

Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie
der Universität zu Lübeck

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

**Vergleichende Evaluierung
etablierter Pharmaka bei
experimenteller Epidermolysis
bullosa acquisita**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Tobias Schröder

aus Ibbenbüren

Lübeck 2021

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. rer. physiol. Katja Bieber Bieber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Bader

Tag der mündlichen Prüfung: 29.6.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.6.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einführung und Fragestellung	1
1.1. Aufbau und Funktion der Haut	1
1.2. Blasenbildende Autoimmundermatosen	1
1.3. Epidermolysis bullosa acquisita	2
1.3.1. Epidemiologie	3
1.3.2. Klinik	3
1.3.3. Pathogenese	5
1.3.4. Diagnose	8
1.3.5. Therapie	8
1.4. Tiermodelle	12
1.4.1. Mausmodelle der EBA mit mCol7 ^{vWFA2}	12
1.4.2. Anti-mCol7 ^{vWFA2} Antikörpertransfer-induziertes EBA-Mausmodell	13
1.4.3. mCol7 ^{vWFA2} -Immunisierungs-induziertes EBA-Mausmodell . . .	15
1.5. Fragestellung	16
2. Materialien und Methoden	18
2.1. Verwendete Tiere	18
2.2. Verwendete Geräte	19
2.3. Verwendete Materialien	21
2.4. Verwendete Software	25
2.5. Verwendete Puffer und Lösungen	25
2.6. Verwendete Antikörper	26
2.7. Methoden zur Herstellung des rekombinanten mCol7 ^{vWFA2}	27
2.7.1. Proteingewinnung und Aufreinigung mittels Affinitätschromato-	
grafie	27
2.7.2. Überprüfung der Reinheit des purifizierten mCol7 ^{vWFA2} mittels	
SDS-PAGE	29

2.7.3.	Quantitative Proteinbestimmung mittels UV-photometrischer Methode	29
2.7.4.	Pufferwechsel, Aufkonzentrierung, Sterilfiltrierung und Aliquotierung der mCol7 ^{vWFA2} -Proteinlösung	31
2.8.	Das Antikörpertransfer-induzierte Modell	31
2.8.1.	Immunisierung von Kaninchen mit mCol7 ^{vWFA2} und Affinitätschromatografie zur Aufreinigung von Gesamt-Kaninchen-IgG . .	31
2.8.2.	Titerkontrolle des Immun-IgG mittels indirekter Immunfluoreszenz	33
2.8.3.	Durchführung des Antikörpertransfer-induzierten Modells	34
2.9.	Das Immunisierungs-induzierte Modell	35
2.10.	Untersuchungsmethoden an der Maus	37
2.10.1.	Bestimmung der betroffenen Körperoberfläche (klinischer Score)	37
2.10.2.	Indirekter ELISA zur Bestimmung der Antikörperkonzentration in den Tiermodellen	38
2.10.3.	DIF der Proben aus dem Antikörpertransfer-induzierten Modell sowie dem Immunisierungs-induzierten Modell der EBA	42
2.10.4.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
2.11.	Auswertung und Statistik	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Aufreinigung von mCol7 ^{vWFA2} aus E. coli ER2566	47
3.1.1.	Herstellung und Titerkontrolle des Immun-IgGs	49
3.2.	Untersuchung etablierter Pharmaka im Antikörpertransfer-induzierten Modell der experimentellen EBA	49
3.2.1.	Methylprednisolonbehandlung verbessert den klinischen Verlauf einer Antikörpertransfer-induzierten EBA in AIL Tieren in Generation G14	49
3.2.2.	Dapson verbessert den klinischen Verlauf einer Antikörpertransfer-induzierten EBA in AIL Tieren in Generation 16	53
3.2.3.	Dapson und Colchicin verbessern den klinischen Verlauf einer Antikörpertransfer-induzierten EBA in AIL Tieren in der Frühphase der Klinik in Generation 19	57
3.2.4.	Reduktion der Krankheitsaktivität bei AIL-Mäusen mit fortschreitender Generation im Antikörpertransfer-induzierten Modell nachweisbar	59

3.3. Untersuchung etablierter Pharmaka in Immunisierungs-induzierter experimenteller EBA	60
3.3.1. Methylprednisolon verbessert den klinischen Verlauf einer Immunisierungs-induzierten EBA in B6.SJL-H2s C3c/1CyJ Tieren	60
3.3.2. Methylprednisolon reduziert den Anteil an IgG1 im Verlauf der Immunisierungs-induzierten EBA bei B6.SJL-H2s C3c/1CyJ Mäusen	62
3.3.3. Als Kontrolle des Immunisierungs-induzierten Modells wurde die Bindung von Immunglobulin- und Komplement C3a-Ablagerungen an der DEJ detektiert	63
4. Diskussion	65
5. Zusammenfassung	80
Literaturverzeichnis	81
A. Anhang	I
A.1. Aufbau der Ankerfibrillen aus Kollagen VII	I
A.2. Expasy Proteinparameter	II
A.3. Zertifikat des Tierkurses	IV
A.4. Genehmigung des Tierversuchsantrags	V
A.5. G12-Daten von Dr. Hiroaki Iwata	VI
A.6. AIL	VI
Danksagungen	VII
Lebenslauf	VIII

Abkürzungsverzeichnis

AIL autoimmunitätsanfällige erweiterte Kreuzungslinie (*autoimmune prone advanced intercross line*)

ANOVA *Analysis of variance*

APC antigenpräsentierende Zelle

AUC *Area under the curve*

BAID blasenbildende Autoimmundermatose

BMZ Basalmembranzone

BP bullöses Pemphigoid

BP-EBA bullös-pemphigoidartige EBA

Brunsting-Perry-EBA EBA Variante ähnlich des Pemphigoid-Typs Brunsting-Perry

BSA bovines Serumalbumin

C3 Komplementkomponente 3

CBD Chitinbindedomäne

CD *Cluster of differentiation*

COL7 Typ VII Kollagen

Col7^{vwFA2} von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne 2 des Kollagen VII

CYP3A4 Cytochrom P₄₅₀ 3A4

DEJ dermo-epidermale Junktionszone

DIF direkte Immunfluoreszenz

Abkürzungsverzeichnis

DMSO Dimethylsulfoxid

EBA Epidermolysis bullosa acquisita

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EZM extrazelluläre Matrix

Fas *Fas Cell Surface Death Receptor*

GST Gluthatione-S-Transferase

H&E Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HLA Humane Leukozytenantigene (*human leucocyte antigen*)

HRP Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*)

i.p. intraperitoneal

IBDG *International Bullous Disease Group*

IgA-EBA lineare-IgA-Dermatose-ähnliche EBA

IIF indirekte Immunfluoreszenz

IL Interleukin

Immun-IgG Gesamt-Kaninchen-IgG mit anti-mCol7^{vWFA2}

IMPACT-TWIN *Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag-
Two Intein*

IPTG Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

IVIG intravenöse Immunglobuline

KOF Körperoberfläche

LAD lineare IgA-Dermatose

LD₅₀ mittlere lethale Dosis

mCOL7 murine Kollagen Typ VII

mCol7^{vWFA2} von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne 2 des murinen Kollagen VII

mCOL7C Rekombinantes Kollagen VII aus NC1-Domäne mit den Aminosäuren 757 bis 967

mCOL7c murine Kollagen Typ VII

MM-EBA Schleimhaut-Pemphigoidartige EBA (*mucous membrane EBA*)

MPO Myeloperoxidase

mPSL Methylprednisolon

MPV Maus Parvovirus

NC1 nicht-kollagenöse Domäne 1 des COL7

NC2 nicht-kollagenöse Domäne 2 des COL7

PBS phosphat-gepufferte Salzlösung (*Phosphate-buffered saline*)

PEG Polyethylenglykol 20000

QTL *Quantitative Trait Locus* (in etwa Quantitativer Merkmalslokus)

RCT randomisiert kontrollierte Studie

ROS reaktive Sauerstoffspezies

SDS Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SEM Standardfehler

SLE systemischer Lupus erythematoses

SNP Einzelnukleotidpolymorphismus

SPF spezifisch-pathogenfreie Tierhaltungsbedingungen

T_{reg} regulatorische T-Zellen

TMB Tetramethylbenzidin

UAW unerwünschte Arzneimittelwirkung

1. Einführung und Fragestellung

1.1. Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut hat als größtes Organ des menschlichen Körpers lebensnotwendige und vielseitige Funktionen [98]. Um diese vielen Aufgaben zu erfüllen, besitzt die Haut einen typischen Aufbau, welcher in Epidermis, Dermis und Subcutis unterteilt ist [99]. Ein besonders wichtiger Bereich für diese Arbeit ist die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ) zwischen Dermis und Epidermis. Hier erfolgt die Verankerung des Zytoskeletts der Basalzellen mit der Basalmembran sowie der extrazelluläre Matrix (EZM) der Dermis [98,204]. Die Anforderungen an die DEJ sind eine hohe mechanische Belastbarkeit bei gleichzeitiger Elastizität. Weiterhin muss der Austausch von Zellen (insbesondere Leukozytenmigration), Zytokinen und Metaboliten ermöglicht sein [98]. Der subbasale Bereich wird weiterhin in mehrere Lamina unterteilt (Abbildung 1.1.): Lamina lucida sowie densa und die Sublamina densa. Einen wichtigen stabilisierenden Beitrag hat unter anderem das Typ VII Kollagen (COL7), welches als Hauptbestandteil der Ankerfibrillen [247] (Anhang Abbildung A.1.) eine Verankerung mit tieferen Schichten bewirkt. COL7 ist das Autoantigen (Kapitel 1.3.3.) der in dieser Arbeit zentralen blasenbildenden Autoimmundermatose (BAID) Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) [46, 98, 125].

1.2. Blasenbildende Autoimmundermatosen

BAID sind eine Gruppe chronischer, schwerwiegender und pathogenetisch heterogener Autoimmunerkrankungen der Haut und Schleimhäute [198]. Autoimmunität bedeutet einen Verlust der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen [37]. In der Regel sind die Ursachen dieser Erkrankungen ein Zusammenspiel von Umweltfaktoren und Genetik [59, 221], aber BAID können sogar als unerwünschte Arzneimittelwirkung (UAW) von Immuncheckpoint-Inhibitoren auftreten [201]. Typischerweise werden BAID durch Autoantikörper gegen verschiedene Strukturproteine der Haut charakterisiert (Abbildung 1.1.). Im Laufe der Erkrankung kommt es zu Inflammationen sowie konsekutiven

1. Einführung und Fragestellung

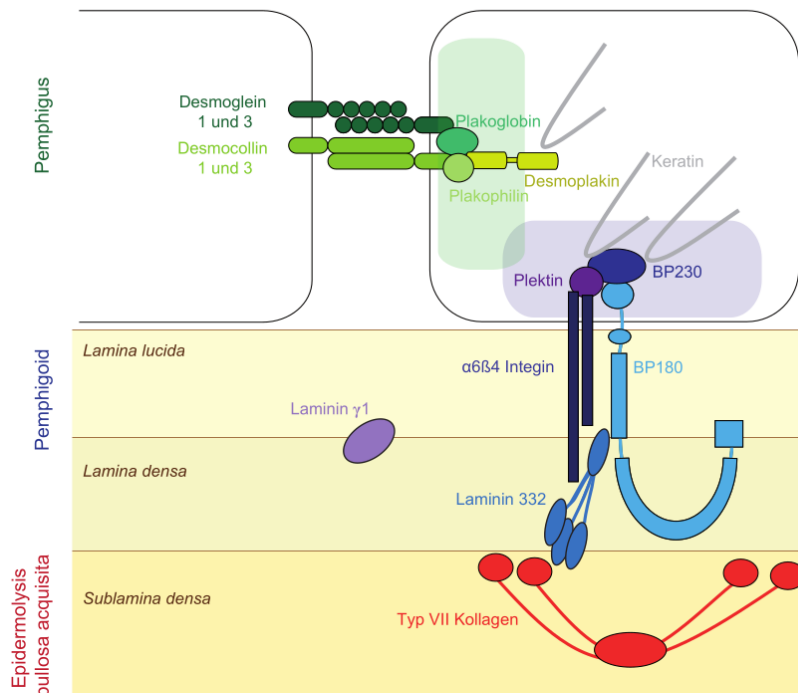


Abbildung 1.1.: Aufbau der dermo-epidermalen Junktionszone. Dargestellt sind nur Antigene von BAID. Das Schema zeigt verschiedene Autoantigene von BAID. Dargestellt sind in grün die Antigene der Pemphiguserkrankungen, welche sich an den Basalzellen und übrigen Keratinozyten befinden. Die Antigene der Pemphigoiderkrankungen befinden sich an den Basalzellen, in der Lamina lucida sowie in der Lamina densa und sind in blau abgebildet. In rot ist das Hauptantigen der EBA das Kollagen Typ VII in der Sublamina densa dargestellt, welches ein Hauptbestandteil der Ankerfibrillen ist [25]. (Abbildung adaptiert aus [25])

Disadherenzen zwischen verschiedenen Hautschichten (z. B. epidermal oder subepidermal), was zu der namensgebenden Blasenbildung führt. BAID werden in Pemphiguserkrankungen (Autoantikörper gegen Keratinozytenproteine wie z. B. beim Pemphigus vulgaris), Pemphigoiderkrankungen (bilden subepidermale Blasen durch Autoantikörper gegen Basalmembranstrukturen wie beim bullösen Pemphigoid (BP) oder eben Ankerfibrillen wie bei der EBA) und Dermatitis herpetiformis eingeteilt [165, 198].

1.3. Epidermolysis bullosa acquisita

Die EBA ist eine durchaus seltene Hauterkrankung, welche durch Autoantikörper gegen COL7 charakterisiert ist und von Elliot 1895 als nicht erbliche Form der Epidermolysis bullosa dystrophica beschrieben wurde [60, 125]. Ein knappes Jahrhundert später konnten Woodley et al. zeigen, dass es sich beim COL7 um das Antigen der EBA handelt [247]. An der DEJ führen Autoantikörper zu Immunkomplexablagerungen, welche ein

pro-inflammatorisches Milieu induzieren und zu Gewebsschäden wie beispielsweise Blasenbildung, Krusten oder Erosionen führen [125].

1.3.1. Epidemiologie

In den letzten Jahrzehnten wurden in mehreren Studien die Inzidenzen von EBA beschrieben, trotzdem sind epidemiologische Daten immer noch rar. In den ersten Daten des Schleswig-Holstein Register für Bullöse Autoimmundermatosen finden sich z. B. für 2016 keine neuen Erstdiagnosen [12]. Die Inzidenz der EBA wird bei 0,2 - 1 Neuerkrankungen pro Jahr und einer Million Einwohner eingeschätzt [15, 16, 169, 255]. Neuere Schätzungen gehen für Deutschland von einer Inzidenz von <0,5 Neuerkrankungen pro Jahr und Million Einwohner aus und einer Prävalenz (in 2014) von 2,84 Erkrankten pro einer Million Einwohner in Deutschland aus [95, 125]. Die EBA tritt zum Teil mit regionalen bzw. ethnische Häufungen auf [138]. Wie zum Beispiel bei kürzlicher Publikation des bullösen Pemphigoid[207] besteht eine Assoziation mit Humane Leukozytenantigene (*human leucocyte antigen*) (HLA)-Polymorphismen auch in der EBA [75, 125, 256].

1.3.2. Klinik

Die Symptomatik der EBA besteht vor allem an traumaaanfälligen Regionen aus Bullae, Vesicae, Erosionen, Erythem, Krusten, Hämorrhagien, bei Behaarung auch Alopezie und bei der klassischen Variante später auch Narben- und Milienbildung. Darüber hinaus wird die Lebensqualität durch die Erkrankung eingeschränkt, weshalb sogar spezielle Fragebögen etabliert wurden [208, 233]. Die klinischen Manifestationen können variabel sein und werden in mehrere Typen eingeteilt [199]. Zu nennen sind hier vor allem die früh beschriebene klassische/mechanobullöse Form [60, 104, 113, 245], welche auch als nicht-inflammatorische Variante klassifiziert wurde [181, 190]. Hiervon wird die nichtklassische/nicht-mechanobullöse Form [74] unterschieden, welche in weitere Formen unterteilt wird. Dieses sind die bullös-pemphigoidartige EBA (BP-EBA), welche die klinischen Diagnosekriterien der EBA und des BP erfüllt [74], eine schleimhautpemphigoidartige EBA, die klinisch durch vorherrschende Schleimhautläsionen definiert wird [4, 50, 145], eine EBA-Variante mit dem Bild einer linearen IgA-Dermatose, definiert durch Immunablagerungen mit IgA an der DEJ [33, 135, 237] sowie eine Form unter dem Bild eines lokalisierten vernarbenden Pemphigoids vom Typ Brunsting-Perry [44, 112, 131, 139, 181, 199] (Tabelle 1.1.).

1. Einführung und Fragestellung

Tabelle 1.1.: Aufstufung klinischer Varianten der EBA mit möglichen charakteristischen Ausprägungen (modifiziert nach Prost-Squarcioni et al. [181])

Klassische / mechanobullöse Variante	
	Charakteristika Trauma-induzierte Läsionen (Fragilität der Haut) [190] Bullöse /vesikuläre Läsionen oder Erosionen Läsionen umgeben von nichtentzündlicher oder vernarbter Haut Bildung von Narben und Milien Vorwiegend in traumaaanfälligen und extensorenseitigen Hautstellen (z. B. über Handrücken, Ellenbogen, Knie, Achillessehne) Nageldystrophie möglich vernarbende Alopezie möglich
Nichtklassische / nicht-mechanobullöse EBA	
Subtyp	Charakteristika
BP-EBA [33, 74]	mit charakteristischen Merkmalen des BP (Pruritus, Gespannte Bullae mit Erythem oder Urtikaria, Beteiligung von Körperstamm und Hautfalten) gewöhnlich gemischt mit für BP atypischen Läsionen (Hautfragilität, Bulla auf normaler nicht entzündeter Haut, Milien, Befall von Gesicht oder Streckseiten der Extremitäten)
Schleimhaut-Pemphigoidartige EBA (<i>mucous membrane EBA</i>) (MM-EBA)	vornehmlich Befall von Schleimhaut mit Plattenepithelien (Mundhöhle, Pharynx, Ösophagus, Epiglottis, Konjunktiven, Genital, Anus, Atemwege)
EBA Variante ähnlich des Pemphigoid-Typs (Brunsting-Perry (Brunsting-Perry-EBA))	Chronisch rezidivierende BAID welche auf Kopf und Hals beschränkt ist [44, 112, 131, 139]
lineare-IgA-Dermatose-ähnliche EBA (IgA-EBA)	BAID mit linearer IgA-Ablagerungen an der Basalmembranzone (BMZ) in der direkten Immunfluoreszenz (DIF) [33, 135, 237] kann lineare IgA-Dermatose (LAD) ähneln kann zu starker Schleimhautvernarbung führen

Die große Variabilität der Klinik und Serologie führte zu einer kleinen Reihe von Studien [33, 36, 105, 122, 211], die sich mit den verschiedenen Varianten sowie deren Häufigkeit und Differenzierungsmöglichkeiten mit geringen Fallzahlen befasst haben [125]. Die häufigste Präsentationen der EBA ist die klassische/mechanisch-bullöse [125]. Allerdings gibt es auch Überschneidungen von einzelnen Varianten [125] und zudem sind Veränderungen des klinischen Bildes im Laufe der Erkrankung im selben Patienten möglich [86]. Auch gibt es Hinweise darauf, dass eine IgA-EBA eine eigene Entität darstellen könnte und dass viele Fälle als lineare IgA-Dermatose klassifiziert worden

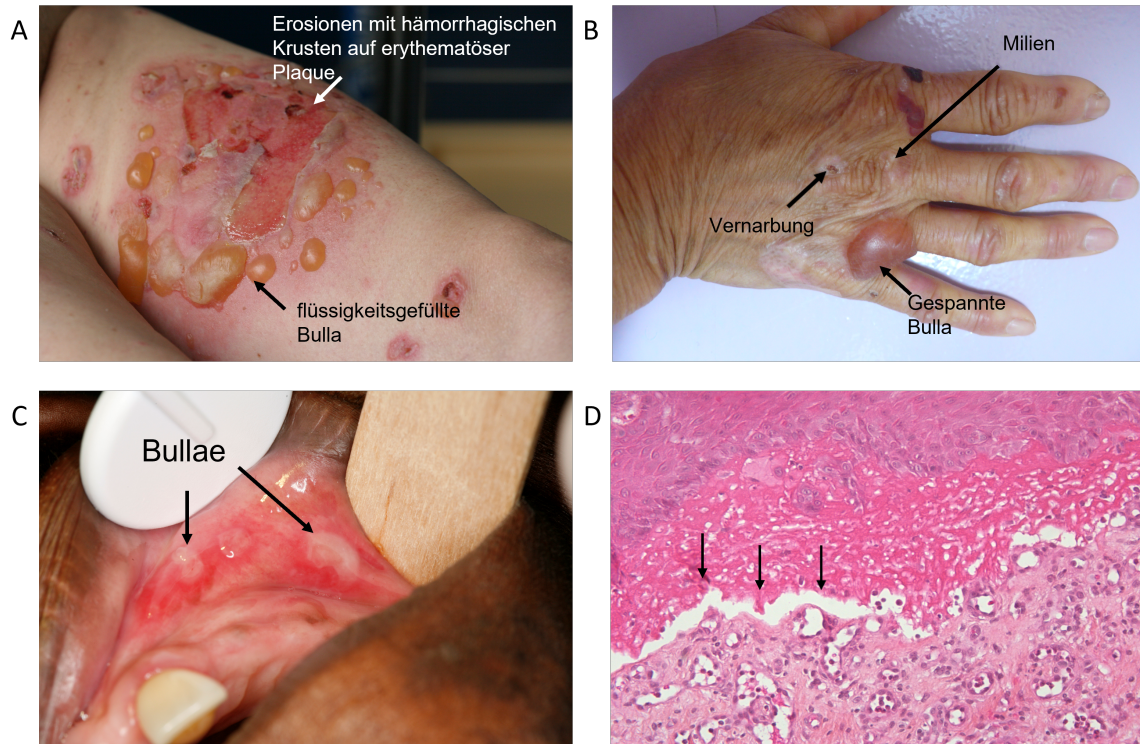


Abbildung 1.2.: Klinische Bilder der EBA (Bilder aus [125]) **A** Patientenbild einer BP-ähnlichen EBA mit ausgedehnten bullösen Läsionen, Erosionen mit vereinzelt Hämorrhagien, Erythem und flüssigkeitsgefüllten Blasen **B** Patientenbild einer mechanobullösen EBA mit ausgedehnter Blasenbildung an mechanisch belasteter Körperregion ohne peribullöse klinische Entzündungszeichen **C** Bilder einer Blasenbildung (Pfeilmarkierung) der oralen Mucosa eines Patienten mit BP-ähnlicher EBA **D** HE-Färbung eines Patienten mit BP-ähnlicher EBA die an den Markierungen subepitheliale Blasenbildung mit Infiltraten zeigt.

sein könnten [11].

1.3.3. Pathogenese

COL7 ist maßgeblich an der Adhäsion der Basalmembran mit der darunter liegenden Dermis beteiligt, insbesondere geschieht dies durch Interaktion zu anderen Kollagenen und der EZM [38, 235, 236]. Dieses Kollagen wird in verschiedene Domänen unterteilt, welche die nicht-kollagenöse Domäne 1 des COL7 (NC1), die kollagenöse Domäne und die nicht-kollagenöse Domäne 2 des COL7 (NC2) sind (Abbildung 1.3.) [140]. Eine besondere Beachtung erfährt eine Subdomäne von NC1 die von-Willebrand-Faktor-Ähnliche Domäne 2 des Kollagen VII (Col7^{vWFA2}), welche eine wichtige Rolle in diversen Adhäsionsinteraktionen mit anderen Kollagenen spielt [236, 240, 243]. Binden Autoantikörper an Col7^{vWFA2} führt dieses zur Störung der Interaktionen zwischen den Kollagenen [140]. Darüber hinaus sind mittlerweile weitere Wechselwirkungen mit zusätzlichen

1. Einführung und Fragestellung

Strukturen belegt worden [78]. Mehrere Epitope wurden auf den einzelnen Abschnitten mittels Patientenseren kartiert, deren überwiegende Mehrheit Antikörper gegen die NC1-Domäne enthält [76, 137, 239]. Eine besonders hohe Immunogenität scheint die Col7^{vWFA2}-Domäne als Teil der NC1-Domäne zu haben [109, 140]. Im Tierversuch dieser Arbeit wird ein rekombinantes von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne 2 des murinen Kollagen VII (mCol7^{vWFA2}) verwendet.

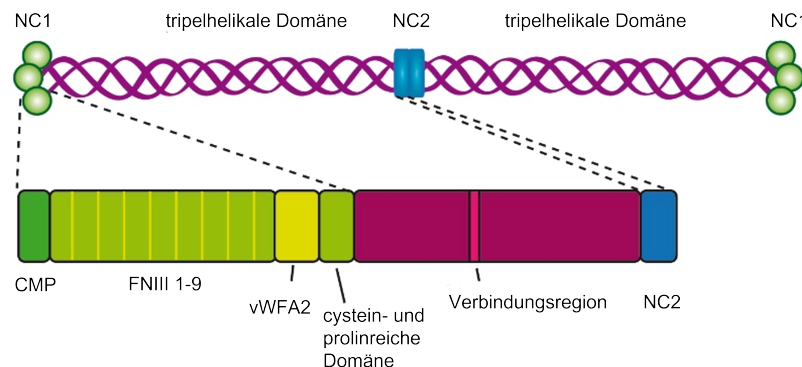


Abbildung 1.3.: Schematische Struktur des humanen Kollagen Typ VII mit der Col7^{vWFA2}-Domäne Die Col7^{vWFA2}-Domäne ist in der Abbildung als gelbes Rechteck dargestellt, welches zur NC1 auf der linken Seite (grün) gehört. FNIII: Fibronectin-III-ähnliche Domäne, CMP: Kollagen Mimetisches Peptid, NC1 bzw. 2: nicht-kollagenöse Domäne, Col7^{vWFA2}: von Willebrand-Faktor-ähnliche Domäne A2, (modifizierte Abbildung aus Unterstützende Informationen von [22])

Die Pathogenese der EBA kann in mehrere Phasen eingeteilt werden, welche in Abbildung 1.4. dargestellt sind. Wie bei den meisten Autoimmunerkrankungen liegt auch bei der EBA initial ein Verlust der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen vor. Die EBA wird durch eine Kombination aus bestimmten genetischen Prädispositionen innerhalb [75, 256] und außerhalb des MHC-Locus [142, 143, 174, 202, 217] und Umwelteinflüssen wie dem Mikrobiom [59, 221] initiiert. Die Gründe und Zusammenhänge sind aber noch nicht vollständig verstanden [125].

Die meisten Einsichten in die Pathogenese sind in Mausmodellen gewonnen worden. Im Folgenden wird daher die Pathogenese der Maus beschrieben. Erkenntnisse über die Pathogenese im Menschen werden explizit gekennzeichnet. Nach dem Verlust der Toleranz erfolgt die afferente Phase mit der Autoantikörperbildung [109]. Diese ist ein bedeutender, wenn auch komplexer Vorgang, welcher ebenfalls noch nicht vollständig verstanden ist [125]. Hierbei differenzieren sich autoreaktive B-Zellen zu Plasmazellen und führen zu persistierender Autoantikörperbildung [116, 230]. Beteiligt sind hieran eine Vielzahl an miteinander interagierenden Immunzellen wie z. B. antigenpräsentierenden

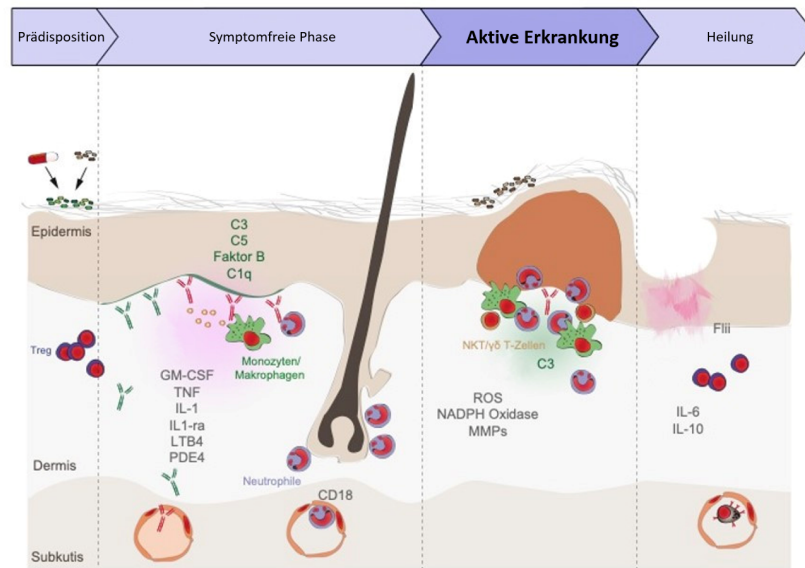


Abbildung 1.4.: Schematische Darstellung einzelner Phasen in der Pathogenese der EBA
 Genetische Prädisposition und Umwelteinflüsse tragen zum Verlust der Toleranz bei. Durch Vermittlung von antigenpräsentierenden Zellen (APC) werden autoreaktive B- und T-Zellen induziert. Das führt zur klonalen Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen in Plasmazellen, welche infolge Autoantikörper gegen COL7 sezernieren. In der symptomfreien Phase binden die Autoantikörper an die Antigene und bilden Immunkomplexe. Ein Zusammenspiel verschiedener Immunzellen mit diesen Immunkomplexen führt zur Sezernierung diverser proinflammatorischer Zytokine, Leukotriene und Proteasen und zu einem proinflammatorischen Milieu, was zur Extravasation und Migration weiterer Immunzellen in die Haut führt. In der aktiven Erkrankung vermitteln Immunzellen wie polymorphkernige neutrophile Granulozyten, NKT-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen Gewebsschäden mittels ROS (NADPH-sowie MPO-abhängig) und Matrix-Metalloproteasen (Modifiziert nach [125]). Die Heilung zeigt lokale Abheilungsprozesse an, die eine Hauterscheinung abheilen lassen, trotzdem kann an anderen Hautstellen erneut eine Manifestation der EBA auftreten.

