe (b) als auch der Versuchsgruppe (d) zeigen deutliche Krankheitszeichen, die flächenmäßige Ausprägung ebendieser weicht statistisch nicht signifikant voneinander ab. Auch das Körpergewicht bleibt bei beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum konstant (c). Tiere beider Versuchsgruppen zeigen im HE-Schnitt Entzündungszeichen (e) sowie IgG- (f) und C3-Ablagerungen (g) an der dermo-epidermalen Junctionszone. Exemplarisch sind nur Gewebeschnitte von Tieren der Versuchsgruppe gezeigt. DMSO: Dimethylsulfoxid, ns: nicht signifikant.

3.4 Kombinierte pharmakologische Blockade der Komplement-5a-Rezeptoren 1 und 2 verbessert das Krankheitsbild nicht

Im zweiten Versuch wurde mit A8^{Δ71-73} ein peptidischer C5aR-Antagonist eingesetzt, der neben der Bindung an C5aR auch die Bindung von C5a an C5L2 unterbinden kann. Vorweg muss erwähnt

werden, dass A8^{Δ71-73} nicht kommerziell erhältlich ist. Der Entwickler dieses Peptids, Prof. Jörg Köhl, stellte uns für diese Versuche freundlicherweise eine kleine Menge des Antagonisten zur Verfügung, das Versuchsprotokoll wurde in enger Absprache mit ihm entworfen. Da die Herstellung des Peptids sehr kostspielig ist, galt es, aus einer möglichst kleinen Menge des Mittels möglichst viele valide Aussagen zu generieren. Daher wurde in diesem Versuch nicht nur die Krankheitsausprägung der Mäuse beobachtet, Hauptzweck war es vielmehr, die Extravasation neutrophiler Granulozyten im Verlauf der Pathogenese der EBA beurteilen zu können. Die Ergebnisse dieses Versuchsteils werden unter 3.5 präsentiert.

Anders als bei der Behandlung mit W-54011 wurde die Behandlung mit A8^{Δ71-73} nicht zwei Tage vor, sondern parallel zur Krankheitsinduktion begonnen. Der Antagonist wurde alle 12 Stunden intravenös injiziert. Dies machte es nötig, den pathogenen Antikörper anders als im Versuch mit W-54011 intraperitoneal zu injizieren, da die gemeinsame i.v.-Injektion von Antikörper und C5aR-Antagonist schlicht zu viel Volumen für das Herz-Kreislaufsystem der Mäuse bedeutet hätte. Die Behandlung wurde über 4 Tage fortgeführt, insgesamt erhielten die Tiere also 8 Injektionen des Peptids. Je 4 Tiere wurden mit dem Rezeptorblocker behandelt, 4 Kontrolltieren wurde mit PBS das Lösungsmittel des blockierenden Peptids injiziert. An Tag 4 wurde das erste Mal die Krankheitsausprägung bei den Mäusen bewertet, nachfolgende Untersuchungen erfolgten an Tag 8 und 12. Wie beim Versuch mit W-54011 fanden diese Untersuchungen verblindet statt, der Untersucher bei beiden Versuchen war derselbe.

Auch die Behandlung mit A8^{Δ71-73} war nicht in der Lage, das Krankheitsbild bei den Versuchstieren signifikant zu verbessern. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Behandlung mit W-54011: Während an Tag 4 nur minimale Unterschiede in der Krankheitsausprägung beider Gruppen festzustellen waren, waren an Tag 8 die behandelten Tiere sogar stärker betroffen als die unbehandelten. Die Befunderhebung an Tag 12 bestätigte diesen Eindruck. Aufgrund großer individueller Schwankungen und der kleinen Gruppengröße erreichten diese Abweichungen jedoch ebenfalls nie statistische Signifikanz. Das Gewicht der Versuchstiere schwankt in diesem Versuch, im Verlauf der ersten Tage tritt ein Gewichtsverlust ein, der ab Tag 8 wieder aufgeholt wird. Dieser Effekt ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Versuchstiere an Tag 1 und 3 lange in Narkose liegen und auch in den Stunden nach der eigentlichen Narkose ein eingeschränktes Fressverhalten zeigen. Die verglichen mit den Vorversuchen geringere Krankheitsausprägung der Tiere der Kontrollgruppe lässt sich ebenfalls über die narkosebedingt geringere Aktivität der Mäuse erklären. Während und nach der Narkose konnten diese Tiere sich nicht kratzen. Dieses Verhalten kann sonst regelhaft bei EBA-Modelltieren beobachtet werden und trägt mutmaßlich in nicht unbedeutendem

Ausmaß zur Bildung der makroskopisch sichtbaren Hautläsionen bei. Abbildung 18 fasst die Ergebnisse dieses Versuches zusammen.

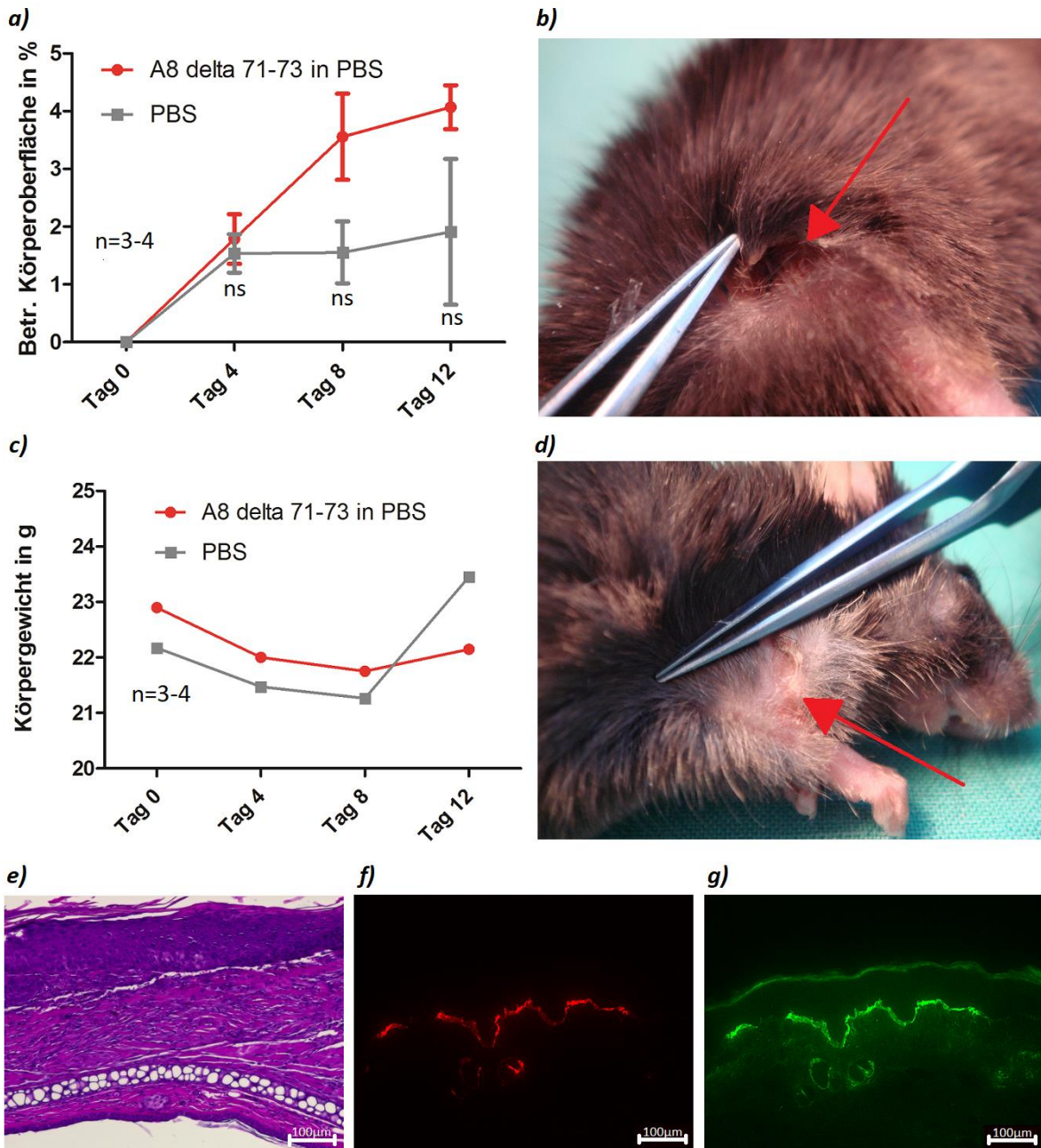


Abbildung 18: Behandlung mit dem Komplement-5a (C5aR)- und C5L2-Antagonisten A8^{Δ71-73} verbessert das Krankheitsbild nicht (a). Wie im Versuch mit W-54011 zeigen Tiere sowohl der Kontroll- (b) als auch der Versuchsgruppe (d) deutliche Hautläsionen. Das Gewicht der Tiere schwankt etwas stärker als bei Behandlung mit W-54011, Abweichungen waren jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant (c). Tiere beider Gruppen zeigen im HE-Schnitt Entzündungszeichen (e) sowie IgG- (f) und C3-Ablagerungen (g) an der dermo-epidermalen Junktionszone. Erneut sind exemplarisch nur Gewebeschnitte von Tieren der Versuchsgruppe gezeigt. PBS: Phosphate buffered saline, ns: nicht signifikant.

Es bleibt also festzuhalten, dass zwei molekular verschiedenen Klassen zugehörige C5aR-Blocker nicht in der Lage waren, das Krankheitsbild der EBA zu verbessern. Im Gegenteil zeigte sich sogar

eine Tendenz dieser Pharmaka, das Krankheitsbild zu verschlimmern, welche aber keine statistische Signifikanz erreichte.

3.5 Die kombinierte Blockade der Komplement-5a-Rezeptoren 1 und 2 reduziert für einen kurzen Zeitraum die Extravasation neutrophiler Granulozyten

Zwei Tage vor Versuchsbeginn sowie an Tag 1 und 3 nach Krankheitsinduktion wurde mittels 2-Photonen-Mikroskopie die Anzahl der in die Dermis ausgewanderten neutrophilen Granulozyten bestimmt. Von jedem Versuchstier wurde ein Ohr mikroskopiert, pro Ohr wurden Aufnahmen von je 7 Quadern mit quadratischer Grundfläche (Stacks) angefertigt. Diese hatten eine Kantenlänge von 250 μm und eine Tiefe von 90 μm . Ein Stack entspricht einem Bildstapel von 46 Bildern, die im vertikalen Abstand von 2 μm aufgenommen wurden. Hinterher wurde dieser Bildstapel computergestützt zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt. Mittels dreier verschiedener Detektionskanäle konnten der injizierte Antikörper, die neutrophilen Granulozyten und das dermale Kollagen Typ I nachgewiesen werden. Ein Beispiel für einen solchen Stack zeigt Abbildung 19.

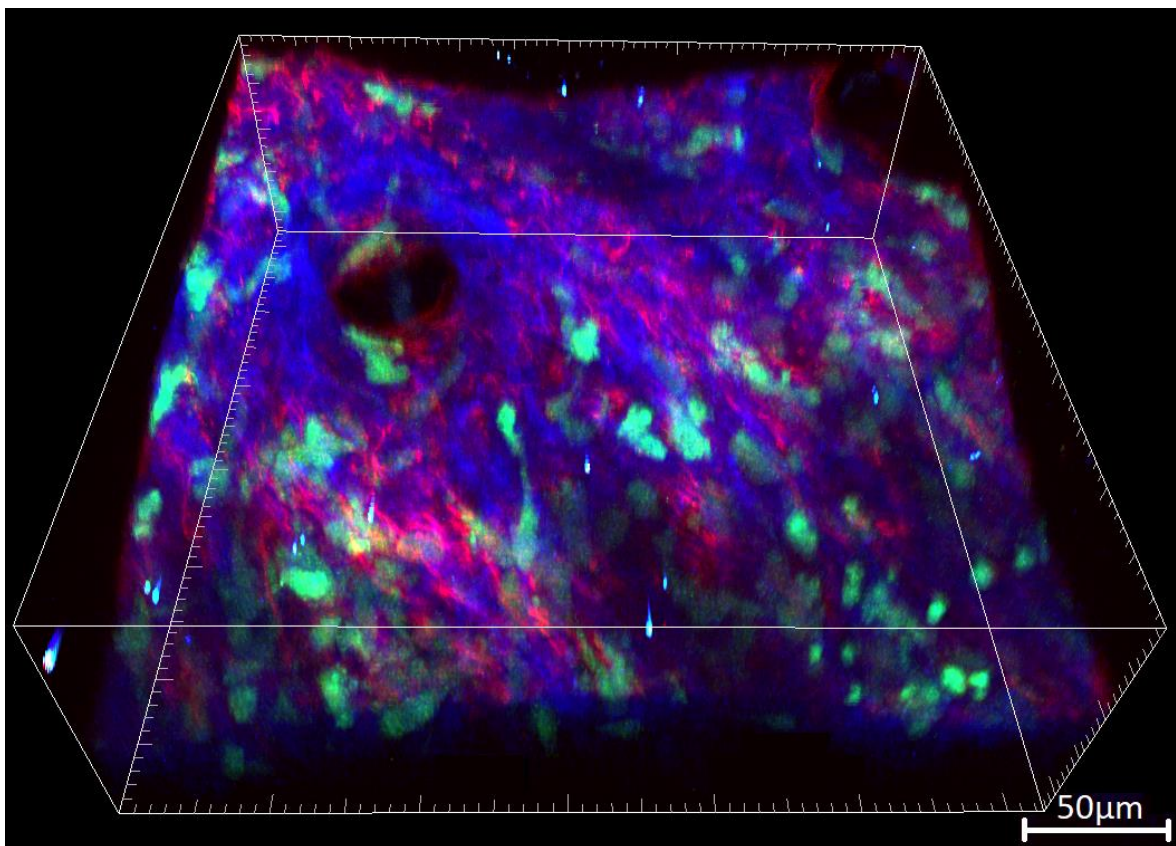


Abbildung 19: Überblick über einen 3D-Stack der Dermis eines Mausohres. In blau ist das Signal des dermalen Kollagens zu erkennen. An der oberen Grenze dieses Signales, welche der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ) entspricht, ist das rote Signal des gebundenen Antikörpers auszumachen. Deutlich zu erkennen sind die grünen neutrophilen Granulozyten, die in diesem Beispiel recht zahlreich in die Dermis eingewandert sind. Überlagerungen des roten und grünen Signals

erscheinen gelblich. An diesen Stellen binden Neutrophile unmittelbar an die DEJ. Dieser Stack wurde an Tag 3 nach Krankheitsinduktion bei einer Maus aufgenommen, die mit A8^{Δ71-73} behandelt wurde.

Die neutrophilen Granulozyten in den so erhaltenen Stacks wurden dann händisch gezählt, die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Visualisierungen vor Versuchsbeginn wurden vorgenommen, um einen Referenzwert für die Zahl neutrophiler Granulozyten pro Stack in einem gesunden Mausohr zu ermitteln. Dieser Wert streute von Stack zu Stack zwar recht stark, im Durchschnitt lag der Wert jedoch bei allen sechs visualisierten Mäusen zwischen 5 und 10. Eine durchschnittliche Neutrophilenzahl in dieser Größenordnung pro Stack kann also als kennzeichnend für ein gesundes Mausohr angenommen werden.

An Tag 1 nach Krankheitsinduktion zeigten sich deutliche Differenzen zwischen den behandelten und den nicht behandelten Tieren. Während die Zahl der Neutrophilen bei den unbehandelten Mäusen stark auf Werte von im Durchschnitt 15 bis 40 anstieg, blieb sie bei den behandelten Mäusen in dem Rahmen, der auch vor Versuchsbeginn vorgelegen hatte. An Tag 3 nach Krankheitsinduktion war dieser Effekt jedoch nicht mehr nachzuweisen. Während die Neutrophilenzahlen der behandelten Mäuse weiter leicht anstiegen, fielen die Neutrophilenzahlen bei den unbehandelten Mäusen wieder auf Werte, die ebenfalls leicht über ihrem Ausgangslevel vor Versuchsbeginn lagen (Abbildung 20).