Zellen (APC), autoreaktive B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten [42, 109, 125, 203, 216]. Außerdem spielen regulatorische T-Zellen (T_{reg}) eine Rolle, sowohl in der Maus, als auch im Menschen [87, 161]. Es schließt sich die sog. Effektorphase an, was in der EBA die autoantikörpervermittelte Inflammation und subepidermale Blasenbildung bezeichnet. Dies geschieht durch Antikörperbindung an das COL7 (an Haut oder auch Schleimhäuten in Maus und Mensch [107, 175]), konsekutiver Bildung eines vor allem pro-inflammatorischen Milieus [100, 101, 144, 202, 203, 213, 219] (inklusive Komplementaktivierung [155]), Migration diverser Leukozyten (neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, Monozyten/Makrophagen) aus Blutgefäßen [27, 42, 101, 213] und der Aktivierung von überwiegend proinflammatorischen $Fc\gamma$ -Rezeptoren der neutrophilen Granulozyten in Mensch [218] und Maus [116, 173, 217]. Diese Aktivierung setzt eine Signalkaskade [125, 141] in Gang. Eine Modulationen von $Fc\gamma$ -Rezeptoren kann ein Ziel für therapeu-

1. Einführung und Fragestellung

tische Optionen sein und in diese Kaskade eingreifen [118,127]. Durch eine Aktivierung und fortschreitende Rekrutierung von Immunzellen [196] führt dieses letztendlich zu einer Gewebsschädigung in Maus und Mensch [252]. Dieser Gewebsschaden wird in beiden Spezies durch die Kombination von reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen vermittelt [27,42,94,116,128,241]. Neutrophile Granulozyten (und auch Makrophagen) sind in Maus und Mensch bei der ROS-Freisetzung (sog. ‘*respiratory burst*’) abhängig von NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase (MPO) [6,42,125,176]. Als letzte Phase sollte die Wundheilung erläutert werden. Diese stellt eine insgesamt insuffiziente Abheilung einzelner Läsionen dar, da einerseits die Blasenbildung erneut an dieser und weiteren Hautstellen auftreten kann und bei der klassischen Variante auch Narben resultieren können [125].

1.3.4. Diagnose

Da die Klinik sehr variabel und ähnlich zu anderen BAID ist, wird Diagnose bzw. Differentialdiagnose mittels histologischen und labormedizinischen, insbesondere serologischen Untersuchungen gesichert. Die Routinehistologie mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E), DIF [132] und indirekter Immunfluoreszenz (IFF) sind in der Lage eine subepidermale BAID zu diagnostizieren, aber nicht eine weitergehende Differentialdiagnose zu stellen. Eine genaue Bestimmung der subepithelialen BAID sollte durch weitere nicht-Routinediagnostiken erfolgen. Einige Beispiele hierfür sind der COL7-spezifische Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder direkte Immunelektronenmikroskopie. Weitere Methoden finden sich in den aktuellen Diagnosekriterien der *International Bullous Disease Group* (IBDG) [181].

1.3.5. Therapie

Die Therapie der EBA wird mittels immunsuppressiver Pharmaka [199] sowie in selteneren Fällen per apparativer Therapie wie z. B. der Immunadsorption durchgeführt [126,130]. Weitere spezifischere Medikamentenkandidaten sind durch verschiedene Methoden entdeckt worden und befinden sich z.T. in Prüfung [24]. Die aktuelle Pharmakotherapie der EBA beinhaltet neben der obligaten Supportivtherapie (Wundpflege und -therapie sowie Strategien zur Traumavermeidung) [89] häufig systemische Kortikoide wie Methylprednisolon (mPSL), welches als erste Wahl in BAID verbreitet angewendet werden [204]. Auch wenn die Therapie hiermit zu signifikanten Verbesserungen der Symptome führen kann [110,246], ist die Therapie in einigen Fällen auch mit steroidensparender Komedikation nicht immer erfolgversprechend [62]. Besonders relevant

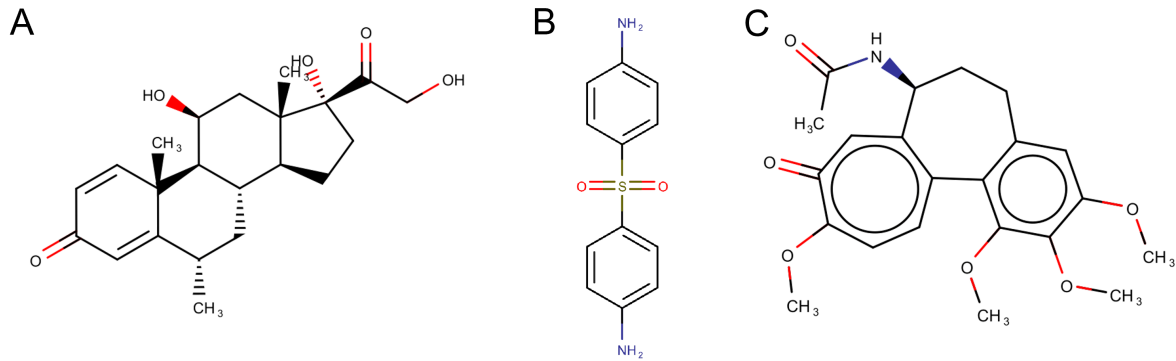


Abbildung 1.5.: Strukturformeln der untersuchten Medikamente **A** Methylprednisolon (erstellt nach [184]) **B** Dapson (erstellt nach [182]) **C** Colchicin (erstellt nach [21,183])

ist dieses aufgrund der starken Nebenwirkungen in der Langzeitsteroidtherapie wie z. B. Cushing-Syndrom, Diabetes mellitus Typ 2 oder Hypertonus [62, 89]. Die steroidensparende Komedikation kann und wird häufig mit den in dieser Studie verwendeten Colchicin und/oder Dapson vorgenommen, aber auch mit weiteren Immunsuppressiva wie z. B. Methotrexat, Cyclosporin A oder Azathioprin [62, 110, 122, 125, 204]. Aufgrund von Expertenmeinung wird Colchicin trotz geringer therapeutischer Breite auch als Erstlinientherapie für milde Fälle von EBA verwendet, da es bei vorsichtiger Dosierung relativ wenige UAW besitzt [49, 52, 62]. Etablierter scheint aber auch in milden Fällen eine Kombination mit Steroiden und weiteren Medikamenten wie z. B. Dapson [106]. Dapson wird zudem häufig in EBA-Patienten angewandt und wird auch auf Basis von Expertenmeinungen als sichere und effektive Erstlinientherapie bewertet [103, 122, 125]. Monotherapien mit einem der oben genannten Pharmaka sind in der EBA publiziert worden [49, 103, 105, 152, 237], aber gewöhnlich werden Kombinationstherapien bevorzugt [73, 105, 122].

Eine weitere therapeutischen Modulation stellen intravenöse Immunglobuline (IVIg) und einige bereits zugelassene spezifische Biologika dar [125, 189]. Besonders hervorzuheben ist der seit einiger Zeit bedeutender werdende Einsatz von IVIg und Rituximab, welche als einzige Pharmaka in einer Übersichtsarbeit von Koga et al. mit einer kompletten Remission der EBA assoziiert waren [125]. Es gibt experimentelle Ansätze zur personalisierten und antigenspezifischen Therapie von BAID mittels chimerischen Antigenrezeptor T-Zellen [23]. Weitere Medikamentenkandidaten sind durch verschiedene Methoden entdeckt worden und befinden sich z.T. in Prüfung und sogar eine kurative Therapie wird bereits für möglich gehalten [24]. Aktuell gibt es allerdings kein zugelassenes Immunsuppressivum, was Immunreaktionen antigenspezifisch supprimieren

1. Einführung und Fragestellung

kann [68]. Diese antigenunspezifische Therapie führt auch zur Suppression gewünschter Immunreaktionen und kann z.T. starke UAW, wie Kanzerogenität, opportunistische Infektionen oder ein Cushing-Syndrom haben [162, 163].

Methylprednisolon (mPSL)

Methylprednisolon (mPSL) (Abbildung 1.5. A) ist ein Glucocorticoid, welches sich vom endogenen Cortisol ableitet [67]. Aufgrund dessen ist es für die Zellmembranen gut permeabel. Es wirkt an intrazellulären Steroidrezeptoren als Transkriptionsfaktor, vor allem katabol auf den Proteinmetabolismus. Corticosteroide regulieren so z. B. bis zu 20 % aller in Leukozyten exprimierten Gene [166]. Glucocorticoide hemmen die proinflammatorische Zytokinproduktion von Lymphozyten und folglich auch die Interleukin (IL)-2-induzierte Zellproliferation von T-Lymphozyten, indem sie als Transkriptionsfaktoren die diverse proinflammatorische Genexpression beeinflussen. Als Beispiel dient hier der NF- κ B vermittelte Signaltransduktionsprozess. Die Folgen sind u.a. Hemmung der Vasodilatation und antiödematöse Wirkung durch Hemmung der Gefäßpermeabilität. Außerdem erfolgt eine Apoptoseinduzierung bei Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten durch Induktion von Endonucleasen, die Verringerung von Adhäsionsmolekülen mit der Folge von reduzierter Leukozytenmigration aber auch die Hemmung von Inflammationsspätfolgen wie Fibroblastenproliferation und somit auch Bindegewebsproliferation (Remodelling) [69, 166]. Besonders bei einer Langzeittherapie mit Überschreiten der sogenannten Cushing-Schwelle sind vielgestaltige Nebenwirkungen typisch [97]. Um die UAW zu minimieren und um idealerweise die Cushing-Schwelle zu unterschreiten wird bei Autoimmunerkrankungen versucht die Kortikosteroid-Therapie in der Regel mit anderen Medikamenten (z. B. zytotoxischen Pharmaka) zur Steroideinsparung kombiniert. Diese Medikamente können aber weitere bzw. andere UAW bedingen [164].

Dapson (4,4'-Diaminodiphenylsulfon, DDS)

Dapson ist ein Sulfon (Strukturformel Abbildung 1.5. B) und wurde zuerst 1908 von Fromm und Wittmann synthetisiert [72]. Erst später geriet Dapson bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten in den Fokus z. B. bei der Therapie der Lepra [34, 35, 250]. Der Wirkungsmechanismus als Antiinfektivum beruht auf der Hemmung der de-Novo-Synthese von Folsäure [48]. Darüber hinaus besitzt Dapson antiinflammatorische Eigenschaften [79], sodass es bei vielen verschiedenen inflammatorischen Hauterkrankungen und insbesondere bei BAID eingesetzt wird [197, 199]. Bei den BAID sind dies Pemphigus vulgaris, BP, lineare Immunoglobulin A Dermatose, Pemphigoid gestationis,

Dermatitis herpetiformis During und EBA [85, 200]. Dapson wirkt, wie im Folgenden gezeigt wird, auf neutrophile Granulozyten, welche für Gewebsschädigungen verantwortlich sein können (Kapitel 1.3.3.). Dieser Gewebsschaden wird durch ein Zusammenspiel von massiver ROS-Freisetzung und proteolytischen Enzymen [42, 241] auch in der EBA vermittelt [42, 94, 116, 128, 241]. Ein wesentliches Enzym der ROS-Generierung ist hierbei die MPO, welche in Neutrophilen aber auch in Monocyten/Makrophagen vorkommt [6, 176, 244]. Seit längerem ist eine Inhibierung des Myeloperoxidase-ROS-Halogenid Komplexes, verringerte Ausschüttung von ROS (*'respiratory burst'*) sowie eine reduzierte Zytotoxizität von Neutrophilen durch Dapson bekannt [32, 222, 257]. Dapson hemmt desweiteren die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an bestimmte Integrine [30], an IgG und IgA [229] sowie an die Epidermis [156]. Zusätzlich konnten inhibitorische Wirkungen durch Dapson auf Chemotaxis [53, 93, 250, 257], Synthese von verschiedenen Entzündungsmediatoren [54, 115, 250] nachgewiesen werden. Den vielen z.T. synergetischen Mechanismen, die eine Rolle an der antiinflammatorischen Eigenschaft des Dapsons haben können, stehen auch hier UAW gegenüber. Die bisher bekannten UAW sind Hämolyse, Kopfschmerzen und gastrointestinale Beschwerden [192]. Die Verträglichkeit ist aber in der Literatur insgesamt als gut beschrieben, was eine jahrelange Therapie möglich macht [70].

Colchicin

Colchicin, ist ein Alkaloid aus der Pflanze *Colchicum autumnale* (Strukturformel Abbildung 1.5. C) welches als Arzneimittel unter anderem bei Gicht zum Einsatz kommt [71]. Weiterhin wird es beim familiären Mittelmeerfieber (Mittel der Wahl), Morbus Behçet, chronische Urticaria, Leukozytoklastische Vaskulitis und EBA verwendet [52]. Zwar ist Colchicin bei der EBA als eines der etablierten Pharmaka beschrieben [199], allerdings gibt es nur wenige Fallbeschreibungen von erfolgreichen Monotherapien mit Colchicin bei EBA [2, 49, 152]. Der vollständige molekulare Wirkmechanismus des Colchicins ist nicht vollständig bekannt. Gesichert ist aber eine inhibitorische Wirkung auf die Polymerisierung der Mikrotubuli [71]. Diese haben wichtige Funktionen beim intrazellulären Transport und auch bei der Mitose von Zellen [84]. Werden diese nun gehemmt, folgt eine reduzierte Phagozytoseaktivität in Leukozyten und eine Reduktion der Migration eben dieser in inflammatorische Bereiche, aber auch eine Inhibierung Interleukinsynthese [71]. Colchicin beeinflusst die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und senkt die Serumkonzentrationen von IL-1b und IL-2 [2], ferner hemmt es die Antikörpersekretion aus Plasmazellen [5] und die interferoninduzierte Expression

1. Einführung und Fragestellung

von HLA-DR [154]. Allerdings ist Colchicin teratogen, was einen besonderen therapeutischen Hinweis darstellt. [71]. Colchicin wird des Weiteren über Cytochrom P₄₅₀ 3A4 (CYP3A4) metabolisiert und besitzt daher eine breite Möglichkeit von Arzneimittelinteraktionen [71]. Der Einsatz erfolgt auch bei einigen BAID wie Dermatitis herpetiformis (Duhring), IgA-Pemphigus und eben der EBA [200]. In einzelnen Kasuistiken wird es als erfolgreich und verträglich beschrieben [49, 152]. Engineer et al. bewerteten in einer Übersichtsarbeit die Effektivität und Verträglichkeit dieser Einzelfälle positiv, stellten aber klar, dass eine Evaluation anhand weniger Fälle schwierig ist, sodass hier weitere Evidenz wünschenswert ist [62].

1.4. Tiermodelle

1.4.1. Mausmodelle der EBA mit mCol7^{vWFA2}

Wie in Kapitel 1.3.3. beschrieben, sind Tierversuche maßgeblich am bisherigen Erkenntnisgewinn bei der EBA-Pathogenese beteiligt. Im Allgemeinen ist die Maus ein guter Modellorganismus in biomedizinischer Erforschung menschlicher Pathophysiologien [47, 146]. Auch wenn sich das Aussehen von Maus und Mensch sehr stark unterscheidet, sind murine Genetik [61], Physiologie, Organfunktionen und biochemische Abläufe nahe verwandt mit den humanen Gegenstücken [191]. Weitere Gründe für die Maus sind rein praktischer Natur, so sind eine geringe Größe, ein kurzer Reproduktionszyklus, eine einfache Handhabung ein Vorteil und letztendlich auch ökonomische Gründe [47, 146, 223]. Ein weiterer Grund für die Maus ist die Möglichkeit Inzuchtstämme zu generieren und langfristig fortzuführen. Diese zeichnen sich durch eine nahezu 100%ige genetische Identität aus, wodurch die phänotypische Varianz minimiert und die Reproduzierbarkeit einfacher erreicht wird [147]. Allerdings zeigen Studien verschiedener Fachgebiete wie z. B. Pharmakokinetik oder Schmerzforschung, dass Tier und Mensch so unterschiedlich sind und keine direkte Übertragung auf den Menschen zulassen [90, 91, 157]. Es gibt bereits Unterschiede in den Ergebnissen zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies [64, 92, 123], z. B. auch in der EBA [195]. Auch daher wird kontrovers diskutiert in wie weit die Ergebnisse aus Tierversuchen eine Wirkung im Menschen voraussagen können [249]. Mausmodelle werden bei der Entwicklung von Pharmaka den randomisiert kontrollierten Studien (RCTs) vorgeschaltet, dabei zeigten mehrere Studien zu antiinflammatorischen Pharmaka eine geringe Erfolgsrate [210]. In fast 150 dieser RCTs wurden antiinflammatorische Wirkstoffkandidaten getestet, die Versuchstieren tatsächlich einen Benefit brachten, im (kritisch kranken) Patienten aber

versagten [210].

Bei der EBA sind im Mausmodell sowohl Antikörpertransfer- als auch Immunisierungs-induzierte Modelle etabliert. In dieser Arbeit wurde ein zum Zeitpunkt der Versuche gerade neu etabliertes Modell auf Grundlage des mCol7^{vWFA2}[140] als Epitop verwendet. Dieses ist die Weiterentwicklung von Iwata et al. [109] des von Sitaru et al. [217] entwickelten Modells. Der Vorteil des mCol7^{vWFA2} gegenüber dem Rekombinantes Kollagen VII aus NC1-Domäne mit den Aminosäuren 757 bis 967 (mCOL7C) ist, dass nun bedingt durch die neuere Aufreinigung nur das Zielprotein vorliegt und kein Gluthatione-S-Transferase (GST). Dieses liegt im Vorgängermodell neben dem Zielprotein bei der Immunisierung vor und ist auch immunogen. Darüber hinaus ist nicht geklärt welche weiteren Effekte das GST haben kann. Die Immunisierungseffizienz und Krankheitsschwere in SJL-Mäusen beim murine Kollagen Typ VII (mCOL7c)-Modell ist mit 82,8 % und ca. 2,0-2,5 % betroffener Körperoberfläche (KOF) (n=29) unterhalb der des mCol7^{vWFA2}-Modells mit einer Effizienz von 100 % und ca. 7-8 % betroffener-KOF (n=16) [109, 217]. Zudem wird im Originalpaper eine Immunisierung sowie drei Boost-Immunisierungen benötigt [217]. Erst in einer späteren Veröffentlichung ist nur noch eine Immunisierung notwendig, die eine mit dem Col7^{vWFA2}-Modell vergleichbare Krankheitsschwere hervorruft [88].

Für die auf Col7^{vWFA2} basierenden EBA Modelle wurde in dieser Arbeit auf ein Antikörpertransfer-induziertes und ein Immunisierungs-induziertes Mausmodell zurückgegriffen, welche im Folgenden erläutert werden. Zu erwähnen ist, dass die experimentelle EBA im Mausmodell mit Inflammationen einhergeht. Im Menschen ist die nicht-inflammatorische klassische mechanobullöse EBA aber der verbreitetere Typ. Das Mausmodell besitzt hier eine Ungenauigkeit, indem es die nicht-klassische Variante abbildet.

1.4.2. Anti-mCol7^{vWFA2} Antikörpertransfer-induziertes EBA-Mausmodell

Beim Antikörpertransfer werden Kaninchen aktiv mit mCol7^{vWFA2} und einem Adjuvans immunisiert. Die daraus resultierenden Antikörper gegen mCol7^{vWFA2} werden aus Kaninchenserum aufgereinigt und können dann den Mäusen injiziert werden (Abbildung 1.6.). Im Gegensatz zum Kaninchen handelt es sich für die Maus um pathologische Antikörper. Diese lagern sich an der DEJ ab und führen zur Immunreaktion, Inflammation

1. Einführung und Fragestellung

mation und letztendlich zur typischen Klinik der EBA (Kapitel 1.3.2.) [25, 219, 248].

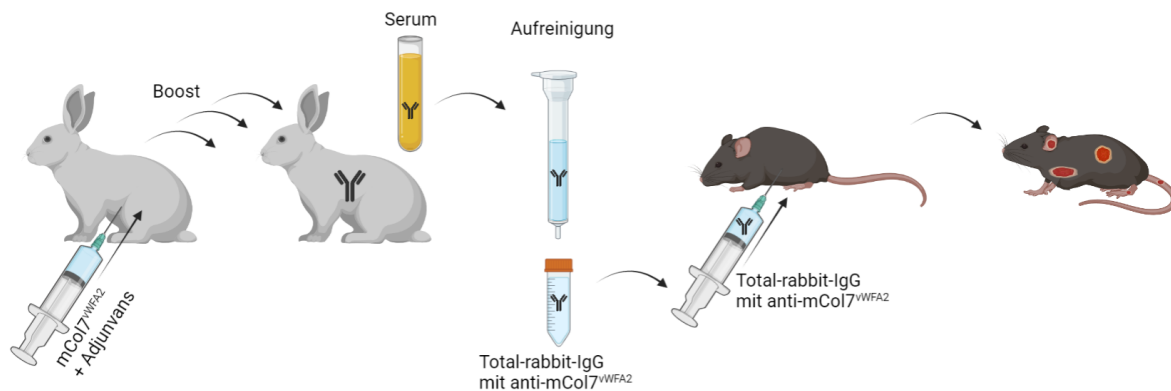


Abbildung 1.6.: Schematische Darstellung des Antikörpertransfers Das mCol7^{vWFA2} wird Kaninchen zusammen mit einem Adjuvans s.c. injiziert, es folgen 3 Boostimmunisationen an Tag 14, 28 und 56. Die Kaninchen reagieren mit Antikörperbildung gegen mCol7^{vWFA2}. Nach Blutentnahme wird das Serum per Zentrifugation gewonnen. Das Gesamte IgG des Serums wird über eine Protein-G-Säulenchromatografie aufgereinigt. Das so entstandene Gesamt-Kaninchen-IgG mit Anti-mCol7^{vWFA2}-IgG wurde zur Induktion einer experimentellen EBA genutzt, wie in Kapitel 2.8. dargestellt [111]. (Die Grafik wurde mit Biorender.com erstellt.)

Vor- und Nachteile des Antikörpertransfermodells der EBA

In Antikörpertransfermodellen lassen sich Therapien deutlich schneller bewerten, da die klinische Manifestation der EBA nach ca. vier Tagen eintritt und nicht erst nach mehreren Wochen, wie z. B. bei der Immunisierungs-induzierten EBA. Weiterhin können die Mechanismen von Antikörperproduktion und Verlust der Toleranz nicht evaluiert werden, sodass therapeutische Wirkungen auf die Effektorphase beschränkt sind. Dieses stellt einen Nachteil des Modells für Therapieevaluation dar [108]. Die klinische Manifestation hält sich ohne weiteren Antikörpertransfer zudem nur für wenige Tage, sodass in dieser Arbeit der Score ab dem 12. bis 14. Tag wieder abnimmt. Trotz aller Homologien zwischen Mensch und Maus unterscheiden sich die Interaktionen verschiedener Immunzellen und auch die Signaltransduktion zwischen Maus und Mensch [125], sodass die Situation im Menschen nicht vollständig durch die in der Maus wiedergegeben werden kann [22, 108]. Ein weiter Vorteil ist hier aber die Anwendbarkeit der Antikörpertransfer-induzierten EBA in den autoimmunitätsanfälligen erweiterten Kreuzungslinien (*autoimmune prone advanced intercross line*) (AIL)-Mäusen. Dr. H. Iwata konnte als Konzeptüberprüfung zeigen, dass ein Antikörpertransfermodell mit Col7^{vWFA2} hohe Inzidenzen an EBA erbringen kann (unveröffentlichte Daten Anhang A.5.). Später wurde aus dieser Grundlage ein Bestandteil unserer Veröffentlichung mit

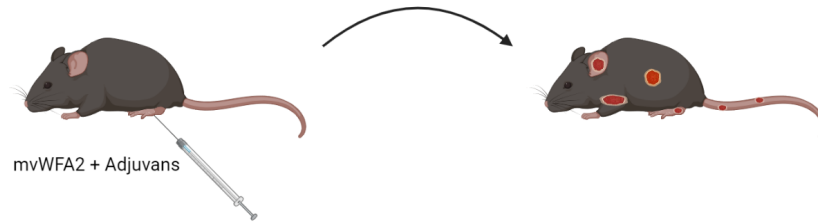


Abbildung 1.7.: Prinzip der Immunisierung mit $mCol7^{vWFA2}$, Immunisierung mittels des rekombinant hergestellten $mCol7^{vWFA2}$ und dem Adjuvans TiterMax in die Fußsohlen der Maus. Nach 4 Wochen sind beginnende Hautläsionen erkennbar, nach 6-7 Wochen erfolgt eine Therapie für 4 Wochen.

Dr. Iwata als Erstautor, worin die Anwendbarkeit in den AIL-Mäusen dann publiziert wurde [111].

1.4.3. $mCol7^{vWFA2}$ -Immunisierungs-induziertes EBA-Mausmodell

In diesem Modell werden die Mäuse mit $mCol7^{vWFA2}$ und einem Adjuvans immunisiert (Kapitel 2.9. und Abbildung 1.7.) Dieses ist eine nähere Nachbildung der humanen EBA-Pathogenese als lediglich beim Antikörpertransfer, da die gesamte Pathogenese neben der efferenten Phase auch inkl. der afferenten Phase ausgelöst wird [25].

Vor- und Nachteile des Immunisierungs-induzierten EBA-Mausmodell

Immunisierungs-induzierte Mausmodelle zeichnen sich durch die Abbildung von großen Teilen der EBA-Pathogenese aus, mit der Einschränkung, dass Selbsttoleranzverlust durch das Adjuvanz artifiziell hervorgerufen wird und nicht durch andere Umweltfaktoren. Dieses ermöglicht auch eine Untersuchung von längeren Therapien (vier Wochen) sowie deren Folgen, da nach einmaliger Immunisierung die EBA langanhaltend und nicht von Antikörperinjektionen abhängig ist. Nachteilig ist, dass dieses komplexe System aufgrund von mehr potentiellen Störgrößen (wie z. B. der Herstellung einer Antigen-Adjuvans-Emulsion) der Pathogenese störanfälliger ist, als bei der Verwendung von vorliegenden Antikörpern. Zudem ist im Vergleich zum Antikörpertransfermodell die Versuchsdurchführung im Immunisierungs-induzierten Modell länger und damit aufwändiger [25].

1.5. Fragestellung

Die bisherige humane Evidenz zur EBA stammt aus Einzelfallberichten, ergänzt durch wenige retrospektive Studien von Fallberichten. Kasuistiken sind und bleiben unverzichtbar in der Medizin, schließlich konnten wegweisende Übersichtsarbeiten Kenntnisse zur EBA zusammenfassen. Die aktuell etablierte Therapie beruht aber auf Expertenmeinungen retrospektiver Fälle, welche in einer jüngeren Meta-Analyse untersucht wurde. Diese ist zwar aktuell die beste verfügbare Evidenz nach den Kriterien der Evidenz-basierten Medizin, trotzdem werden für eine bessere Evidenz prospektive Therapiestudien dringend benötigt. Für eine allgemeine Therapieempfehlung sind insbesondere RCT erstrebenswert, allerdings sind diese meines Wissens aufgrund der geringen Inzidenz von $<0,5$ Neuerkrankungen pro Jahr und pro 1.000.000 Einwohner aktuell nicht verfügbar. Es ist auch unwahrscheinlich, dass diese in naher Zukunft durchgeführt werden können. Ein mögliches Studiendesign einer solchen hypothetischen RCT würde entweder mit der Evaluation von Monotherapien im ersten Schritt beginnen müssen oder mehr Patienten für direkte Kombinationstherapien benötigen. Erstere Möglichkeit ist ethisch nicht vertretbar und im Gegensatz zur Deklaration von Helsinki, nicht zuletzt weil sich eine Placebokontrolle verbietet. Für eine hypothetische Studie in Kombinationstherapie ist die Inzidenz der EBA zu gering, um ausreichend Patienten hierfür gewinnen zu können. Kurz gesagt, die Therapie einer EBA ist bisher schwierig, unzufriedenstellend und auf kasuistischer Expertenmeinung beruhend.

Diese Arbeit beschäftigt sich prospektiv mit der Evaluation der 'etablierten' Therapeutika mPSL, Dapson sowie Colchicin in zwei EBA-Mausmodellen. Dieses hat das Ziel, die herausfordernde Therapie der EBA zu verbessern. Die Maus hat, wie oben dargelegt, diverse Vorteile als Stellvertreter, aber auch Nachteile. Zur Untersuchung der Medikamente wurde im ersten Schritt ein Auszuchtstamm verwendet. Diese AIL-Mäuse sind heterogener und damit eher mit einer menschlichen Population zu vergleichen als ein Inzuchtstamm. Der Einsatz der AIL-Mäuse musste in der Antikörpertransfer-induzierten EBA erfolgen, da diese für eine Immunisierungs-induzierte EBA nicht ausreichend suszeptibel sind. Die Antikörpertransfer-induzierten EBA bildet aber nur einen Teil der Pathogenese ab und damit könnten potentielle Interaktionen der Medikamente an der Pathogenese, wie z. B. bei der Antikörperbildung, unerkant bleiben. Deshalb folgte eine Untersuchung an dem Inzuchtstamm B6.SJL-H2s C3c/1CyJ im Immunisierungs-induzierten Modell. Hierbei können, bis auf den artifiziell induzierten Verlust der Toleranz, alle Bestandteile der Pathogenese untersucht werden. Die B6.SJL-H2s C3c/1CyJ-

Mäuse sind als Inzuchtstamm ‘hochstandardisierte Organismen’. Damit geht einher, dass die Ergebnisse schlechter auf den Menschen übertragbar sind. Bei Anwendung beider Modalitäten, so die Hypothese, lassen sich gegebenenfalls Ergebnisse erhalten, die sich kombinieren lassen. Die Anwendung erfolgt in EBA-Modellen auf Grundlage von mCol7^{vWFA2} als ein immundominantes Epitop des murinen Kollagen Typ VII (mCOL7). mCol7^{vWFA2}-Modelle sind zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung sehr neu, bieten aber Vorteile gegenüber den Modellen auf Basis des mCOL7C.