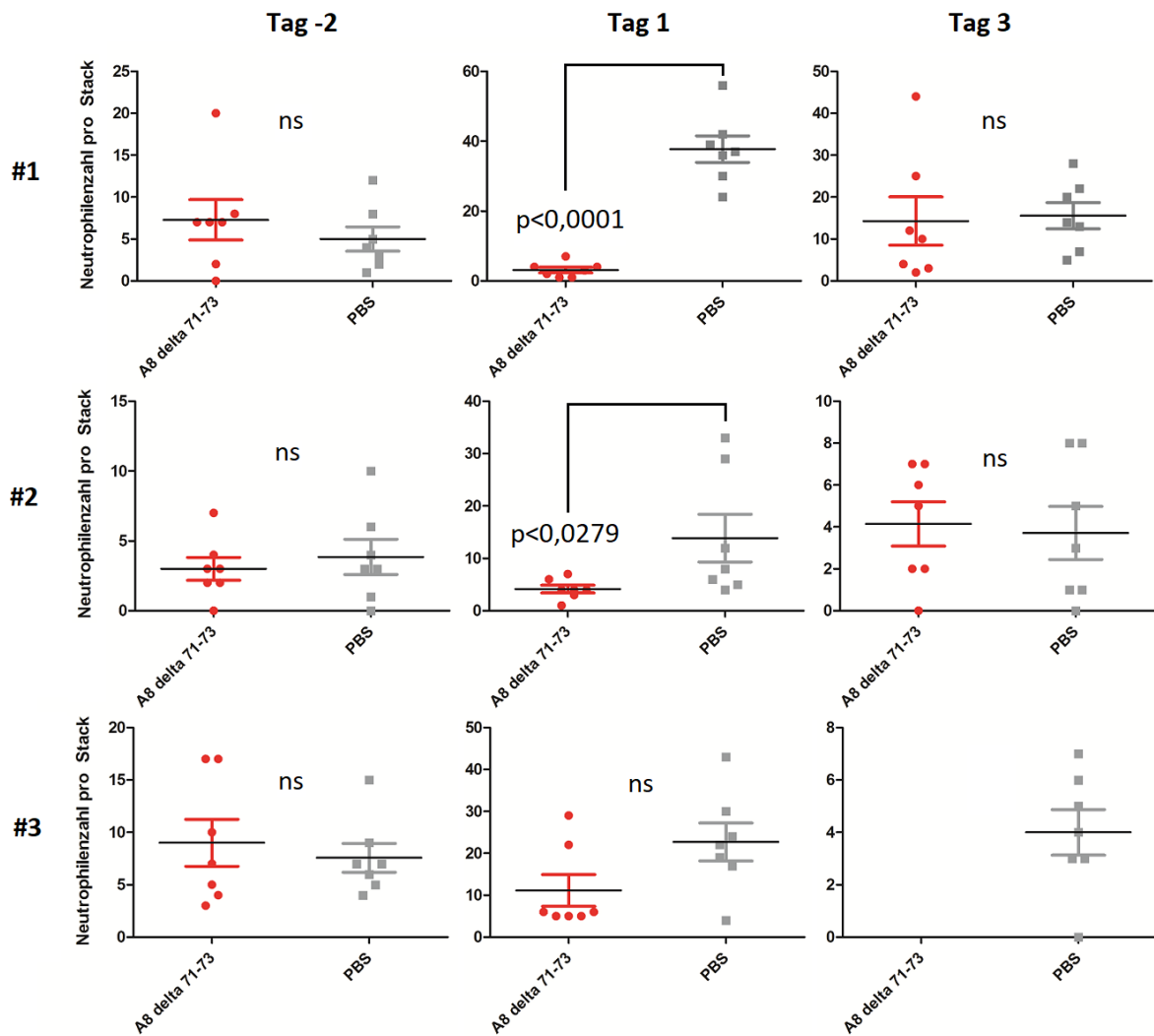


Abbildung 20: Behandlung mit A8^{Δ71-73} vermindert die Extravasation neutrophiler Granulozyten nur an Tag 1 nach Krankheitsinduktion. Jeder Punkt in der Grafik zeigt die Zahl der ausgewanderten Neutrophilen pro Stack an. Von insgesamt 6 Mäusen [3 Versuchsgruppe (rot), 3 Kontrollgruppe (grau)] wurden zu drei Zeitpunkten (Tag -2 = 2 Tage vor Krankheitsinduktion, Tag 1 bzw. 3 = erster bzw. dritter Tag nach Krankheitsinduktion) je 7 Stacks aufgenommen. Bei einer Maus der Versuchstiergruppe stellten sich die Bilder der 3. Visualisierung als nicht auswertbar dar. Signifikante Unterschiede der Neutrophilenzahlen zeigen sich nur bei 2 von 3 Versuchstieren an Tag 1 nach Krankheitsinduktion. Diese sind auf einen temporären Anstieg der Zahlen in der Kontrollgruppe zurückzuführen, der in der Versuchsgruppe nicht eintritt. ns: nicht signifikant, p signifikant wenn <0,05 im Mann-Whitney-U-Test.

In Abbildung 21 sind die erhobenen Daten zusammengefasst dargestellt. Analysiert man die Mittelwerte der Anzahl der ausgewanderten Neutrophilen der einzelnen Versuchstiere wird deutlich, dass vor Krankheitsauslösung sowie 3 Tage später kaum Unterschiede in der Zahl der ins Gewebe ausgewanderten Neutrophilen vorliegen. An Tag 1 ist eine starke Tendenz zu einer verstärkten Extravasation bei den nicht behandelten Versuchstieren zu erkennen, welche jedoch knapp keine statistische Signifikanz erreicht.

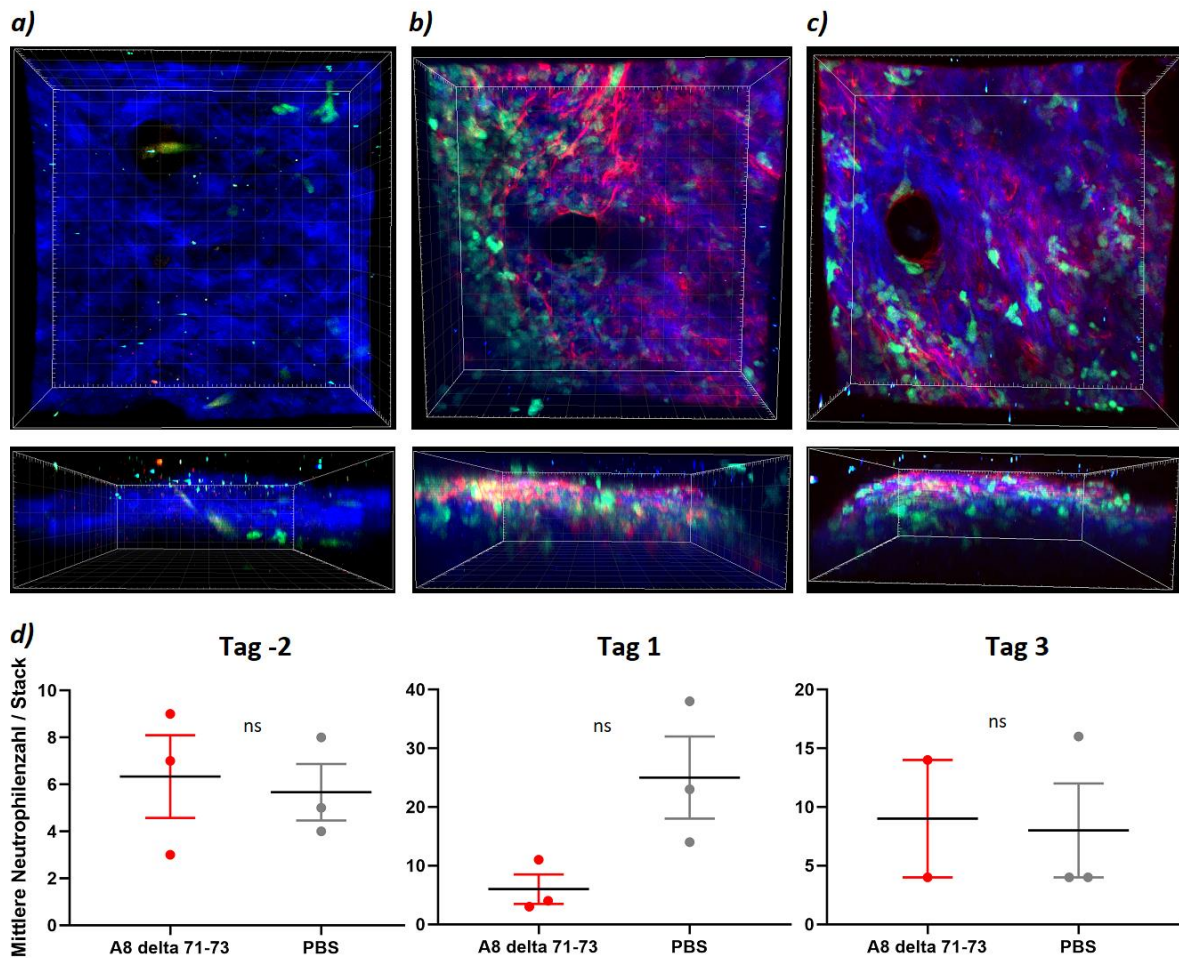


Abbildung 21: Übersicht über die Versuchsergebnisse der Visualisierung. (a), (b) und (c) zeigen exemplarisch 3D-Stacks von Mausohren der Versuchsgruppe vor (a), an Tag 1 (b) und an Tag 3 (c) nach Krankheitsinduktion. In (d) sind die Mittelwerte der ausgewanderten neutrophilen Granulozyten pro Stack dargestellt. Während vor Versuchsbeginn sowie an Tag 3 nach Krankheitsinduktion im Mittel kaum Unterschiede festzustellen sind, zeigt sich an Tag 1 eine statistisch jedoch nicht signifikante Differenz. ns: nicht signifikant, p signifikant wenn $<0,05$ im Mann-Whitney-U-Test.

3.6 Nur A8 ^{Δ 71-73} zeigt *in vitro* Effekte, C5a-vermittelte Signale zu inhibieren

Um der fehlenden klinischen Wirkung der beiden getesteten C5aR-Antagonisten weiter auf den Grund zu gehen, wurde in einem Folgeversuch *in vitro* getestet, ob die Substanzen in der Lage sind, den ROS-Release muriner neutrophiler Granulozyten zu inhibieren. Um die *in vivo* Situation möglichst realistisch nachzubilden, wurden murine neutrophile Granulozyten mit Immunkomplexen aus mCol7c und anti-mCol7c-IgG inkubiert. Diese Immunkomplexe liegen an der DEJ der Versuchstiere vor. In vorhergehenden Arbeiten am Institut konnte gezeigt werden, dass Tiere, bei denen pharmakologisch bestimmte Fc-Rezeptoren blockiert wurden, komplett vor der Krankheitsausprägung geschützt sind. Es ist daher davon auszugehen, dass die Stimulation von Fc-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten einen wichtigen Schritt in der Krankheitsentwicklung darstellt. Würde man Zellen ohne Immunkomplexe inkubieren, würde der ROS Release Assay also bewusst um wesentliche Elemente gekürzt werden und hätte somit keine Aussagekraft mehr. Als

Negativkontrolle wurden stets Proben ohne Zellen mitgeführt. Zur Positivkontrolle wurden Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) inkubiert. Um beurteilen zu können, ob das bei LysM-eGFP-Mäusen veränderte Genom einen Einfluss auf den ROS-Release neutrophiler Granulozyten hat, wurden initial vergleichende Versuche mit Zellen von beiden eingesetzten Mausstämmen (LysM-eGFP und C57Bl/6) durchgeführt. Abbildung 22 fasst die Ergebnisse dieses Versuches zusammen. Es zeigt sich, dass zwischen den Neutrophilen beider Mausstämme keine signifikanten Unterschiede des ROS-Release bei Stimulation mit Immunkomplexen vorliegen. Weiterhin wurde untersucht, ob die eingesetzten Inhibitoren ohne Vorliegen von C5a einen Einfluss auf den ROS-Release der Granulozyten hatten. Dies erfolgte insbesondere, um eventuelle agonistische Effekte der Pharmaka am C5a-Rezeptor auszuschließen. Es bestätigte sich, dass bei Inkubation mit Immunkomplexen das Hinzufügen der Pharmaka bei Zellen beider Mausstämme ohne Einfluss auf den ROS-Release blieb. Bei Stimulation der Neutrophilen mit den Pharmaka allein, ohne das parallele Vorliegen von Immunkomplexen, ist überhaupt kein ROS-Release nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

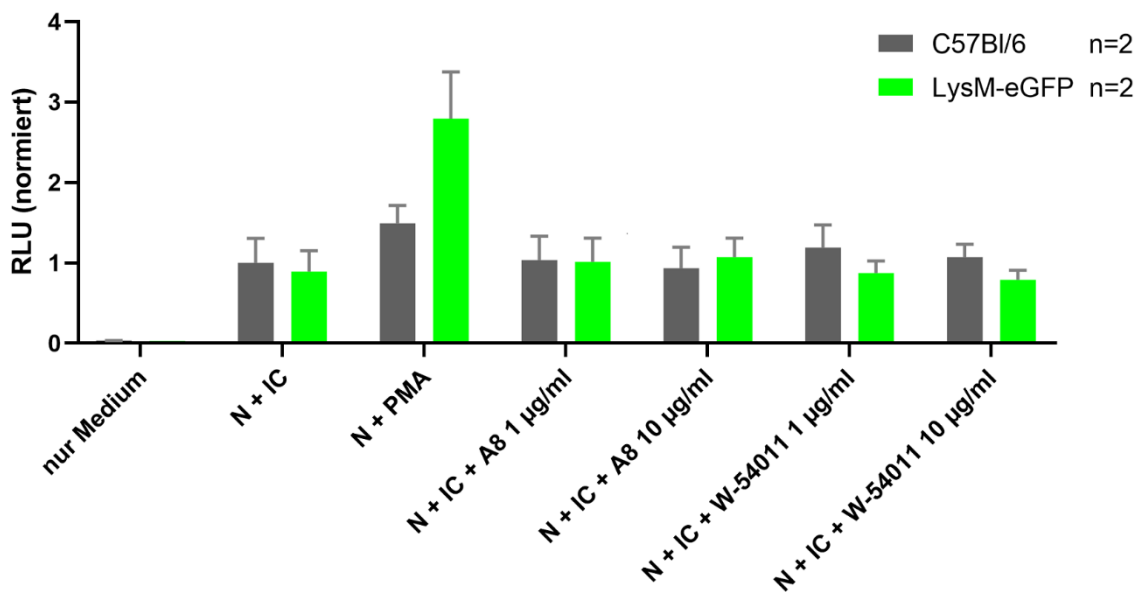


Abbildung 22: Es bestehen keine signifikanten Unterschiede im ROS-Release zwischen neutrophilen Granulozyten von C57Bl/6 und LysM-eGFP-Mäusen bei Inkubation mit Immunkomplexen. Die eingesetzten Inhibitoren haben in Abwesenheit von C5a keinen signifikanten Einfluss auf den ROS-Release. Es wurden Zellen von je 2 Mäusen verwendet, zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf N (von C57Bl/6-Tieren) + IC = 1 normiert. N: Neutrophile, IC: Immunkomplexe, PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, RLU: relative Lumineszenzeinheiten, p signifikant wenn <0,05 im Mann-Whithney-U-Test.

Die Bestimmungen wurden insgesamt viermal wiederholt, hierbei wurden je zweimal Zellen von C57Bl/6-Versuchstieren und zweimal solche von LysM-eGFP-Mäusen verwendet. In jedem Versuchsdurchlauf wurden lediglich Zellen eines einzelnen Versuchstieres eingesetzt, es fand kein Pooling von Zellen verschiedener Versuchstiere statt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass im Vergleich der neutrophilen Granulozyten beider Mausstämme untereinander kein signifikanter Unterschied im ROS-Release besteht. Lediglich die Positivkontrolle (PMA) fällt bei den Granulozyten von LysM-eGFP-Mäusen stärker aus. Auch dieser Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz und ist auf eine vergleichsweise schwache Positivreaktion der Neutrophilen von C57Bl/6-Mäusen zurückzuführen, wie in den folgenden Versuchen deutlich wird. Da basierend auf diesen Ergebnissen davon ausgegangen werden kann, dass sich neutrophile Granulozyten von C57Bl/6- und LysM-eGFP-Mäusen in ihrer Reaktion auf die Stimulation mit Immunkomplexen und den eingesetzten Pharmaka nicht relevant voneinander unterscheiden, wurden die Folgeversuche nur noch mit neutrophilen Granulozyten von C57Bl/6-Mäusen vorgenommen.