Zusammenfassend macht die retrospektive Evidenz der sehr seltenen EBA und die Ermangelung von RCTs oder ausreichender Patientenzahlen für diese eine Therapie der EBA herausfordernd. Daher scheint die Kombination zweier neuer EBA-Mausmodelle zur prospektiven Therapieevaluation eine gute Möglichkeit zu sein, um bisherige Therapiekenntnisse zu erweitern.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verwendete Tiere

Die Tiere (ausschließlich Hausmaus, *Mus musculus musculus*) wurden in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten. Alle Mäuse wurden unter den spezifischen experimentellen Standardbedingungen gehalten. Das bedeutet die Haltung in spezifisch-pathogenfreier Umgebung, mit einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus und Versorgung mit Standard-Mausfutter (#1320 Altromin Spezialfutter GmbH) sowie angesäuertes Trinkwasser jeweils ad libitum. Außerdem wurden die Tiere täglich durch tierpflegerisches Fachpersonal versorgt. Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse zwischen fünf und zehn Wochen alt. Die Immunisierungen, Bestimmung des Scores, Fotografien und Tötungen erfolgten unter intraperitoneal applizierter Narkose mit einem sterilfiltrierten ($0,45\ \mu\text{m}$) Gemisch aus Ketamin (100 mg/ml) und Xylazin (15 mg/ml). Dabei wurde eine Dosis von $10\ \mu\text{l/g}$ Körpergewicht verwendet. Die Tiere wurden zweimal wöchentlich gewogen um die Medikamente zu dosieren und um starke Abnahmen des Körpergewichts als Stressindikator zu erkennen (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 2.1.: Verwendete Mausstämme

Tiere	Bezugsquelle
Maus Inzuchtstamm B6.SJL-H2s C3c/1CyJ	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA Stocknummer: 000966
Maus Auszuchtstamm AIL [142, 238]	Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie, Lübeck, Deutschland

Die Genehmigung zur Durchführung des Versuchsvorhabens als Teilprojekt des AZ 78-7/10 (Anhang A.4.) erfolgte nach Begutachtung durch die Tierschutz-Ethikkommission des damaligen Ministeriums für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume in Kiel. Die folgenden Tierversuche wurden von mir als zertifiziertem Fachpersonal (A.3. im Anhang) durchgeführt. Bei den in den Versuchen verwendeten Tieren handelte es sich um Mäuse aus der internen Zucht des Lübecker Instituts für Experimentelle Dermatologie in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck. Die Tiere der

AIL-Gründerstämme [142, 238] wurden vom Institut bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Für den Stamm B6.SJL-H2s C3c/1CyJ wurden initial Embryonen von The Jackson Laboratory zur fortlaufenden internen Zucht gekauft. Alle Tiere wurden vom Institut für experimentelle Dermatologie in der Gemeinsamen Tierhaltung als Linie etabliert und die Tiere aus den Zuchten für die nachfolgenden Versuche verwendet. Im Antikörpertransfer-induzierten Modell verwendete ich AIL-Mäuse der Generation 14, 16 und 19. Diese bekam ich freundlicherweise von Prof. Ibrahim zur Verfügung gestellt. Eine sogenannte ‘AIL’ ist eine sequentielle und zufällige Kreuzung von mindestens zwei verschiedenen Mausstämmen unter Vermeidung von Verwandtenkreuzungen um genetische Charakteristika zu untersuchen [51]. Die Kreuzungen erfolgten mit gleichen Stamm- und Geschlechtsanteilen sowie unter Vermeidung von Verwandtenkreuzung analog zu Ludwig et al [142] mit mindestens 50 Zuchtpaaren pro Generation [142, 221, 238].

Die AIL in dieser Arbeit entstand aus den vier ‘Gründerstämmen’ MRL/MpJ, NZM-2410/J, BxD2/TyJ und Cast/EiJ. Drei der Gründerstämme neigen zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen. So können BxD2/TyJ spontan Autoantikörper, Arthritis und Glomerulonephritis entwickeln [160]. NZM2410/J sind anfällig für eine Lupus-Nephritis [158]. Die MRL/MpJ entwickeln mehrere Autoimmunitäten wie Arthritis, Arteritis, Glomerulonephritis und Pankreatitis und besitzen eine T-Zell Dysfunktion [114]. Der Cast/EiJ-Stamm ist als von Wildtieren abgeleiteter Stamm genetisch heterogener als die restlichen Gründerstämme [119]. Alle Gründerstämme sind empfänglich gegenüber einer experimentellen EBA mittels Antikörpertransfer [195]. Die Cast/EiJ-Mäuse sind als einziger Gründerstamm nicht suszeptibel gegenüber einer Immunisierungs-induzierten EBA [142]. In diesem Umfeld diverser Suszeptibilitäten für Autoimmunität in MRL/MpJ, NZM2410/J und BxD2/TyJ sowie den Cast/EiJ als einem von Wildmäusen abgeleiteten Stamm mit komplexer genetischen Variabilität [119], entsteht mit der AIL eine heterogenere Population als es in Inzuchtstämmen möglich ist [142] und besitzt damit den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit zum Menschen.

2.2. Verwendete Geräte

In der folgenden Tabelle 2.2. sind die für diese Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

2. Materialien und Methoden

Tabelle 2.2.: Verwendete Geräte

Gerätename	Firma
Mikro20-Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Hettich Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Avanti J-E Hochgeschwindigkeitszentrifuge, 4 Liter Kapazität mit JA-10 Aluminiumrotor 6 x 500 ml	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Trockenschrank ED115	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Criterion™ Elektrophorese Set (Vertikale midi-Format Zelle, Tank, Kabel, Kassette, Kamm, Ladehilfe, Spannungsquelle Power Pac 300)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)-Zubehör Mini-Protean® 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Ultratiefkühltruhe ULT Freezer	CARLO ERBA Reagents GmbH, Emmendingen, Deutschland
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer 5436; comfort; Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Abzug captair chem	Erlab, Val de Reuil Cedex, Frankreich
ÄKTApurifier™10 (inkl. CU-905, Frac-950, Mixer M-925, Monitor UV-900, Monitor pH/C-900, Pump P-903, Valve INV-907, Valve PV-908 und Superloop, 50ml)	GE Healthcare, Boston, USA
Bio-Vortex V1	Hassa-Laborbedarf, Lübeck, Deutschland
Mikrotiterplattenrüttler Heidolph TitraMax	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Reac 2000 Vortex	Heidolph, Schwabach Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
LaminAir HB 2448 Workbench	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
French-Press <i>Cell Disrupter</i> 40K	IEC-Thermo, Rockford, USA
Spektralphotometer V550 UV/VIS	JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
Waage EMB 220-1	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Waage KERN GJ 610-2M	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000E	KEYENCE DEUTSCHLAND GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland

Labor-Arbeitsstation Biowizard Workbench	Kojair, Vilppula, Finnland
Wasserbad	Köttermann-Labortechnik, Uetze, Deutschland
Mikrotom A550	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin Einbettungsstation TES Valida	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB 45	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Entwässerungsautomat TPC 15 Duo	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
New Brunswick Innova 4330 Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA
Feinwaage Analytical Plus	OHAUS, Parsippany, USA
Waage AdventurerTM	OHAUS, Parsippany, USA
Waage Precision Standard	OHAUS, Parsippany, USA
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Plattenlesegerät <i>Platereader</i> Victor 3	Perkin Elmer, Waltham, USA
Testplattenmischer TPM 4	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Vortex-Genie 2	scientific Industries, Bohemia, USA
Autoklav Laboklav MSV 55	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
Vortex	snijders scientific, Tilburg, Niederlanden
Heizrührplatte CB162	Stuart, Staffordshire, UK
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Autoklav 3850 ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
pH-Meter pH 330	WTW, Weilheim, Deutschland
pH-Meter pH562	WTW, Weilheim, Deutschland
	VWR Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.3. Verwendete Materialien

Die verwendeten Materialien sind in der Tabelle 2.3. aufgelistet.

Tabelle 2.3.: Verwendete restliche Materialien

Materialien und Chemikalien	Hersteller/Entwickler
Einmalspritze 1 ml, Injekt®-F, steril	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Omnican F 1 ml 30G	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
1 ml Spritze Luer-Lok-Tip	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Kanüle Microlance 3 26G	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Spritze mit -Ansatz 10 ml, steril	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Sprühpflaster	Beiersdorf, Hamburg, Deutschland
Mouse IgG ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA

2. Materialien und Methoden

Mouse IgG1 ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Mouse IgG2a ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Mouse IgG2b ELISA Quantitation Set	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Chromatografiesäule Econo-Column®	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Plastik-Pasteur Pipetten 1 ml/Einmal	BioSigma, Cona, Italien
Mikroemulsionsnadel <i>gauge</i> 18×, L2 7/8 in.	Cadence Science Inc., Cranston, USA
4 % Roti-Histofix	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) (Albumin Fraktion V, Biotinfrei, NZ-Origin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Membra-Cel Dialyseschlauch, MWCO 14,000	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol 99.9 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Plast Paraffin Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Weithalsflasche ROTILABO® GL 80 Klarglas, 500 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PAP-Pen Dako® Pen S2002	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenz-Einfassmedium (<i>Fluorescence mounting medium</i>)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
mCol7 ^{vWFA2}	Eigene Herstellung im Labor des Instituts für Chemie, Universität zu Lübeck nach Leineweber et al. [140]
mCol7 ^{vWFA2} Referenzprobe für SDS-PAGE	Erhalten von Dr. Iwata, hergestellt im Labor des Instituts für Chemie, Universität zu Lübeck von und nach Leineweber et al. [140]
Combitips 0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 12,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Dispenserpipette Multipipette PLUS	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipetten, Multipipetten 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 30-300 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten Research 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, ELISA-Tips 2-200 μ l, 20-300 μ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pellet der <i>E. coli</i> ER2566 mit klonierter Sequenz mCol7 ^{vWFA2}	Erhalten von Prof. Seeger, Institut für Chemie, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
Serum der mit mCol7 ^{vWFA2} immunisierten Kaninchen	Eurogentec, Belgien

2.3. Verwendete Materialien

Einmal-Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Protein G Säulenmaterial	GenScript Biotech, Leiden, Niederlande
pipetus-Pipettierhilfe	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pasteur-Glaspipette	Karl-Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Objektträger mit gesunder Maushaut	Labor LIED, Lübeck, Deutschland
Micromount Eindeckmedium	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Einbettungskassette Slimsette	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
LB Medium	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland
cOmplete® [®] , Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
EDTA Dinatriumsalz 0,1M	Roth, Eigeltingen, Deutschland
Ethanol 70 % vergällt	Roth, Eigeltingen, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Eigeltingen, Deutschland
Salzsäure 2M	Roth, Eigeltingen, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold® Kryoeinbettform Standard (4557)	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tissue-Tek® O.C.T. Kryoeinbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
End-to-End Kapillare 20µL K2E	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Filtopur V50 Filter	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Klebefolie, optisch-klar	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Safe-Seal-Gefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Schraubröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
CA-Membran 0,2 µm Filter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Polyethylenglykol 20000 (PEG)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TRIS (hydromethylaminomethan)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Carbenicillin Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Carbonat-Bicarbonat Puffer	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Eosin-G 1 %	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Hämatoxylin Lösung nach Mayer	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ketamin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

2. Materialien und Methoden

Na-HEPES	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumcarbonat, wasserfrei	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natronlauge 2M	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Schwefelsäure 1M (2N)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
TiterMax® Classic Adjuvant liquid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
TRIS HCl	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Tween 20 (Polysorbat 20)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Xylazin	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Xylol Histologische Qualität	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Axygen Versiegelungsfolien und Klebefolien für Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DWK Life Sciences Wheaton Färbeschale aus Glas für 20 Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Filtermembran, Spritzenaufsatz 0,45µm, steril	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Glycin 99%	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hecht Karl Färbepbank mit Glasschale	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Midi Gel Adapter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nunc MaxiSorp® ELISA Mikrotiterplatte hohe Proteinbindungskapazität	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Objektträger, Menzel Gläser mit Mattrand (20 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TRIS-Base	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Turbo-TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zentrifugen-Filtereinsätze, Amicon 10kDa, 30kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Demineralisiertes Wasser	UKSH Apotheke, Lübeck, Deutschland
Flüssigstickstoff	UKSH Apotheke, Lübeck, Deutschland
Trockeneis	UKSH Apotheke, Lübeck, Deutschland
Deckgläschen, quadratisch 18x18 mm	VWR Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.4. Verwendete Software

Die Tabelle 2.4. führt alle Softwares auf, welche beim Daten erfassen und verarbeiten verwendet wurden.

Tabelle 2.4.: Verwendete Software

Software name	Hersteller/Entwickler
Office 365	Microsoft, Redmond, USA
SigmaPlot 14.5	Systat, Erkrath, Deutschland
TeXstudio 3.1.2	Benito van der Zander, Jan Sundermeyer, Daniel Braun, Tim Hoffmann
GraphPad Prism 9.2.0	GraphPad Software, San Diego, USA
MarvinSketch 21.14	ChemAxon Ltd., Budapest, Ungarn
UNICORN 5.11	GE Healthcare, Boston, USA

2.5. Verwendete Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in der Tabelle 2.5. aufgelistet.

Tabelle 2.5.: Verwendete Puffer und Lösungen

Name (Methode)	Herstellung
LB Medium (IMPACT Twin) [170]	4 Kapseln LB Medium pro Liter deion. Wasser Autoklavieren bei 121°C und 2 Bar für 20 Min
B1 Puffer (IMPACT Twin) [170]	20 mM Na-HEPES, pH 8,5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA;
B2 Puffer (IMPACT Twin) [170]	20 mM HEPES, pH 6,5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA;
Bindungs Puffer (Protein G Chromatografie) [117]	20 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8,0; 150 mM NaCl;
Glyzinpuffer (Protein G Chromatografie) [117]	0,2 M Glycin, pH 2,8
Neutralisationspuffer (Protein G Chromatografie) [117]	1 M TRIS HCl, pH 9,0;
Lagerungspuffer Säulenmaterial (Protein G Chromatografie) [117]	20 vol% Ethanol in Bindungspuffer
Ketamin/Xylazin Lösung (Tieranästhesie) [117]	Abwiegen von 1,5 mg Xylazin Feststoff >99%/ml und 10 mg/ml Ketamin Feststoff und anschließend in deionisiertem Wasser lösen. Sterilfiltrieren mit 0,2µm

2. Materialien und Methoden

Laemmli Laufpuffer , 10x (SDS-PAGE) [117]	0,25 M TRIS-Base; 1,92 M Glycin; 1 % SDS; Mit demineralisiertem Wasser verwenden; Vor der Elektrophorese auf 1x verdünnen
Laemmli Ladepuffer , 2x (SDS-PAGE) [117]	126 mM TRIS HCl, pH 6,8; 20 % Glycerin; 4 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau
Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-buffered saline</i>) (PBS) , 1x [117]	Für 10fache Konzentration (10x); 450 g NaCl (1,37 M); 10 g KCl (27 mM); 87 g Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (100 mM); 9 g NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (20mM); Auf 5 l mit demineralisiertem Wasser auffüllen; Vor Gebrauch mit demineralisiertem Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnen
Beschichtungspuffer (ELISA) [17]	0,05 M Carbonat-Bicarbonat Puffer, pH 9.6
Waschlösung (ELISA) [17]	50 mM TRIS; 0,14 M NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 8,0
Blockungspuffer / Blockierungslösung (ELISA) [17]	50 mM TRIS; 0,14 M NaCl; 1 % BSA (Albumin Fraktion V, Biotinfrei, NZ-Origin); pH 8,0
PBST (ELISA) [117]	1 % Tween-20 in 1x PBS
Proben-/ Konjugatverdünnungslösung (ELISA) [17]	50 mM TRIS; 0,14 M NaCl; 1 % BSA (Albumin Fraktion V, Biotinfrei, NZ-Origin); 0,05 % Tween 20
Substrat (ELISA) [17]	Turbo-TMB-ELISA
Stopplösung (ELISA) [17]	0,18 M Schwefelsäure
DIF-Probenpuffer (Blocking/sampling buffer) (DIF) [117]	1 % BSA (Albumin Fraktion V, Biotinfrei, NZ-Origin) in PBST

2.6. Verwendete Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 2.6. aufgelistet.

Tabelle 2.6.: Verwendete Antikörper

Name	Hersteller
BD Pharmingen™ FITC Anti-Mouse IgG2a (553390)	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Pharmingen™ FITC Rat Anti-Mouse IgG1 (553443)	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Pharmingen™ FITC Rat Anti-Mouse IgG2b (553395)	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Goat Anti-mouse IgG-Fc HRP (A90-131P)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Goat Anti-Mouse-IgG1-HRP (A90-105P)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Goat Anti-Mouse-IgG2a-HRP (A90-107P)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Goat Anti-Mouse-IgG2b-HRP (A90-109P)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA

2.7. Methoden zur Herstellung des rekombinanten mCol7^{vWFA2}

Dako® FITC-conjugated polyclonal Swine anti-rabbit Ig (F0054)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Dako® Polyclonal Goat-anti-RabbitIgG HRP, (REF P0448)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
polyclonal goat anti-rabbit-IgG	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunglobulins FITC-konjugated	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Cappel™ Fluorescein-conjugated GOAT IgG to mouse complement C3 (855500)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland

2.7. Methoden zur Herstellung des rekombinanten mCol7^{vWFA2}

2.7.1. Proteingewinnung und Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie

Das rekombinante mCol7^{vWFA2} musste für die Immunisierungen in den Tierversuchen hergestellt und aufgereinigt werden. Dieses Protein ist die mCol7^{vWFA2}-Domäne des murinen Kollagen Typ VII (Abbildung 1.3.) mit einer Molekülmasse von 20,3kDa und hat folgende Aminosäuresequenz: ACS HGPVDVVFL HATRDNAHNA EAVRRVLERL VSALGPLGPQ AAQVGLLTYS HRPSPLFPLN SSHDLGIILR KIRDIPYVDP SGNNLGTAVT TAHRYLLASN APGRRQQVPG VMVLLVDEPL RGDILSPIRE AQTSGLVMA LSLVGADPEQ LRRLAPGTDP IQNFFAVDNG PGLDRAVSDL AVALCQAA [140]

Analog zu Leineweber et al. [140] erfolgte auch in dieser Arbeit die Gewinnung mittels *Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag-Two Intein* (IMPACT-TWIN) Protokolls von New England Biolabs (Abbildung 2.1.) [170]. Dafür wurde eine rekombinant hergestellte DNA-Sequenz in einem Vektor im *E. coli* ER2566 kloniert. Dieser Klon war bereits in LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin vermehrt worden und hatte das Zielprotein samt IMPACT-TWIN-System bereits durch Stimulation mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) exprimiert. Diese Bakteriensuspension war schon bei 4 °C und 3500 x g für 10 min zentrifugiert worden. Freundlicherweise wurde mir das so bereitete Pellet des *E. coli* ER2566 von Frau M.Sc. Sarah Schönig und Prof. Seeger aus dem Insitut für Chemie der Universität Lübeck zur Verfügung gestellt, sodass nur das vorhandene Protein aufgereinigt werden musste. Das Pellet

2. Materialien und Methoden

Nach Klonierung und Expression:

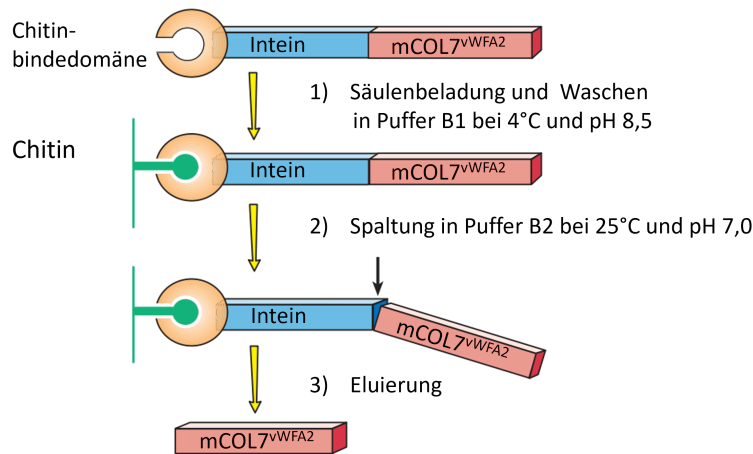


Abbildung 2.1.: Prinzip der Aufreinigung Nach Klonierung, Expression und Zellyse liegt das Protein in Lösung vor. Es besteht sequenziell aus einer Chitinbindedomäne, einem Intein und dem Zielprotein mCol7^{vWFA2}. Die Lösung wird in Puffer B1 bei 4°C und pH 8,5 auf die Säule beladen. Dort bindet die Chitinbindedomäne an das Säulenmaterial aus Chitin. Danach wird nicht gebundenes Material mittels Waschung mit Puffer B1 entfernt. Anschließend erfolgt ein Pufferwechsel auf den Puffer B2 bei 25°C und pH 7,0. Temperatur und pH-Wert entsprechen nun dem Optimum des Inteins und daher erfolgt eine enzymatische Abspaltung des Zielproteins mCol7^{vWFA2}. Dieses wird daraufhin eluiert und liegt nun purifiziert vor. (Abbildung modifiziert nach [170])

wurde daher von mir in 30ml Puffer B1 bei 4°C unter Zugabe von Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellyse in Puffer B1 unter Zusatz von 0,1 % Tween 20 mittels auf 4 °C gekühlter French-Press in drei Durchgängen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden für 30min bei 4 °C und 19000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Bestandteilen inkl. des Zielproteins wurde über eine Schleife, die sogenannte *superloop*, einer Vorrichtung zur Beladung einer pressurierten Säule mit großen Volumina, auf die Säule mit *Chitin-Beads* aufgetragen. Über eine Bindung der Chitinbindedomäne (CBD) an das Chitin im Säulenmaterial und anschließender Waschung mit Puffer B1 war es möglich, das Protein bestehend aus CBD, Intein und dem Zielprotein mCol7^{vWFA2} an das Säulenmaterial zu binden. Dann wurde die Säule, mit Puffer B2 (pH = 7,0) befahren und verblieb über Nacht bei 25 °C und pH 7,0 um die Selbstspaltungs-Reaktion (*self-cleavage*) des Inteins (27 kDa) ablaufen zu lassen. Das enzymatisch aktive Zentrum des Inteins trennte die Peptidbindung zum mCol7^{vWFA2} ab, welches fortan wieder gelöst war. Nach Elution lag das mCol7^{vWFA2} purifiziert in Puffer B2 vor.

Sämtliche im ÄKTApurifier™ verwendete Puffer, Lösungen und auch der Überstand

2.7. Methoden zur Herstellung des rekombinanten mCol7^{vWFA2}

wurden zuvor filtriert ($0,2\mu\text{m}$) um Beschädigungen des Gerätes durch Fremdkörper zu vermeiden. Im Gerät herrschte eine Temperatur von 4°C .

Insgesamt wurden auf diese Weise 3 Chargen mCol7^{vWFA2} aus 6 Aufreinigungen hergestellt. Es erfolgte ein Pufferwechsel mittels Dialyse auf PBS. Dazu wurde ein Membra-Cel Dialyseschlauch, MWCO 14,00Da mit dem gepoolten Eluat gefüllt und sequentiell mit dreimal 5 Liter PBS bei 4°C gegeben. Zuerst erfolgte dieses für 2 Stunden, dann über Nacht und anschließend für weitere 4 Stunden.

2.7.2. Überprüfung der Reinheit des purifizierten mCol7^{vWFA2} mittels SDS-PAGE

Das nun hergestellte mCol7^{vWFA2} musste nun auf Reinheit überprüft und bewertet werden. Dazu wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli benutzt [134]. Hierbei bilden die Proteine mit dem SDS einen negativ geladenen Komplex mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis und dabei unterbindet das SDS durch Denaturierung der Proteine weitere Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dies und der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix führen dazu, dass die SDS-Protein-Komplexe sich im elektrischen Feld nach ihren Molekulargewichten aufteilen [186].

Die SDS-PAGE wurde analog zu Kasprick et al. [117] durchgeführt mit dem kleinen Unterschied, dass kein 16 %iges Trenngel verwandt wurde. Wie in Kapitel 2.7.1. beschrieben, hat mCol7^{vWFA2} ein Molekulargewicht von 20,3kDa, daher wurde nach Rehm und Letzel ein 15 %iges Trenngel für Proteine mit 10–60 kDa benutzt [186]. Das purifizierte mCol7^{vWFA2} konnte nach einer Sterilfiltrierung mit $0,2\mu\text{m}$ zur Injektion verwendet werden.

2.7.3. Quantitative Proteinbestimmung mittels UV-photometrischer Methode

Als nächstes wurde die Konzentration der Proteinlösung photometrisch bestimmt, um eine genaue Dosierung zu ermöglichen. Ein zentraler Aspekt der Photometrie ist das Lambert-Beer'sche-Gesetz, welches auf der Grundlagenforschung von Bouger [31], Lambert [136] und Beer [13] beruht und die Abschwächung von Licht einer Wellenlänge in Abhängigkeit der Konzentration beschreibt. Daher besteht die Möglichkeit quantitati-

2. Materialien und Methoden

ver Bestimmungen, sofern der Analyt eine wellenlängenspezifische Absorption besitzt und dessen Extinktionskoeffizient als Materialkonstante bekannt ist. Die Konzentration kann dann mit folgender Formel bestimmt werden:[28, 80]

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

$$c = \frac{E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda} \cdot d} \quad (2.2)$$

E_{λ} : Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge

ϵ_{λ} : Extinktionskoeffizient (i.d.R. molar) bei einer bestimmten Wellenlänge $\left[\frac{l}{mol \cdot cm} \right]$

c : Konzentration $\left[\frac{mol}{l} \right]$

d : Schichtdicke $[cm]$

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden direkte UV-Photometrische Bestimmungen unter Berücksichtigung der spezifischen Aminosäuresequenz aus Kapitel 2.7.1. vorgenommen. Diese UV-Photometrische Methode wurde von Gill und Hippel erweitert und beruht auf der UV-Absorption insbesondere von aromatischen Aminosäuren, so dass jedes Protein einen spezifischen Koeffizienten besitzt. Der molare Extinktionskoeffizient ($\lambda = 280 \text{ nm}$) von mCol7^{vWFA2} wurde auf Grundlage der Aminosäuresequenz mit Expasy berechnet und beträgt $\epsilon_{280nm} = 4595 \frac{l}{mol \cdot cm}$. Ebenfalls angegeben ist, dass eine beispielhafte mCol7^{vWFA2}-Lösung mit einer Massenkonzentration von 1 mg/ml eine Extinktion von $E_{280nm} = 0,226$ besitzt (bei $d = 1 \text{ cm}$) (Daten im Anhang A.2.) [77, 83, 215].

Mit dem obengenannten Lambert-Beer'schen Gesetz (Formel 2.2.) kann aus der Beispielextinktion $E_{280nm} = 0,226$ die Konzentration berechnet werden:

$$\begin{aligned} c &= \frac{E_{280nm}}{\epsilon_{280nm} \cdot d} = \frac{0,226}{4595 \frac{l}{mol \cdot cm} \cdot 1cm} \\ &= 4,91846 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{l} \end{aligned}$$

Dies ist die Stoffmengenkonzentration. Die gewünschte Massenkonzentration β kann daraus mithilfe der molaren Masse $M = 20309,3 \frac{g}{mol}$ (Ebenfalls von Expasy Anhang

A.2.) wie folgt berechnet werden:[29]

$$\beta = \frac{m}{V} = \frac{m}{n} \cdot c = M \cdot c \quad (2.3)$$

$$= 20309,3 \frac{g}{mol} \cdot 4,91846 \cdot 10^{-5} \frac{mol}{l} \quad (2.4)$$

$$= 1,00 \frac{g}{l} \quad (2.5)$$

m : Masse [g]

V : Volumen [l]

M : molare Masse $\left[\frac{g}{mol} \right]$

Die UV-Photometrischen Messungen wurden mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 durchgeführt.

2.7.4. Pufferwechsel, Aufkonzentrierung, Sterilfiltrierung und Aliquotierung der mCol7^{vWFA2}-Proteinlösung

Das mCol7^{vWFA2} war nun aufgereinigt, per SDS-PAGE kontrolliert und lag in PBS vor. Da die Konzentration nicht die Zielkonzentration von 2 mg/ml für Injektionen hatte wurden diese aufkonzentriert. Dazu wurden Zentrifugen-Filtereinsätze mit Durchlässigkeiten von Molekülmassen von unter 10 kDa (Amicon 10 kDa) verwendet. Hiermit wurde bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert bis die gewünschte Konzentration von 2 mg/ml erreicht war. Anschließend erfolgte die Sterilfiltrierung per 10ml-Spritze mit einem Filtermembran-Spritzenaufsatz (0,45 µm) sowie eine Aliquotierung unter sterilen Bedingungen an einer Labor-Arbeitsstation zu jeweils 1,5 ml aliquotiert.

2.8. Das Antikörpertransfer-induzierte Modell

2.8.1. Immunisierung von Kaninchen mit mCol7^{vWFA2} und Affinitätschromatografie zur Aufreinigung von Gesamt-Kaninchen-IgG

Teile des hergestellten rekombinanten mCol7^{vWFA2} Batch#01 wurden an die Fa. Eurogentec in Belgien zur aktiven Immunisierung von Kaninchen und anschließenden Gewinnung von Blutserum verschickt. Dazu wurden Kaninchen (Weiße Neuseeländer) mit 250 µg (aus einer Lösung mit der Konzentration 2 mg/ml) und kompletten Freund-Adjuvans an Tag 0 immunisiert. Es erfolgten drei Boosterimmunisierungen an Tag

2. Materialien und Methoden

14, 28 und 56 von 250 μg (erneut aus einer Lösung mit der Konzentration 2 mg/ml) und einem inkompletten Freund-Adjuvans. Zwei Monate nach Immunisierung und in Folge alle 3 Wochen bekam ich anti-mCol7^{vWFA2}-haltige Seren, die bei -20 °C gelagert wurden. Die Kaninchenserum die ich von der Fa. Eurogentec erhalten hatte, wurden von mir über eine Protein-G Affinitätschromatographie zu Gesamt-Kaninchen-IgG mit anti-mCol7^{vWFA2} aufgereinigt. Dieses wird im Folgenden 'Immun-IgG' genannt. Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf einer hohen Selektivität der Substanz an einen trägergebundenen Liganden (stationäre Phase) [187]. Als Ligand wurde hier rekombinantes Streptokokken-Protein G verwendet. Dieses hat eine hohe Affinität zur Fc-Domäne von Antikörpern aller Subklassen des IgG [220]. Diese Adhäsion bzw. Wechselwirkung ist reversibel und kann wie in diesem Versuchsaufbau nach Änderung des pH-Wertes erfolgen[187].