Um die Potenz des verwendeten rekombinanten murinen C5a zu testen, wurden neutrophile Granulozyten mit C5a in verschiedenen Konzentrationen (1, 10 und 100 ng/ml) inkubiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass C5a in der Lage ist, konzentrationsabhängig den ROS-Release dieser Zellen zu erhöhen (Abbildung 23). Erneut wurden als Negativkontrolle Wells ohne Zellen, als Positivkontrolle mit PMA inkubierte Zellen mitgeführt. Testweise wurde auch eine Inkubation mit C5a in hoher Konzentration, aber ohne Immunkomplexe vorgenommen. Die Zellen setzten in diesem Falle zwar reaktive Sauerstoffspezies frei, das Ausmaß dieser Freisetzung betrug jedoch nur weniger als ein Drittel dessen, was bei Kostimulation mit Immunkomplexen und C5a gemessen werden konnte. Wie im Vorversuch wurden die Bestimmungen nacheinander mit Zellen von vier verschiedenen Versuchstieren vorgenommen, ein Pooling von Zellen verschiedener Versuchstiere fand nicht statt.

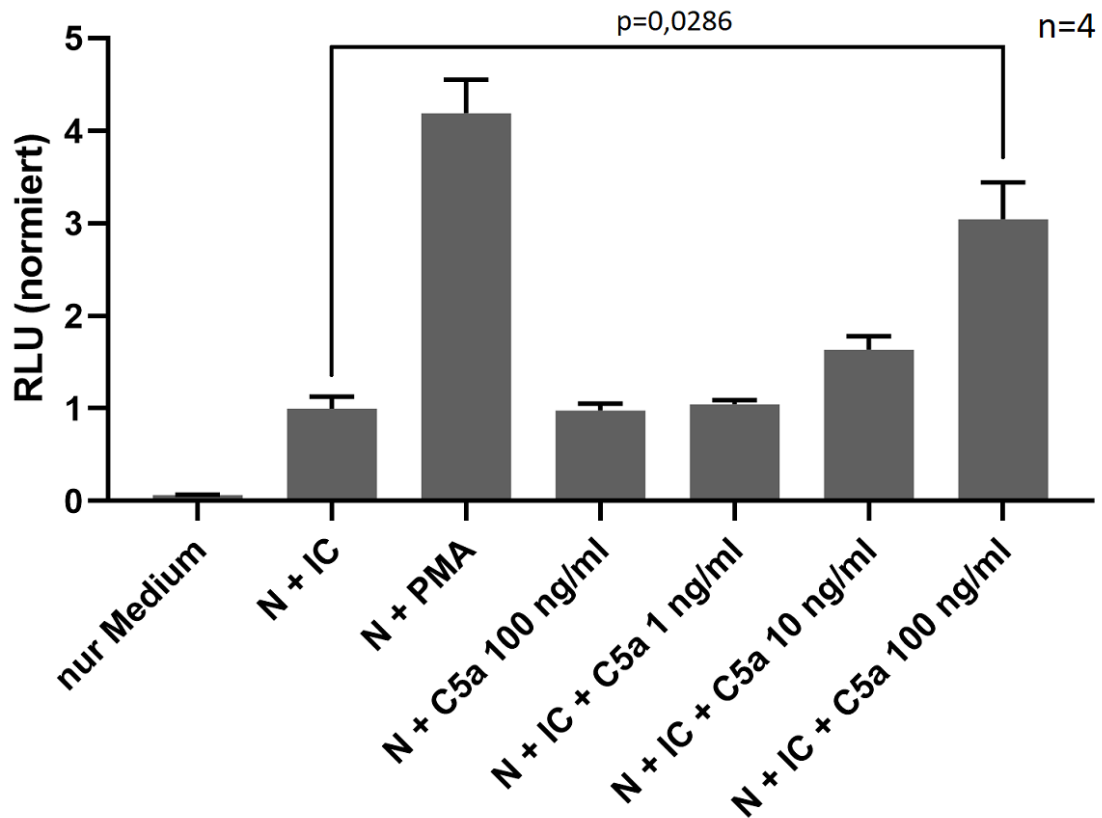
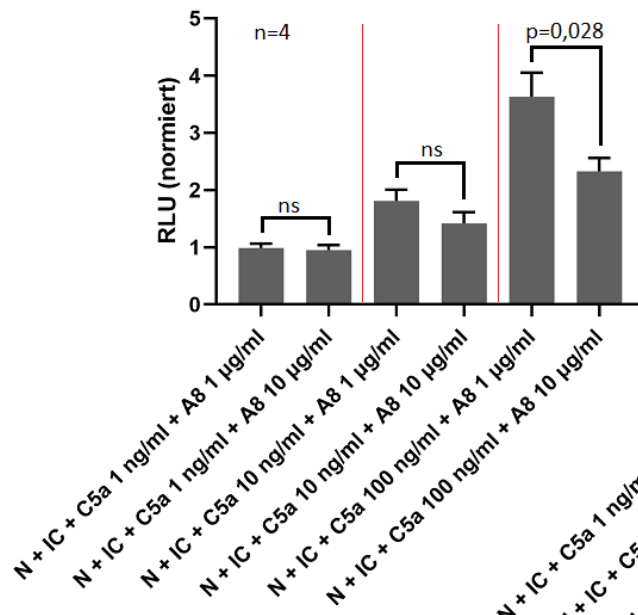


Abbildung 23: Rekombinantes murines C5a ist in der Lage, die ROS-Freisetzung neutrophiler Granulozyten konzentrationsabhängig zu erhöhen. Werden die Zellen mit C5a, aber ohne Immunkomplexe inkubiert, werden in deutlich geringerem Ausmaß reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt als bei Kostimulation mit Immunkomplexen und C5a. Es wurden Zellen von je 4 Mäusen verwendet, zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf N + IC = 1 normiert. N: Neutrophile, IC: Immunkomplexe, PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, RLU: relative Lumineszenzeinheiten, p signifikant wenn <0,05 im Mann-Whithney-U-Test.

Im selben Versuch wurden zusätzlich zur Stimulation mit Immunkomplexen und C5a jeweils die verwendeten Inhibitoren in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 und 10 µg/ml) zugegeben. Um den Substanzen Gelegenheit zu geben, an die Rezeptoren zu binden, wurden die C5aR-Antagonisten zuerst zu den Zellen gegeben, erst nach 15-minütiger Inkubation wurde dann das murine C5a hinzugefügt.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 24 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass W-54011 nicht in der Lage ist, die durch C5a induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus neutrophilen Granulozyten wirksam zu verhindern. Der peptidische Inhibitor A8^{Δ71-73} zeigt in hohen Konzentrationen eine deutliche Tendenz zur Reduktion der ROS-Freisetzung.

a)



b)

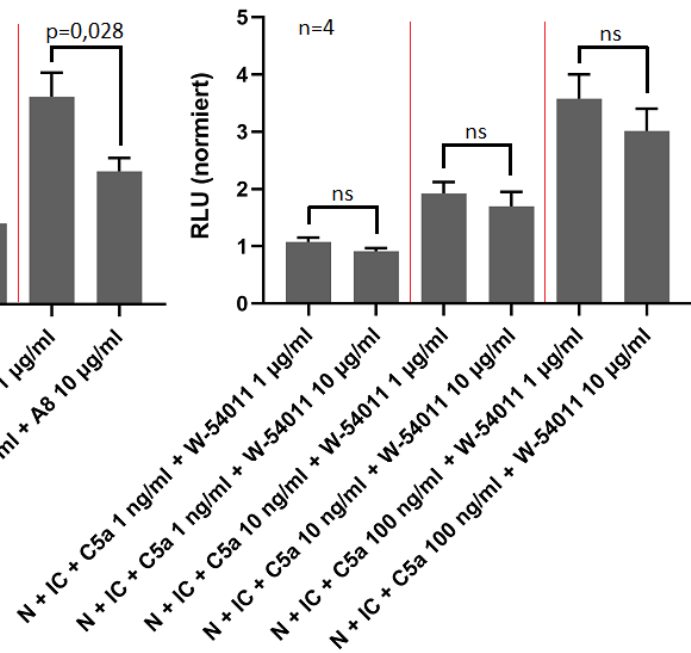


Abbildung 24: $A8^{\Delta 71-73}$ zeigt in hoher Konzentration signifikant mehr Wirkung als in niedriger Konzentration [rechte Balken in (a)]. W-54011 kann den Komplement-5a- (C5a) vermittelten Anstieg der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nur minimal inhibieren (b). Es wurden Zellen von je 4 Mäusen verwendet, zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf $N + IC = 1$ normiert. N: Neutrophile, IC: Immunkomplexe, RLU: relative Lumineszenzeinheiten, ns: nicht signifikant, p signifikant wenn $<0,05$ im Mann-Whitney-U-Test.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche hatten zum Ziel, die Rolle des Anaphylatoxins C5a in der Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita auf zeitlicher und räumlicher Ebene genauer einzugrenzen. Ein durchaus erhoffter therapeutischer Effekt dieser Substanzen konnte nicht gezeigt werden – dennoch brachten die Visualisierungsversuche Erkenntnisse, die mit anderen Methoden nur schwer oder nicht zu erbringen gewesen wären. Insbesondere die zeitliche Komponente der C5a-Wirkung konnte mithilfe der Beobachtung der Neutrophilen-Extravasation über mehrere Tage hinweg genauer eingegrenzt werden. Durch die Blockade des C5a-Rezeptors konnte unmittelbar nach Krankheitsinduktion eine starke Tendenz zur Reduktion der Neutrophilenzahlen in der Dermis erreicht werden, welche jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Schon 3 Tage nach Krankheitsauslösung ist überhaupt kein Effekt mehr zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass im chronischen Krankheitsverlauf (und dieser ist, gerade in Bezug auf eine perspektivische Behandlung beim Menschen, der Relevante) andere Mechanismen für die Aufrechterhaltung der dermalen Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Ein Pathogenesemodell, welches diese Erkenntnis berücksichtigt und dabei auf zahlreiche weitere aktuelle Arbeiten Bezug nimmt, wird am Ende dieser Diskussion entwickelt.

Weiterhin muss jedoch auch erörtert werden, wo mögliche Störvariablen liegen, die die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflusst haben könnten. Da zahlreiche verschiedene Methoden, Mausstämme und Pharmaka verwendet wurden, ist eine kritische Auseinandersetzung mit der Art der Versuchsdurchführung unabdingbar. Auf den nächsten Seiten soll auf diese potentiellen Störfaktoren eingegangen werden und erörtert werden, an welchen Stellen ein Einfluss wahrscheinlich und an welchen Stellen weniger wahrscheinlich ist. Darüber hinaus werden auch weitere Faktoren, welche die Arbeit limitieren, adressiert.

4.2 Potentielle strukturelle Fehlerquellen

4.2.1 Wirksamkeit der verwendeten Pharmaka

Die Blockade des Komplementsystems ist ein vergleichsweise neuartiger Therapieansatz. Während ein C5-Inhibitor, wenn auch nur für wenige Indikationen, schon zur Behandlung beim Menschen zugelassen ist, gestaltete sich die Suche nach einem kompetenten Inhibitor des C5a-Rezeptors als schwierig. Zwar wurden verschiedene Moleküle beschrieben, die in-vitro C5a-vermittelte Signale durch Rezeptorblockade inhibieren können. Meist wurden die einzelnen Moleküle aber nur im Rahmen weniger Studien getestet. Es muss bei Betrachtung der Versuchsergebnisse also

berücksichtigt werden, dass die pharmakologische Blockade schwächen aufweisen kann, schlicht, weil noch keine umfassend getesteten, *in-vivo* wirksamen C5aR-Antagonisten zur Verfügung stehen. Um dennoch möglichst valide Ergebnisse zu erzielen, wurde in dieser Arbeit mit zwei chemisch komplett verschiedenen Antagonisten gearbeitet. Die Gründe für die Auswahl ebendieser beiden Substanzen sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

A8^{Δ71-73} hatte sich nach Literaturrecherche schnell als Wunschkandidat für die Studien herausgestellt. Von allen beschriebenen Rezeptorblockern war er einer der wenigen, der schon bei der Erstbeschreibung auch *in vivo* getestet wurde und hier Wirksamkeit gezeigt hatte (Heller et al., 1999a). Als Kriterium für die Wirksamkeit wurde in dieser Publikation die Zahl der neutrophilen Granulozyten, die nach einer Entzündungsreaktion in die Bauchhöhle von Mäusen rekrutiert wurden, herangezogen. Der Inhibitor konnte die Zahl dieser Zellen signifikant senken. Auch wenn hier nur der Verlauf in den ersten 6 Stunden nach Auslösung der Entzündungsreaktion betrachtet wurde, kam dieser Aufbau den von mir geplanten Experimenten von allen Testsettings am nächsten. Für sämtliche andere Inhibitoren waren überhaupt keine *in vivo*-Daten verfügbar. Aus diesem Grunde wurden die aufwendigen Visualisierungsversuche in dieser Arbeit ebenfalls mit A8^{Δ71-73} und nicht mit W-54011 durchgeführt – für erstgenannten Inhibitor war der Effekt, einen Einfluss auf das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten zu haben, schon einmal nachgewiesen worden.

Kommerziell erhältlich ist A8^{Δ71-73} nicht. Durch den glücklichen Umstand, dass mit Prof. Köhl der Erstbeschreiber dieses Wirkstoffes am selben Campus arbeitet, konnten dennoch Versuche hiermit durchgeführt werden. Das Versuchsprotokoll wurde in enger Kooperation mit ihm erstellt, die Dosierung des Wirkstoffes in Höhe von 80 µg pro Injektion wurde von ihm vorgeschlagen und entsprach der Menge, die auch in anderen Modellen *in vivo* Wirksamkeit gezeigt hatte. Die Plasmahalbwertszeit von freiem C5a wird auf weniger als 5 min eingeschätzt. In einer Studie mit radioaktiv markiertem C5a an Kaninchen konnte nach 30 min noch etwa 20% der direkt nach Applikation vorliegenden C5a-Konzentration im Plasma nachgewiesen werden (Webster et al., 1982). Schon in der Erstpublikation des Inhibitors A8^{Δ71-73} wird darauf hingewiesen, dass dessen Halbwertszeit aufgrund der molekular nur geringfügig veränderten Struktur mit der von freiem C5a vergleichbar ist (Heller et al., 1999a). Basierend auf diesen Informationen wurde ein im Vergleich zum Versuch mit W-54011 engmaschigeres Injektionsintervall gewählt. Unser Versuchsprotokoll berücksichtigte, dass der Inhibitor *i.v.* injiziert werden musste. Aufgrund der starken Ladung des Moleküls wurde die Inhibitorlösung ausschließlich mit Low-Binding-Materialien behandelt. Stets wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Vergleichend sollte ein nichtpeptidischer Rezeptorantagonist getestet werden. Von den wenigen kommerziell erhältlichen wies W-54011 hier die überzeugendste Datenlage auf. In Anbetracht der Tatsache, dass schon bei der Erstbeschreibung die fehlende Wirksamkeit bei Mäusen hervorgehoben wurde (Sumichika et al., 2002) und dieser Befund durch speziesabhängige Differenzen in der Struktur des C5a-Rezeptors sogar molekular erklärt werden konnte (Waters et al., 2005), erscheint diese Feststellung paradox. Dennoch wurde der Antagonist in verschiedenen Settings auch an Mäusen eingesetzt und konnte hier teils bessere Ergebnisse erzielen als vergleichend getestete peptidische Inhibitoren (Sendler et al., 2015). Der Wirkstoff wurde nach Herstellerangaben gelagert und verdünnt. Es wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Dosierung von 10 µg pro Injektion (entspricht etwa 500 µg/kg KG oder ca. 10 µM bei einem Blutvolumen von 2 ml) war etwas höher als in anderen Publikationen, in denen dieser Inhibitor eingesetzt wurde. Es gibt jedoch keinen Grund zur Annahme, dass sich dies negativ auf die Wirksamkeit auswirken sollte. Agonistische Effekte treten laut Erstbeschreiber erst ab einer Dosierung oberhalb von 10 µM auf. Da wir überdies i.p. und nicht i.v. injizierten, ist davon auszugehen, dass systemisch nie eine derartige Konzentration erreicht wurde.

Die Ergebnisse, die der ROS-Release bietet, nähren jedoch Zweifel an der Wirksamkeit der verwendeten Pharmaka. In diesen Experimenten wurde versucht, anhand der verwendeten C5a- und Inhibitorkonzentrationen die Verhältnisse im Serum der Versuchstiere möglichst exakt nachzustellen. Bei Gesunden C57Bl/6-Mäusen liegt die Serum-C5a-Konzentration bei ca. 10 ng/ml (Leinhase et al., 2006), es muss davon ausgegangen werden, dass diese im Krankheitsfall deutlich ansteigt. Daher wurden Konzentrationen bis 100 ng/ml getestet. Die Inhibitorkonzentrationen richten sich ebenfalls nach der Menge der im Tierversuch eingesetzten Dosis.

Bei W-54011 sind keine Effekte feststellbar, die den C5a-vermittelten ROS-Release abschwächen, bei A8^{Δ71-73} ist erst in hohen Konzentrationen ein signifikanter Effekt erkennbar. Überzeugende Ergebnisse sind dies nicht. Im Falle von W-54011 schienen Waters et al. (2005) richtig angenommen zu haben, dass der Antagonist keine nachweisbare Wirkung am murinen C5a-Rezeptor entfaltet. Es darf angezweifelt werden, dass überhaupt eine Interaktion stattgefunden hat. Auf A8^{Δ71-73} trifft dies nicht zu – hier sind Effekte erkennbar, die aber auch nicht in der erhofften Deutlichkeit aufgetreten sind.

4.2.2 Frühere Versuchsergebnisse – Artefakte eines fehlerhaften Mausmodells?

Die Ergebnisse der Visualisierungsversuche aus dieser Arbeit deuten darauf hin, dass C5aR-vermittelte Signale insbesondere zu Beginn der dermalen Entzündungsreaktion eine Rolle spielen. Wichtig ist nun die Feststellung, dass mit dem verwendeten Mausmodell nur die Effektorphase der

EBA dargestellt werden kann. Das Injizieren von Antikörpern in vorher gesunde Tiere simuliert lediglich, was geschieht, wenn sich diese Antikörper bereits gebildet haben und frei im Blut vorhanden sind. Sämtliche Pathogeneseschritte, die vor Erreichen dieses Status durchlaufen werden (Toleranzverlust gegen Kollagen Typ VII, Einleitung einer Immunantwort, Bildung von Autoantikörpern) können in diesem Modell nicht simuliert werden. Theoretisch ist es also denkbar, dass C5a eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der EBA in solchen frühen Krankheitsstadien wahrnimmt, in der Effektorphase selbst dann aber nur noch von untergeordneter Bedeutung ist. Über den Einfluss von C5aR-vermittelten Signalen in den Pathogeneseschritten, die vor der Antikörperbildung stattfinden, kann mithilfe des verwendeten Modells keine Aussage getroffen werden. Hier ist weitere Forschung nötig, die sich des aktiven EBA-Modells bedienen müsste. Zwei Argumente sprechen jedoch dafür, dass C5a zumindest auch in der Effektorphase der Krankheit von Relevanz ist: Erstens lassen die Visualisierungsversuche dieser Arbeit einen Effekt auf die Neutrophilenzahl in der Dermis kurz nach Krankheitsinduktion erkennen, der durch andere Mechanismen als die C5aR-Blockade nicht erklärbar ist. Und zweitens sind, bei Verwendung des Antikörpertransfer-Modells, sowohl C5aR- als auch C5-Knockout-Mäuse nahezu komplett vor der Krankheitsausprägung geschützt sind (Sitaru et al., 2005; Karsten et al., 2012).

Es lohnt jedoch ein genauerer Blick in die Veröffentlichungen, in denen die letztgenannten Erkenntnisse publiziert worden sind. Sowohl Sitaru et. al. (2005) als auch Karsten et. al. (2012) verwendeten für ihre Versuche ein Protokoll, bei dem der durch Immunisierung von Kaninchen gewonnene Antikörper vor Injektion in die Versuchsmäuse nicht affinitätsspezifisch aufgereinigt wurde. Den Mäusen wurden also neben dem pathogenen Antikörper, der sich gegen mCol7c richtet, zusätzlich sämtliche zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Kaninchenserum vorliegende IgG injiziert. Im von uns durchgeführten Aufreinigungsprozess hat sich herausgestellt, dass sich von der Gesamtmasse der IgG im Kaninchenserum nur ca. 0,5 bis 2% spezifisch gegen mCol7c richten. Von diesem spezifischen Antikörper reichte eine zweimalige Injektion von 250 µg aus, um bei Mäusen das klinische Bild der EBA auszulösen. Um auch durch Injektion unspezifischer IgG eine ausreichende Konzentration der pathogenen Antikörper in den Versuchstieren zu erreichen, injizierten Sitaru et al. (2005) 15 mg dieser Lösung alle 2 Tage. Dies führte ebenfalls zum erfolgreichen Auslösen des Krankheitsbildes, allerdings wurden mit jeder Injektion vermutlich mindestens 14,7 mg unspezifischer, für die Mäuse artfremder IgG koinjiziert. Darüber hinaus wird die Masse der injizierten pathogenen Antikörper stark geschwankt haben, da deren Anteil an der Gesamtmasse, wie in unserem Aufreinigungsverfahren deutlich wurde, zwischen 0,5 und 2% schwankte.

Es ist durchaus denkbar, dass es durch die Masse artfremder IgG, die den Mäusen injiziert wurde, zu Interaktionen kam, die den Verlauf der Krankheit beeinflussten und das Modell somit verfälschten. Insbesondere besteht die Möglichkeit, dass diese Antikörperinjektion zu einer Komplementaktivierung bei den Tieren führte. Sämtliche injizierten Antikörper gehörten der IgG-Klasse an. Im Gegensatz zu Mäusen und Menschen liegen im Kaninchen keine verschiedenen IgG-Subklassen vor, alle IgG sind in der Lage, C1q zu binden und somit das Komplementsystem zu aktivieren (Rayner et al., 2013). Dies bestärkt den Verdacht, dass die massive Injektion dieser Antikörper zu einer Komplementaktivierung geführt haben kann. Führt man diesen Gedanken weiter, liegt die Vermutung nahe, dass eine Anti-Komplement-Therapie nach Injektion großer Mengen eines unspezifischen IgG-Cocktails einen größeren Effekt hat, als wenn, wie in diesen Studien, der pathogene Antikörper allein injiziert wird. Es ist daher zu empfehlen, Studien an diesem Modell nur noch mit spezifisch aufgereinigten IgG durchzuführen, um das Risiko von Interaktionen und Verfälschungen zu verringern.

4.2.3 Differenzen in den verwendeten Mausstämmen

Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt in den verwendeten Mausstämmen. In der Modellbeschreibung des aktiven EBA-Modells, bei dem durch Immunisierung mit Peptidfragmenten die komplette Autoimmunreaktion in den Mäusen modelliert werden kann, zeigte sich, dass verschiedene Mausstämme sehr unterschiedlich stark ausgeprägte Krankheitsbilder entwickeln (Sitaru et al., 2006). Beobachtungen verschiedener Versuche am Institut legen nahe, dass auch im passiven Modell Unterschiede in der Krankheitsausprägung in Abhängigkeit vom Mausstamm bestehen. Dies ist aber nie systematisch evaluiert worden. Dieser Fragestellung soll in einem Folgeversuch nachgegangen werden. Einen interessanten, direkten Nachweis darüber, dass die Relevanz des Komplementsystems bei der gleichen Krankheit von Mausstamm zu Mausstamm variieren kann, zeigte ein Versuch an einem Mausmodell der Immunkomplex-vermittelten Peritonitis. Bei BALB/c und C57BL/6-Mäusen wurde das komplette Komplementsystem mittels Kobragift degradiert, danach erfolgte das Auslösen der Entzündungsreaktion im Peritoneum der Versuchstiere (Arthus-Reaktion). Nach Tötung der Tiere wurde die Zahl der Neutrophilen, die in die Bauchhöhle rekrutiert worden waren, gezählt. Interessanterweise war die Komplementdepletion bei BALB/c-Mäusen in der Lage, die Zahl der eingewanderten Neutrophilen drastisch zu reduzieren, während sich bei C57BL/6-Mäusen kaum Änderungen zeigten (Heller et al., 1999b). Die in meiner Arbeit verwendeten Mäuse hatten alle einen C57BL/6-Hintergrund, schlicht aufgrund der Tatsache, dass die zur Visualisierung benötigten LysM-eGFP-Mäuse ebenfalls diesen genetischen Hintergrund haben.

Oben genannte Fehlerquellen „struktureller“ Natur lassen sich nie gänzlich ausschließen. Meiner Ansicht nach sollte insbesondere der Einfluss der unspezifischen IgG auf den Krankheitsverlauf genauer untersucht werden. Eventuelle Zusammenhänge zwischen der Injektion dieser und einer Aktivierung des Komplementsystems müssen aufgedeckt werden. Auch der Einfluss des Mausstammes auf den Krankheitsverlauf bedarf dringend genauerer Untersuchungen.

4.3 Limitationen

Neben den zuvor genannten potentiellen Fehlerquellen ist diese Arbeit auch durch weitere Gegebenheiten limitiert, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

So ist das Mitführen einer Negativkontrolle, in der eine durch C5a induzierte Zunahme der Neutrophilenextravasation beobachtet werden könnte, praktisch nicht umsetzbar. Dies ist einerseits durch die extrem kurze Plasmahalbwertszeit von C5a von weniger als fünf Minuten bedingt (Webster et.al., 1982). Ein Aufrechterhalten von relevanten Wirkspiegeln über einen Versuchszeitraum von mehreren Tagen könnte so nicht sichergestellt werden. Darüber hinaus nimmt eine externe C5a-Applikation selbst Einfluss auf die Zahl der im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten. Da diese Zellen für die Pathogenese der EBA relevant sind, muss befürchtet werden, dass das Krankheitsmodell, welches es zu erforschen gilt, hierdurch verfälscht werden würde. Außerdem ist es technisch nicht möglich, das C5a unmittelbar an der DEJ zu applizieren – dies wäre jedoch nötig, um die C5a-Effekte in der Pathogenese der EBA zu simulieren. Eine systemische Applikation brächte, aufgrund der auf Chemotaxis basierenden Effekte des Moleküls, keine neuen Erkenntnisse, sondern würde das Krankheitsmodell grundlegend verfälschen.

Auch das Mitführen einer Positivkontrolle mit funktionierender C5aR-Blockade ist bisher nicht möglich, schlicht deshalb, da die zur Verfügung stehenden Pharmaka in ihrer Wirkung begrenzt sind. Ein Rückschritt auf die genetische Ebene wäre denkbar, die Visualisierungsversuche könnten auch mit C5aR-Knockout-Mäusen durchgeführt werden. Dies ist jedoch heute noch nicht umsetzbar, da hierfür ein kombinierter LysM-eGFP/C5aR-Knockout-Mausstamm benötigt werden würde.

Das Durchführen von Visualisierungsversuchen verbraucht zeitlich und materiell eine Menge Ressourcen. Insbesondere durch die Tatsache, dass am Standort Lübeck nur ein für die Visualisierungsversuche geeignetes 2-Photonen-Mikroskop zur Verfügung steht, welches von zahlreichen Arbeitsgruppen verwendet wird, war es nötig, diesbezüglich zu priorisieren. Bei fehlender klinischer Wirksamkeit und der Tatsache, dass zuvor noch keine in-vivo-Effekte auf die Migration neutrophiler Granulozyten beschrieben wurden, wurde daher auf die Durchführung von

Visualisierungsversuchen unter C5aR-Blockade mit W-54011 verzichtet. Auch die Gruppengröße der Visualisierungsversuche, ist, bedingt durch die begrenzten Kapazitäten, mit n=3 recht klein. Dieser Einschränkung wurde auch dadurch begegnet, dass bei jedem Versuchstier in Rahmen jeder Visualisierung Aufnahmen von 7 verschiedenen Hautabschnitten angefertigt wurden.

4.4 Pathogenesemodell unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die zeitliche Wirkung von C5aR-vermittelten Signalen auf die Neutrophilenextravasation auf einen engen Zeitraum von 1-2 Tagen nach Induktion der Krankheit beschränkt ist. Interessant hieran ist nun nicht nur, dass die Blockade des C5a-Rezeptors also für die chronischen Verlaufsformen keinen geeigneten Therapieansatz darstellt (was ja auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte). Vielmehr müssen andere, vom Komplementsystem unabhängige Mechanismen dafür sorgen, dass die dermale Entzündungsreaktion aufrechterhalten wird. Bringt man nun eine Reihe von wissenschaftlichen Versuchsergebnissen der letzten Jahre mit den hier vorliegenden Resultaten zusammen, entsteht ein Modell der Pathogenese, indem die Rolle von C5a sehr viel kleiner ist als bisher angenommen. Stattdessen muss die Rolle der neutrophilen Granulozyten selbst, die bisher meist lediglich als letztes Glied in der Kette wahrgenommen wurden, stärkere Beachtung finden. Hieraus lassen sich auch Hinweise ableiten, welche Zielmoleküle in Zukunft stärker in den Fokus der Forschung rücken sollten. Auf den folgenden Seiten wird dieses überarbeitete Pathogenesemodell schrittweise hergeleitet.

4.4.1 Die Expression von Fcγ-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten ist notwendig, um das Krankheitsbild der Epidermolysis bullosa acquisita auszulösen

Bereits vor einigen Jahren wurden Nachweise erbracht, dass neutrophile Granulozyten die mit Abstand wichtigsten Effektorzellen im EBA-Mausmodell sind. Jüngere Forschungsarbeiten konnten dies immer wieder bestätigen. Über die Mechanismen der Rekrutierung jener Zellen zum Ort des Geschehens und deren Aktivierung am Zielort herrscht jedoch weit weniger Einigkeit.

Als zentrale Mediatoren dieser Vorgänge werden neben dem Komplementsystem vor allem Fcγ-Rezeptoren, die von den neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, diskutiert (Mihai und Nimmerjahn, 2013). Diese Rezeptoren binden den Fc-Teil muriner IgG und vermitteln bei Bindung durch einen Antikörper je nach Art des Rezeptors unterschiedliche Signale an die Zelle. Es ist somit leicht nachvollziehbar, dass diese Rezeptoren auch bei der experimentellen EBA eine entscheidende Rolle spielen, liegen hier doch zahlreiche Immunkomplexe an der DEJ vor. Neutrophile Granulozyten, die diese Rezeptoren exprimieren, werden, vermittelt durch lokale Komplementaktivierung, an die DEJ rekrutiert. Eine Interaktion zwischen dem Fc-Teil der injizierten

IgG und den von neutrophilen Granulozyten exprimierten Fc γ -Rezeptoren erscheint also sehr wahrscheinlich.

Mäuse exprimieren 5 verschiedene Klassen von Fc γ -Rezeptoren (Bruhns, 2012), die mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen IgG-Subklassen binden. Von diesen 5 Rezeptortypen vermittelt nur einer inhibitorische Effekte (Fc γ R-IIB), drei andere vermitteln aktivierende Signale (Fc γ R-I, Fc γ R-III, Fc γ R-IV). Ein weiterer, Fc γ R-n, wird hauptsächlich im Zusammenhang der Degradierung von Immunkomplexen gesehen. Injiziert man Mäusen Antikörper, die sich spezifisch gegen mCol7c richten, deren Fc-Fragment aber artfremd ist und deshalb nicht an murine Fc γ -Rezeptoren binden kann, entwickeln diese Mäuse keine Krankheit (Sesarman et al., 2008). In weitergehenden Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die pharmakologische Blockade des aktivierenden Fc γ -Rezeptors IV ausreicht, um Mäuse komplett vor dem Krankheitsbefall zu schützen (Kasperkiewicz et al., 2012).