Die Affinitätschromatographie wurde analog zur Beschreibung von Kasprick et al. [117] durchgeführt. Die Säule war bereits mit Protein-G-gekoppelter Agarose (Protein-G Säulenmaterial als stationäre Phase) beladen und in Ethanol 20 % bei 4°C eingelagert. Diese wurde sequentiell mit zwei Säulenvolumen PBS, einem Säulenvolumen Glycinpuffer, einem Säulenvolumen 1M NaCl-Lösung, erneut mit zwei Säulenvolumen PBS und letztendlich mit zwei Säulenvolumen Bindungspuffer gespült, sodass sie wieder einsatzbereit waren. Das Säulenvolumen betrug jeweils 70ml. Hiernach wurden je 50ml Serum auf die Säulen gegeben. Leere Serumflaschen wurden mit Bindungspuffer gespült und restliches Serum quantitativ in die Säule überführt, welche verschlossen und bei 4°C auf einem Rüttler (Geschwindigkeit 3) für 2,5 Stunden inkubiert wurde. Danach wurde das Serum abgelassen und aufgefangen. Damit die Säule nicht trocken lief, wurde Bindungspuffer nachgefüllt. Anschließend wurde die Säule mit ca. 500ml Bindungspuffer gespült bis zur $\text{OD}_{280\text{nm}} < 0,1$. 3ml Neutralisationspuffer wurden in eine saubere 500ml Weithalsflasche vorgelegt. Hierin wurde das IgG mit Glycinpuffer (Ansäuerung führt zur Ligandenablösung von der Säule) bis $\text{OD}_{280\text{nm}} < 0,05$ eluiert. Die Säule wurde dabei mit Glycin-Puffer aufgefüllt, damit das Säulenmaterial nicht trocken läuft. Der pH-Wert im Eluat wurde mit Neutralisationspuffer auf 7,4 eingestellt. Die Säule wurde für den nächsten Durchgang vorbereitet, indem sie mit mit Glycinpuffer bis $\text{OD}_{280\text{nm}} < 0,01$ gespült wurde. Danach erfolgte eine Spülung mit je einem Säulenvolumen 1M NaCl-Lösung und Bindungspuffer. Der Vorgang wurde wiederholt bis 20 Serumflaschen (Serumvolumen 25-35ml) aufgereinigt waren. Das Eluat (pH 7,4) der verschiedenen Durchgänge wurde gepoolt und in einen mit demineralisiertem Wasser angefeuchteten Dialyseschlauch gefüllt. Dieser wurde gut verschlossen und

mit PEG für 1,5 Stunden bedeckt. PEG nimmt als hygroskopische Substanz Wasser aus dem Dialyseschlauch auf und sorgt so für eine Aufkonzentrierung des IgGs. Anschließend wird der Dialyseschlauch gereinigt und abgespült. Danach erfolgte ein Pufferwechsel auf PBS, indem der saubere Dialyseschlauch mit dem aufkonzentrierten IgG in PBS dialysiert wurde. Dafür wurde der Schlauch drei mal in jeweils frischem 5L PBS-Puffer für 2 Stunden, dann über Nacht und anschließend für 4 Stunden eingelegt. Hiernach wurde der Inhalt des Dialyseschlauchs in vier 50 ml Saerstedt Schraubröhrchen aufbewahrt und mittels eines Amicon 10K 3,220 x g für 15-20 min bei 4 °C unter mehrfachen Konzentrationsbestimmungen zentrifugiert bis 25 mg/ml erreicht waren. Als quantitativer Nachweis wurde die OD_{280nm} einer 1:50 verdünnte Probe des Eluats in PBS bestimmt. Analog zu Kapitel 2.7.3. benötigt IgG als Protein eine spezifische Korrektur in der UV-Photometrie. Die OD_{280nm} wurde durch die spezifische Korrektur des Kaninchen-IgGs von 1,35 dividiert [117]), um die Konzentration zu erhalten. Die Konzentration wurde auf 25 mg/ml eingestellt, aliquotiert (1,5 ml entspricht 15 Injektionen) filtriert (0,20 µm) und bei -20 °C gelagert.

2.8.2. Titerkontrolle des Immun-IgG mittels indirekter Immunfluoreszenz

Ich führte vor dem Antikörpertransfer eine Titerkontrolle des Immun-IgGs mittels indirekter Immunfluoreszenz durch. Dazu werden Gefrierschnitte von Hautproben einer gesunden Maus mit dem Immun-IgG inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper versetzt. Sofern signifikante Mengen des spezifischen Antikörpers gegen mCol7^{vWFA2} im Immun-IgG vorhanden sind, ist dies bei der Fluoreszenzmikroskopie an einer linearen Fluoreszenz im Bereich der DEJ erkennbar. Dazu wurde das Immun-IgG aus 2.8.1. 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600 und 1:51200 mit PBS verdünnt. Jeweils 25 µl hiervon wurden auf vorgefertigte Objektträger mit je einem Gefrierschnitt von gesundem murinen Hautgewebe gegeben und für 45min inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurde im nächsten Schritt mit 25 µl des 2. Antikörpers (*Dako®FITC-conjugated polyclonal Swine anti-rabbit-Ig, F0054*) für 30 min inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS (drei Mal) wurde das Gewebe fluoreszenzmikroskopiert. Eine lineare Fluoreszenz der DEJ wurde als positive Antikörperablagerung an der DEJ gewertet. Die höchste Verdünnungsstufe bei der noch eine positive Fluoreszenzablagerung an der DEJ festgestellt wird, gibt den Titer an.

2.8.3. Durchführung des Antikörpertransfer-induzierten Modells

Tabelle 2.7.: Behandlungsgruppen im Antikörpertransfer-induzierten Modell Die Tabelle listet die Applikationsform, die Konzentration, das verwendete Volumen und das zeitliche Intervall der einzelnen Behandlungsgruppen auf.

Medikament	Applika- tionsform	Konzentration	Volumen	Intervall
PBS (Kontrolle)	i.p.	-	80 μ l	täglich
Dapson	i.p.	34 mg/kg	max. 100 μ l	täglich
Colchicin	oral	1 mg/kg	max. 100 μ l	wöchentlich sonst PBS täglich oral
Methylprednisolon	i.p.	30 mg/kg	max. 100 μ l	täglich

Das Antikörpertransfer-induzierte Modell der EBA, welches in Kapitel 1.4.1. vorgestellt wird, wurde hintereinander an 3 verschiedenen Generationen von AIL-Mäusen verwendet. Die Tabelle 2.7. listet alle angewandten Behandlungen auf. In Generation G14 wurden nur eine Kontrollgruppe und eine Methylprednisolongruppe untersucht. In den Generationen G16 und G19 gab es neben der Kontrollgruppe eine Dapson- und eine Colchicingruppe.

Je 2,5mg des Immun-IgG aus Kapitel 2.8.1. wurde den AIL-Mäusen an Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10 i.p. injiziert. Die Therapie nach den in Tabelle 2.7. aufgelisteten Behandlungsgruppen mit den darin genannten Dosen erfolgte täglich. Die Bestimmung der von EBA-Läsionen betroffenen Körperoberfläche (Kapitel 2.10.1.) erfolgte an Tag 0, 4, 8, 12, 16 und 20. Zusätzlich wurden an Tag 12 und 20 klinische Fotografien der Mäuse angefertigt und an Tag 20, dem Endpunkt, erfolgte zudem eine Blutabnahme (optional für Antikörper-ELISAs falls erforderlich), Tötung und die Ohrentnahme für die DIF. Der Ablauf ist in Abbildung 2.2. noch einmal schematisch dargestellt.

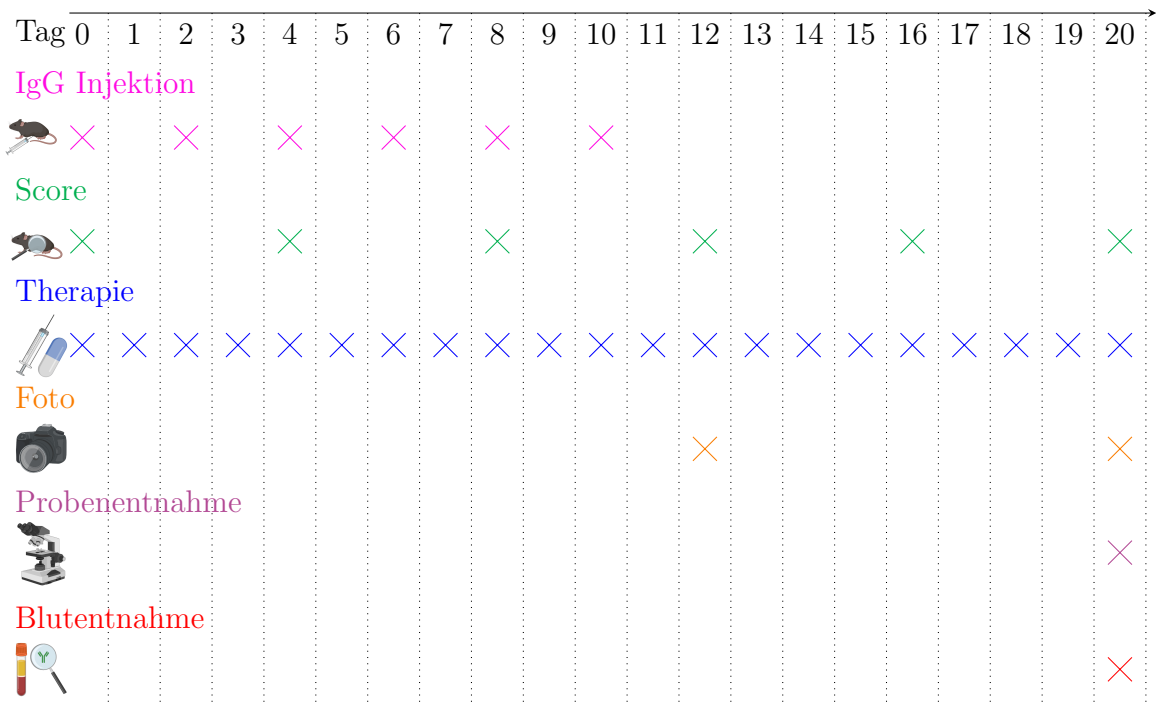


Abbildung 2.2.: Studien-Design des Antikörpertransfer-induzierten Modells Schematische Darstellung des Studiendesigns. Den Tieren wurde an Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gesamt-Kaninchen-IgG i.p. injiziert. Gleichzeitig wurde der Score von Tag 0 bis Tag 20 alle 4 Tage erhoben. Zusätzlich fand die Therapie täglich bis Tag 20 statt. An Tag 12 und Tag 20 wurden die Tiere fotografiert. Am Endpunkt (Tag 20) erfolgte zudem eine Blutabnahme, Tötung und die Ohrentnahme für die DIF und H&E. (Die verwendeten Grafiken wurden mit Biorender.com erstellt.)

2.9. Das Immunisierungs-induzierte Modell

Da das Antikörpertransfer-induzierte Modell in den AIL eine signifikante Reduktion der Krankheitsaktivität in höheren Generationen zeigte und niedrige Generationen nicht zur Verfügung standen, erfolgte eine Evaluation etablierter Pharmaka im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell. Die Immunisierung erfolgte mittels Protein/ Adjuvanz-Emulsion. Die Emulgierung von mCol7^{vWFA2} und dem Adjuvans (TiterMax® *Classic Adjuvant*) erfolgte bei 4°C. Es wurde eine 1ml Spritze mit 0,25ml der mCol7^{vWFA2}-Lösung gefüllt und eine zweite Spritze mit 0,5ml TiterMax befüllt. Diese Spritzen wurden über eine Mikroemulsionsnadel verbunden und dann die hydrophile Phase (mCol7^{vWFA2}) zuerst in die lipophile Phase gegeben. Die Emulgierung beider Phasen erfolgte für 1 Minute, indem die Phasen vor und zurück durch die Nadel gepresst wurden, bis sich eine feste Emulsion ergab. Darauffolgend wurden weitere 0,25 ml der mCol7^{vWFA2}-Lösung mit der bestehenden Emulsion auf gleiche Weise emulgiert. Die Konzentration betrug nun 1mg/ml. Die so bereiteten Spritzen wurden auf Eis

2. Materialien und Methoden

gelagert. Mit dieser Emulsion wurde die Mäuse innerhalb von 90 Minuten mit $120 \mu\text{l}$ plantar immunisiert ($60 \mu\text{g}$ mCol7^{vWFA2} pro Fuß).

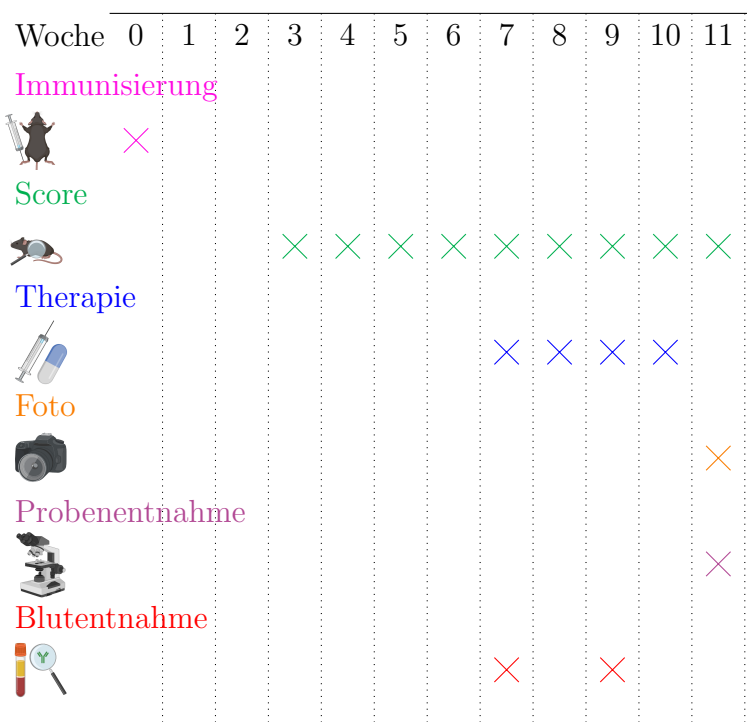


Abbildung 2.3.: Studien-Design für das Immunisierungs-induzierte Modell Schematische Darstellung des Studiendesigns. Die Mäuse wurden in Woche 0 mit $120 \mu\text{g}$ mCol7^{vWFA2} und äquivalenter Menge TiterMax plantar subkutan immunisiert. In Woche 7 und 9 erfolgten Blutabnahmen. Der Score wurde ab Woche 3 bis zum Endpunkt in Woche 11 wöchentlich erhoben. Die Therapie hingegen fand in Woche 7, 8, 9 und 10 statt. Am Endpunkt wurden klinische Fotos angefertigt und Ohren als Gewebeproben entnommen. (Die Grafiken wurden mit Biorender.com erstellt.)

Der Score (Kapitel 2.10.1.) wurde ab der dritten Woche post-Immunisierung wöchentlich bis Woche 11 erhoben. Mäuse mit mehr als 1,5 % der betroffenen KOF konnten in die Behandlungsgruppen eingeschlossen werden. Dies wurde zu Beginn der Woche 7 evaluiert und dann mit der Therapie für 4 Wochen begonnen. Die Mäuse wurden in die Behandlungsgruppen Kontrolle (PBS) und mPSL eingeteilt. Die Dosierung, die Applikationsform und das Intervall der Medikamente ist in Tabelle 2.8. dargestellt.

Tabelle 2.8.: Behandlungsgruppen im Immunisierungs-induzierten Modell Die Tabelle listet die Applikationsform, die Konzentration, das verwendete Volumen und das zeitliche Intervall der einzelnen Behandlungsgruppen auf.

Medikament	Applikationsform	Konzentration	Volumen	Intervall
PBS (Kontrolle)	i.p.	-	$80 \mu\text{l}$	täglich
Methylprednisolon	i.p.	30mg/kg	max. $100 \mu\text{l}$	täglich

Um den Stress auf die Mäuse abzuschätzen und die Dosis jeweils anzupassen, wurden diese zwei Mal in der Woche gewogen (Daten nicht dargestellt). Anschließend erfolgten Antikörperbestimmungen mittels ELISA aller Tiere in Woche 7 und 9 sowie einmalig eine DIF nach Organentnahme. Zusätzlich wurden klinische Fotos am Endpunkt angefertigt (Abbildung 2.3.).

2.10. Untersuchungsmethoden an der Maus

2.10.1. Bestimmung der betroffenen Körperoberfläche (klinischer Score)

A	Körperteil	Gewichtungsfaktor (Anteil an der gesamten Körperoberfläche)	B
	Linkes Ohr	2,5%	
	Rechtes Ohr	2,5%	
	Rechtes Auge	0,5%	
	Linkes Auge	0,5%	
	Schnauze	2,5%	
	Mucosa	2,5%	
	Kopf und Hals	9,0%	
	Linkes Vorderbein	5,0%	
	Rechtes Vorderbein	5,0%	
	Linkes Hinterbein	10,0%	
	Rechtes Hinterbein	10,0%	
	Schwanz	10,0%	
	Torso	40,0%	
	Gesamt	100,0%	

Abbildung 2.4.: Anteile der einzelnen Körperteile an der KOF A Die Tabelle zeigt die Anteile der einzelnen Körperteile an der KOF, wie sie zur Berechnung des Scores als Gewichtung verwendet wurden. B Darstellung der Begrenzungen der einzelnen Körperteile der Maus (Modifiziert nach Kasprick et al.) [117]

Die klinische Schwere der Erkrankung in einer experimentellen EBA wird von der prozentualen von EBA affizierten KOF repräsentiert. Klinische Erscheinungen sind als Erythem, Blasenbildung, Erosionen und Krusten definiert [219].

Im Immunisierungs-induzierten Modell wurden die Tiere wöchentlich und im Antikörpertransfer-induzierten Modell alle 4 Tage von mir begutachtet. Dazu wurde der prozentuale Anteil von EBA-Läsionen an den einzelnen Körperteilen bewertet. Die Gewichtung der einzelnen Körperteile bezogen auf die gesamte KOF des Tieres ist in

2. Materialien und Methoden

Abbildung 2.4. angegeben. Gemäß dieser wurde aus dem Gewichtungsfaktor und den Anteilen von EBA-Läsionen der einzelnen Körperteile der Score mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Score} = \sum_{\text{Körperteile}} p_{\text{Anteil an Läsionen an Körperteil}} \cdot p_{\text{Gewichtungsfaktor}} \quad (2.6)$$

Die *Area under the curve* (AUC) ist die Fläche unter den Scoremesspunkten, welche über die Zeit aufgetragen werden. Dabei werden zwischen den einzelnen Messpunkten Trapezoide gebildet und deren Flächen aufsummiert. Damit kann die AUC als Maß für die Krankheitsschwere im gesamten Untersuchungszeitraum dienen. In Formel 2.7. ist exemplarisch die Berechnung der Fläche eines Trapezoids zwischen den benachbarten Punkten (x_1, y_1) und (x_2, y_2) aufgeführt. Alle Trapezoide werden dann über den gesamten Zeitraum aufsummiert um die AUC zu bestimmen.

$$\text{AUC}_{\text{zwischen benachbarten Punkten } (x_1, y_1) \text{ und } (x_2, y_2)} = \frac{(y_2 + y_1) \cdot (x_2 - x_1)}{2} \quad (2.7)$$

2.10.2. Indirekter ELISA zur Bestimmung der Antikörperkonzentration in den Tiermodellen

Ein ELISA dient dem Nachweis und der Quantifizierung von Antikörpern oder Antigenen in flüssigen Proben[234] und wurde 1971 erstmals von Engvall, Avrameas und Kollegen vorgestellt[7, 63]. In dieser Arbeit dient der ELISA dem Nachweis von IgG oder IgG-Subklassen gegen mCol7^{vWFA2}, um ein weiteres Maß für die Bewertung der Therapie und Krankheitsschwere der EBA zu ermitteln.

Im Folgenden wird das Prinzip des hier verwendeten indirekten ELISA erläutert. Um die Antikörper im Mausserum nachzuweisen, werden *Wells* mit dem entsprechenden Antigen, in diesem Fall dem mCol7^{vWFA2}, beschichtet und die restlichen Proteinbindstellen der Polystyrolplatte mit BSA (Albumin Fraktion V, Biotinfrei, NZ-Origin) geblockt. Dann wird dieses mit dem Serum der Versuchstiere (Probeflüssigkeit) inkubiert. Das Serum enthält Anti-mCol7^{vWFA2}-Immunglobuline (= Analyten) in einer unbekanntem Konzentration. Die Versuchstiere haben diese Antikörper entweder via Immunisierung gebildet oder aber über Antikörpertransfer erhalten. Dabei entstehen mit dem gesuchten Antikörper Immunkomplexe. Alle ungebundenen Teile der Unter-

suchungsflüssigkeit werden danach durch Waschen entfernt. Im weiteren Prozess wird dann mit enzymkonjugierten Antikörpern (zweiter Antikörper in diesem Fall mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*) (HRP) konjugiert) inkubiert, welche sich an den im ersten Schritt entstandenen Immunkomplex bindet. So entsteht ein weiterer Immunkomplex, welcher in Abbildung 2.5. dargestellt ist. Nachdem die nicht gebundenen zweiten Antikörper durch Waschen entfernt wurden, wird in dieser Arbeit Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat für das konjugierte Enzym HRP hinzugegeben. Nun kann die HRP die Farbreaktion katalysieren, bis diese nach einer exakt festgelegten Reaktionszeit mit Schwefelsäure gestoppt wird. Bei einer spezifischen Reaktionszeit ist die Farbreaktion direkt proportional zur Konzentration des Analyten und kann durch photometrische Methoden quantifiziert werden [117, 188, 234, 254].

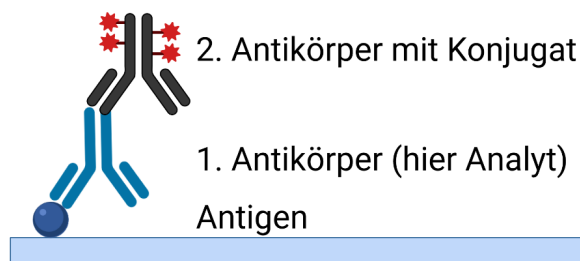


Abbildung 2.5.: Schematischer Aufbau des Antikörper-Nachweises mit ELISA Es ist der Immunkomplex dargestellt, welcher sich beim Antikörper-Nachweis bildet. Die Unterlage aus Polystyrol ist mit dem Antigen beschichtet. An diesem bindet der erste Antikörper (in diesem Fall der Analyt), an welchen wiederum der zweite Antikörper, ein anti-Immunglobulin-Antikörper, bindet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert, welches später eine Farbreaktion katalysiert, was dann photometrisch gemessen werden kann. Da die Menge dieser Farbreaktion von der Menge des Analyten abhängt, kann so die Konzentration des Analyten ermittelt werden, was in der Regel über eine Eichreihe und eine Regression erfolgt [81, 188]. (Abbildung nach [188] und erstellt mit BioRender.com)

Gesamt-Kaninchen-IgG-ELISA im Antikörpertransfer-induzierten Modell

Dieser ELISA dient zur Quantifizierung der mCol7^{vWFA2}-spezifischen Kaninchen-IgGs, welche im Antikörpertransfer Modell der EBA den Tieren exogen zugeführt wurden. In dem Antikörpertransfer-induzierten EBA-Modell ist dieses normalerweise keine Standarduntersuchung, da die Gesamt-Kaninchen-IgG Menge in jedem Versuchstier identisch sein sollte. Dieser ELISA wurde allerdings in Generation 16 zur Überprüfung des Modells analog zu Kasprick et al. [117] durchgeführt.

Die 96-well-Platte wurde mit 100 μl pro Well von einer 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mCol7^{vWFA2}-Lösung in Beschichtungspuffer beladen und über Nacht bei 4 °C und 200 rpm auf einem Rüttler inkubiert. Nach dem Beladen wurden die Platten fünf Mal mit Waschpufferlösung ge-

2. Materialien und Methoden

waschen. Danach wurde mit $200\mu\text{l}$ Blockierungslösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. So wurde eine weitere Adsorption an den Proteinbindestellen der festen Phase verhindert. Nach erneutem Waschen (5x) wurde die Proben- und Standardverdünnungsreihe in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Proben wurden 1:5000, 1:10000 und 1:20000 verdünnt und $50\mu\text{l}$ gemäß Pipettierschema in die Wells pipettiert (Spalte 3 bis 12 auf 2 Platten). Als Standard wurde ein gleichmäßiges gepooltes Serum aller zu untersuchenden Mäuse verwendet. Dazu wurde $1\mu\text{l}$ Mausserum jeder Maus aus der Gesamtheit der zu untersuchenden Mausseren zusammengeführt. Dann erfolgten Verdünnungen in den Stufen 1:650, 1:1250, 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:20000 sowie 1:40000, welche jeweils für Doppelbestimmungen angelegt waren. Diese wurden zusammen mit Blindwerten (Doppelbestimmung Probenpuffer) jeweils $50\mu\text{l}$ pro Well gemäß Pipettierschema (Spalte 1 und 2) pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach erneutem Waschen (5 Mal) wurden $100\mu\text{l}$ des 1:20000 verdünnten zweiten Antikörpers (Dako® Polyclonal Goat-anti-RabbitIgG HRP, REF P0448), welcher mit HRP konjugiert war, pipettiert. Nach erneutem Waschen (5 Mal) wurden $50\mu\text{l}$ TMB als Substrat der HRP zu den Wells zugefügt. Die Reaktion wurde nach genau 13,5 Minuten durch Hinzugeben von $50\mu\text{l}$ der 0,18 M Schwefelsäure gestoppt. Mit dem Plattenlesegerät wurde die OD bei 450nm je Well für 0,1 s gemessen.

Analog zu Kasprick et al. erfolgte die Durchführung durch mich [117]. Über eine 3-parametrische sigmoide Regression nach Chapman der Standardseren (SigmaPlot 14.5) wurden über die Funktionsgleichung in Excel die Konzentrationen der Testseren ermittelt. Die Regression nach Chapman zeigte sich im *Curve-Fitting* durch einen geringeren *Standard Error of Estimate* gegenüber anderen Regressionsarten überlegen. Dabei werden für die Formel 2.8. die 3 Parameter a, b und c ermittelt.

$$f(x) = a \cdot (1 - e^{-b \cdot x})^c \quad (2.8)$$

Mit Hilfe der Formel und den in SigmaPlot ermittelten Parametern wurde die Konzentration aus der gemessenen optischen Dichte in Excel berechnet. Dazu wurden die Konzentrationen in Relation zum gepoolten Standardserum gesetzt und zeigten lediglich relative Unterschiede der Seren gegenüber diesem Standard an. Dies ist hinreichend, um Unterschiede zwischen den Therapiegruppen aufzuzeigen. Gemittelte Werte der

relativen Konzentration wurde bei jeder Maus ermittelt, dann nach Therapiegruppen gemittelt (Darstellung 3.6.).

mCol7^{vWFA2}-ELISA verschiedener IgG-Subklassen im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell

Im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell wurde eine quantitative Bestimmung der murinen anti-mCol7^{vWFA2} in den IgG-Subklassen IgG1, IgG2a und IgG2b mit dem jeweiligen *Mouse IgG1, IgG2a bzw. IgG2b ELISA Quantitation Sets* durchgeführt.

Dafür wurden die Probenwells der Polystyrolplatte mit 100 μ l einer mCol7^{vWFA2}-Lösung in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml in PBS bei pH 7,4 auf einem Rüttler bei 200 rpm über Nacht bei 4 °C inkubiert. Da es kein Standardserum mit bekannten Konzentrationen an Anti-mCol7^{vWFA2} gibt, wurden aus dem jeweiligen *Quantification Set* für das *Coating* der Standardreihe 100 μ l 1:100 verdünnter *Coating* Antikörper (*Goat Anti-mouse* IgG1 bzw. IgG2a bzw. IgG2b) genutzt. Folglich ist eine Bestimmung in exakten Massenkonzentrationen nicht vollständig übertragbar, sodass *Coating*-Antikörper und Mausserum als Surrogat genutzt werden. Daher wird das Ergebnis in relativen Konzentrationen angegeben.

Nach dem Beladen wurden die Platten fünf Mal mit Waschpufferlösung bewaschen. Danach wurde mit 200 μ l der Blockierungslösung für 1 Stunde geblockt. So wurde eine weitere Adsorption an Proteinbindestellen der festen Phase verhindert. Nach erneutem Waschen (5x) wurde die Proben- und Standardverdünnungsreihe in Zweifachansatz durchgeführt. Als Standard wurde das *Mouse reference serum* von Bethyl (IgG1 3,0 mg/ml, IgG2a 2,5 mg/ml sowie IgG2b 2,6 mg/ml) in den Verdünnungen 1:650, 1:1250, 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:20000 sowie 1:40000 in Doppelbestimmung verwendet.

Die Probenverdünnungen erfolgten mit 1:2000 und 1:10000 je in Doppelbestimmung. Nach einer erneuten Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler wird erneut gewaschen und anschließend detektiert. Als zweiter Antikörper wurden Anti IgG1-HRP 1:200000, Anti IgG2a-HRP 1:100000, Anti IgG2b-HRP 1:100000 verdünnt zugegeben (70 μ l). Zur Entwicklung wurden 70 μ l TMB hinzugegeben und mit der 0,18M Schwefelsäure nach genau 15 min gestoppt. Mit dem ELISA-Plattenlesegerät wurde die OD bei 450nm je Well für 0,1 s gemessen.

2. Materialien und Methoden

Die Durchführung erfolgte von mir, wie oben angegeben und analog zu den Herstellerangaben nach den Protokollen der *Quantification Kits* von Bethyl Laboratories (E90-105, E90-107 sowie E90-109) [17–19].

Auch hier wurden wieder über eine 3-parametrische sigmoide Regression nach Chapman (Formel 2.8.) der Standardseren (SigmaPlot 14.5) und über die Funktionsgleichung in Excel die Konzentrationen der Testseren ermittelt. Der gemittelte Wert der Konzentration wurde bei jeder Maus in Woche 7 auf 100 % definiert und Woche 9 als prozentualer Anteil von Woche 7 angegeben, um den Verlauf über die Behandlungsgruppen darzustellen.

2.10.3. DIF der Proben aus dem Antikörpertransfer-induzierten Modell sowie dem Immunisierungs-induzierten Modell der EBA

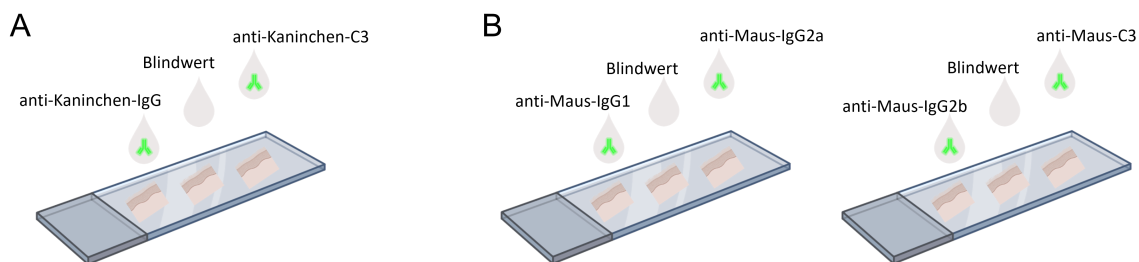


Abbildung 2.6.: Schematische Übersicht der Durchführung der DIF in den einzelnen Tiermodellen A Antikörpertransfer-induziertes EBA-Modell: Dargestellt sind schematisch die in diesem Modell verwendeten Antikörper bei den Gefrierschnitten B Immunisierungs-induziertes EBA-Modell: Dargestellt sind schematisch die in diesem Modell verwendeten Antikörper bei den Gefrierschnitten (Erstellt mit Biorender.com, Durchführung modifiziert nach [117])

Die DIF ermöglicht den Nachweis von z. B. Antikörpern oder Komplementfaktoren in einer Hautbiopsie, indem sie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifische Gewebearten markiert. Dafür werden typischerweise Gefrierschnitte der Probe mit diesem Antikörper inkubiert, welche spezifisch an die entsprechenden Epitope binden. Nachdem der Färbungsüberstand abgewaschen wurde, kann die so präparierte Probe an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden [205].