4.4.2 Es bestehen Interaktionen zwischen Komplementsystem und Fc γ -Rezeptor vermittelten Signalen

Lange Zeit wurden Komplementsystem und die über Fc γ -Rezeptoren vermittelten Signale isoliert voneinander betrachtet. Im Jahre 2002 gelang dann der Nachweis, dass C5a über Bindung an seinen Rezeptor maßgeblich an der Regulation der Expression dieser Rezeptoren beteiligt ist. Für die Versuche wurde ein murines Modell der Immunkomplex-vermittelten Lungenentzündung verwendet. Man fand heraus, dass, in Anwesenheit von C5a, alveolare Makrophagen die Expression des inhibitorischen Fc γ R-IIB herunterregulieren, während der aktivierende Fc γ R-III heraufreguliert wird (Shushakova et al., 2002). In einem Modell der Immunkomplex-vermittelten hämolytischen Anämie konnten diese Befunde auch auf Gewebsmakrophagen der Leber übertragen werden (Kumar et al., 2006). Auch wenn in dieser Studie keine Aussage über den Fc γ R-IV getroffen wurde (er war zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert) und man die Erkenntnisse nicht einfach auf neutrophile Granulozyten übertragen kann, bieten sie doch einen guten Ansatzpunkt. Die Autoren der erstgenannten Publikation äußerten die Vermutung, dass C5a dazu diene, die Erregungsschwelle der Zellen herabzusetzen – und zwar vermittelt über die Expressionsprofile der Fc γ -Rezeptoren. C5a würde die Zellen quasi auf die bald durch den Fc-Teil von Immunkomplexen eintretende Stimulation vorbereiten – oder – anders ausgedrückt: Immer da, wo parallel C5a und Immunkomplexe vorliegen, sollen die Zellen durch diese auch aktiviert werden. Der Nachweis wurde jeweils nur für gewebständige Makrophagen in den jeweiligen Modellen erbracht. Man geht davon aus, dass diese dann durch ihre verstärkte Aktivität die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen vorantreiben.

Gleichzeitig grenzen Shushakova et al. (2002) den Zeitpunkt der Hauptwirkung des Anaphylatoxins C5a ein: Als chemotaktischer Signalgeber und Modulator von myeloiden Zellen läge diese klar auf dem Beginn der Immunkomplex-vermittelten Entzündungsreaktion. Passend zu diesen Erkenntnissen fand die Arbeitsgruppe an genetisch veränderten Mäusen heraus, dass nur das Fehlen des FcγR-III, nicht aber des C5a-Rezeptors zu einer Verminderung der späten neutrophilen Infiltration nach Auslösung der Entzündungsreaktion führte.

4.4.3 Komplement-5a-Wirkungen sind nur in der Frühphase Immunkomplex-vermittelter Entzündungsreaktionen relevant

Ein weitere, hochinteressante Publikation, die sich direkt mit dem Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten nach Induktion einer Immunkomplex-vermittelten Entzündung beschäftigt, kommt zu einer ähnlichen zeitlichen Einordnung der C5a-Effekte (Sadik et al., 2012). Mittels eines Modells der Immunkomplex-vermittelten Arthritis an Mäusen gelang es, die Rolle von C5a bei der Rekrutierung von Neutrophilen noch genauer einzugrenzen. Ausgangspunkt für diese Studie war der Befund, dass in diesem Modell sowohl C5aR als auch Fcγ-Rezeptoren zur Krankheitsauslösung nötig waren. Weiterhin waren genetisch veränderte Mäuse, die Leukotrien B4 (LTB4) und Interleukin-1β (IL-1β) nicht exprimierten, vor der Krankheitsausprägung geschützt. Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurde experimentell nachgewiesen, dass Neutrophile nach Stimulation mit C5a oder Immunkomplexen LTB4 freisetzen – dieser Lipidmediator fungiert selber als chemotaktischer Signalgeber und sorgt dafür, dass weitere Neutrophile rekrutiert werden. Schon bei einer Konzentration von nur 10 ng/ml C5a wurde merklich LTB4 freigesetzt. Stimulierte man die Zellen mit Immunkomplexen und C5a parallel, erhöhte dies die LTB4-Freisetzung. In Bezug auf IL-1β fand man heraus, dass Immunkomplexe alleine in der Lage waren, die Freisetzung dieses Chemokins zu verursachen. C5a hat auf die Freisetzung jedoch keinen Einfluss.

Weitergehend wurde nachgewiesen, dass die Koexpression von C5aR und 5-Lipoxygenase (einem Enzym, was für die Bildung von LTB4 nötig ist) in Neutrophilen gegeben sein muss, um das Krankheitsbild auszulösen. Auch Fcγ-Rezeptoren und IL-1β müssen in denselben Zellen exprimiert werden, damit es zur Krankheit kommt. Die Koexpression von C5aR und IL-1β ist hingegen nicht notwendig, um das Krankheitsbild auszulösen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass wirklich die beiden oben beschriebenen Signalwege (C5aR → LTB4; FcγR → IL-1β) und nicht nur die einzelnen beschriebenen Mediatoren und Rezeptoren von essentieller Bedeutung für die Pathogenese der Immunkomplex-vermittelten Arthritis sind.

Die Autoren leiten aus diesen Ergebnissen eine sequentielle Kaskade der Entzündungsmediatoren ab, die durchlaufen werden muss, damit es zu einer Immunkomplex-vermittelten

Entzündungsreaktion kommen kann. C5a habe seine Hauptfunktionen hierbei in der frühen Phase der Entzündungsreaktion.

4.4.4 Hypothetischer Ablauf der dermalen Entzündungsreaktion bei experimenteller Epidermolysis bullosa acquisita

Es ist durchaus möglich, dieses Bild noch ein wenig konkreter zu zeichnen – und es ist auch durchaus möglich, die Erkenntnisse auf die Vorgänge bei experimenteller EBA zu übertragen. C5a ist ein sogenanntes *end-target-chemoattractant*, es besitzt eine höhere Potenz, Neutrophile anzulocken als zum Beispiel LTB₄, welches in die Kategorie der intermediären *Chemoattractants* fällt (Heit, 2005). Wird irgendwo im Gewebe das Komplementsystem aktiviert (wie es bei der experimentellen EBA durch die Bindung von IgG an die DEJ geschieht), wird C5a freigesetzt. Für neutrophile Granulozyten entsteht so ein starkes Signal, zu diesen Stellen zu wandern, welches gegebenenfalls andere Signale überlagert. Am Ort des Geschehens treffen die neutrophilen Granulozyten auf die gebundenen Immunkomplexe, die mit ihrem Fc-Teil an die Fc γ -Rezeptoren der Neutrophilen binden. Bei experimenteller EBA scheint hier insbesondere Fc γ R-IV relevant zu sein. Sowohl durch die Stimulation von C5a über C5aR als auch durch die Stimulation von Immunkomplexen über Fc γ -Rezeptoren setzen die Zellen daraufhin LTB₄ frei. Es bleibt festzuhalten, dass bereits an dieser Stelle C5a nicht mehr zwingend erforderlich ist, wenngleich auch die höchste Freisetzung von LTB₄ durch Kostimulation mit beiden Signalgebern erreicht wird (Sadik et al., 2012). LTB₄ sorgt nun als *Chemoattractant* dafür, dass weitere Neutrophile zum Ort der Entzündung rekrutiert werden. Diese werden wieder durch Immunkomplexe stimuliert, wodurch es erneut zur Freisetzung von LTB₄ kommt. Wichtiger ist aber, dass durch die Stimulation der Fc γ -Rezeptoren auch IL-1 β freigesetzt wird. Die Freisetzung dieses Zytokins induziert dann erst die eigentliche Effektorphase der Krankheit, welche durch die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und folgender Freisetzung von ROS und anderen gewebsschädigenden Mediatoren gekennzeichnet ist. Auch die Regulierung der Entzündungsreaktion und eventuelles Abklingen wird über IL-1 β -Signale vermittelt.

Der oben genannte Ablauf der EBA-Pathogenese ist Spekulation. Die Spekulation ist allerdings sehr gut begründbar. Sowohl Shushakova et al. (2002) als auch Sadik et al. (2012) ordnen die C5a-Effekte bei Immunkomplex-vermittelten Entzündungsreaktionen sehr früh ein. Sadik et al. (2012) weisen darüber hinaus zwei Signalwege nach, die notwendig sind, damit in einem anderen Modell eine Immunkomplex-vermittelte Entzündungsreaktion entstehen kann (C5aR \rightarrow LTB₄ und Fc γ R \rightarrow IL-1 β). Weiterhin schlagen sie eine zeitliche Abfolge des Durchlaufens eben dieser Kaskade vor, die C5a ganz an den Anfang stellt. Wichtig ist hierbei, dass auch Stimulation mit Immunkomplexen allein zur LTB₄-Freisetzung führen kann, die zwingend notwendige Rolle von C5aR-vermittelten Signalen zum Auslösen des Signalweges wird somit in Frage gestellt.

4.4.5 Interleukin-1 β ist für die Aufrechterhaltung der dermalen Entzündungsreaktion verantwortlich

In den letzten Jahren wurde vermehrt versucht, bullöse Autoimmundermatosen durch Eingriffe in das endogene Mediatorensystem zu behandeln. 2013 wurde am experimentellen EBA-Mausmodell nachgewiesen, dass die Behandlung mit rekombinanten Interleukin-6 (IL-6) zur Besserung des Krankheitsbildes führt (Samavedam et al., 2013). Hochinteressant ist nun, dass diese Effekte hauptsächlich durch eine Verstärkung der Expression des endogenen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) vermittelt wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass über diesen Rezeptor Signale vermittelt werden, die für die Ausprägung der EBA relevant sind. In einem Folgeversuch konnte nachgewiesen werden, dass auch die direkte Behandlung mit dem synthetischen IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra in der Lage war, das Krankheitsbild zu verbessern (Samavedam et al., 2013).

Zwei Jahre später gelang dann der Nachweis, dass es das Spaltprodukt IL-1 β ist, welches eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der EBA einnimmt (Sadeghi et al., 2015). Im Serum erkrankter Tiere liegt IL-1 β , nicht aber IL-1 α in 4-6mal höherer Konzentration vor als in gesunden Kontrollmäusen. Die Höhe der gemessenen IL-1 β -Spiegel korreliert mit der Ausprägung der Krankheit. Die selektive Inhibition von IL-1 β mittels eines Antikörpers vermittelt sogar eine stärkere Verbesserung des Krankheitsbildes, als es die unspezifische Inhibition von IL-1 tut. Auch wenn bei Mäusen schon Krankheitszeichen vorlagen, konnte durch Behandlung mit Anakinra das weitere Fortschreiten eingedämmt werden. Der Ansatz der IL-1-Inhibition scheint also auch therapeutisches Potential zu haben. Die Wirkung der IL-1-Inhibition konnte mit geringerer Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin) im Bereich der Dermis erklärt werden (Sadeghi et al., 2015). Die Autoren dieser Studie testeten darüber hinaus an genetisch veränderten Mäusen, ob die Freisetzung von IL-1 β durch Caspase-1 moduliert wird. Dieses Enzym ist als wichtiger Regulator der IL-1 β -Freisetzung bekannt (Dinarello, 2011). Da dies nicht der Fall war, spekulierten sie, dass andere, vermutlich von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Proteinase für die Spaltung des IL-1 β -Precursors verantwortlich waren.

Schon vor über zwanzig Jahren wurden in der Blasenflüssigkeit von Patienten, die am bullösen Pemphigoid erkrankt waren, erhöhte IL-1 β -Spiegel gemessen (Schmidt et al., 1996). Das bullöse Pemphigoid ist wie die EBA eine Pemphigoid-Erkrankung und eng mit dieser verwandt. Interessanterweise war in der Blasenflüssigkeit IL-1 α nicht erhöht, sondern im Gegenteil sogar erniedrigt. Dies lässt vermuten, dass IL-1 β nicht nur in murinen Modellen von Pemphigoid-Erkrankungen von zentraler Bedeutung ist, sondern auch in der Pathogenese und Aufrechterhaltung der Erkrankung beim Menschen eine wichtige Rolle spielt.

4.4.6 Das Anaphylatoxin C5a als Kickoff-Molekül für einen chronisch-inflammatorischen Teufelskreis

Ergänzt man den oben aufgestellten, hypothetischen Ablauf der dermalen Entzündungsreaktion bei experimenteller EBA mit diesen Erkenntnissen über die Wirkungen von IL-1 β , entsteht ein vollständiges, in sich schlüssiges Modell, welches C5a eine Rolle ganz zu Beginn dieser Entzündungsreaktion zuweist und IL-1 β als zentralen Mediator bei der Aufrechterhaltung der Entzündung sieht. In allen Schritten nach der Rekrutierung der ersten neutrophilen Granulozyten - von der Freisetzung von LTB₄ über die Rekrutierung weiterer Neutrophiler, die Fc γ R-IV-Stimulation und die Freisetzung von IL-1 β - ist C5a nicht mehr relevant. Rekrutierte Neutrophile setzen LTB₄ frei. Dies geschieht aber auch auf Stimulus von Immunkomplexen über Fc γ -Rezeptoren. Über Fc γ -Rezeptoren vermittelte Signale sind es auch, die zur Freisetzung von IL-1 β führen. IL-1 β seinerseits erhöht dann wieder die Expressionsrate von endothelialen Adhäsionsmolekülen und begünstigt dadurch die Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten (Abbildung 24).

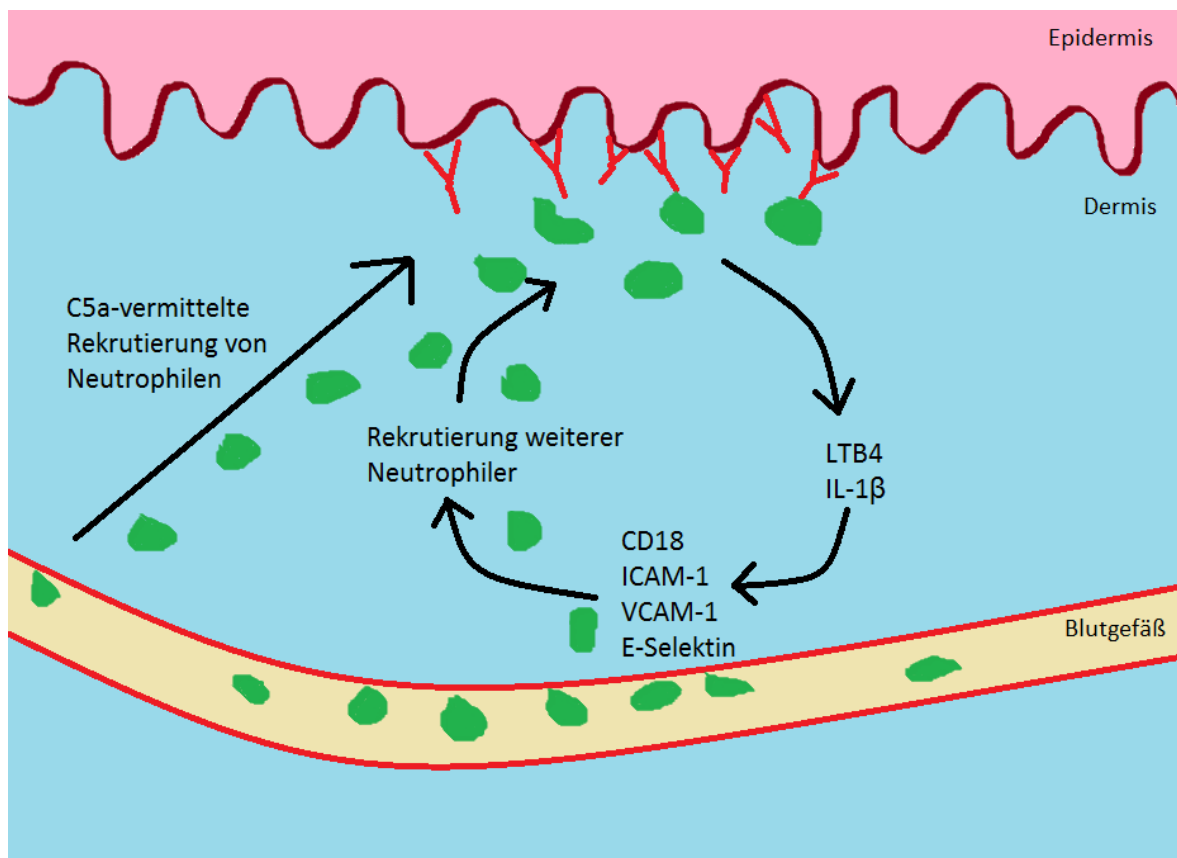


Abbildung 25: Mechanismen der Neutrophilen-Rekrutierung bei experimenteller Epidermolysis bullosa acquisita. Initial stellt das durch Komplementaktivierung freigesetzte Anaphylatoxin C5a den wichtigsten Signalgeber für neutrophile Granulozyten dar, aus den Blutgefäßen in das Gewebe der Dermis auszuwandern. Befinden sich jedoch bereits Neutrophile an der dermo-epidermalen Junctionszone, sind diese selber in der Lage, durch Freisetzung von LTB₄ und IL-1 β weitere Zellen ins Gewebe zu rekrutieren. C5a ist zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion nicht mehr nötig. CD18: Cluster of differentiation 18; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1, IL-1 β : Interleukin-1 β , LTB₄: Leukotrien B₄, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1.