Tabelle 2.9.: In den DIF Verwendete Antikörper Es werden die in den DIF verwendeten Antikörper mit ihrem Hersteller und der verwendeten Verdünnung aufgelistet.

Für Nachweis	Antikörper	Hersteller	Verwendete Verdünnung
Anti-IgG	Dako® FITC-conjugated polyclonal Swine anti-rabbit Ig (F0054)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	1 : 100
Anti-C3	Cappel™ Fluorescein-conjugated GOAT IgG to mouse complement C3 (855500)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland	1 : 50
Anti-IgG1	BD Pharmingen™ FITC Rat Anti-Mouse IgG1 (553443)	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland	1 : 100
Anti-IgG2a	BD Pharmingen™ FITC Anti-Mouse IgG2a (553390)	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland	1 : 100
Anti-IgG2b	BD Pharmingen™ FITC Rat Anti-Mouse IgG2b (553395)	BD biosciences, Heidelberg, Deutschland	1 : 100

In beiden in dieser Arbeit beschriebenen Tiermodellen entnahm ich nach der Tötung der Versuchstiere die Ohren. Diese wurden halbiert und direkt in einer Kryoeinbettform mit Tissue-Tek® O.C.T. Kryoeinbettmedium, einem entsprechenden Medium für Gefrierschnitte, eingebettet und auf Trockeneis gelegt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C , bis sie mittels Mikrotom freundlicherweise von Frau R. Gembicki in $6\ \mu\text{m}$ Stärke geschnitten wurden. Ich bekam von der Kollegin pro eingebetteter Probe mehrere Objektträger mit je 3 Gefrierschnitten, welche bei -20°C gelagert wurden und im Folgenden von mir immungefärbt wurden. Die Objektträger wurden zu Beginn der Immunfärbung für 10 min bei Raumtemperatur angetaut. Die einzelnen Gewebsschnitte wurde mit einem PAP-Pen umkreist, um das spätere ineinanderlaufen verschiedener Immunfärbungen auf einem Objektträger zu verhindern. Alle weiteren Färbungsschritte wurden in einer abgedunkelten feuchten Färbekbank durchgeführt. Initial wurde jeder Gewebeschnitt mit $100\ \mu\text{l}$ Probenpuffer für 30 min bei Raumtemperatur geblockt.

Zur Übersichtlichkeit und besseren Lesbarkeit des Textes wurden die verwendeten Verdünnungen der nun folgenden fluoreszenzmarkierten Antikörper in Tabelle 2.9. zusammengefasst.

Im Antikörpertransfer-induzierten Modell der EBA werden Anti-IgG und Anti-Komplementkomponente 3 (C3) in den angefertigten Gefrierschnitten verwendet. Ana-

2. Materialien und Methoden

log dazu wurden im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell Anti-IgG1, Anti-IgG2a, Anti-IgG2b und Anti-C3 bestimmt. Je nach Modell wurde jeder der benötigten Antikörper auf ein mit dem PAP-Pen separierten Gewebeschnitt aufgetragen. Die Färbungen erfolgten mit den in Tabelle 2.9. dargestellten Antikörpern und Verdünnungen. Einzelne Gewebeschnitte wurden mit $100\mu\text{l}$ des verdünnten Antikörpers aufgetragen (vergleiche Abbildung 2.6.) und für 60 Minuten inkubiert. Danach wurde dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit Fluoreszenz-Einfassmedium und Deckgläsern eingebettet, bei 4°C angetrocknet und abschließend mikroskopiert und bilddokumentiert.

2.10.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin wurde bereits vor mehr als 100 Jahren als Färbemittel beschrieben und stellt bis heute als Hämatoxylin-Eosin die häufigste Standardfärbung zur morphologischen Histologie dar [232]. Es ist eine Mischfärbung mit verschiedenen Affinitäten zu pH-Werten oder Strukturen in Geweben. Eosin färbt als Anionischer Farbstoff kationische Proteine (Zytoplasma und Faserstrukturen wie Kollagene) rot und Hämatoxylin beziehungsweise Hämalaun färbt anionische Makromoleküle blau (z. B. Ribonukleinsäuren im Zellkern, Glykosoaminoglykane) [206]. Die Färbungen und Mikroskopien wurden freundlicherweise von Frau R. Gembicki aus den von mir entnommenen Proben (Zwei Mausohrhälften für min. einen Tag in Histofix-Lösung eingelegt) nach dem Protokoll von Kasprick et al. durchgeführt [117]. Dazu wurde die Proben automatisiert-instrumentell in Parafin eingebettet. Die Teile des Blocks wurden mittels Mikrotom in $6\mu\text{m}$ -Schichten geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Es folgte eine Fixierung für 5 Minuten mittels Formalin (Roti-Histofix), danach wurde mit Leitungswasser gespült und die Objektträger in Hämatoxylin für eine Minute eingetaucht. Es folgte eine Spülung mit Leitungswasser bis die ablaufende Flüssigkeit klar wurde. Danach wurden die Objektträger für 1 Minute in Eosinlösung getaucht, erneut gespült bis die Flüssigkeit klar wurde. Es folgte eine Entwässerung der gefärbten Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, $2 \times 95\%$, $2 \times 100\%$) in einer Färbeschale für jeweils 1 min. Danach wurde zweimalig mit Xylol klar gespült, bevor die Schnitte mittels Einbettmedium und Deckgläsern eingedeckt wurden [117].

2.11. Auswertung und Statistik

Die Auswertung der meisten Daten erfolgte in Excel von Microsoft Office 365. Dies betrifft die Scores, die Berechnung der AUC und auch die Ergebnisse des ELISAs. Die grafische Darstellung und statistische Analyse dieser wurden aber in GraphPad Prism 9.2.0 umgesetzt.

Für alle Generationen und Modelle wurden die Mittelwerte der Scores nach Therapiegruppen unterteilt als Liniendiagramm mit dem Standardfehler (SEM) als Fehlerbalken dargestellt. Dies wird ergänzt durch Kennzeichnung des Signifikanzniveaus zwischen einer der Therapiegruppen und der Kontrollgruppe mit Sternchen ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$) über dem jeweiligen Zeitpunkt. Zur Analyse wurde eine *Two-Way Analysis of variance* (ANOVA) mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test verwendet. Zusätzlich wurden die AUCs in Excel berechnet und die Verteilung der AUCs dann als Box-Whisker-Plots nach Tukey dargestellt. Dabei sind die Quartile, der Median, die Extremwerte und eventuelle Ausreißer dargestellt, welche mehr als das 1,5-Fache des Interquartilsabstands vom unteren oder oberen Quartils entfernt sind. Auch hierbei erfolgte in den Diagrammen eine Differenzierung nach Therapiegruppen. Zur Analyse der Daten wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet und die daraus resultierenden p-Werte bezogen auf die Kontrollgruppe werden als Signifikanzniveau ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$) über dem jeweiligen Box-Whisker-Diagramm dargestellt.

Um alle Generationen des Antikörpertransfer-induzierten Modells zu vergleichen, wurden auch die AUCs der Kontrollgruppen per Kruskal-Wallis-Test mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test miteinander verglichen und die Verteilung als Box-Whisker-Diagramm nach Tukey dargestellt. Dabei sind die Quartile durch die Box repräsentiert und der Median unterteilt die Box in 2 Teile. Die Extremwerte werden wiederum durch die Whisker dargestellt und eventuelle Ausreißer, welche mehr als das 1,5-fache des Interquartilsabstands vom unteren oder oberen Quartil entfernt sind, werden durch Symbole in der entsprechenden Boxfarbe abgebildet.

In Generation 16 des Antikörpertransfer-induzierten Modells wurde zusätzlich ein ELISA durchgeführt, wobei die Konzentration für das Gesamt-Kaninchen-IgG bestimmt

2. Materialien und Methoden

wurde. Dafür wurden 2 Proben pro Maus in 3 Verdünnungen (1:5.000, 1:10.000, 1:20.000) getestet. Die Daten wurden ebenfalls in Excel ausgewertet und dort gemittelt, um eine relative Konzentration zu ermitteln. Die sigmoide 3-Parameter Regression nach Chapman der Standardseren erfolgte aber mit Systats SigmaPlot 14.5. Mithilfe der Formel 2.8. und den ermittelten Parametern konnte die relative Konzentration aus der gemessenen optischen Dichte in Excel berechnet werden. Die statistische Auswertung der Daten per Kruskal-Wallis-Test erfolgte mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test. Die Darstellung als Box-Whisker-Diagramm nach Tukey wurde hingegen mit GraphPad Prism 9.2.0 erstellt. Dabei sind die Quartile durch die Box repräsentiert und der Median unterteilt die Box in 2 Teile. Die Extremwerte werden wiederum durch die Whisker dargestellt und eventuelle Ausreißer, welche mehr als das 1,5-fache des Interquartilsabstands vom unteren oder oberen Quartil entfernt sind, werden durch Symbole in der entsprechenden Boxfarbe abgebildet. Wie die Box-Whisker-Plots der AUC enthält auch dieser die p-Werte bezogen auf die Kontrollgruppe als Signifikanzniveau ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$) über dem jeweiligen Box-Whisker-Diagramm der anderen Therapiegruppen.

Im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell wurden der ELISA-Daten nach Antikörper-subklassen unterteilt und dann in den Diagrammen nach Therapiegruppen differenziert betrachtet. Die Auswertung der Daten erfolgte wie im Antikörpertransfer-induzierten Modell in Excel und die sigmoide 3-Parameter Regression nach Chapman (Formel 2.8.) der Standardseren erfolgte ebenfalls wieder mit Systats SigmaPlot 14.5. Aus den Daten wurden Liniendiagramme mit der SEM als Fehlerbalken mit GraphPad Prism 9.2.0 erzeugt. In diesen ist die gemittelte relative Konzentration in Relation zu derselben bei Therapiebeginn über den Messverlauf aufgetragen. Zur Analyse wurde eine Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Aufreinigung von mCol7^{vWFA2} aus E. coli ER2566

Um das Protein mCol7^{vWFA2} für die Tierversuche zu gewinnen, wurde dieses in Bakterienkultur hergestellt und anschließend mittels des Flüssigchromatographiesystems ÄKTApurifier™ aufgereinigt. Die Herstellung von mCol7^{vWFA2} und dessen Aufreinigung mittels IMPACT TWIN wurde sequentiell insgesamt sechs Mal (Ansatz I - VI) durchgeführt. Hieraus resultierten drei Batches (Tabelle 3.1.). Batch#01 entstand aus dem gefilterten Ansatz I und den Ansätzen III und IV. Batch#02 resultierte aus Ansatz V und Batch#03 ist aus dem Ansatz VI entstanden.

Tabelle 3.1.: Übersicht über die Batches der Herstellung von mCol7^{vWFA2} vor der Aufkonzentrierung auf 2 mg/ml Die Übersicht über die Herstellung von mCol7^{vWFA2} mittels IMPACT-TWIN Protokoll mit korrigierter photometrischer Messung listet die Proteinkonzentration, das Volumen und die daraus resultierende Menge enthaltenes mCol7^{vWFA2} auf. Dabei enthielt Batch #02 die höchste Konzentration an mCol7^{vWFA2}, aber #01 die größte Menge.

Batch	Ansatz	Proteinkonzentration [mg/ml]	Volumen [ml]	Menge mCol7 ^{vWFA2} [mg]
#01	I <i>filtriert</i> , III und IV (gepoolt)	0,97	44	42,68
#02	V	1,66	20	33,20
#03	VI	1,10	10	11,00

Bei der Kontrolle der Ansätze per SDS-PAGE auf Verunreinigungen fielen im Ansatz I und II Banden bei ca. 20kDa sowie bei 30kDa auf (Abbildung 3.1. A). 20 kDa entsprechen ungefähr der Molekülmasse des Col7^{vWFA2} und 30kDa der des Inteins [140, 149]. Ansatz III zeigte eine Bande bei ca. 20kDa. Die Banden bei 30kDa wurden als Verunreinigung mit dem Intein gewertet, welches bei der Immunisierung der Tiere nicht vorliegen darf. Im Originalpaper des Inteins ist dessen scheinbare Molekülmasse mit 28-

3. Ergebnisse

32kDa angegeben [149]. Daher erfolgte der erfolgreiche Versuch die Verunreinigungen mittels Zentrifugen-Filterinsatz Amicron 30K zu entfernen. Davon wurde das Filtrat verwendet (Ansatz I_{filtriert}) und der Überstand verworfen. Ansatz I_{filtriert} zeigte in der SDS-PAGE keine Bande mehr bei 30kDa. Ansatz II zeigte gelelektrophoretisch viel Verunreinigung sowie wenig Zielprotein und wurde daher verworfen. Ansatz III und IV hatten keine Verunreinigungen und wurden mit dem filtriertem Ansatz I zur Batch#01 gepoolt (Abbildung 3.1. B). Ansatz V und VI blieben ebenfalls ohne Verunreinigungen und wurden jeweils zu einer eigenen Batch (nicht dargestellt). Zur Kontrolle des aufgereinigten mCol7^{vWFA2} wurde eine Referenzprobe von Dr. Iwata untersucht, welche initial von Leineweber et al. hergestellt und von Dr. Iwata erfolgreich eingesetzt wurde. Mittels SDS-PAGE wurde diese Referenz mit Batch#01 und #02 verglichen, ohne dass Verunreinigungen oder andere Auffälligkeiten ersichtlich waren (Abbildung 3.1. C).

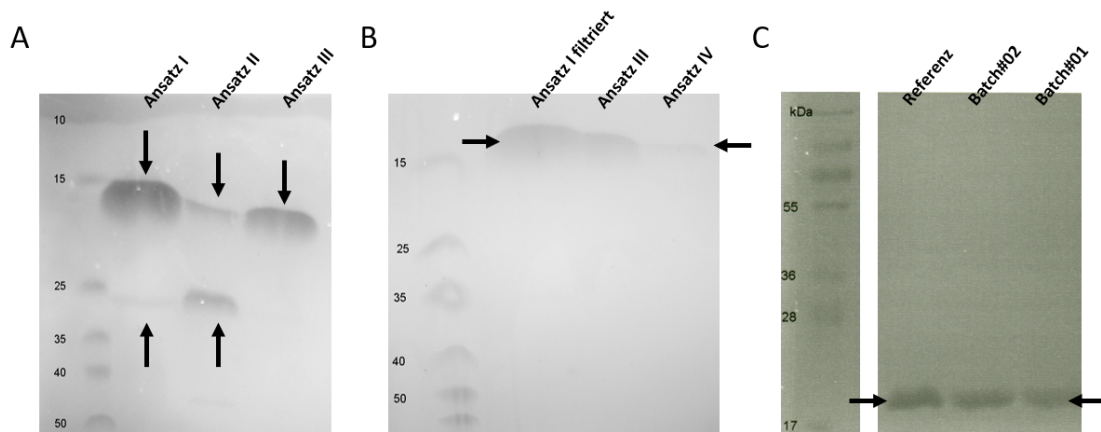


Abbildung 3.1.: Nachweis des aufgereinigten mCol7^{vWFA2} mittels SDS-PAGE. **A** SDS-PAGE verschiedener Ansätze der Proteinisolierung als Qualitätskontrolle. Ansatz I zeigte leichte Spuren von Intein, sowie eine kräftige Bande mCol7^{vWFA2}. Ansatz II zeigte eine deutliche Verunreinigung mit Intein und eine schwache Bande mCol7^{vWFA2}. Ansatz III zeigte sich zufriedenstellend mit nur einer Bande im Bereich des mCol7^{vWFA2} ohne Inteinspuren. **B** Zur Abtrennung der Inteinverunreinigung wurde das Protein des Ansatzes I mit 30K Amicron Filtern zentrifugiert und Ansatz I_{filtriert} genannt. Deutlich zu erkennen ist weiterhin die Bande mit dem eluierten mCol7^{vWFA2}, wohingegen keine Verunreinigung bei >25kDa erkennbar ist. Ansatz III und IV zeigten sich mit nur einer Bande im Bereich des mCol7^{vWFA2} ohne Inteinspuren. **C** Kontrolle der hergestellten Batch#01 und #02 mittels SDS-PAGE. Es wurde Batch#01 und #02 mit etablierten mCol7^{vWFA2} als Referenz verglichen. Alle drei Proben Batch#01 und #02 sowie die Vergleichsprobe (Referenz) zeigten in der SDS-PAGE eine Bande mCol7^{vWFA2} mit identischer Molekülmasse ohne ersichtliche Verunreinigungen.

Die hergestellten Batches (Abbildung 3.1.) wurden weiter behandelt wie beschrieben (Kapitel 2.7.4.). Hieraus entstanden bei Batch#01 elf, bei Batch#02 acht und bei Batch#03 zwei volle Aliquots mit je 1,5ml, welche bei -80°C gelagert wurden.

3.1.1. Herstellung und Titerkontrolle des Immun-IgGs

Das endgültige Volumen des Immun IgGs betrug 88ml, dieses entspricht 2,2g IgG. Vor Versuchsbeginn konnte ein Titer von 1:12800 bestimmt werden, da dieses die höchste Verdünnungsstufe ist, bei der noch eine positive Fluoreszenzablagerung an der DEJ festgestellt wurde. Zwischen den Durchführungen von Generation 16 und 19 ergab eine erneute Kontrolle ebenfalls einen Titer von 1:12800 (Daten nicht dargestellt).

3.2. Untersuchung etablierter Pharmaka im Antikörpertransfer-induzierten Modell der experimentellen EBA

Zur Evaluierung der Pharmaka mPSL, Dapson und Colchicin verwendete ich das Antikörpertransfer-induzierte Modell der EBA. Hierzu wurden AIL-Mäuse der Generationen 14, 16 und 19 untersucht. Insgesamt erhielt eine Maus sechs Injektionen mit 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG, welches auch spezifische Antikörper gegen mCol7^{vWFA2} beinhaltet. Hierdurch wird eine experimentelle EBA induziert. Im Folgenden werden die Ergebnisse nach Generationen unterteilt vorgestellt.

3.2.1. Methylprednisolonbehandlung verbessert den klinischen Verlauf einer Antikörpertransfer-induzierten EBA in AIL Tieren in Generation G14

Zur Evaluierung von mPSL verwendete ich AIL-Mäuse der G14, welche 6 mal mit 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG injiziert wurden (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA entwickelten. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit mPSL oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen (Abbildung 2.2.).

Die betroffene KOF wurde an Tag 0, 4, 8, 12, 16 und 20 bestimmt (Abbildung 3.2. A) Beim Vergleich der Mittelwerte konnten per Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test signifikante Unterschiede an Tag 12, 16 und 20 zwischen der Methylprednisolongruppe

3. Ergebnisse

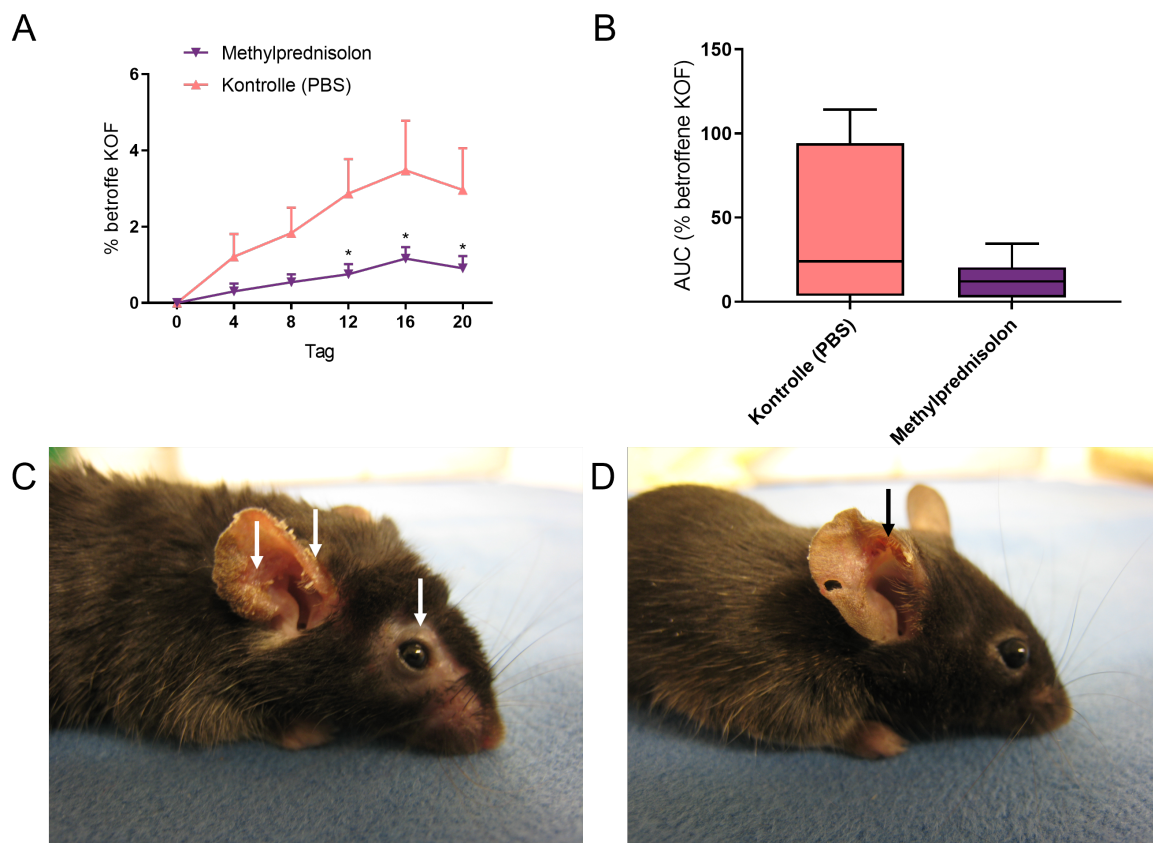


Abbildung 3.2.: Methylprednisolon verbessert den klinischen Verlauf der EBA in Generation 14. AIL-Mäuse der G14, welche sechs mal mit 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG injiziert wurden (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA entwickelten. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit mPSL oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. Die betroffene KOF wurde an Tag 0, 4, 8, 12, 16 und 20 bestimmt. **A** Die Mittelwerte der Scores über den gesamten Zeitraum wurden bestimmt und differenziert nach Behandlungsgruppen mit SEM als Fehlerbalken dargestellt. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Methylprednisolon- und der Kontrollgruppe in der Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test an den Tagen 12, 16 und 20. **B** Die AUC des klinischen Verlaufs von Tag 0-20 wurde bestimmt und die Verteilung als Box-Whisker-Diagramm nach Tukey, unterteilt nach Behandlungsgruppen, dargestellt. Das Signifikanzniveau des p-Werts des Mann-Whitney-U-Tests ist nicht gekennzeichnet, da dieser mit $p = 0,3244$ nicht signifikant ist. **C** Beispielbild einer Maus der Kontrollgruppe von Tag 12 mit Alopezie periorbital (Pfeil) sowie im Schnauzen-Bereich. Zusätzlich sind Krusten an den mit Pfeilen markierten Stellen des Ohres erkennbar. **D** Beispielbild einer Maus der Methylprednisolongruppe von Tag 12 mit Erosionen und Krusten am Ohr an der mit Pfeilen markierten Stelle Gruppengröße: PBS n=10, Methylprednisolon n=10; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; AUC - Area under the curve; KOF - Körperoberfläche

und der Kontrollgruppe festgestellt werden. In der Verteilung der AUCs des klinischen Verlaufs von Tag 0-20 (Abbildung 3.2. B) sind zwar Unterschiede ersichtlich, aber diese sind im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p = 0,3244$). Zusätzlich wurden klinische Bilder der Mäuse an Tag 20 angefertigt. (Abbildung 3.2. C und D).

3.2. Untersuchung etablierter Pharmaka im Antikörpertransfer-induzierten Modell der experimentellen EBA

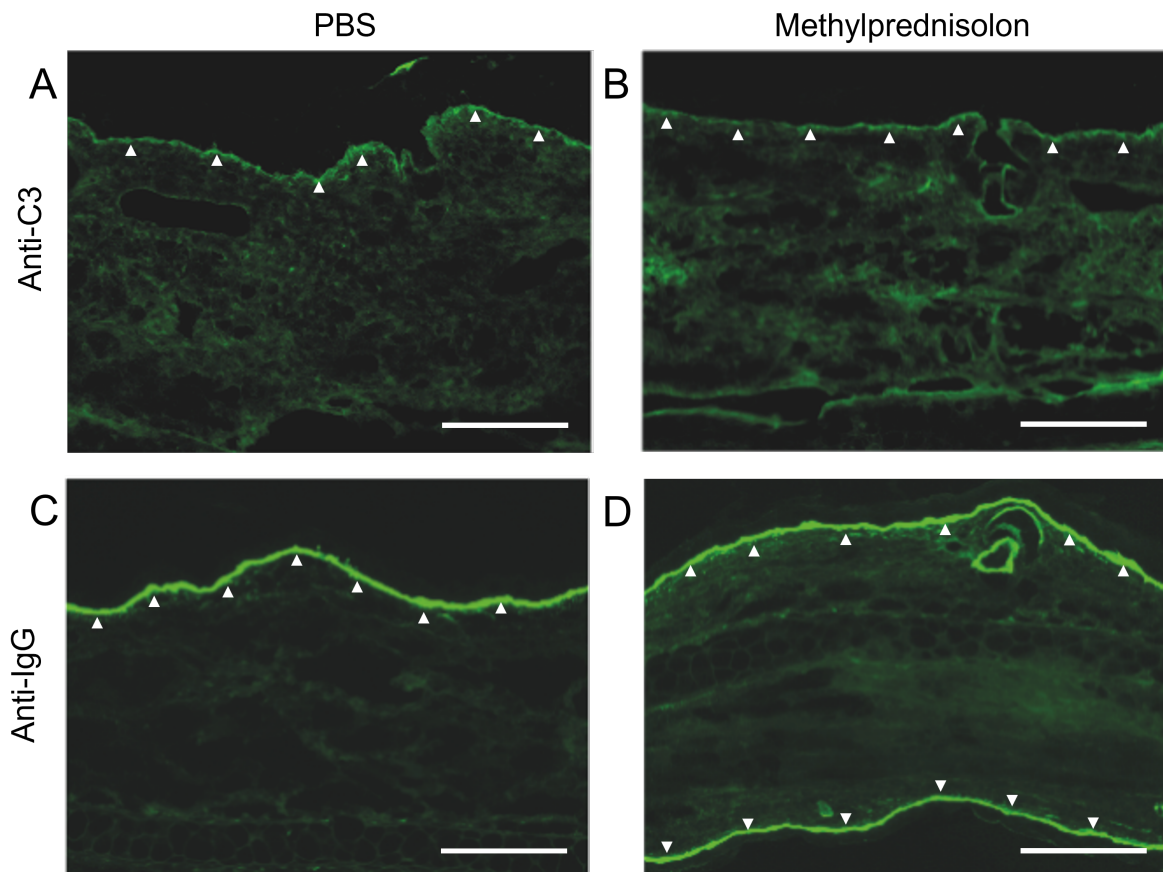


Abbildung 3.3.: Erwartungsgemäß sind keine Unterschiede der Bindung von IgG und Komplementablagerung an der DEJ in Generation 14 zu erkennen. Kryoschnitte von Ohrhautproben der AIL-Mäuse der Generation 14 wurden an Tag 20 entnommen und per DIF untersucht. Diesen AIL-Mäusen wurde vorher sechs mal 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG injiziert (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und sie entwickelten daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit mPSL oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. **(A und B)** Exemplarische DIF einer AIL-Maus der Generation 14 mit Fluoreszenzmarkierung an Anti-C3 aus der Methylprednisolongruppe und der Kontrollgruppe mit PBS-Behandlung. Erwartungsgemäß sind C3a-Ablagerungen in beiden Proben vornehmlich an der DEJ ohne Intensitätsunterschiede ersichtlich und mit Pfeilen markiert. **(C und D)** Exemplarisches Bild der DIF einer AIL-Maus der Generation 14 mit Fluoreszenzmarkierung an Anti-IgG aus der Methylprednisolongruppe und der Kontrollgruppe mit PBS-Behandlung. Erwartungsgemäß sind IgG-Ablagerungen in beiden Gruppen an der DEJ ohne Intensitätsunterschiede ersichtlich. Die Pfeile markieren die Ablagerungen an der DEJ. Maßstab: 100 μ m; Gruppengröße: PBS n=10, Methylprednisolon n=10; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; C3 - Komplementkomponente 3; IgG - Immunglobulin-G

Kryoschnitte von Ohrhautproben, welche den AIL-Mäusen der Generation 14 an Tag 20 nach der Tötung entnommen wurden, wurden per DIF untersucht (Abbildung 3.3.). Dabei handelt es sich um eine Anti-Maus-C3- sowie um eine Anti-Kaninchen-IgG-Fluoreszenzmarkierung. Die DIF dient als Kontrolle des EBA-Modells und zeigte an der DEJ fluoreszierende Kaninchen-IgG-Ablagerungen bei der PBS-Probe (Abbildung

3. Ergebnisse

3.3. A) und der Methylprednisolonprobe (Abbildung 3.3. B). Erwartungsgemäß sind in den mit Anti-IgG markierten Proben (Abbildung 3.3. C und D) sowie in den Anti-C3 markierten Proben (Abbildung 3.3. A und B) keine Unterschiede der Intensität an der DEJ ersichtlich.