Es bleibt nun die Frage, warum sowohl C5- als auch C5aR-Knockout-Mäuse fast vollständig vor der Krankheitsausprägung geschützt sind. Ich vermute, dass diese Moleküle durchaus wichtig sind – und zwar in dem Sinne, dass es ohne den ersten Impuls für Neutrophile, an die Stellen zu migrieren, an denen Immunkomplexe vorliegen, nicht funktioniert. Als sehr starkes *end-target-chemoattractant* kann C5a Signale von anderen endogenen Mediatoren überlagern und die Zellen gezielt an den Ort des Geschehens lotsen. Damit ist seine Funktion aber bereits erfüllt. C5a stellt ein Kickstart-Molekül dar, was im weiteren Verlauf der Erkrankung keine besondere Relevanz mehr hat.

Genetisch veränderten Mäusen fehlt dieser Induktor der Entzündungsreaktion. Zwar binden auch in diesen Tieren pathogene IgG an die DEJ, und auch in solchen Mäusen kommen vereinzelt Neutrophile in der Dermis vor. Doch selbst wenn ein solcher Neutrophiler zufällig mit einem Immunkomplex interagiert, wäre das Resultat lediglich die Freisetzung von sehr geringen Mengen LTB₄ und IL-1 β . Es ist jedoch trotz allem denkbar, dass eine Krankheitsinduktion auch komplett ohne C5a-vermittelte Signale möglich ist. Diese bräuchte, ohne den initialen Anschlag durch das Anaphylatoxin, jedoch sehr viel länger. In den Studien von Sitaru et al. (2005) und Karsten et al. (2012), in denen eine Resistenz von C5- bzw. C5aR-defizienten Mäusen nachgewiesen wurde, wurden die Tiere 12 Tage beobachtet. Da es bis zur Ausbildung erster Hautläsionen selbst mit C5a als Signalgeber mehrere Tage braucht, mag diese Periode zu kurz gewesen sein.

Blockiert man C5a pharmakologisch, wird man nie einen Status erreichen, der dem in genetisch veränderten Mäusen ähnlich ist. Die C5aR-Antagonisten, die zur Verfügung stehen, sind noch nicht ausgereift. Weiterhin werden in den Versuchstieren starke Schwankungen in den Serumspiegeln vorliegen, da die Medikamente nicht kontinuierlich, sondern alle paar Stunden oder sogar Tage injiziert werden, und teils sehr kurze Halbwertszeiten haben. Es ist davon auszugehen, dass mit der zurzeit vorhandenen pharmakologischen Therapie keine zeitlich kontinuierliche, vollständige Blockade des C5aR erreicht werden kann. Eine solche Blockade wäre aber nötig, um das C5a-vermittelte Startsignal für die Entzündungsreaktion wirksam auszuschalten.

In meinen Versuchen waren diese Effekte sehr gut zu beobachten. An Tag 1 nach Antikörperinjektion vermochte die Blockade von C5aR zwar, die Zahl der Neutrophilen in der Dermis im Vergleich zu Kontrolltieren zu senken. Bei den Kontrolltieren waren, vermutlich C5a-vermittelt, massiv Neutrophile in die Dermis emigriert. Die Blockade reichte aber nicht aus. Schon an Tag 3 waren in der Neutrophilenzahl keine Unterschiede mehr zu erkennen. Sowohl bei behandelten als auch bei unbehandelten Tieren lagen in der Dermis circa doppelt so viele

Neutrophile vor wie vor der Antikörperinjektion. Die Entzündungsreaktion hatte, trotz pharmakologischer Blockade des C5a-Rezeptors, Fahrt aufgenommen.

Aufbauend auf die Erkenntnisse, dass pharmakologische Blockade des FcγR-IV Mäuse komplett vor der Krankheitsausprägung schützt (Kasperkiewicz et al., 2012), konnte in unserer Gruppe der überraschende Nachweis erbracht werden, dass bei so behandelten Mäusen nicht weniger, sondern mehr Neutrophile in der Dermis zu finden sind. Sadik et al. (2012) bezogen sich in ihren Studien vorwiegend auf den FcγR-III. Es lässt sich mutmaßen, dass die Rekrutierung vorwiegend durch letztgenannten Rezeptor mediiert wird, die anschließende Aktivierung der Neutrophilen, die schließlich zur Freisetzung von gewebsschädigenden Verbindungen und Enzymen führt, aber über den FcγR-IV vermittelt wird. Können diese Signale nicht weitergeleitet werden, werden immer mehr Neutrophile in die Dermis rekrutiert, die dort aber ihre Funktion nicht erfüllen können. Unterbleibt die Aktivierung und der finale Zerfall der Neutrophilen, werden diese auch nicht von Makrophagen phagozytiert. Es kommt zu einem Anstau der Zellen im Gewebe der Dermis.

Obwohl in dieser Arbeit bestätigt wurde, dass C5a *in vitro* bei Neutrophilen die ROS-Freisetzung erhöhen kann, scheint dies nicht der Aktivierungsmechanismus zu sein, welcher *in vivo* relevant ist. Diese Effekte scheinen über den FcγR-IV vermittelt zu werden. Anders ist nicht zu erklären, warum C5a-Blockade keinen therapeutischen Nutzen bringt, die Blockade des FcγR-IV jedoch komplett vor Krankheitsausprägung schützt – obwohl sogar mehr Neutrophile in die Dermis rekrutiert werden.

4.4.7 Potentielle Zielmoleküle zur Behandlung der Epidermolysis bullosa acquisita

Ausgehend von diesem Modell ist der Ansatz, die Ausprägung von EBA mittels Komplementblockade verhindern zu wollen, klar der falsche Weg. Am Patienten wird die Krankheit erst über die Symptome diagnostiziert – zu diesem Zeitpunkt hätte C5a seine Funktionen bereits erfüllt. Man muss jedoch berücksichtigen, dass die reale EBA, anders als im Antikörpertransfer-induziertem Mausmodell, eine chronische Erkrankung ist. Laufend werden neue Antikörper gebildet, laufend werden diese Antikörper an Kollagen Typ VII binden, es wird dementsprechend auch ständig das Komplementsystem aktiviert. Es ist denkbar, dass C5a also unter chronischen Bedingungen eine Rolle spielt und pharmakologische Blockade hier einen Nutzen haben könnte. Die Struktur der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimente lässt hierüber keine Aussage zu.

Vielversprechender ist es, in zukünftigen Studien solche Moleküle als Ziele zu wählen, welche nach oben aufgestellter Hypothese auch nach Induktion der Entzündungsreaktion dazu beitragen, diese weiter zu unterhalten. Da die Behandlung von Patienten so gut wie immer erst dann beginnt, wenn die Symptome den Patienten stören und er deshalb einen Arzt aufsucht, sind vorwiegend solche

Therapien sinnvoll, die neben einem prophylaktischen auch einen therapeutischen Nutzen haben. Die Inhibition von IL-1 hat diesen im Tiermodell bereits unter Beweis gestellt. Auch für LTB₄ hat es bereits vielversprechende erste Studien gegeben, die kombinierte Blockade von C5a und LTB₄ wird in einem Review als potentiell effektive Therapie für IgG-vermittelte Autoimmunkrankheiten gehandelt (Sadik et al., 2018). Einen weiteren möglichen Ansatzpunkt würde die Blockade von FcγR-IV darstellen, auch hier lohnt sich weitere Forschung. Der Einsatz von C5aR-Blockern wäre hingegen nur als Rezidivprophylaxe bei solchen Patienten denkbar, bei denen mit konventioneller pharmakologischer Therapie eine vollständige Beschwerdefreiheit erreicht werden konnte.

4.5 Ausblick

In den nächsten Jahren werden in unserer Arbeitsgruppe die Pathomechanismen der EBA weiter erforscht werden, auch die Rolle des Komplementsystems soll weiter studiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben hier eine Reihe von Fragen aufgeworfen, die es zu beantworten gilt. So soll zum Beispiel in einer Vergleichsstudie getestet werden, ob die über die Jahre anhand von verschiedenen Mausstämmen und mittels verschiedener Modelle gewonnenen Erkenntnisse überhaupt als allgemeingültig betrachtet werden können, oder nur durch den Mausstamm oder das Mausmodell bedingte Effekte sind. Die Extravasation neutrophiler Granulozyten soll auch unter dem Einfluss anderer Therapieansätze beobachtet werden. Des Weiteren wird an der Entwicklung einer Software gearbeitet, die es ermöglichen soll, automatisiert zwischen Neutrophilen und Makrophagen in den erhaltenen Bildern zu unterscheiden – dies würde die Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten erhöhen, insbesondere, wenn diese von verschiedenen Untersuchern erhoben worden sind.

Generell ist damit zu rechnen, dass die Modulation des Komplementsystems in Zukunft eine Therapieoption für verschiedenste Krankheiten darstellen wird. Mit Eculizumab ist jedoch erst ein Wirkstoff dieser Medikamentenklasse zugelassen. Die Zulassung ist auf zwei seltene Erkrankungen (aHUS und PNH) beschränkt. Zahlreiche Fallberichte, in denen dieser Stoff außerhalb der Zulassung erfolgreich eingesetzt wurde (Johnson und Leca, 2015; Misawa, 2015; Salvadori, 2015), lassen das Potential dieser Wirkstoffklasse jedoch bereits vermuten. Es ist damit zu rechnen, dass in den nächsten Jahren weitere Pharmaka zugelassen werden, auch C5a-Blocker befinden sich bereits in klinischen Studien (Vergunst et al., 2007; Jayne et al., 2014). In Bezug auf eine mögliche Anwendung bei EBA wirft diese Arbeit jedoch Zweifel auf. Die an genetisch veränderten Tieren gemachten Beobachtungen ließen sich durch pharmakologisches Targeting des C5aR nicht reproduzieren. Die Untersuchung des Extravasationsverhaltens neutrophiler Granulozyten legt nahe, dass C5a-vermittelte Effekte wenn überhaupt nur im sehr frühen Stadium der Krankheitsentwicklung eine Rolle spielen. Zum Zeitpunkt, an dem sich erste Symptome zeigen, wäre eine Behandlung mit dieser

Wirkstoffklasse also bereits nicht mehr wirksam. Dies deutet darauf hin, dass trotz der Wichtigkeit von C5a und C5aR in der Pathogenese der EBA die pharmakologische Inhibition dieser Komponenten keine wirksame Therapie darstellen würde.

5 Literaturverzeichnis

Ahmed, A.R. und Gürçan, H.M. (2012). Treatment of epidermolysis bullosa acquisita with intravenous immunoglobulin in patients non-responsive to conventional therapy. Clinical outcome and post-treatment long-term follow-up. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 26, 1074-1083.

Baicán, A., Chiriac, G., Torio-Padron, N. und Sitaru, C. (2013). Childhood epidermolysis bullosa acquisita associated with severe dental alterations. A case presentation. *J Dermatol* 40, 410-411.

Bernard, P., Vaillant, L., Labeille, B., Bedane, C., Arbeille, B., Denoeux, J.P., Lorette, G., Bonnetblanc, J.M. und Prost, C. (1995). Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group. *Archives of dermatology* 131, 48-52.

Bertram, F., Bröcker, E.-B., Zillikens, D. und Schmidt, E. (2009). Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7, 434-439.

Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119, 5640-5649.

Carney, D.F., Haviland, D.L., Noack, D., Wetsel, R.A., Vik, D.P. und Tack, B.F. (1991). Structural aspects of the human C5 gene. Intron/exon organization, 5'-flanking region features, and characterization of two truncated cDNA clones. *The Journal of biological chemistry* 266, 18786-18791.

Chams-Davatchi, C., Valikhani, M., Daneshpazhooh, M., Esmaili, N., Balighi, K., Hallaji, Z., Barzegari, M., Akhiani, M., Ghodsi, Z., Mortazavi, H. und Naraghi, Z. (2005). Pemphigus: analysis of 1209 cases. *International journal of dermatology* 44, 470-476.

Chenoweth, D.E. und Hugli, T.E. (1978). Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 3943-3947.

Chiriac, M.T., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D. und Sitaru, C. (2007). NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *The Journal of pathology* 212, 56-65.

Denk, W., Strickler, J.H. und Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.

Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720-3732.

Elliott, G.T. (1895). Two cases of Epidermolysis bullosa. *Journal of Cutaneous and Genito-Urinary Diseases* 13.

Faust, N., Varas, F., Kelly, L.M., Heck, S. und Graf, T. (2000). Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96, 719-726.

Gammon, W.R., Heise, E.R., Burke, W.A., Fine, J.D., Woodley, D.T. und Briggaman, R.A. (1988). Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita

antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *The Journal of investigative dermatology* *91*, 228-232.

Gerard, N.P. und Gerard, C. (1991). The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* *349*, 614-617.

Gerard, N.P., Hodges, M.K., Drazen, J.M., Weller, P.F. und Gerard, C. (1989). Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *The Journal of biological chemistry* *264*, 1760-1766.

Guo, R.F., Riedemann, N.C., Laudes, I.J., Sarma, V.J., Kunkel, R.G., Dilley, K.A., Paulauskis, J.D. und Ward, P.A. (2002). Altered neutrophil trafficking during sepsis. *Journal of immunology* *169*, 307-314.

Guo, R.F. und Ward, P.A. (2005). Role of C5a in inflammatory responses. *Annual review of immunology* *23*, 821-852.

Haviland, D.L., McCoy, R.L., Whitehead, W.T., Akama, H., Molmenti, E.P., Brown, A., Haviland, J.C., Parks, W.C., Perlmutter, D.H. und Wetsel, R.A. (1995). Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *Journal of immunology* *154*, 1861-1869.

Heit, B. (2005). Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and 4-integrin in neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Science* *118*, 5205-5220.

Heller, T., Hennecke, M., Baumann, U., Gessner, J.E., Vilsendorf, A.M.Z., Baensch, M., Boulay, F., Kola, A., Klos, A., Bautsch, W. und Köhl, J. (1999a). Selection of a C5a Receptor Antagonist from Phage Libraries Attenuating the Inflammatory Response in Immune Complex Disease and Ischemia/Reperfusion Injury. *J Immunol* *163*, 985-994.

Heller, T., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Klos, A., Bautsch, W., und Köhl, J. (1999b). Cutting Edge: Fc Receptor Type I for IgG on Macrophages and Complement Mediate the Inflammatory Response in Immune Complex Peritonitis. *J Immunol* *162*, 5657-5661.

Higginbottom, A., Cain, S.A., Woodruff, T.M., Proctor, L.M., Madala, P.K., Tyndall, J.D., Taylor, S.M., Fairlie, D.P. und Monk, P.N. (2005). Comparative agonist/antagonist responses in mutant human C5a receptors define the ligand binding site. *The Journal of biological chemistry* *280*, 17831-17840.

Hughes, A.P. und Callen, J.P. (2001). Epidermolysis bullosa acquisita responsive to dapsone therapy. *Journal of cutaneous medicine and surgery* *5*, 397-399.

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

Ishii, N., Yoshida, M., Hisamatsu, Y., Ishida-Yamamoto, A., Nakane, H., Iizuka, H., Tanaka, T. und Hashimoto, T. (2004). Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *The British journal of dermatology* *150*, 843-851.

Ishii, N., Yoshida, M., Ishida-Yamamoto, A., Fritsch, A., Elfert, S., Bruckner-Tuderman, L. und Hashimoto, T. (2009). Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy. *British Journal of Dermatology* *160*, 1090-1093.