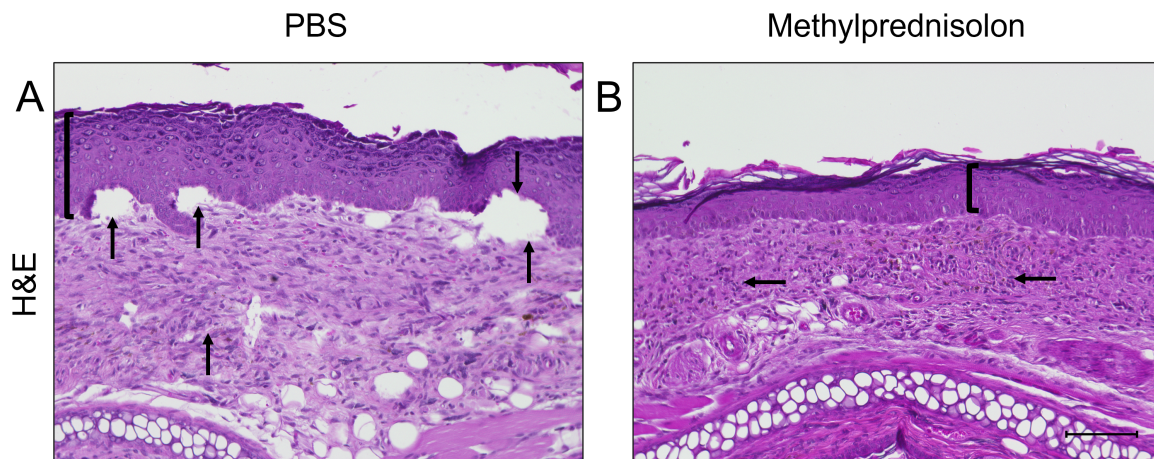


Abbildung 3.4.: Histologische Beispielbilder der AIL-Mäuse in Generation 14 zeigen morphologische Entzündungszeichen. Ohrhautproben der AIL-Mäuse der Generation 14 wurden an Tag 20 entnommen, wovon H&E-Färbung angefertigt wurden. Diese AIL-Mäuse wurden vorher sechs mal mit 2,5 mg Immun-IgG injiziert (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und entwickelten daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit mPSL oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. Die Histologien erfolgten zur Konzeptüberprüfung des EBA-Modells um Entzündungszeichen an der Haut darzustellen. **A** Beispielbild einer H&E der Kontrollgruppe der G14 mit granulozytärer Infiltration, subepidermaler Blasenbildung (Pfeile) und verbreiteter Epidermis (Klammer) **B** Beispielbild einer H&E der Methylprednisolongruppe mit granulozytärer Infiltration (Pfeile) ohne subepitheliale Separation, aber mit verbreiteter Epidermis (Klammer). Maßstab: 100µm; Gruppengröße: PBS n=10, Methylprednisolon n=10; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; H&E - Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zusätzlich wurden an den an Tag 20 entnommenen Ohrhautproben H&E-Färbungen der PBS- und der Methylprednisolongruppe der Generation 14 angefertigt (Abbildung 3.4.). Dabei sind bei dem Bild der Kontrollgruppe (Abbildung 3.4. A) granulozytäre Infiltrationen, subepidermale Blasenbildung und eine verbreiterte Epidermis ersichtlich. Im Beispielbild der Methylprednisolongruppe (Abbildung 3.4. B) zeigt sich zwar eine granulozytäre Infiltration, aber ohne subepitheliale Separation und mit verbreiteter Epidermis. Physiologisch besitzt die Maus ca. 1-2 Schichten der Epidermis am Ohr. Bei der restlichen Haut sind 4 Schichten Epidermis typisch [129].

3.2.2. Dapson verbessert den klinischen Verlauf einer Antikörpertransfer-induzierten EBA in AIL Tieren in Generation 16

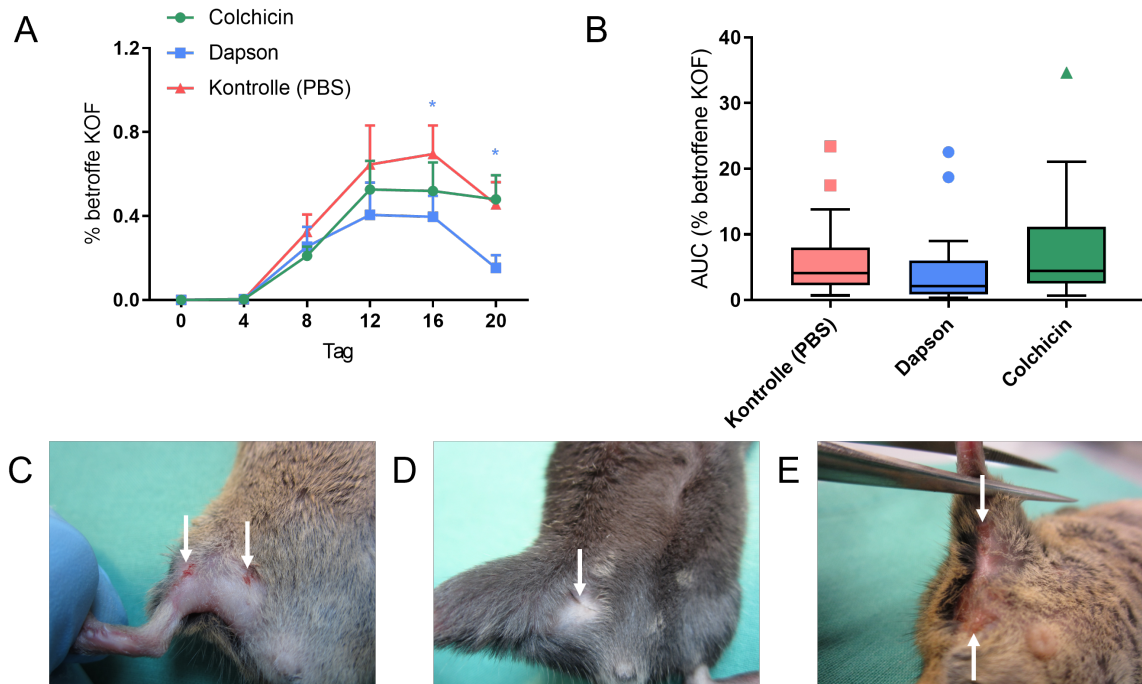


Abbildung 3.5.: Dapson verbessert den klinischen Verlauf der EBA in Generation 16. AIL-Mäuse der G16, welche sechs mal mit 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG injiziert wurden (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA entwickelten. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit Dapson, Colchicin oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. Die betroffene KOF wurde an Tag 0, 4, 8, 12, 16 und 20 bestimmt. **A** Die Mittelwerte der Scores über den gesamten Zeitraum wurden bestimmt und differenziert nach Behandlungsgruppen mit SEM als Fehlerbalken dargestellt. Dabei steigt in allen Gruppen der Score ab Tag 8 an, um ab Tag 12 abzufachen und zwischen Tag 16 und 20 abzusinken. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Dapson- und der Kontrollgruppe in der Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test an den Tagen 16 und 20. **B** Die AUC des klinischen Verlaufs von Tag 0-20 wurde bestimmt und die Verteilung als Box-Whisker-Diagramm nach Tukey, unterteilt nach Behandlungsgruppen, dargestellt. Die Signifikanzniveau der p-Werte der Kruskal-Wallis ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test sind nicht gekennzeichnet, da diese mit $p = 0,1187$ für Dapson und $p = 0,6858$ für Colchicin (jeweils bezogen auf die Kontrolle) nicht signifikant sind. **C** Beispielbild einer Maus der Kontrollgruppe an Tag 12 mit Alopezie am Hinterlauf sowie Erosion (Pfeile). **D** Beispielbild einer Maus der Dapsongruppe an Tag 12 mit kleinflächiger inguinaler Alopezie (Pfeil). **E** Beispielbild einer Maus der Colchicingruppe an Tag 12 mit Krusten, Erosionen und Alopezie (Pfeile). Gruppengröße: PBS $n=24$, Dapson $n=22$, Colchicin $n=23$; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; AUC - Area under the curve; KOF - Körperoberfläche

3. Ergebnisse

Nachdem sich in Generation 14 mPSL als wirksam zeigte, erfolgte die Fortführung der Versuche mit weiteren in der Therapie der EBA etablierten Pharmaka. Ausgewählt wurden Dapson und Colchicin, welche bereits in der Klinik häufig Verwendung finden [49,106,200]. AIL-Mäusen der Generation 16 wurde insgesamt jeweils sechs mal 2,5 mg Immun-IgG injiziert (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10). Es begann eine tägliche Behandlung mit Dapson oder PBS (als Kontrolle), sowie eine wöchentliche Behandlung mit Colchicin (an den übrigen Tagen PBS oral) ab Tag 0 (Abbildung 2.2. und Tabelle 2.7.).

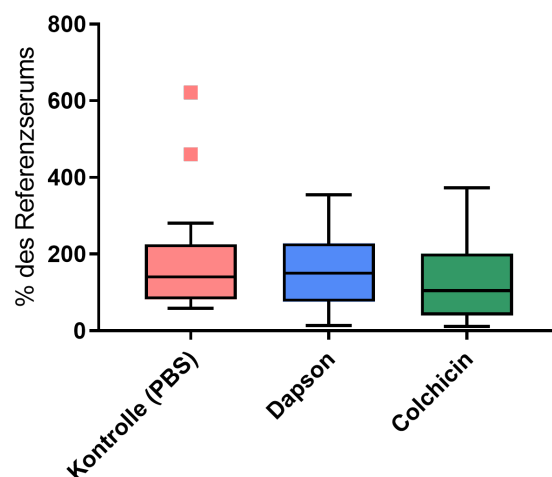


Abbildung 3.6.: Erwartungsgemäß tritt keine Reduktion des Anteils spezifischer Antikörper in der Antikörpertransfer-induzierten EBA auf. AIL-Mäuse der G16, welche sechs mal mit 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG injiziert wurden (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA entwickelten. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit Dapson, Colchicin oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. An Tag 20 wurden Blutproben genommen und per ELISA auf Anti-Maus-Kaninchen-IgG untersucht. Dies diente einer Überprüfung der injizierten Antikörper. Die Verteilung der Konzentrationen (% des Referenzserums) wird als Box-Whisker-Diagramm nach Tukey dargestellt. In der Kruskal-Wallis ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test konnten keine signifikanten Unterschiede, bezogen auf die Kontrollgruppe, festgestellt werden. Gruppengröße: PBS n=24, Dapson n=22, Colchicin n=23; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung

Die betroffene KOF wurde an Tag 0, 4, 8, 12, 16 und 20 bestimmt (Abbildung 3.5. A). Beim Vergleich der Mittelwerte konnten per Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test signifikante Unterschiede an Tag 16 und 20 zwischen der Dapsongruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Zusätzlich wurden die AUCs des klinischen Verlaufs von Tag 0-20 (Abbildung 3.5. B) bestimmt und deren Verteilung mit Hilfe der Kruskal-Wallis ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test analysiert. Dabei wurden keine signifikanten

3.2. Untersuchung etablierter Pharmaka im Antikörpertransfer-induzierten Modell der experimentellen EBA

Unterschiede ermittelt (Dapson $p = 0,1187$, Colchicin $p = 0,6858$, jeweils bezogen auf die Kontrolle). Zusätzlich wurden klinische Bilder der Mäuse an Tag 12 sowie 20 angefertigt (Abbildung 3.5. C bis E).

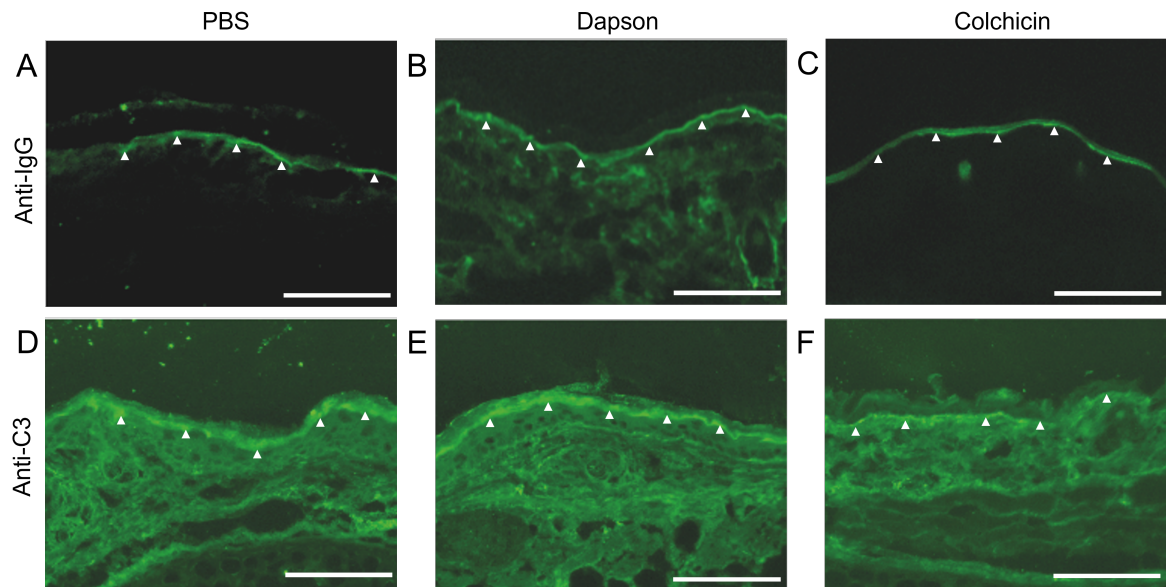


Abbildung 3.7.: Erwartungsgemäß sind keine Unterschiede der Bindung von IgG und Komplementablagerung an der DEJ in Generation 16 zu erkennen. Kryoschnitte von Ohrhautproben der AIL-Mäuse der Generation 14 wurden an Tag 20 entnommen und per DIF untersucht. Diese AIL-Mäuse wurden vorher sechs mal mit 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG injiziert (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und entwickelten daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit Dapson, Colchicin oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. **A, B und C** Beispiele der DIF von AIL-Mäusen in Generation 16 mit Fluoreszenzmarkierung an Anti-IgG in der Kontrollgruppe mit PBS sowie den Behandlungsgruppen mit Dapson und Colchicin. Lineare Ablagerungen an der DEJ sind erwartungsgemäß in allen Beispielbildern erkennbar und mit Pfeilen markiert. **D, E und F** Beispiele der DIF von AIL-Mäusen in Generation 16 mit Fluoreszenzmarkierung an Anti-C3 in der Kontrollgruppe mit PBS sowie den Behandlungsgruppen mit Dapson und Colchicin. Trotz erwartungsgemäß hoher Hintergrundaktivität der Fluoreszenz beim anti-C3 sind lineare Ablagerungen an der DEJ in allen Gruppen erkennbar und mit Pfeilen markiert. Maßstab: $100\mu\text{m}$; Gruppengröße: PBS $n=24$, Dapson $n=22$, Colchicin $n=23$; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; C3 - Komplementkomponente 3; IgG - Immunglobulin-G

Auffällig ist, dass der Anteil der betroffenen KOF sich von Generation 14 auf Generation 16 reduziert hatte. Daher wurde das Immun-IgG weiter untersucht. Eine erneute Titerkontrolle ergab keine Änderungen (Daten nicht dargestellt). Es wurde auch für alle Antikörpertransfere die gleiche Charge und Menge des Immun-IgG verwendet. An Tag 20 wurde in Generation 16 eine Blutprobe entnommen und ein ELISA auf Anti-Kaninchen-IgG mit den gepoolten Seren von Generation 16 durchgeführt. Es wurden von mir pro Maus-Serum von Tag 20 Doppelbestimmungen in je 3 Verdünnungen (1:5.000, 1:10.000, 1:20.000) getestet. Die Konzentrationen wurden pro Maus gemitt-

3. Ergebnisse

telt und nach Behandlungsgruppen differenziert durch eine Kruskal-Wallis ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test analysiert (Abbildung 3.6.). Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Antikörpermenge in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels ELISA ermittelt werden, sodass bisher keine Probleme am Immun-IgG festgestellt werden konnten.

Um das Modell zu validieren, wurden von den Gefrierschnitten der Ohren, welche an Tag 20 entnommen wurden, DIFs der PBS-, Dapson- und Colchicingruppen durchgeführt (Abbildung 3.7.). Erwartungsgemäß sind keine Intensitätsunterschiede, sowohl in den Anti-Kaninchen-IgG- (A bis C) als auch in den Anti-Maus-C3-Proben (D bis F) zwischen den exemplarischen Bildern der Behandlungsgruppen, ersichtlich. Unterschiede in der IgG-Ablagerung an der DEJ sind im Antikörpertransfer-induzierten Modell bei den verabreichten Pharmaka auch nicht zu erwarten, da die IgG-Menge exogen in gleichen Mengen zugeführt wurde.

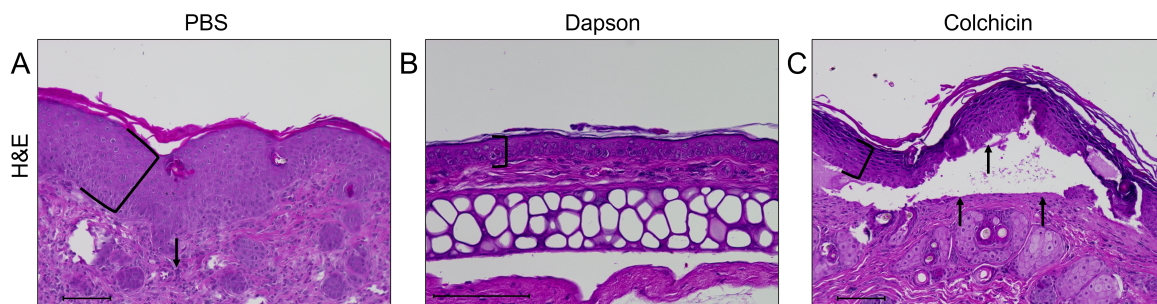


Abbildung 3.8.: Histologische Beispielbilder der AIL-Mäuse in Generation 16 zeigen morphologische Entzündungszeichen in unterschiedlicher Ausprägung. Ohrhautproben der AIL-Mäuse der Generation 16 wurden an Tag 20 entnommen, wovon H&E-Färbung angefertigt wurden. Diese AIL-Mäuse wurden vorher sechs mal mit 2,5 mg Immun-IgG injiziert (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und entwickelten daraufhin eine Antikörpertransfer-induzierte EBA. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit Dapson, Colchicin oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. Die Histologien erfolgten zur Konzeptüberprüfung des EBA-Modells, um Entzündungszeichen an der Haut darzustellen. **A** Beispielbild einer H&E für die PBS-Gruppe mit granulozytären Infiltraten (Pfeil) sowie einer deutlich verbreiterten Epidermis (Klammer) **B** Beispielbild einer H&E der Dapsongruppe mit einer kaum verbreiterten Epidermis ohne entzündliche Infiltrate **C** Beispielbild einer H&E der Colchicingruppe mit granulozytärer Infiltration sowie einer subepidermalen Blasenbildung (Pfeile) mit verbreiteter Epidermis (Klammer) Maßstab: 100 μ m; Gruppengröße: PBS n=24, Dapson n=22, Colchicin n=23; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; H&E - Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zusätzlich zu der Ohrhaut für die Cryoschnitte wurden an Tag 20 auch Ohrhautproben für H&E-Färbungen entnommen (Abbildung 3.8.). Dabei fällt vor allem auf, dass das Beispielbild der Dapsongruppe (Abbildung 3.8. B) insgesamt unauffällig ist,

3.2. *Untersuchung etablierter Pharmaka im Antikörpertransfer-induzierten Modell der experimentellen EBA*

wohingegen sich in der Probe aus der PBS-Gruppe (Abbildung 3.8. A) eine deutlich verbreiterte Epidermis sowie granulozytäre Infiltrate zeigen. In dem Beispielfeld der Colchicingruppe (Abbildung 3.8. C) finden sich eine granulozytäre Infiltration sowie eine subepidermale Blasenbildung mit leicht verbreiteter Epidermis.

3.2.3. Dapson und Colchicin verbessern den klinischen Verlauf einer Antikörpertransfer-induzierten EBA in AIL Tieren in der Frühphase der Klinik in Generation 19

Um die statistische Aussagekraft der Ergebnisse aus Generation 16 durch höhere Fallzahlen zu verbessern, wurden Dapson und vor allem Colchicin in weiteren AIL-Mäusen untersucht. Diesen Mäusen der Generation 19 wurden insgesamt 6 Mal 2,5 mg Gesamtkaninchen-IgG injiziert (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10). Die tägliche Behandlung erfolgte mit Dapson oder in der Kontrollgruppe mit PBS. Colchicin wurde nur einmal in der Woche verabreicht und an den anderen Tagen erfolgte eine orale Gabe von PBS (Abbildung 2.2.). Die betroffene KOF wurde an Tag 0, 4, 8, 12, 16 und 20 bestimmt (Abbildung 3.9. A). Der Score zeigte bei der Kontrollgruppe einen kurzen Anstieg an Tag 4. An diesem Tag gibt es in der Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Colchicin- und Dapsongruppe. Da die Krankheitsaktivität danach aber in allen Gruppen deutlich absinkt, sind keine weiteren signifikanten Unterschiede erkennbar. Zusätzlich wurden die AUCs des klinischen Verlaufs von Tag 0-20 bestimmt und deren Verteilung (Abbildung 3.9. B) mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Dabei gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Krankheitsschwere zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Dapson $p = 0,6306$ und Colchicin $p = 0,9295$ jeweils bezogen auf die Kontrolle). An Tag 12 und 20 wurden klinische Bilder der Mäuse aufgenommen, aber diese weisen fast alle keine Manifestationen einer EBA auf (Abbildung 3.9. C - E).

Die marginalisierte Krankheitsaktivität in Generation 19 machte eine Evaluation von Behandlungsmethoden schwieriger, sodass auf ein ELISA, DIF sowie H&E-Färbungen verzichtet wurde.

3. Ergebnisse

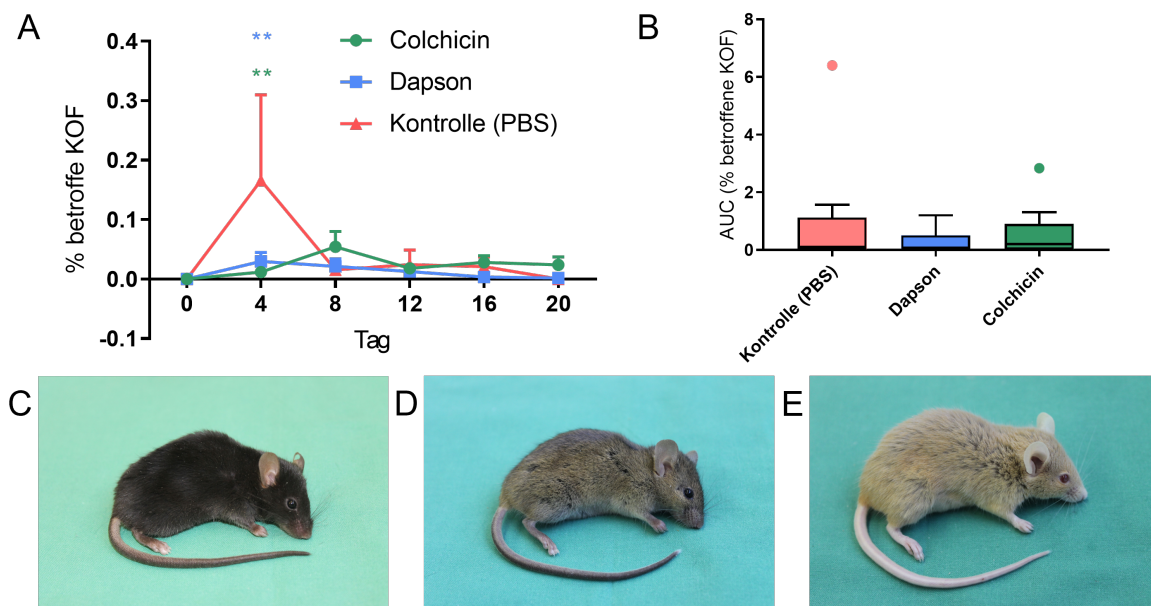


Abbildung 3.9.: Dapson und Colchicin verbessern den klinischen Verlauf der EBA in der Frühphase der Klinik in Generation 19. AIL-Mäuse der Generation 19, welche sechs mal mit 2,5 mg Gesamt-Kaninchen-IgG injiziert wurden (Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10) und daraufhin nur noch eine marginale Antikörpertransfer-induzierte EBA entwickelten. Parallel dazu wurde eine tägliche Behandlung mit Dapson, Colchicin oder PBS als Kontrolle ab Tag 0 begonnen. Die betroffene KOF wurde an Tag 0, 4, 8, 12, 16 und 20 bestimmt. **A** Die Mittelwerte der Scores über den gesamten Zeitraum wurden bestimmt und differenziert nach Behandlungsgruppen mit SEM als Fehlerbalken dargestellt. EBA-Läsionen waren ab dem 4. Tag erkennbar. Für die Colchicin- und Dapsongruppe gab es nur marginale Anstiege. Unter Colchicin-Therapie steigt der Score von Tag 4 auf Tag 8 leicht an und sinkt dann im weiteren Verlauf auf fast 0. Unter den anderen Therapien sinkt der Score schon nach Tag 4 und ist die weiteren Tage bei fast 0. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Dapson- und der Kontrollgruppe sowie der Colchicin- und der Kontrollgruppe in der Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test an Tag 4. **B** Die AUC des klinischen Verlaufs von Tag 0-20 wurde bestimmt und die Verteilung als Box-Whisker-Diagramm nach Tukey, unterteilt nach Behandlungsgruppen, dargestellt. Die Signifikanzniveau der p-Werte der Kruskal-Wallis ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test sind nicht gekennzeichnet, da diese mit $p = 0,6306$ für Dapson und $p = 0,9295$ für Colchicin (jeweils bezogen auf die Kontrolle) nicht signifikant sind. **C** Beispielbild einer Maus der Kontrollgruppe von Tag 12 ohne klinische Manifestationen einer EBA. **D** Beispielbild einer Maus der Dapsongruppe von Tag 12 ohne klinische Manifestationen einer EBA. **E** Beispielbild einer Maus der Colchicingroupe von Tag 12 ohne klinische Manifestationen einer EBA. Gruppengröße: PBS $n=12$, Dapson $n=14$, Colchicin $n=18$; Signifikanzniveau: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; AUC - Area under the curve; KOF - Körperoberfläche

3.2.4. Reduktion der Krankheitsaktivität bei AIL-Mäusen mit fortschreitender Generation im Antikörpertransfer-induzierten Modell nachweisbar

Da über die Generationen aufgefallen ist, dass das Absinken der Krankheitsaktivität eine Evaluation von Behandlungsmethoden immer schwieriger machte, wurde nun überprüft ob diese Reduktion auch statistisch nachweisbar ist. Dafür wurden die AUCs der Kontrollgruppen einer Generation 12, welche von Dr. Iwata mit PBS behandelt wurden (Daten im Anhang in Tabelle A.1.) sowie der Generationen G14, G16 und G19 aus dieser Arbeit, miteinander verglichen. Die Daten von Generation G12 sind bisher noch unveröffentlicht und werden mit der freundlichen Genehmigung von Dr. Iwata verwendet.

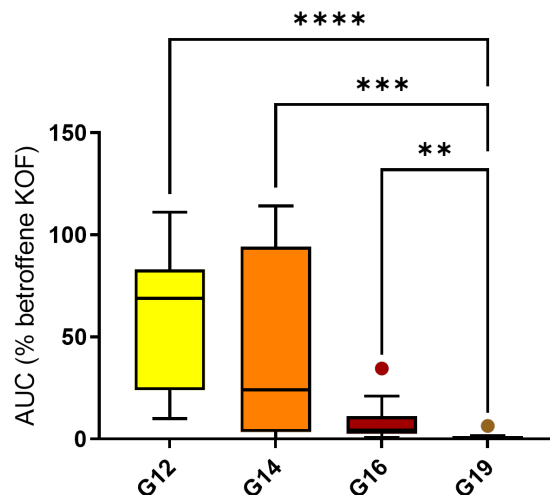


Abbildung 3.10.: Im Antikörpertransfer-induzierten Modell reduziert sich die Krankheitsaktivität mit fortschreitender Generation. Die AUC des klinischen Verlaufs von Tag 0-20 wurde bestimmt und die Verteilung der AUCs der Kontrollgruppen differenziert nach Generationen abgebildet. Die Darstellung ist ein Box-Whisker-Plot nach Tukey und darüber sind die Signifikanzniveau der Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test bezogen auf Generation G19 abgebildet. Dabei sind alle anderen Generationen signifikant höher als G19. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; AUC - Area under the curve; KOF - Körperoberfläche; G12 - Generation 12; G14 - Generation 14; G16 - Generation 16; G19 - Generation 19

Dabei zeigt die Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test, dass es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Generationen gibt (Abbildung 3.10.). So sind Generation 12 (**** $p < 0,0001$), Generation 14 (***) $p < 0,001$ und

3. Ergebnisse

Generation 16 (** $p < 0,01$) signifikant stärker betroffen als Generation 19.

3.3. Untersuchung etablierter Pharmaka in Immunisierungs-induzierter experimenteller EBA

Da das Antikörpertransfer-induzierte Modell in den AIL-Mäusen eine signifikante Reduktion der Krankheitsaktivität in höheren Generationen zeigte, erfolgte eine Evaluation etablierter Pharmaka im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell. Dieses bietet auch den Vorteil, ein breiteres Spektrum der Pathogenese abzubilden, sodass weitere Interaktionspunkte für die Pharmaka möglich sind, wie z. B. der Einfluss von B-Zellen. Im Gegensatz zum prophylaktischen Ansatz des Antikörpertransfermodells kann so eine Therapie nach einer Latenzzeit von 6-7 Wochen erfolgen, die es ermöglicht, dass die Krankheit erst bei einem bestimmten Schweregrad therapiert wird. Außerdem wurde nun der Inzuchtstamm B6.SJL-H2s C3c/1CyJ verwendet, da dieser für die Immunisierungs-induzierte EBA suszeptibel ist [109, 143].

3.3.1. Methylprednisolon verbessert den klinischen Verlauf einer Immunisierungs-induzierten EBA in B6.SJL-H2s C3c/1CyJ Tieren

Tabelle 3.2.: Im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell besteht eine moderate Immunisierungseffizienz. Mäuse des Stammes B6.SJL-H2s C3c/1CyJ wurden mit mCol7^{vWFA2} und einem Adjuvans immunisiert. Klinisch waren bei den Tieren EBA-Läsionen ab der 5. Woche nach Immunisierung erkennbar und steigend. Mäuse mit mehr als 1,5 % der betroffenen Körperoberfläche konnten in die Behandlungsgruppen eingeschlossen werden. 16 Mäuse erfüllten dieses Einschlusskriterium. Elf Mäuse entwickelten eine EBA mit einem zu niedrigen Score von unter 1,5 % und bei 25 manifestierte sich keine klinische EBA.

Kategorie	Anzahl	Anteil
Immunisiert	54	
Gestorben	2	
Inzidenz	27/52	51,9 %
Score <1,5 %	11/52	21,2 %
Score ≥1,5 %	16/52	30,7 %

Zur Ergänzung der Daten aus den vorherigen Versuchen, wurde das schon in Generation 14 als wirksam erwiesene mPSL auch im Inzuchtstamm bei einer Immunisierungs-induzierten EBA untersucht. Dafür wurden Mäuse des Stammes B6.SJL-H2s C3c/1CyJ

3.3. Untersuchung etablierter Pharmaka in Immunisierungs-induzierter experimenteller EBA

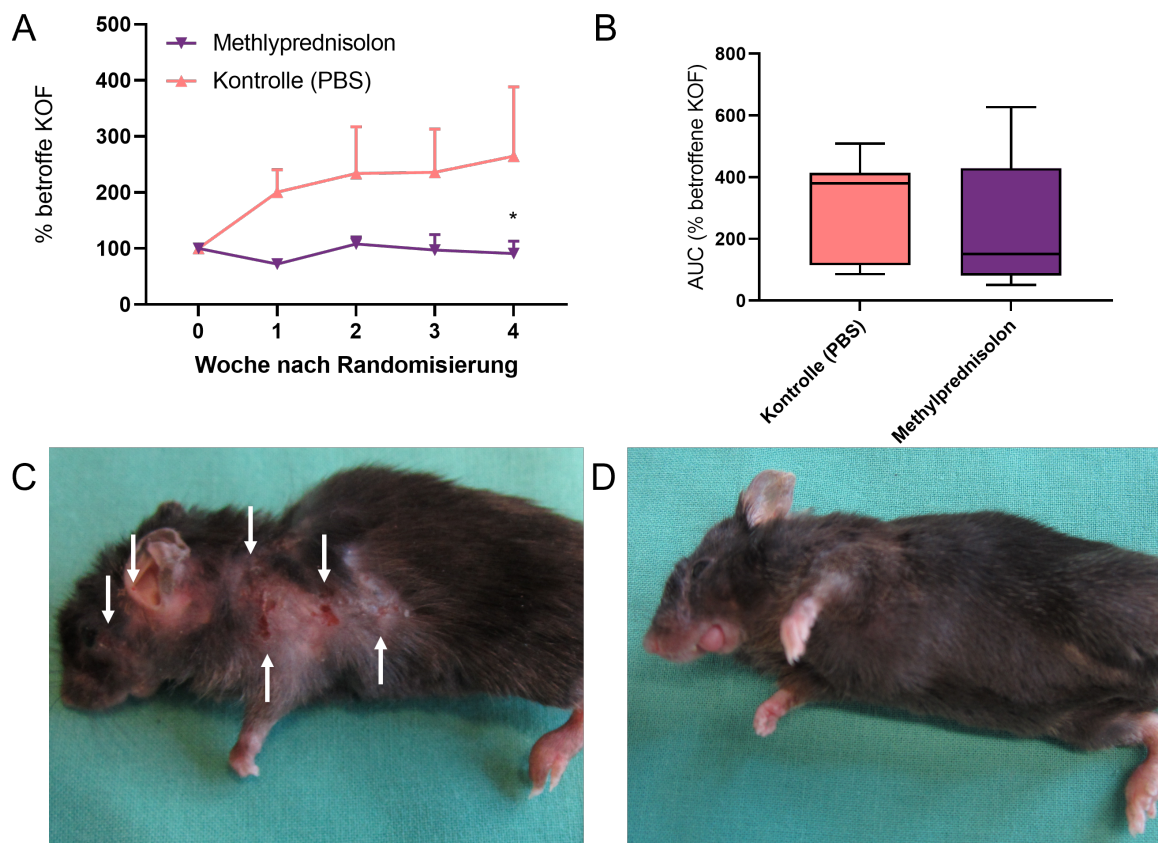


Abbildung 3.11.: Methylprednisolon führt im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell zu einer Verbesserung des klinischen Verlaufs. B6.SJL-H2s C3c/1CyJ-Mäuse, welche einmalig mit $60 \mu\text{g}$ mCol7^{vWFA2} plantar immunisiert wurden (Woche 0) und daraufhin eine Immunisierungs-induzierte EBA entwickelten. Die betroffene KOF wurde in Woche 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 bestimmt. Mit Beginn der Woche 7 nach Immunisierung erfolgte die Randomisierung und es wurde eine tägliche Behandlung mit mPSL oder PBS als Kontrolle etabliert. **A** Die Mittelwerte der prozentualen Scores bezogen auf den Beginn der Randomisierung in Woche 7 über den gesamten Therapiezeitraum wurden bestimmt und differenziert nach Behandlungsgruppen mit SEM als Fehlerbalken dargestellt. Das Sternchen kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen der mPSL- und der Kontrollgruppe in der Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test in Woche 4 nach der Randomisierung. **B** Die AUC des klinischen Verlaufs von Woche 0 bis 11 wurde bestimmt und die Verteilung als Box-Whisker-Diagramm nach Tukey, unterteilt nach Behandlungsgruppen, dargestellt. Das Signifikanzniveau des p-Werts des Mann-Whitney-U-Tests ist nicht gekennzeichnet, da dieser mit $p = 0,4079$ nicht signifikant ist. **C** Beispielbild einer Maus aus der Kontrollgruppe in Woche 11 mit Alopezie am Rumpf und Kopfbereich sowie Krusten und Erosionen an markierten Stellen. **D** Beispielbild einer Maus der Methylprednisolongruppe in Woche 11 mit leichter Alopezie im Schnauzen und Halsbereich. Gruppengröße: PBS $n=7$, Methylprednisolon $n=9$; Signifikanzniveau: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; AUC - Area under the curve; KOF - Körperoberfläche

mit mCol7^{vWFA2} und einem Adjuvans immunisiert (Abbildung 2.3.). Klinisch waren bei den Tieren EBA-Läsionen ab der 5. Woche nach Immunisierung erkennbar und ansteigend. Mäuse mit mehr als 1,5% der betroffenen Körperoberfläche in Woche 7 konnten in die Behandlungsgruppen eingeschlossen werden (Tabelle 3.2.). In Woche 7

3. Ergebnisse

erfolgte die Randomisierung und der Beginn der Therapiephase der eingeschlossenen Mäuse. Die Behandlungen erfolgten mit mPSL oder PBS als Kontrolle täglich über 4 Wochen (Woche 7, 8, 9 und 10). Ab Woche 3 wurde die betroffene KOF wöchentlich bis zum Endpunkt in Woche 11 ermittelt. Um die Änderung der KOF besser vergleichen zu können, wurde die KOF in Woche 7 als Referenz genommen und die darauf folgenden Werte als prozentualer Anteil dieses Startwerts berechnet (Abbildung 3.11. A). Eine Analyse dieser Daten durch eine Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der mPSL-Gruppe und der Kontrollgruppe. Zusätzlich wurde die AUC über den gesamten Untersuchungszeitraum (Woche 3 bis 11) berechnet und die Verteilung der beiden Behandlungsgruppen durch einen Mann-Whitney-U-Test analysiert (Abbildung 3.11. B). Diese Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der beiden Gruppen. Außerdem wurden in Woche 11 klinische Bilder der Mäuse angefertigt (Abbildung 3.11. C).

3.3.2. Methylprednisolon reduziert den Anteil an IgG1 im Verlauf der Immunisierungs-induzierten EBA bei B6.SJL-H2s C3c/1CyJ Mäusen

Um die Anteile spezifischer Antikörper der B6.SJL-H2s C3c/1CyJ Mäuse zu ermitteln, wurden in Woche 7 (vor dem Behandlungsbeginn) und 9 (nach dem Behandlungsbeginn) Blutproben der Mäuse genommen und diese mit einem Antikörper-ELISAs auf die Anteile von IgG1, IgG2a und IgG2b in beiden Behandlungsgruppen untersucht (Abbildung 3.12.). Die gemittelten relativen Konzentrationen, bezogen auf den Therapiebeginn (Woche 7), wurden durch eine Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli als Post-hoc-Test analysiert, wobei sich in Woche 9 ein signifikanter Unterschied in der IgG1-Konzentration ergab. Der IgG2a- und IgG2b-ELISAs wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

3.3. Untersuchung etablierter Pharmaka in Immunisierungs-induzierter experimenteller EBA

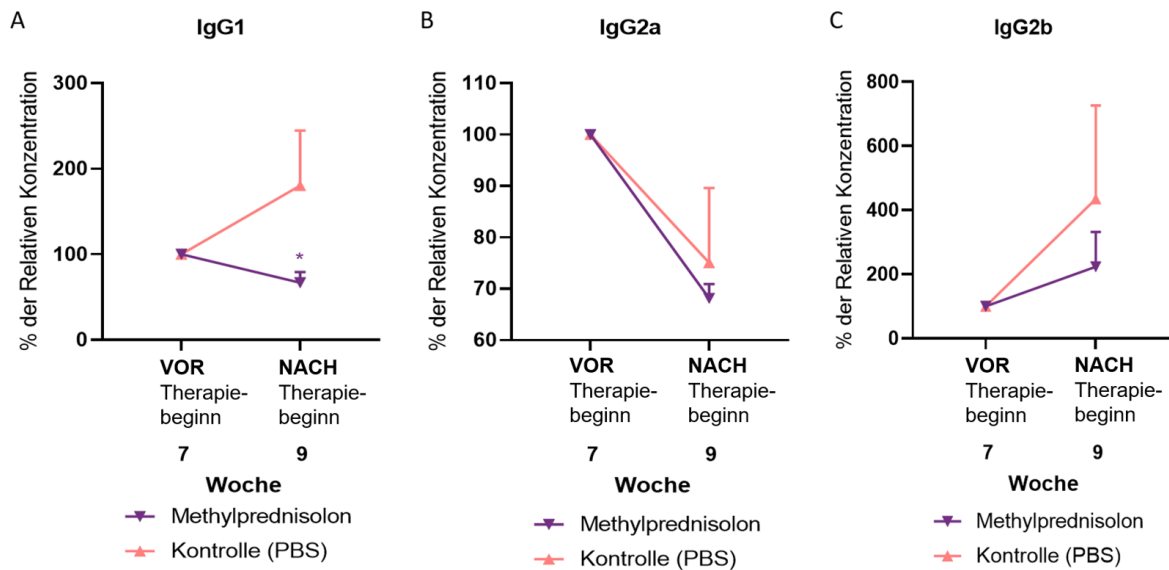


Abbildung 3.12.: Methylprednisolon reduziert den Anteil an IgG1 im Verlauf der Immunisierungs-induzierten EBA bei B6.SJL-H2s C3c/1CyJ Mäusen. B6.SJL-H2s C3c/1CyJ-Mäuse, welche einmalig mit $60 \mu\text{g}$ mCol7^{WFA2} plantar immunisiert wurden (Woche 0) und daraufhin eine Immunisierungs-induzierte EBA entwickelten. Ab Woche 7 wurde eine tägliche Behandlung mit mPSL oder PBS als Kontrolle begonnen. In Woche 7 (vor Behandlungsbeginn) und in Woche 9 (nach Behandlungsbeginn) wurde den B6.SJL-H2s C3c/1CyJ Mäusen Blutproben abgenommen und diese per ELISA auf die Antikörperklassen IgG1, IgG2a und IgG2b untersucht. **A** Mittelwerte der relativen Konzentration an IgG1 bezogen auf den Behandlungsbeginn (Woche 7) über den gesamten Zeitraum differenziert nach Behandlungsgruppen mit SEM als Fehlerbalken. In Woche 9 nach dem Behandlungsbeginn ist die IgG1-Konzentration der Methylprednisolongruppe in der Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). **B** Mittelwerte der relativen Konzentration an IgG2a bezogen auf den Behandlungsbeginn (Woche 7) über den gesamten Zeitraum, differenziert nach Behandlungsgruppen mit SEM als Fehlerbalken. Eine Analyse durch eine Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli ergab keine signifikanten Unterschiede. **C** Mittelwerte der relativen Konzentration an IgG2b bezogen auf den Behandlungsbeginn (Woche 7) über den gesamten Zeitraum, differenziert nach Behandlungsgruppen mit SEM als Fehlerbalken. Eine Analyse durch eine Two-Way ANOVA mit einer zweistufigen linearen step-up Testprozedur nach Benjamini, Krieger und Yekutieli ergab keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Gruppengröße: PBS n=7, Methylprednisolon n=9; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ansonsten keine Signifikanz $p > 0,05$; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; IgG1 - Immunglobulin-G1; IgG2a - Immunglobulin-G2a; IgG2b - Immunglobulin-G2b

3.3.3. Als Kontrolle des Immunisierungs-induzierten Modells wurde die Bindung von Immunglobulin- und Komplement C3a-Ablagerungen an der DEJ detektiert

Um das Modell zu validieren wurden von den Gefrierschnitten der Ohren, welche nach der Tötung in Woche 11 entnommen wurden, DIFs der PBS- und Methylprednisolongruppen durchgeführt (Abbildung 3.13.). Es sind Ablagerungen von Antikörpern der

3. Ergebnisse

Klassen IgG1, IgG2a, IgG2b sowie C3 an der DEJ von immunisierten Mäusen in der Kontroll- und der Therapiegruppe zu erkennen, was das Modell, eine Komplementbeteiligung und eine Autoantikörperbildung, im Rahmen der Immunisierung, bestätigt.

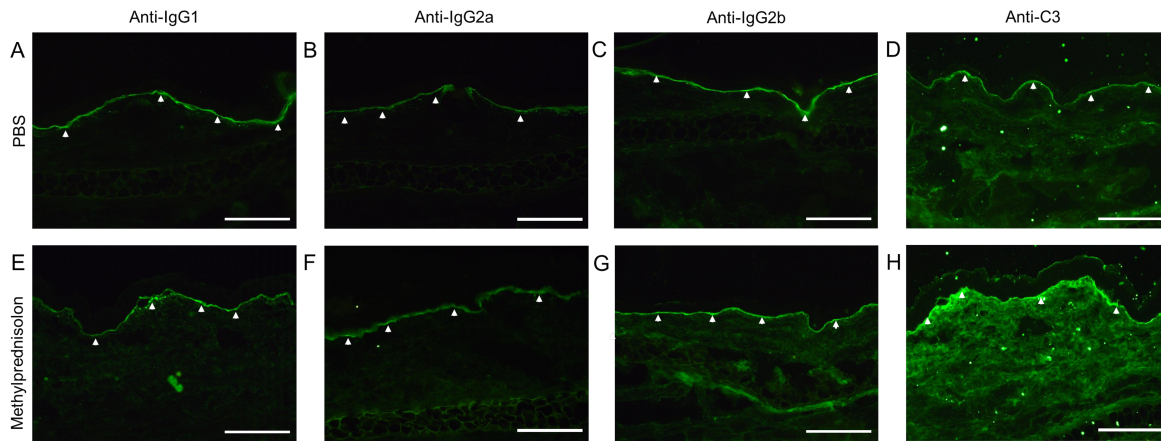


Abbildung 3.13.: Als Kontrolle des Immunisierungs-induzierten Modells wurde die Bindung von Immunglobulin- und Komplement C3a-Ablagerungen an der DEJ mittels DIF detektiert. B6.SJL-H2s C3c/1CyJ-Mäuse wurden einmalig in Woche 0 mit $60 \mu\text{g}$ mCol7^{vWFA2} plantar immunisiert, daraufhin entwickelten sie eine Immunisierungs-induzierte EBA, wurden ab Woche 7 täglich mit Methylprednisolon oder PBS (als Kontrolle) behandelt und mit Beginn der Woche 11 getötet. Hiernach wurden die Ohren entnommen, Kryoschnitte angefertigt und mittels DIF auf IgG1, IgG2a, IgG2b und C3a zur Validierung des Modells untersucht. **A** Beispielbild der Anti-IgG1-DIF einer Maus der Kontrollgruppe (PBS) des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). **B** Beispielbild einer Anti-IgG2a-DIF einer Maus der Kontrollgruppe (PBS) des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). **C** Beispielbild einer Anti-IgG2b-DIF einer Maus der Kontrollgruppe (PBS) des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). **D** Beispielbild einer Anti-C3-DIF einer Maus der Kontrollgruppe (PBS) des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). **E** Beispielbild einer Anti-IgG1-DIF einer Maus der Methylprednisolongruppe des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). **F** Beispielbild einer Anti-IgG2a-DIF einer Maus der Methylprednisolongruppe des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). **G** Beispielbild einer Anti-IgG2b-DIF einer Maus der Methylprednisolongruppe des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). **H** Beispielbild einer Anti-C3-DIF einer Maus der Methylprednisolongruppe des Immunisierungs-induzierten Modells mit Ablagerungen an der DEJ (Pfeile). Maßstab: $100 \mu\text{m}$; Gruppengröße: PBS n=7, Methylprednisolon n=9; PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung; IgG1 - Immunglobulin-G1; IgG2a - Immunglobulin-G2a; IgG2b - Immunglobulin-G2b; C3 - Komplementkomponente 3

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in der EBA etablierte Pharmaka an zwei Mausmodellen evaluiert. Einerseits geschah dieses per Antikörpertransfermodell im für Autoimmunität prädisponierten Auszuchtstamm als schnelles prophylaktisches Vorgehen. Hier zeigten Methylprednisolon und Dapson eine signifikante Verbesserung der Klinik dieser Erkrankung. Weiterhin erfolgte eine Testung des Standardtherapeutikums Methylprednisolon in einem therapeutischen Immunisierungs-induzierten Modell. Methylprednisolon zeigte hier nicht nur signifikante Verbesserungen auf die klinische Erkrankungsschwere, sondern auch eine signifikante Reduktion des spezifischen Antikörpertiters der Klasse IgG1.

Das Antikörpertransfer-induzierte Modell der experimentellen EBA wurde als prophylaktisches Studiendesign im für Autoimmunität prädisponierten Auszuchtstamm untersucht. Hier zeigte die Untersuchung der 'etablierten' Pharmaka signifikante Unterschiede. So verbessert in Generation 14 die Methylprednisolonbehandlung den klinischen Score signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Danach wurden Colchicin und Dapson in Generation 16 und 19 untersucht. In Generation 16 zeigte Dapson einen signifikant besseres Ergebnis beim klinischen Score im Vergleich zur Kontrollgruppe. In Generation 19 zeigen sich im Score in der Frühphase der Klinik signifikante Unterschiede in der Behandlung mit Colchicin und Dapson, jeweils bezogen auf die Kontrollgruppe. Da über die Generationen auffiel, dass die Reduktion der Krankheitsaktivität eine Evaluation von Behandlungsmethoden progredient erschwerte, wurde nun überprüft ob diese Reduktion auch statistisch nachweisbar ist. Dafür wurden die AUCs der Kontrollgruppen einer Untersuchung in Generation 12, welche von Dr. Iwata behandelt wurde, und meine Daten der Generationen G14, G16 und G19 miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Krankheitsaktivität mit fortschreitender Generation im Antikörpertransfer-induzierten Modell bis hin zur minimalen EBA-Manifestation in Generation 19. Daher erfolgte eine weitere Evaluation von mPSL im Immunisierungs-induziertem EBA-Modell. Dabei zeigte sich nicht nur signifikante Verbesserung im klinischem Score sondern auch im spezifischen IgG1-ELISA.

4. Diskussion

Das Antikörpertransfermodell erfolgte in AIL-Mäusen, welche sequentiell und zufällig unter Vermeidung von Verwandtenverpaarungen gekreuzt sind [51]. Die AIL in dieser Arbeit entstand aus den vier ‘Gründerstämmen’ BxD2/TyJ, NZM2410/J, MRL/MpJ und Cast/EiJ. Kreuzungen erfolgten mit gleichen Stamm- und Geschlechtsanteilen mit mindestens 50 Zuchtpaaren pro Generation [142,221,238]. Drei der Gründerstämmen neigen zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen. So besitzt der von den Inzuchtstämmen C57BL/6J und DBA/2J abgeleitete BxD2/TyJ eine generalisierte Entwicklung von Autoimmunität. So entwickeln die Tiere spontan Autoantikörper, Arthritis und Glomerulonephritis [160].

NZM2410/J sind abgeleitet von *New Zealand black* und *New Zealand white* Mäusen. Aufgrund der Elternstämmen besitzen sie die Kombination verschiedener Suszeptibilitätsgene zur Anfälligkeit für spontane Lupus-Nephritis [194]. Daher wurden sie für genomweite Assoziationsstudien zur Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen eingesetzt [158, 178]. Die MRL/MpJ entwickeln gleich mehrere Autoimmunitäten wie Arthritis, Arteritis, Glomerulonephritis oder Pankreatitis und besitzen eine T-Zell Dysfunktion [114]. Auch ist es besonders, dass MRL/MpJ ein normales *Fas Cell Surface Death Receptor* (Fas)Rezeptor-Gen besitzen, welches bei der Apoptose von aktivierten Lymphozyten, also bei der Hämostase von Immunreaktionen, eine wichtige Rolle spielt. Trotz funktionsfähigem Fas-Rezeptor sind MRL/MpJ-Mäuse aber anfällig für Autoimmunität [45, 133]. Nach einer mathematischen Abschätzung anhand des Zuchtprotokolls stammt das Genom dieses Stammes zu 75 % aus LG/J, zu 12,6 % aus AKR/J und zu 12,1 % aus C3H/Di und lediglich 0,3 % aus C57BL/6J aus welchen die MRL/MpJ abgeleitet sind [133]. Der Cast/EiJ-Stamm ist ein von gefangenen Wildtieren aus Thailand abgeleiteter Mausstamm. Als solcher unterscheidet sich dieser von typischen Labormäusen, wie die anderen Gründerstämmen, durch ein heterogenes Genom [119], und wurde aufgrund dieser Charakteristik für die AIL ausgewählt. Die Vorfahren der Gründerstämmen sind bis auf C57BL/6 nicht redundant, aber dieses stellt lediglich 0,3 % des Genoms der MRL/MpJ dar. Zusammengefasst sind drei Gründerstämmen der AIL selbst aus unterschiedlichen Mausstämmen mit verschiedenen Vorfahren abgeleitet und besitzen verschiedene genetische Prädispositionen für diverse (teilweise sogar spontane) Autoimmunerkrankungen. Eine zusätzliche genetische Heterogenität wird durch den von Wildtieren abgeleiteten Stamm Cast/EiJ vermittelt. In diesem Umfeld verschiedener Mausstämmen mit diversen Suszeptibilitäten für Autoimmunität, sowie einem Auszuchtstamm, entsteht mit der AIL eine heterogenere Population als es in

Inzuchtstämmen möglich ist [125, 142]. Zudem besitzen die AIL-Mäuse eine Suszeptibilität für die experimentelle EBA mittels Antikörpertransfer (bisher unveröffentlichte Daten von Dr. Iwata Anhang A.5.).

Alle Gründerstämme der AIL sind empfänglich gegenüber einer experimentellen EBA mittels Antikörpertransfer. Allerdings zeigten Sadeghi et al. in einer vergleichenden Untersuchung deutliche Unterschiede bezüglich Dauer bis zum Beginn erster klinischer Manifestation und auch des maximalen klinischen Scores. So zeigte der MRL/MpJ erste Symptome nach ca. 7 Tagen und hatte einen gemittelten maximalen Score von 1,3 % KOF. Weiterhin waren am Stamm NZM2410/J erste Symptome nach ca 7 Tagen bei einem gemittelten maximalen Score von 2,4 % KOF ersichtlich. Der Stamm BxD2/TyJ zeigte erste Symptome bereits nach ca. 4 Tagen und auch der maximale Score war mit 16,2 % KOF erheblich größer als angegeben. Der von Wildtieren abgeleitete Cast/EiJ-Stamm hatte mit ersten Symptomen nach ca 2 Tagen einen noch früheren Beginn der Klinik und zeigte einen beachtlichen maximalen Score von 10,0 % KOF [195]. Im Inzuchtstamm ist eine Medikamentenstudie abhängig von der Genetik und daher auch eben von der stammspezifischen Reaktion auf ein Pharmakon. Hieraus folgt, dass in einem Stamm ein Medikament besonders gut bis gar nicht wirken kann [40, 123]. Einen Stamm zu untersuchen der besonders gut oder besonders schlecht auf eines der oben genannten Therapeutika reagiert, wäre eine Verzerrung der Ergebnisse, die nicht bemerkt werden würde und zu vermeiden ist. Vergleichbares gilt prinzipiell auch bei der stammspezifischen Reaktion auf die Induktion der EBA [195], aber auch für die Evaluation der Pharmaka in der Therapie der EBA. Als Dervasi und Soller das Konzept einer *'advanced intercross line'* beschrieben, wurde es als Methode etabliert um in einer heterogenen Population *Quantitative Trait Locus* (in etwa Quantitativer Merkmalsloкус) (QTL) zu kartieren [51]. Hieraus wurde gefolgert, dass diese Diversität näher an einer natürlichen Population ist und daher in Wirksamkeitsstudien repräsentativer erscheint als in einem Inzuchtstamm. Eine Evaluation der Therapie könnte auch in vielen verschiedenen Inzuchtstämmen evaluiert werden, wie es in Toxizitätsstudien sinnvoll erscheint [40]. Auch scheinen Inzuchtstämme eine statistische Signifikanz mit kleineren Gruppengrößen einfacher zu erreichen und es wird somit erleichtert reproduzierbare Ergebnisse zu liefern [65]. Dieses würde das Problem der stammspezifischen Reaktion auf Pharmaka lösen. Wenn aber Inzuchtstämme verwendet werden sollen, wäre ein Immunisierungs-induziertes Modell zu verwenden (1.4.3.), um die Vorteile der breiteren Abbildung der Pathogenese und des therapeutischen Studiendesigns zu nutzen (2.9.). Diese Inzuchtstämme müssten dann auch für die experimentelle EBA eine Suszeptibi-

4. Diskussion

lität besitzen, die aber an den Haplotyp H2s (und in zu geringen Maße an H2k) gekoppelt ist [143]. Dieses begrenzt die Auswahl an geeigneten Inzuchtstämmen aber so sehr, dass eine Therapiestudie im Immunisierungs-induzierten Modell schwer vorstellbar ist. Ein weiterer Punkt ist, dass die Rekombinationen des genetischen Hintergrundes offensichtlich auch Auswirkungen auf die EBA hat, wie es Ludwig et. al zeigten [142]. Hier wurde eine Immunisierung-induzierte EBA in AIL-Mäusen der Generation vier durchgeführt, um eine QTL-Kartierung vorzunehmen. Der einzige für diese experimentelle EBA suszeptible Gründerstamm war der MRL/MpJ, was nach Mendel'scher Verteilung eine Immunisierungseffizienz von maximal 25 % erwarten ließ. Interessanterweise trat aber eine EBA in 33 % der Fälle auf [142]. Auszuchtstämme liefern zwar keine perfekte aber bessere Vergleichbarkeit zu natürlichen Populationen [1]. Wir entschieden uns daher für eine Evaluation der Therapeutika in einer heterogenen Population mittels Antikörpertransfer-Modell, sowie eines Immunisierungs-induzierten Modells im Inzuchtstamm.

Als Konsens gilt für Autoimmunität ein Zusammenspiel bestimmter genetischer Prädispositionen und Umweltfaktoren. [10, 56, 59, 66, 75, 142, 143, 168, 174, 202, 217, 221, 256]. Beim Menschen sind seit längerem auch genetische Hinweise auf die Empfänglichkeit und Inzidenz der EBA bekannt [75, 174, 256]. In einer genomweiten Assoziationsstudie konnten Ludwig et al. QTLs und die Suszeptibilität der EBA in AIL-Mäusen korrelieren [142]. Sadeghi et al. konnten einen Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) mit signifikanter Assoziation zur Suszeptibilität der EBA bestimmen. Mechanistisch wurde dieser als *Retinoid-related orphan receptor α* identifiziert und zeigte sich essentiell für die Effektorphase der experimentellen EBA [195]. Weitere Belege für Rekombinationen von Suszeptibilitätsgenen und deren Wirkungen auf die Erkrankung gibt es in anderen Autoimmunerkrankungen wie z. B. systemischer Lupus erythematodes (SLE) [158, 159].

Alle diese genetischen Untersuchungen zeigen, dass es viele Loci mit einem Einfluss auf die EBA und somit eine genetische Basis für die Suszeptibilität in der EBA gibt [125]. Insbesondere sind Allele des HLA-Locus entscheidend, wie es eine ethnische Häufung der EBA unter afrikanischstämmiger Bevölkerung mit dem HLA-DRB1*15:03 zeigte (Cave: Die HLA-Nomenklatur wurde 2010 geändert) [75, 256]. Ähnliches gilt in der Maus mit den Haplotyp H2s [143]. Daher liegt es nahe anzunehmen, dass eine fortschreitende genetische Rekombination zu einem Verlust mehrerer Suszeptibilitätsgene in späteren Generationen führen kann, wie es schematisch im Anhang veranschaulicht ist (Anhang A.6.). Eine verminderte Anzahl an Suszeptibilitätsgenen in individuellen

Genomen kann die unterschiedliche Empfänglichkeit in diversen Inzuchstämmen [195] und eine EBA-Resistenz erklären.

Meine Ergebnisse des Antikörpertransfermodells zeigten eine im Verlauf mit steigender Generationszahl abnehmende Krankheitsschwere der EBA. Während der laufenden Versuchsdurchführung von Generation 19 testete ich den Titer des Immun-IgGs erneut mittels Immunfluoreszenz, ohne eine Veränderung zum Vorbefund feststellen zu können (Kapitel 3.1.1.). Für Generation 14, 16 und 19 wurde die gleiche Charge des Immun-IgG verwendet. Lediglich Dr. Iwata hatte in seinen Daten der Generation 12 eine andere Charge verwendet. Da nun die Krankheitsaktivität nur noch marginal vorhanden war, schien eine Weiterführung des Versuches nicht mehr sinnvoll zu sein, um Pharmaka zu evaluieren. Es zeigte sich, dass die Generationszahl eine signifikante Auswirkung auf die Suszeptibilität im Antikörpertransfermodell der EBA (Kapitel 3.2.4.) hat. Zum Ersten folgt hieraus, dass verschiedene Generationen dieses Auszuchtstamms nicht miteinander vergleichbar sind und zweitens kann angenommen werden, dass die Suszeptibilität aufgrund genetischer Rekombination oder Mutationen verloren zu gehen scheint. Eine fehlende Vergleichbarkeit zwischen den Generationen hat den Nachteil, dass anders als initial angedacht, verschiedene Pharmaka über die Generationen nun nicht gegeneinander evaluiert werden können.