- Jayne, D.R.**, Bruchfeld, A., Schaier, M., Ciechanowski, K., Harper, L., Jadoul, M., Segelmark, M., Selga, D., Szombati, I., Venning, M., Hugo, C., van Daele, P.L., Viklicky, O., Portaca, A., Schall, P.J. und Bekker, P. (2014). OP0227 Oral C5a Receptor Antagonist CCX168 Phase 2 Clinical TRIAL in Anca-Associated Renal Vasculitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 73, 148.
- Johnson, C.K.** und Leca, N. (2015). Eculizumab use in kidney transplantation. *Current opinion in organ transplantation* 20, 643-651.
- Joly, P.**, Mouquet, H., Roujeau, J.C., D'Incan, M., Gilbert, D., Jacquot, S., Gougeon, M.L., Bedane, C., Muller, R., Dreno, B., Doutre, M.S., Delaporte, E., Pauwels, C., Franck, N., Caux, F., Picard, C., Tancrede-Bohin, E., Bernard, P., Tron, F., Hertl, M. und Musette, P. (2007). A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *The New England journal of medicine* 357, 545-552.
- Kabashima, K.** und Egawa, G. (2014). Intravital Multiphoton Imaging of Cutaneous Immune Responses. *Journal of Investigative Dermatology* 134, 2680-2684.
- Kagawa, T.F.**, O'Connell, M.R., Mouat, P., Paoli, M., O'Toole, P.W. und Cooney, J.C. (2009). Model for Substrate Interactions in C5a Peptidase from *Streptococcus pyogenes*. A 1.9 Å Crystal Structure of the Active Form of ScpA. *Journal of Molecular Biology* 386, 754-772.
- Karp, C.L.**, Grupe, A., Schadt, E., Ewart, S.L., Keane-Moore, M., Cuomo, P.J., Köhl, J., Wahl, L., Kuperman, D., Germer, S., Aud, D., Peltz, G. und Wills-Karp, M. (2000). Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat Immunol* 1, 221-226.
- Karsten, C.M.**, Pandey, M.K., Figge, J., Kilchenstein, R., Taylor, P.R., Rosas, M., McDonald, J.U., Orr, S.J., Berger, M., Petzold, D., Blanchard, V., Winkler, A., Hess, C., Reid, D.M., Majoul, I.V., Strait, R.T., Harris, N.L., Köhl, G., Wex, E., Ludwig, R., Zillikens, D., Nimmerjahn, F., Finkelman, F.D., Brown, G.D., Ehlers, M. und Köhl, J. (2012). Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nature medicine* 18, 1401-1406.
- Kasperkiewicz, M.**, Nimmerjahn, F., Wende, S., Hirose, M., Iwata, H., Jonkman, M.F., Samavedam, U., Gupta, Y., Möller, S., Rentz, E., Hellberg, L., Kalies, K., Yu, X., Schmidt, E., Häslner, R., Laskay, T., Westermann, J., Köhl, J., Zillikens, D. und Ludwig, R.J. (2012). Genetic identification and functional validation of FcγRIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J. Pathol.*, 228, 8-19.
- Kawai, M.**, Quincy, D.A., Lane, B., Mollison, K.W., Luly, J.R. und Carter, G.W. (1991). Identification and synthesis of a receptor binding site of human anaphylatoxin C5a. *J Med Chem.*, 34, 2068-2071.
- Kim, S.C.**, Kim, J.H. und Kim, Y.H. (2011). Epidermolysis Bullosa Acquisita. A Retrospective Clinical Analysis of 30 Cases. *Acta Derm Venerol* 91, 307-312.
- Kumar, V.**, Ali, SR, Konrad, S., Zwirner, J., Verbeek, J.S., Schmidt, R.E. und Gessner, J.E. (2006). Cell-derived anaphylatoxins as key mediators of antibody-dependent type II autoimmunity in mice. *Journal of Clinical Investigation* 116, 512-520.
- Lappegård, K.T.**, Bjerre, A., Tjønnfjord, G.E. und Mollnes, T.E. (2015). Terapeutisk komplementhemming – fra eksperimentell til klinisk medisin. *Tidsskriftet* 135, 1745-1749.
- Leinhase, I.**, Holers, V.M., Thurman, J.M., Harhausen, D., Schmidt, O.I., Pietzcker, M., Taha, M.E., Rittirsch, D., Huber-Lang, M., Smith, W.R., Ward, P.A. und Stahel, P.F. (2006). Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation. *BMC neuroscience* 7, 55

- Lewis, A.G.**, Köhl, G., Ma, Q., Devarajan, P. und Köhl, J. (2008). Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival. *Clinical & Experimental Immunology* 153, 117-126.
- Li, R.**, Coulthard, L.G., Wu, M.C.L., Taylor, S.M. und Woodruff, T.M. (2013). C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a. *FASEB J* 27, 855-864.
- Liszewski, W.**, Omland, S.H. und Gniadecki, R. (2015). The Successful Use of Extracorporeal Photopheresis in a 12-Year-Old Patient with Refractory Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Pediatr Dermatol* 32, e60-e61.
- Ludwig, R.J.** (2013). Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita. *ISRN dermatology* 2013, 812029.
- Lüllmann-Rauch, R.**, und Asan, E. (2015). Haut und Hautanhangsgebilde. In: Lüllmann-Rauch, R. und Asan, E.: Taschenlehrbuch Histologie. 5. Aufl., 580-600, Thieme, Stuttgart
- Marder, S.R.**, Chenoweth, D.E., Goldstein, I.M. und Perez, H.D. (1985). Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. *Journal of immunology* 134, 3325-3331.
- McKeage, K.** (2011). Eculizumab. *Drugs* 71, 2327-2345.
- Megahed, M.** und Scharffetter-Kochanek, K. (1994). Epidermolysis bullosa acquisita--successful treatment with colchicine. *Archives of dermatological research* 286, 35-46.
- Mihai, S.**, Chiriac, M.T., Takahashi, K., Thurman, J.M., Holers, V.M., Zillikens, D., Botto, M. und Sitaru, C. (2007). The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of immunology* 178, 6514-6521.
- Mihai, S.** und Nimmerjahn, F. (2013). The role of Fc receptors and complement in autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 12, 657-660.
- Misawa, S.** (2015). Novel Therapeutic Interventions in Guillain-Barre Syndrome: Review and Future Perspective. *Brain Nerve* 67, 1421-1428.
- Murphy, K.M.**, Travers, P. und Walport, M. (2014). Das Komplementsystem und die angeborene Immunität. In: Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M., Ehrenstein, M., Mauri, C., Mowat, A., Shaw, A., Seidler, L. und Haüßer-Siller, I.: *Janeway Immunologie*. 7. Aufl., 81-107, Springer Spektrum, Berlin
- Okinaga, S.**, Slattery, D., Humbles, A., Zsengeller, Z., Morteau, O., Kinrade, M.B., Brodbeck, R.M., Krause, J.E., Choe, H.R., Gerard, N.P. und Gerard, C. (2003). C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* 42, 9406-9415.
- Otto, M.**, Hawlisch, H., Monk, P.N., Muller, M., Klos, A., Karp, C.L. und Köhl, J. (2004). C5a mutants are potent antagonists of the C5a receptor (CD88) and of C5L2: position 69 is the locus that determines agonism or antagonism. *The Journal of biological chemistry* 279, 142-151.
- Peng, Q.**, Li, K., Wang, N., Li, Q., Asgari, E., Lu, B., Woodruff, T.M., Sacks, S.H. und Zhou, W. (2009). Dendritic Cell Function in Allostimulation Is Modulated by C5aR Signaling. *The Journal of Immunology* 183, 6058-6068.
- Perianayagam, M.C.**, Balakrishnan, V.S., King, A.J., Pereira, B.J. und Jaber, B.L. (2002). C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway. *Kidney international* 61, 456-463.

- Rayner, L.E.**, Kadkhodayi-Kholghi, N., Heenan, R.K., Gor, J., Dalby, P.A. und Perkins, S.J. (2013). The Solution Structure of Rabbit IgG Accounts for Its Interactions with the Fc Receptor and Complement C1q and Its Conformational Stability. *Journal of Molecular Biology* 425, 506-523.
- Reed, S.L.**, Ember, J.A., Herdman, D.S., DiScipio, R.G., Hugli, T.E. und Gigli, I. (1995). The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *Journal of immunology* 155, 266-274.
- Reißig, D.** und Salvetter, J. (2014). Haut (Integumentum commune). In: Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spaniel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzing, L.J. und Zilch, H.G.: *Anatomie. 2. Aufl.*, 1164-1171, Thieme, Stuttgart
- Roenigk, H.H.** (1971). Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Archives of dermatology* 103 1.
- Sadeghi, H.**, Lockmann, A., Hund, A.-C., Samavedam, U. K. S. R. L., Papi, E., Vafia, K., Hauenschild, E., Kalies, K., Pas, H.H., Jonkman, M.F., Iwata, H., Recke, A., Schön, M.P., Zillikens, D., Schmidt, E. und Ludwig, R.J. (2015). Caspase-1-Independent IL-1 Release Mediates Blister Formation in Autoantibody-Induced Tissue Injury through Modulation of Endothelial Adhesion Molecules. *The Journal of Immunology* 194, 3656-3663.
- Sadik, C.D.**, Kim, N.D., Iwakura, Y. und Luster, A.D. (2012). Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR and FcγR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E3177-85.
- Sadik, C.D.**, Miyabe, Y., Sezin, T., und Luster, A.D. (2018). The critical role of C5a as an initiator of neutrophil-mediated autoimmune inflammation of the joint and skin. *Seminars in immunology* 37, 21-29.
- Salvadori, M.** (2015). Complement involvement in kidney diseases. From physiopathology to therapeutical targeting. *WJN* 4, 169.
- Samavedam, U.K.S.**, Kalies, K., Scheller, J., Sadeghi, H., Gupta, Y., Jonkman, M.F., Schmidt, E., Westermann, J., Zillikens, D., Rose-John, S. und Ludwig, R.J. (2013). Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction. *Journal of Autoimmunity* 40, 74-85.
- Schmidt, E.**, Mitnacht, A., Schomig, H., Dummer, R., Bröcker, E.B. und Zillikens, D. (1996). Detection of IL-1 alpha, IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist in blister fluid of bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science* 11, 142-147.
- Schumacher, W.A.**, Fantone, J.C., Kunkel, S.E., Webb, R.C. und Lucchesi, B.R. (1991). The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo. *Agents and actions* 34, 345-349.
- Sendler, M.**, Beyer, G., Mahajan, U.M., Kauschke, V., Maertin, S., Schurmann, C., Homuth, G., Völker, U., Völzke, H., Halang, W., Wartmann, T, Weiss, F.U., Hegyi, P., Lerch, M.M. und Mayerle, J. (2015). Complement Component 5 Mediates Development of Fibrosis, via Activation of Stellate Cells, in 2 Mouse Models of Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology* 149, 765-776.e10.
- Sesarman, A.**, Mihai, S., Chiriac, M.T., Olaru, F., Sitaru, A.G., Thurman, J.M., Zillikens, D. und Sitaru, C. (2008). Binding of avian IgY to type VII collagen does not activate complement and leucocytes and fails to induce subepidermal blistering in mice. *The British journal of dermatology* 158, 463-471.

- Shimanovich, I.**, Mihai, S., Oostingh, G.J., Ilenchuk, T.T., Bröcker, E.B., Opdenakker, G., Zillikens, D. und Sitaru, C. (2004). Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *The Journal of pathology* 204, 519-527.
- Shushakova, N.**, Skokowa, J., Schulman, J., Baumann, U., Zwirner, J., Schmidt, R.E. und Gessner, J.E. (2002). C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγRs in immune complex-induced lung disease. *The Journal of clinical investigation* 110, 1823-1830.
- Sitaru, C.**, Mihai, S., Otto, C., Chiriac, M.T., Hausser, I., Dotterweich, B., Saito, H., Rose, C., Ishiko, A. und Zillikens, D. (2005). Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *The Journal of clinical investigation* 115, 870-878.
- Sitaru, C.**, Chiriac, M.T., Mihai, S., Buning, J., Gebert, A., Ishiko, A. und Zillikens, D. (2006). Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *Journal of immunology* 177, 3461-3468.
- Sumichika, H.**, Sakata, K., Sato, N., Takeshita, S., Ishibuchi, S., Nakamura, M., Kamahori, T., Ehara, S., Itoh, K., Ohtsuka, T., Ohbora, T., Mishina, T., Komatsu, H. und Naka, Y. (2002). Identification of a potent and orally active non-peptide C5a receptor antagonist. *The Journal of biological chemistry* 277, 49403-49407.
- Takai, T.** (2002). Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* 2, 580-592.
- Theer, P.**, Hasan, M.T. und Denk, W. (2003). Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt. Lett.*, OL 28, 1022-1024.
- Vergunst, C.E.**, Gerlag, D.M., Dinant, H., Schulz, L., Vinkenoog, M., Smeets, T.J., Sanders, M.E., Reedquist, K.A. und Tak, P.P. (2007). Blocking the receptor for C5a in patients with rheumatoid arthritis does not reduce synovial inflammation. *Rheumatology* 46, 1773-1778.
- Waters, S.M.**, Brodbeck, R.M., Steflik, J., Yu, J., Baltazar, C., Peck, A.E., Severance, D., Zhang, L.Y., Currie, K., Chenard, B.L., Hutchison, A.J., Maynard, G. und Krause, J.E. (2005). Molecular characterization of the gerbil C5a receptor and identification of a transmembrane domain V amino acid that is crucial for small molecule antagonist interaction. *The Journal of biological chemistry* 280, 40617-40623.
- Webster R.O.**, Larsen G.L. und Hensons P.M. (1982). In vivo clearance and tissue distribution of C5a and C5a des arginine complement fragments in rabbits. *The journal of clinical investigation* 70(6), 1177-1183
- Werfel, T.**, Oppermann, M., Schulze, M., Krieger, G., Weber, M. und Götze, O. (1992). Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. *Blood* 79, 152-160.
- Woodruff, T.M.**, Nandakumar, K.S. und Tedesco, F. (2011). Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Molecular immunology* 48, 1631-1642.
- Xu, C.**, Zipfel, W., Shear, J.B., Williams, R.M. und Webb, W.W. (1996). Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10763-10768.
- Zipfel, W.R.**, Williams, R.M., Christie, R., Nikitin, A.Y., Hyman, B.T. und Webb, W.W. (2003). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7075-7080.

Zumelzu, C., Le Roux-Villet, C., Loiseau, P., Busson, M., Heller, M., Aucouturier, F., Pendaries, V., Lievre, N., Pascal, F., Brette, M.D., Doan, S., Charron, D., Caux, F., Laroche, L., Petit, A. und Prost-Squarcioni, C. (2011). Black patients of African descent and HLA-DRB1*15:03 frequency overrepresented in epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of investigative dermatology* 131, 2386-2393.

6 Anhänge

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Haut
- Abbildung 2:** Antigene bei blasenbildenden Autoimmundermatosen
- Abbildung 3:** Pathogenese der Gewebsschädigung bei experimenteller Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Komplementsystems
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung der C5aR-Blockade
- Abbildung 6:** Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung von Ein- und Zwei-Photonen-Anregung
- Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Komplement-5a-Rezeptor-1 C5aR-Blockade
- Abbildung 8:** Antikörpertransfer-induziertes Epidermolysis bullosa acquisita-Mausmodell
- Abbildung 9:** Struktur des Experimentes W-54011
- Abbildung 10:** Struktur des Experimentes A8^{Δ71-73}.
- Abbildung 11:** Schematischer Aufbau des Zwei-Photonen-Mikroskops.
- Abbildung 12:** Testung der IgG-Bindekapazität.
- Abbildung 13:** Passiver Antikörpertransfer löst bei Mäusen Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita aus.
- Abbildung 14:** Ein makroskopisch gesundes Ohr zeigt auch mikroskopisch keine Auffälligkeiten.
- Abbildung 15:** Makroskopische Läsionen lassen sich auch mikroskopisch nachweisen.
- Abbildung 16:** An der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) lagert sich die Komplementkomponente 3 (C3) ab.
- Abbildung 17:** Behandlung mit dem Komplement-5a-Rezeptor (C5aR) -Antagonisten W-54011 verbessert das Krankheitsbild nicht.
- Abbildung 18:** Behandlung mit dem Komplement-5a (C5aR)- und C5L2-Antagonisten A8^{Δ71-73} verbessert das Krankheitsbild nicht.
- Abbildung 19:** Überblick über einen 3D-Stack der Dermis eines Mausohres.
- Abbildung 20:** Behandlung mit A8^{Δ71-73} vermindert die Extravasation neutrophiler Granulozyten nur an Tag 1 nach Krankheitsinduktion.
- Abbildung 21:** Ein Effekt auf die Extravasation neutrophiler Granulozyten unter Therapie mit A8^{Δ71-73} besteht nur an Tag 1 nach Krankheitsinduktion.
- Abbildung 22:** Es bestehen keine Differenzen im ROS-Release von Neutrophilen Granulozyten von C57Bl/6 und LysM-eGFP Mäusen, die eingesetzten Inhibitoren haben keine agonistischen Effekte.

Abbildung 23: Die Komplementkomponente 5a (C5a) erhöht konzentrationsabhängig die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Abbildung 24: W-54011 kann den Komplement-5a- (C5a) vermittelten Anstieg der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nicht inhibieren, A8^{Δ71-73} zeigt in hohen Konzentrationen Wirkung.

Abbildung 25: Mechanismen der Neutrophilen-Rekrutierung bei experimenteller Epidermolysis bullosa acquisita.

6.2 Verwendete Materialien

6.2.1 Geräte

Name	Hersteller
Analysenwaage ABJ 80-4M	Kern und Sohn GmbH, Balingen
BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg
Cryostat (Leica CM-3050S)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Eindeckautomat (Leica CV 5030)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Gefrierschrank (-80 °C)	Sanyo Component Europe GmbH, München
Keyence Mikroskop BZ-9000E	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Kühlschrank (4 °C) /Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr-International S.A., Bulle (Schweiz)
MACS® Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer VMS-C4	VWR International GmbH, Darmstadt
MaiTai® Laser	Spectra Physics, Santa Clara (USA)
Mikroskop BZ9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Mikrotom	Bayer Diagnostics GmbH, München
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
Olympus IMT-2 Mikroskop	Olympus, Hamburg
Paraffinausgießkonsole	Tissue Tek Sakura Finetek Europe B.V.KvK, Leiden (Niederlande)
pH-Meter HI 208	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Schüttler Hecht Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön
Transferpipetten	Brand GmbH und Co. Kg, Wertheim
TriMScope II	LaVision BioTec GmbH, Bielefeld
Sterile Werkbank	Nuaire, Plymouth, USA
Vortex	Werner Hassa GmbH, Lübeck
Zentrifuge 5810-R	Eppendorf AG, Hamburg
XLUMPLFL 20× W/0.95 Objektiv	Olympus, Hamburg

6.2.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
1,5 ml/ 2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
15 ml/ 50 ml Falconröhrchen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Amicon Ultra 15 ml Zentrifugations- Filtervorrichtung	Merck KGaA, Darmstadt
CrystalCruz™ Chromatographie-Säulen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Dialyserschlauch Visking, Zellulose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Einmal-Küvetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Einmalspritzen (Omnican® F 1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen (Discarit® II 5ml, 20ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Enthaarungscreme SNÄ Epil	Rufin Cosmetic, Langenhagen
Filterpapier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
MACS®-Separiersäule MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Parafilm®	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Pasteurpipetten	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Pipettenspitzen (Biosphere® Filter Tips)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter (Minisart®)	Sartorius AG, Göttingen
SuperFrost Objektträger	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V.KvK, Leiden (Niederlande)
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura Finetek Europe B.V.KvK, Leiden (Niederlande)

6.2.3 Reagenzien

Name	Hersteller
Ammoniak	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serum-Albumin, Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
C5a (murines, rekombinantes)	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
Chlorwasserstoffsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DAPI Fluoromount™	SouthernBiotech, Birmingham (USA)
Destilliertes Wasser	Klinisch Experimentelle Forschung UKSH, Lübeck
Dimethylsulfoxid 99,9%	Sigma Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
DyLight 594	Thermo Scientific Inc., Rockford (USA)

EDTA-Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Eukitt®	O. Kindler GmbH & Co. , Freiburg
FBS Superior (Fetales bovines Serum)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxilin	Merck KGaA, Darmstadt
Hank's balanced salt solution (HBSS)	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
HEPES 1M	Biochrom GmbH, Berlin
Ketaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Paraplast Plus Paraffin	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Percoll	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Phloxine B	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Roti®-Histofix (Phosphat-gepufferte Formaldehydlösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640 mit L-Glutamin, ohne Glucose, ohne Phenolrot	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
Serum von mit murinem Typ VII Kollagen immunisierten Kaninchen	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich KGaA, Darmstadt
Tween	Sigma-Aldrich KGaA, Darmstadt
Vidisc® Augengel	Bausch & Lomb GmbH, Berlin
Xylazinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

6.2.4 Pharmazeutika und Narkotika

Name	Hersteller
C5a-Rezeptorantagonist W-54011	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
C5a-Rezeptorantagonist A8 ^{Δ71-73}	Zur Verfügung gestellt von Prof. Jörg Köhl, Institut für systemische Entzündungsforschung, Lübeck
Fentanyl	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln
Ketaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

Medethomidinhydrochlorid	Virbac AG, Glattbrugg (Schweiz)
Midazolamhydrochlorid	Hamel Pharma Plus GmbH, Hameln
Murines Typ VII Kollagen	Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie, Lübeck
Ringerlösung	Delta Select GmbH, Dreieich
Xylazinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

6.2.5 Software

GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego (USA)
Imaris 6.3.1	Bitplane, Zürich (Schweiz)
ImSpector Pro	Max-Planck-Institut, Göttingen

6.2.6 Puffer und Lösungen

6.2.6.1 Puffer zur Isolation der anti-mCOL7c-IgG

PBS 10x	450 g NaCl, 87 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O und 9 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O gelöst in 5 l A. dest.
PBS 1x	PBS 10x verdünnt 1:10 in A. dest., pH mit Orthophosphorsäure auf 7,2 eingestellt
TRIS Base 1 M	60,55 g TRIS-base gelöst in 500 ml A. dest., pH mit HCl auf 9,0 eingestellt
Glycinpuffer 0.1 M	7,52 g Glycin-HCl gelöst in 1 l A. dest., pH mit HCl auf 2,8 eingestellt
TRIS Puffer 20 mM	3,15 g TRIS dissolved in 1 l A. dest., mit HCl auf 7,2 eingestellt
TRIS Puffer 20 mM + NaCl 0.5M	3,15 g TRIS and 29.22 g NaCl gelöst in 1 l A. dest., pH mit HCl auf 7,2 eingestellt
Boratpuffer	15,45 g Borsäure gelöst in 5 l A. dest., pH mit NaOH auf 8,5 eingestellt. Anmerkung: Borsäure löst sich bei niedrigem pH nicht gut, daher wurde NaOH bereits zum Auflösen hinzugeben. Die finale pH-Einstellung wurde erst vorgenommen, als die Säure komplett gelöst war.
NaCl 1M	58,44 g NaCl gelöst in 1 l A. dest.
Tritonpuffer	24,85 g NaCl und 0,5 ml Triton verdünnt in 500 ml PBS

6.2.6.2 Puffer für ROS Release Assay

HBSS prep	2,5 ml FBS und 10 ml HEPES verdünnt in 500 ml sterilem HBSS
62% Percoll	2,8 ml Percoll verdünnt mit 1,9 ml HBSS und 310 µl 10x PBS
MACS® Puffer	2,5 ml FBS und 2 ml 0,5 M EDTA verdünnt in 500 ml sterilem PBS
Beschichtungspuffer	5,3 g Na ₂ CO ₃ und 4,2 g NaHCO ₃ verdünnt in 1 l A. <i>dest.</i> ; pH auf 9,6 eingestellt
Waschpuffer	125 µl Tween verdünnt in 250 ml PBS
Blockpuffer	0,25 g BSA verdünnt in 25 ml sterilem PBS mit 12,5 µl Tween
CL-Medium	12,5 ml HEPES and 5 ml FBS verdünnt in 482,5 ml RPMI-1640 (mit L-Glutamin, ohne Glucose, ohne Phenolrot)

6.2.6.3 Anästhesien

Anästhesie zur Visualisierung	50 µl Fentanyl, 400 µl Medetomidin und 800 µl Midazolam verdünnt in 3,5 ml steriler Ringerlösung
Anästhesie zum Scoring	1 ml Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml) und 150 µl Xylazinhydrochlorid (100 mg/ml) verdünnt in 8.85 ml sterilem A. <i>dest.</i>

6.2.7 Belegungspläne der 96-Well-Platten für ROS Release Assay

6.2.7.1 Vergleiche der Neutrophilen von C57Bl/6- und LysM-eGFP-Mäusen (Abb. 22), Ausschluss agonistischer Effekte der eingesetzten Pharmaka

	Zellen Maus 1						Zellen Maus 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	nur Medium	Medium	N + W- 54011 1µg/ml	N + W- 54011 1µg/ml	N + IC + W- 54011 1 µg/ml	N + IC + W- 54011 1 µg/ml	nur Medium	Medium	N + W- 54011 1µg/ml	N + W- 54011 1µg/ml	N + IC + W- 54011 1 µg/ml	N + IC + W- 54011 1 µg/ml
B	nur Antikörper	nur Antikörper	N + W- 54011 10 µg/ml	N + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + W- 54011 10 µg/ml	nur Antikörper	nur Antikörper	N + W- 54011 10 µg/ml	N + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + W- 54011 10 µg/ml
C	nur IC	nur IC	N + A8 1 µg/ml	N + A8 1 µg/ml	N + IC + A8 1 µg/ml	N + IC + A8 1 µg/ml	nur IC	nur IC	N + A8 1 µg/ml	N + A8 1 µg/ml	N + IC + A8 1 µg/ml	N + IC + A8 1 µg/ml
D	nur N	nur N	N + A8 10 µg/ml	N + A8 10 µg/ml	N + IC + A8 10 µg/ml	N + IC + A8 10 µg/ml	nur N	nur N	N + A8 10 µg/ml	N + A8 10 µg/ml	N + IC + A8 10 µg/ml	N + IC + A8 10 µg/ml
E	N + Antigen	N + Antigen					N + Antigen	N + Antigen				
F	N + Antikörper	N + Antikörper					N + Antikörper	N + Antikörper				
G	N + IC	N + IC					N + IC	N + IC				
H	N + PMA	N + PMA					N + PMA	N + PMA				

6.2.7.2 C5a-Testung sowie Einfluss der Pharmaka auf C5a-Freisetzung (Abb. 23, Abb. 24)

	Zellen Maus 1				Zellen Maus 2				10	11	12	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	nur Medium	Medium	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 1µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 1µg/ml	nur Medium	Medium	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 1µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 1µg/ml
B	nur Antigen	nur Antigen	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 10µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 10µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 10µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 10 µg/ml	nur Antigen	nur Antigen	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 10µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + W- 54011 10µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 10µg/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml + A8 10 µg/ml
C	nur Antikörper	nur Antikörper	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 1 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 1 µg/ml	nur Antikörper	nur Antikörper	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 1µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 1 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 1 µg/ml
D	nur C5a 100 ng/ml	nur C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 10 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 10 µg/ml	nur C5a 100 ng/ml	nur C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + W- 54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 10 µg/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml + A8 10 µg/ml
E	nur IC	nur IC	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 1 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 1 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 1 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 1 µg/ml	nur IC	nur IC	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 1 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 1 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 1 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 1 µg/ml
F	IC + C5a 100 ng/ml	IC + C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 10 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 10 µg/ml	IC + C5a 100 ng/ml	IC + C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + W-54011 10 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 10 µg/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml + A8 10 µg/ml
G	N + C5a 100 ng/ml	N + C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml	N + C5a 100 ng/ml	N + C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml	N + IC + C5a 1 ng/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml	N + IC + C5a 100 ng/ml
H	N + PMA	N + PMA	N + IC + C5a 10 ng/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml	N + IC	N + IC	N + PMA	N + PMA	N + IC + C5a 10 ng/ml	N + IC + C5a 10 ng/ml	N + IC	N + IC

7 Danksagungen

Zuallererst möchte ich **Prof. Jennifer Hundt** für die Überlassung des Themas und die herausragende Betreuung danken. Immer ansprechbar, immer gut gelaunt, eine unglaubliche Fachkenntnis in Thematik und Methodik, und, zu guter Letzt, eine Süßigkeitenschublade im Büro, die auch für Doktoranden zugänglich ist - eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen. Danke für das Vertrauen, so eigenständig arbeiten zu dürfen!

Prof. Enno Schmidt danke ich dafür, dass er mir als Leiter des Instituts für Experimentelle Dermatologie in zahlreichen Situationen mit fachlichem Input weiterhelfen konnte.

Weiter möchte ich **Prof. Ralf Ludwig** danken, der stets ein offenes Ohr bei Fragen hatte und mir in zahlreichen Lab-Meetings mit hervorragenden fachlichen Anmerkungen weiterhalf. Nicht zuletzt bedanke ich mich auch für die sehr coole Weihnachtsfeier!

Ich danke **Prof. Detlef Zillikens**, der als Leiter der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie und als Sprecher des Graduiertenkollegs 1727 maßgeblich für die professionelle, dabei aber stets freundliche Arbeitsatmosphäre in der Klinik und den Laboren verantwortlich ist.

Dem **Vorstand des GRK 1727** danke ich für das Vertrauen, welches er in mich gesetzt hat, und der damit einhergehenden finanziellen Unterstützung.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Arbeitsgruppe, bestehend aus **Swantje Häger, Johannes Hillgruber, Rebecca Pfündl, Laura Griewahn** und **Nadine Merg**. Besonders hervorzuheben sind hier Swantje und Johannes – erstere, weil sie als Labormama fungierte und mir und Johannes alle Methoden näherbrachte, letzterer, weil er als Laborbruder derjenige war, der immer zur Stelle war, wenn zwei Hände nicht mehr ausgereicht haben. Rebecca danke ich für immer gute Laune und einen rasant-kontrollierten Fahrstil, Laura für die Geduld, sich meiner bescheidenen Mikrotom-Künste anzunehmen und diese auf ein anderes Niveau zu heben. Nadine danke ich für ihre Unterstützung beim Färben und ihre Tipps, dieses noch effizienter zu gestalten.

Weiter möchte ich **Dr. Anika Kasprick** für ihre Engelsgeduld danken, die sie mit uns bei der Isolation neutrophiler Granulozyten hatte. Ohne ihre Fachkenntnis und ihre Hilfe hätte das, soviel ist gewiss, bedeutend länger gedauert. Oder überhaupt nicht funktioniert.

Dr. Katja Bieber danke ich für ihre unfassbar geschickten Hände im Maus-OP, Anmerkungen prinzipieller Natur und Momente der gemeinsamen Verzweiflung.

Die Bedienung des 2-Photonen-Mikroskops wäre ohne die helfenden Hände von **Dr. Benjamin Sauer** nicht möglich gewesen. Softwarefehler, verstellter Spiegel, Detaileinstellung an einem PMT verkehrt – egal was, egal wo, egal wie, Benjamin ist erreichbar, kommt sofort, findet den Fehler und behebt ihn. Und erklärt dabei noch gut gelaunt verschiedenste Phänomene der Physik.

Ich danke allen Kollegen in Haus 10 und Haus 32, und zwar, weil das Arbeiten mit Ihnen immer Spaß gemacht hat. Besonders **Tanya, Siegfried, Shirin, Sadegh** und **Anne** halfen mir oft bei Gerätefragen, **Melanie** danke ich für das Bereitstellen von Antikörpern, wenn meiner mal aufgebraucht war – immer beste Qualität! **Annika, Katha, Anka, Laura, Georg** und nicht zuletzt **Claudia** und **Astrid** danke ich für ihre Kenntnis eines jeden Kühlschranks- und Schubladeninhalts in Haus 10 – ohne euch hätte ich wohl wochenlang gesucht.

Meiner Freundin **Nina** danke ich für ihre Fähigkeit, meine Begeisterung für alles auch nur ansatzweise Y-förmige („Ein Antikörper!“) nicht nur aushalten, sondern oft sogar teilen zu können.

Meiner **Familie**, meinen **Freunden** und meiner **WG** danke ich für ihr Interesse an und ihre Unterstützung während der Zeit an dieser Arbeit.

8 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, dass ich keine anderen als die angegebenen personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel verwendet habe und dass ich Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut und Sinn nach entnommen wurden, unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe.

Lübeck, den 11. September 2018

Martti Klockemann

9 Lebenslauf

Name
Vorname

Klockemann
Martti



Alter

25 Jahre

Hochschulstudium

2012: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2014: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2018: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Dissertation

Gesamtzeitraum: Februar 2015 – August 2018
Experimente: September 2015 – März 2016