Die etablierten Therapeutika der EBA (wie z. B. Dapson, Colchicin, Glucocorticoid) sind bisher noch nicht im Auszuchtstamm und auch nicht in einem parallelen Vergleich von zwei oder mehr etablierten Pharmaka evaluiert worden. Zwar hatten Hirose et al. IVIG und mPSL in Monotherapie untersucht, aber erstere sind zwar vielversprechend aber noch nicht so weit in der EBA etabliert [102,125]. Erst kürzlich konnten Pipi et al. zeigen, welche vielfältigen Wirkmechanismen und welches Potential IVIG in einer experimentellen EBA besitzt [179]. Die Tiere in dieser Arbeit wurden analog zu bestehender Literatur immunsuppressiv behandelt [14,39,41,43,82,96,100,102,148,231]. Diese Studien verwendeten alle höhere Dosierungen der einzelnen Pharmaka als sie im Menschen üblich sind, was mutmaßlich an der spezifischen Metabolismusrate der Maus liegt. Diese wird ungefähr mit dem 7fachen der humanen Metabolismusrate pro Masseinheit Körpergewicht angegeben [55], weswegen ich mich für eine initiale Dosierung im höheren Bereich der Studienlage entschied (Tabellen 2.7. und 2.8.). Geplant war eine spätere Dosisabstufung, welche durch die sinkende Inzidenz, Krankheitsschwere und z.T. fehlender Signifikanz der ersten Ergebnisse nicht verwirklicht werden konnte. Dies ist eine Limitation dieser Arbeit, da dosisabhängige Effekte nicht evaluiert und die

4. Diskussion

supratherapeutischen Dosen sich ohne eine Abstufung unter dem Einfluss der hohen Metabolismusrate der Maus schlecht beurteilen lassen. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Anzahl der verwendeten Mäuse.

Colchicin wurde nach Literaturrecherche bisher nur außerhalb eines Mausmodells der EBA untersucht. Hierbei wurden oft einmalige Dosen [39, 153] verwendet, aber keine längerfristige Therapie durchgeführt. Kürzlich wurde eine Studie publiziert, welche die Toxizität einer täglichen Therapie von 0,5 und 2,5 mg/kg für 1 Woche darstellt [214]. Colchicin wurde aufgrund der geringen therapeutischen Breite (Kapitel 1.3.5.) und langen Halbwertszeit in dieser Arbeit wöchentlich mit 1 mg/kg Körpergewicht dosiert, was im Vergleich zur LD₅₀ i.p. (Maus) von 2 mg Colchicin/kg Körpergewicht eine hohe Dosis darstellt [183, 193].

Ich verwendete Dapson in einer täglichen Dosierung von 34 mg/kg. Verschiedene Autoren haben Dapson in unterschiedlichen Mausversuchen und Dosierungen bei anderen Erkrankungen angewendet [14, 43, 82, 148, 231]. Deren verwendete tägliche Dosis variiert von 0,2 mg/kg [43] über 15 mg/kg [14] bis 34 mg/kg [82]. Der für eine Methämoglobinie wichtige Metabolit ist das Dapsonhydroxylamin. Aufgrund fehlender muriner N-Hydroxylierung und möglicher vermehrter Gewebsanreicherung ist die Toxizität in der Maus geringer als im Menschen [231]. Erst kürzlich veröffentlichten Murthy et al. eine Evaluation von Dapson in der EBA mit mehreren Konzentrationen (100, 10, 1 und 0,1 mg/kg) mit 9 bis 11 Mäusen pro Gruppe in einem Antikörpertransfermodell. Dapson in 10 und 100 mg/kg zeigten signifikante und dosisabhängige Besserungen im klinischen Score der EBA [167]. In meiner Arbeit wurde Dapson in Generation 16 und 19 untersucht. In beiden Generationen gab es signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. Dabei war der Score in Generation 16 an den Tagen 16 und 20 signifikant niedriger und in Generation 19 lediglich an Tag 4. Hier lässt sich vermuten, dass in den Therapiegruppen ein prophylaktischer Effekt auftritt, wobei die Aussagekraft sehr eingeschränkt ist, da auch in der Kontrollgruppe der Score ab Tag 8 wieder absinkt. Es zeigten sich Effekte des Dapsons, welche aber nicht so groß wie bei Murthy et al. waren, obwohl die Dosis im signifikant wirksamen Bereich von Murthy et al. lag. Das Immunglobulin war von Murthy et al. auf spezifische Anti-COL7-Antikörper aufgereinigt worden, was die sehr unterschiedlichen Dosen erklärt. In meiner Arbeit wurde Anti-mCol7^{vWFA2} Immunglobulin 2500 µg an Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10 verwendet. Murthy et al. nutzen 50 µg spezifisches Anti-mCOL7C an Tag 0, 2 und 4. Meine Versuchstiere zeigten erst zu späteren Zeitpunkten signifikante Unterschiede im Score, was womöglich auf mehrere Faktoren

zurückzuführen ist. Zum Einen sind die Paratope des polyklonalen Antikörpers aufgrund eines anderen Epitops, namentlich dem Col7^{vWFA2}, verschieden und besitzen höchstwahrscheinlich einen anderen Titer als bei Murthy et al. Zum Anderen wurde bei Murthy et al. mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in Maisöl ein anderes Lösungsmittel verwendet. Außerdem wurde in meiner Arbeit das Immun-IgG bis Tag 10 injiziert, was den längeren Verlauf der EBA erklärt. Des Weiteren ist die Gruppengröße mit 9-11 Mäusen bei Murthy et al. pro Dosierung vs. 22-24 in Generation 16 sowie 12-14 in Generation 19 geringer, zeigt aber trotz kleiner Gruppengröße eine Signifikanz. Der aufgrund von Varianz [1] und „experimentellem Hintergrundrauschen“ [65] im Auszuchtstamm wahrscheinlich ausschlaggebende Faktor ist aber, dass in meiner Arbeit ein Auszuchtstamm verwendet wurde und bei Murthy et al. ein Inzuchtstamm. Insgesamt zeigen sich auch bei methodischen Unterschieden kongruente Ergebnisse in der Therapie. Dapson hat klinische Effekte in einer experimentellen EBA, dabei konnten Murthy et al. sogar dosisabhängige Effekte zeigen.

Im Antikörpertransfermodell dieser Arbeit sowie bei Murthy et al. wurden die Medikamente prophylaktisch d.h. bereits während respektive vor dem ersten Antikörpertransfer gegeben. In Generation 19 ist der Score sehr gering, aber interessanterweise ist trotzdem an Tag 4 erkennbar, dass die Kontrollgruppe einen signifikant höheren Score besitzt als die Gruppen mit Colchicin und Dapson. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die geringe Krankheitsaktivität durch die Therapeutika im Verlauf vollständig eingedämmt wird.

Murthy et al. haben meines Wissens bisher die einzige Studie über Dapson in einer experimentellen EBA publiziert. In der EBA wurden bisher nur wenige andere etablierte Pharmaka im Tierversuch evaluiert. Das Glucocorticoid mPSL ist bisher von Hellberg et al. [96], Hirose et al. [100,102] und Koga et al. [124] in experimenteller EBA untersucht worden. Hellberg et al. untersuchten in einem Antikörpertransfermodell mPSL (20 mg/kg), welches eine signifikante Besserung des Scores an Tag 12 im Inzuchtstamm C57Bl/6 zeigte [96]. Auch wird von Hellberg et al. ein anderes Epitop des mCOL7 als das von mir verwendete mCol7^{vWFA2} benutzt. Weiterhin führten Hirose et al. eine Untersuchung von mPSL in einem Immunisierungs-induzierten EBA-Modell in Mäusen des Inzuchtstammes SJL durch (mPSL 20 mg/kg n=28 ; Kontrolle n=44). Die Kollegen zeichneten signifikante Unterschiede an Woche 1, 2 und 4 im klinischen Score und keine Signifikanten Unterschiede zwischen mPSL und der Kontrolle in ELISA und DIF auf. Das Hauptaugenmerk lag auf IVIG, welches akut besser wirkte als mPSL [102]. Koga et

4. Diskussion

al. setzten es als Vergleich zu einer weiteren nicht etablierten Therapie ein und zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede beim Methylprednisolon in einem Antikörpertransfermodell und in einem Immunisierungsmodell der EBA .

In meiner Arbeit gab es eine signifikante Verbesserung des Scores der Methylprednisolongruppe gegenüber der Kontrollgruppe an den Tagen 12, 16 und 20. Meine Ergebnisse sind zwar nicht vollständig mit Hellberg et al. vergleichbar, da das Augenmerk auf BP lag. Allerdings gibt es Ergebnisse im Antikörpertransfermodell der EBA an Tag 12, welche signifikante Verbesserung der Klinik im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. Ferner sind die verwendeten Antikörper und die Gruppengröße für das mPSL nicht rekonstruierbar, da die zusätzlichen Materialien online nicht mehr verfügbar sind. Die Ergebnisse von Hirose et al. sind mit meinen im Immunisierungs-induzierten Modell vergleichbar. Hirose et al. hatten mit SJL-Mäusen einen anderen suszeptiblen Inzuchtstamm verwendet als ich mit dem Stamm B6.SJL-H2s C3c/1CyJ. Aufgrund von möglichen Einflüssen des Inzuchtstammes sind diese Ergebnisse erfreulich, da in beiden Stämmen Methylprednisolon signifikante Verbesserungen der Klinik zeigt. Darüber hinaus sind in meiner Arbeit im Immunisierungs-induzierten Modell signifikant weniger Antikörper der Subklasse IgG1 im ELISA detektiert worden. Das ist insbesondere wichtig, da IgG1 als ‘Treiber der Erkrankung’ (eigene Übersetzung, *disease driver*) gilt [88].

Eine Limitation am Antikörpertransfermodell ist die weniger vollständige Abbildung der Pathogenese, welche sich auf die Effektorphase beschränkt [25]. Immunisierungs-induzierte Modelle bilden die gesamte Bandbreite vom Verlust der Toleranz bis zur Abheilung der Blasenbildung ab (Abbildung 1.4. zur Pathogenese), auch wenn der Verlust der Toleranz artifiziell mittels Adjuvans hervorgerufen wird. Beim Antikörpertransfer findet der Verlust der Toleranz und die Autoantikörperbildung nicht statt und die Pathogenese bezieht sich hauptsächlich auf die Effektorphase. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass natürliche Killerzellen und $\gamma\delta$ T-Zellen [27] sowie T_{reg} s [26] einen Einfluss auf die EBA in einem Antikörpertransfermodell haben. Weiterhin zeigten Niebuhr et al., dass B- und T-Zellen einen Einfluss bei der Immunantwort auf den Transfer der xenogenen Antikörper (Kaninchen anti-mCOL7-Antikörper) haben [172]. Im Antikörpertransfermodell besteht die Möglichkeit, dass Therapien Effekte an nicht abgebildeten Teilen der Pathogenese hervorrufen und nicht unbedingt das komplette Potential im Antikörpertransfermodell bei identischen Nebenwirkungen ausschöpfen. Als Beispiel kann die besonders breite antiinflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden (Kapitel 1.3.5.) auch auf B-Zellen bzw. Plasmazellen genannt werden. Also könnten

diese auf die Autoantikörperproduktion wirken. Werden aber endogen keine Autoantikörper gebildet, kann das Glucocorticoid weniger effektiv sein als im Immunisierungs-induzierten Modell.

Hirose et al. verwendeten SJL-Mäuse [102], sodass ich nun für eine Erweiterung auf den ebenfalls suszeptiblen Inzuchtstamm B6.SJL-H2s C3c/1CyJ [143] zurückgegriffen habe. Vorteilhaft ist hierbei, dass nun die gesamte Pathogenese abgebildet wird und ergänzend ein weiterer Stamm untersucht wird. Daher lassen sich stammspezifische Unterschiede erkennen oder ggf. ausschließen, wie sie in unterschiedlichen Fällen berichtet wurden [123,143]. Unter diesen Überlegungen führte ich das Immunisierungs-induzierte EBA Modell auch mit mPSL als Ergänzung zu den Ergebnissen von Hirose et al. durch. In meiner Arbeit zeigte mPSL signifikante Verbesserungen des klinischen Scores und darüber hinaus auch signifikant niedrigere Antikörperspiegel in dem anti-Col7^{WFA2}-spezifischen ELISA der Subklasse IgG1. Ergebnisse einer experimentelle EBA zeigten, dass die Subklassen IgG2b und IgG2c mit Hautläsionen in der Maus assoziiert waren [88]. Zwar stellt es keine Translation in den Menschen dar, aber interessant ist, dass IgG1 im Menschen (neben IgG3) eine pathogene Antikörpersubklasse ist und als ein Treiber der Erkrankung gelten kann [185].

Ein weiterer Vorteil des Immunisierungs-induzierten Modells ist auch, dass nach einer Krankheitsinduktionsphase eine mehrwöchige Therapie und somit auch längere Observationszeiten und daher bessere Therapieevaluationen ergeben können. Die statistische Aussagekraft der Ergebnisse im Immunisierungs-induzierten Modell der EBA ist allerdings begrenzt, aufgrund der geringen Anzahl an eingeschlossenen Tieren. Dies lag an der geringen Immunisierungseffizienz. Obwohl es sich um einen suszeptiblen Inzuchtstamm handelt [143], lag die Immunisierungseffizienz in meiner Arbeit bei lediglich 51,9%. Leider erfüllten nur 30,7% der überlebenden 52 Tiere das Einschlusskriterium von mindestens 1,5% der betroffenen KOF (Tabelle 3.2.). Der Verdacht liegt nahe, dass dieses an dem neuen Modell auf Basis des mCol7^{WFA2} liegen kann. Vor dieser Arbeit war von Sitaru et al. ein Immunisierungs-induziertes Modell der EBA auf Basis des mCOL7C etabliert worden, welches häufig genutzt wurde. Die klinische Immunisierungseffizienz lag in diesem etablierten Modell bei Erstpublikation mit vier Immunisierungen (drei Boostimmunisierungen) bei 82,8% (24/29) in SJL-Mäusen [217]. Mit dieser aufwändigen Herangehensweise erhält man ein relativ gutes Ergebnis. Iwata et al. nutzen aber das auch in meiner Arbeit verwendete Modell als Konzeptüberprüfung, da der Bedarf an weniger aufwändigen Modellen gegeben war. Dieses zum damaligen

4. Diskussion

Zeitpunkt sehr neue Modell wurde von mir zur Fragestellung der Therapieevaluation und der Anwendbarkeit neuer Mausmodelle in dieser Arbeit genutzt. Iwata et al. zeigten im gleichen Modell aber eine bessere klinische Immunisierungseffizienz von 90,9 % (10/11) als Sitaru et al. in 2006 [217] und auch bessere Effizienzen als in meiner Arbeit [109].

Laut Informationen innerhalb der Arbeitsgruppe liegt die Immunisierungseffizienz im mCol7^{vWFA2}-Immunisierungs-induzierten Modell aktuell bei 50 bis 80 % (persönliche Kommunikation). Somit ist in meiner Arbeit die Immunisierungseffizienz prinzipiell nicht besonders hoch aber letztendlich noch im Rahmes des Modells. Die Ursachen für eine reduzierte Effizienz können vielfältig sein. Unter anderem können das Alter, Geschlecht, Mikrobiom, Haltungsbedingungen und Hygiene Einfluss auf die Immunisierung haben, was im Folgenden diskutiert wird.

Das Alter der Mäuse im Immunisierungs-induzierten Modell lag in meiner Arbeit bei 10-16 Wochen bei Immunisierung. Hellberg et al. sowie Hirose et al. verwendeten Mäuse im Alter von 6-8 Wochen, Murthy et al. 8-12 Wochen und Koga et al. 6-10 Wochen bei Immunisierung. Der Altersunterschied könnte einen weiteren Faktor für die geringe Inzidenz darstellen. Im Antikörpertransfer waren die AIL-Mäuse bei erster Antikörperinjektion 6-10 Wochen alt, das gleiche Alter wiesen die von Dr. Iwata durchgeführten Tierversuche mit einer Fallzahl von n=8 auf (Tabelle im Anhang A.1).

Die Geschlechterverteilung im Immunisierungs-induzierten Modell war in meiner Arbeit ausgeglichen, wie auch in den Arbeiten von Hellberg et al., Hirose et al., Murthy et al. sowie Koga et al.. In der AIL lag die Geschlechterverteilung bei 28 % männlichen Mäusen und 72 % weiblichen Tieren. Diese Asymmetrie geht auf vermehrtes Kampfverhalten unter den Männchen zurück. Dieses trifft aber gleichmäßig verteilt auf alle Generationen zu. Vergleichsmöglichkeit der AIL im Antikörpertransfermodell gibt es nur mit den Vorabdaten (A.1), bei denen das Geschlecht bei einer Fallzahl von n=8 auf beide Geschlechter gleich verteilt war. Eine multivariaten lineare Regression (Daten nicht dargestellt) wurde von Dr. A. Künstner durchgeführt und ergab keine signifikanten Auswirkungen des Faktors Geschlecht auf den klinischen Score, sodass hier nicht von einer Verzerrung ausgegangen wird.

Srinivas et al. untersuchten in einer experimentellen EBA neben genetischen Grundlagen auch das Mikrobiom, welches sich in resistenten und suszeptiblen Mäusen unter-

schied. So konnten QTLs für Suszeptibilität und Einfluss auf das Mikrobiom identifiziert werden [221]. Das Mikrobiom hat wiederum ebenfalls Auswirkung auf die Entwicklung einer EBA. So korrelierte eine subklinische Inflammation der Haut vor Immunisierung, gemessen an Zellmarkern und pro-inflammatorischen Zytokinen, mit einer erhöhten Suszeptibilität bei experimenteller EBA [59]. Andere Ergebnisse bringt eine Arbeit von Beura et al., welche zeigt, dass in genetisch prädisponierten Mäusen eine Manifestation von Autoimmunerkrankungen weniger häufig in Abwesenheit einer kommensalen Flora auftreten kann [20]. Außerdem manifestieren sich, unter dem Einfluss von Infektionenserfahrungen der Organismen, heterologe Reaktionen des Immungedächtnisses, welche als Auslöser für Autoimmunität dienen können. [3, 20, 209, 226, 227, 253] Alle diese Studien beziehen sich allerdings nicht auf eine Hauterkrankung oder gar die EBA, sodass die Daten von Srinivas et al. sowie Ellebrecht et al. für Autoimmunität der Haut aussagekräftiger sind. Weitere Forschung ist hier wünschenswert. Prinzipiell kann in meiner Arbeit das Mikrobiom als ein Faktor auf die Inzidenz der EBA einen Einfluss haben. Ich habe aber keine Untersuchungen am Mikrobiom der Mäuse durchgeführt, sodass dieses nicht belegt oder ausgeschlossen werden kann.

Nach Ende der Versuchsdurchführung war eine Infektion der Mäuse mit Maus Parvovirus (MPV) in der SPF entdeckt worden, die zur Tötung des Gesamtbestandes führte. MPV beeinflussen als lymphocytotrope Erreger der Maus vor allem T-Zellen, verursachen keine klinischen Beschwerden, persistieren, sind auch mit aktuellen Labormethoden schwer nachzuweisen und können mausbasierte Forschung beeinträchtigen [171]. MPV wurde im Rahmen des Verlusts von T-Zellfunktion und Lebensfähigkeit in Zellkultur entdeckt. Das Virus inhibiert *in-vitro* die Proliferation von *Cluster of differentiation* (CD)8⁺, CD4⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen [150]. Nach einer Infektion sind die zytolytischen Fähigkeiten von T-Zellen eingeschränkt [151]. Es verringert die Proliferationsrate der Lymphozyten in Milz und poplitealen Lymphknoten, verstärkt aber die Proliferation von Zellen aus mesentialem Lymphknoten [151]. Zusammengefasst ist das MPV nicht einfach zu detektieren, verursacht prolongierte Verläufe und hat Auswirkung auf T-Zellen der Maus. Es bleibt aber spekulativ wie lange vorher die Infektion in der Tierhaltung bestand und ob dieses einen Einfluss auf die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse hatte (vor allem im Immunisierungs-induzierten Modell), sollte aber aufgrund der Vollständigkeit nicht unerwähnt bleiben.

Die Haltungsbedingungen in der Gemeinsamen Tierhaltung, insbesondere Tag-Nacht-Rhythmus, Futter, Wasser, Streu, Käfige, Räumlichkeiten und auch das Tierpflegeri-

4. Diskussion

sche Personal waren identisch mit den Studien der Kollegen [96, 102, 109, 124, 167, 172]. Allerdings gab es zur Zeit meiner Versuchsdurchführung bei Generation 16 in den spezifisch-pathogenfreien Tierhaltungsbedingungen (SPF) einen Darmparasitenbefall vieler Mäuse mit den murinen Fadenwürmern *Syphacia spp.* sodass die Gesamtheit der Mäuse in der SPF mit Fenbendazol behandelt wurden. Generation 19 war nicht mehr betroffen. In der Literatur gibt es eine Korrelation der fehlenden Inzidenz von Infektionen insbesondere von Darmparasitosen und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen [8]. Dieses führte zur Postulierung der ‘Hygiene Hypothese’ [224, 225] in der pathogene Mikroorganismen und das kommensale Mikrobiom Einfluss auf Suszeptibilität von Autoimmunität oder Atopie haben [9]. Auch sind viele antiinflammatorische und immunsuppressive Mechanismen von diversen Parasitosen mit Wirkungen auf die Wirtsimmunologie wie z. B. T_{reg} , alternativ-aktivierte Makrophagen, Suppression von Th1-polarisierter Immunantwort oder antiinflammatorischen Zytokinen beschrieben worden [8, 57, 177, 228]. Interessant ist dieses auch, da ein rekombinantes Fusionsprotein aus einem caninen Nematoden bereits als potentiell Antiinflammatorisches Therapeutikum auf die EBA untersucht wurde.[120] So zeigten sich unkomplizierte intestinale Nematodeninfektionen vorteilhaft auf die Entwicklung in anderen Modellen von Autoimmunerkrankungen, in Modellen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis oder experimenteller Colitis [121, 212, 251]. Anders als im Mausmodell der chronisch-entzündlichen Colitis [121] ist aber die Wirkung für die Haut unklar. Es gibt aber auch einige Nematoden, wie die *Larva migrans cutanea*, welche für kutane Migration bekannt sind [242]. Eine solche lokale Hautaffektion der Parasiten wäre gemäß den Ergebnissen von Ellebrecht et al. wiederum als ein Faktor für eine Entwicklung der EBA vorstellbar [59]. Allerdings scheint die einzige Hautaffektion muriner Fadenwürmer auf perianale Eiablage beschränkt zu sein [180, 180], ansonsten ist nach Literaturrecherche keine Beschreibung einer kutanen Migration muriner Fadenwürmer zu finden. Trotzdem ist im Menschen eine extraintestinale Fadenwurmerkrankung beschrieben worden [58]. Für murine Fadenwürmer ist die Maus kein Fehlwirt, sondern sie sind stark an den Verdauungstrakt der Maus angepasst, sodass eine direkte kutane Affektion unwahrscheinlich ist (Expertenmeinung). Eine Hautaffektion, welche zu vermehrter Krankheitsschwere in der EBA führt, ist somit unwahrscheinlich, da einmal die Inzidenz in der Generation 16 bereits sehr gering ist und ein entsprechendes Verhalten der Würmer als unwahrscheinlich bewertet wurde. Generation 19 hatte noch eine geringere Inzidenz und keine Parasitose. Im Gegensatz zu den Quellen anderer muriner Autoimmunitäten [121, 212, 251] fanden die Parasitosen in den AIL-Mäusen der Generation 16 in einem Antikörpertransfer-induzierten Modell statt. Da

parasitäre Immunmodulation über die T_{reg} s erfolgen kann, erscheint der Einfluss von Wurminfektionen bei dieser Arbeit geringer als in einem Immunisierungs-induzierten Modell zu sein. Insgesamt scheint der Einfluss auf die Inzidenz der Erkrankung im Antikörpertransfermodell nicht auszuschließen zu sein, allerdings könnte dies ein lohnendes Ziel für weitere Forschung sein. Es lässt sich nicht ausschließen, dass einerseits eine Nematodeninfektion als Surrogatparameter für hygienische Bedingungen, immun-suppressive parasitäre Wirkungen oder andererseits eine antiparasitäre Therapie einen Einfluss auf die Suszeptibilität in der EBA hatte.

Eine weitere mögliche Störgröße kann die Proteinherstellung darstellen. Diese ist ein zentraler Prozess, bei welchem Fehler erst spät entdeckt werden können. Dieses Protein wird in beiden Modellen benötigt. Einerseits zur Immunisierung der Kaninchen im Antikörpertransfermodell und andererseits zur Immunisierung von Mäusen im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell. Ein Fehler beim Protein kann sich auf das Immunisierungs-induzierte Modell sowie auf die Kaninchenimmunisierung des Antikörpertransfer-induzierten Modells auswirken. Die Kaninchen bildeten erfolgreich spezifische IgG Antikörper gegen die DEJ, was ich per Titerbestimmung mittels Immunfluoreszenz bestätigen konnte und somit gleichzeitig eine Qualitätskontrolle des aufgereinigten mCol7^{vWFA2} darstellt. Da das verwendete Immun-IgG gepoolt wurde und aus allen aufgereinigten Kaninchenserum hergestellt wurde, ist in jeder Generation die gleiche Charge Immun-IgG verwendet worden. Der aliquote Teil des mCol7^{vWFA2} (Batch#01), welcher zur Immunisierung der Kaninchen genutzt wurde, war offensichtlich gut geeignet die Bildung spezifischer Anti-mCol7^{vWFA2}-Antikörper im Kaninchen hervorzurufen. Trotzdem war im Immunisierungs-induzierten Modell die Effizienz der Immunisierung nur bei 51,9%. Es wurde sowohl für die Immunisierung der Kaninchen im Antikörpertransfer als auch für die Immunisierung der Mäuse im Immunisierungs-induzierten Modell Batch#01 verwendet. Da die Mäuse im Antikörpertransfermodell zumindest in den Generationen 14 und 16 erkrankten, scheint die Möglichkeit einer falschen Proteingewinnung als alleiniger Faktor sehr unwahrscheinlich zu sein. Prinzipiell kann ein Fehler bei der Immunisierung der Mäuse allerdings die Immunisierungseffizienz beeinträchtigen, z. B. bei der relativ aufwändigen Herstellung der Antigen-Adjuvans-Emulsion. Ein solcher Fehler kann aber von mir nicht kategorisch ausgeschlossen werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass weitere Teile des Proteins eine unterschiedliche Qualität gehabt haben könnten, was ggf. zu unterschiedlichen Immunisierungserfolgen führen könnte. Prinzipiell ist es möglich, dass einzelne aliquote Teile der Gesamt-

4. Diskussion

menge ein beeinträchtigt Protein beinhalteten. Ich hatte mit jedem Arbeitsschritt die Gefahr von Ausfällungen des Proteins, insbesondere außerhalb des optimierten Puffers B2, was auch zu Verlusten führte. Somit könnten die unterschiedlichen Erfolge erklärt werden. Optimierungsbedarf gibt es bei der Proteinherstellung, um Verluste an Substanz und Immunogenität zu vermeiden. Sinnvoll erscheinen zusätzliche Qualitätssicherungen des Proteins wie eine Testung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode und eine Überprüfung der Immunisierungseffizienz sowie des Scores an einer kleinen Kohorte von Mäusen. So könnten Probleme mit einer Charge ausgeschlossen werden, bevor größere Gruppen an Tieren immunisiert werden. Diese Vorgehensweise wird mittlerweile in der Arbeitsgruppe praktiziert. Des Weiteren sind weniger Arbeitsschritte nach Aufreinigung mittels IMPACT TWIN wünschenswert. Auch wenn die Abtrennung von Inteinresten erfolgreich war, stellte dieses einen weiteren Arbeitsschritt dar, der mehr Präzipitationen des Proteins, also Verluste bedeuten kann. Aber bevor die gesamte Charge verworfen wird kann sich ein Versuch der Abtrennung lohnen. Wenn die Immunisierungseffizienz in einem kleinen vorgeschalteten Tierversuch bestätigt wurde, ist dies besser, als viele Tiere mit einer eventuell schlechteren Immunisierungseffizienz zu immunisieren. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit ist, auf die technisch sehr elegante, aber anspruchsvolle Verwendung des ÄKTApurifizierers zu verzichten. Dann kann ohne Konkurrenz um diese Ressource eine Arbeitsrationalisierung durch Umstellung auf eine einfache Pumpe erfolgen, was ökonomischer ist. So lässt sich die Proteingewinnung deutlich flexibler und mit weniger Geräten durchführen, auch wenn der manuelle Aufwand größer ist. Auch dies ist mittlerweile laborinterner Standard [117] geworden. Des Weiteren wäre auch eine Immunisierung der Tiere mit dem Protein nicht in PBS sondern in Puffer B2 denkbar. Auch wenn es etwas ungewöhnlich ist, wäre dies eine weitere Möglichkeit, welche evaluiert werden könnte, um weitere Arbeitsschritte am Protein zu minimieren. Positiv ist hingegen, dass bei Sterilfiltrierung und einer Lagerung bei -80°C eine (mikrobiologisch induzierte) Proteolyse nur schwer vorstellbar ist.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Modelle trotz einiger Limitationen funktioniert haben. Drei für die Standardtherapie der EBA bedeutende Medikamente konnten prophylaktisch im Antikörpertransfermodell untersucht werden, von denen Dapson und mPSL gewirkt haben. Colchicin zeigte zwar eine Signifikanz am vierten Tag in der Generation 19, aber aufgrund der dann vorliegenden marginalen Krankheitschwere der EBA, ist die Aussagekraft dieser Werte zweifelhaft. Weitere Forschung zur Evaluation des Colchicins wird nötig sein, um die Therapie in Zukunft besser beurteilen

zu können. Weiterhin konnte sogar im Immunisierungs-induzierten Modell mPSL therapeutisch untersucht und signifikante Unterschiede erzielt werden. Hier zeigte mPSL signifikant positive Wirkungen auf Klinik und sogar Serologie der Erkrankung. Dieses gibt einen Hinweis auf den Stellenwert der beschriebenen Medikamente in der Standardtherapie der EBA. Weitere Forschung ist sicherlich notwendig für die Evaluation der Medikamente gegeneinander sowie von Kombinationstherapien, aber auch um weitere Medikamente wie z.B. Rituximab oder IVIG zu evaluieren und auch im Besonderen die Translation in den Menschen zu erreichen, um so die Evidenzbasis der Therapie dieser Erkrankung im Patientensinne zu verbessern.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation der auf Basis von Expertenmeinungen etablierten Therapien der seltenen bullösen Autoimmundermatose EBA. Da hier auch Kombinationstherapien oft nicht die gewünschten Erfolge bringen und RCTs aufgrund der Epidemiologie in naher Zukunft nicht zu erwarten sind, wurde dieses von mir in zwei verschiedenen Modellen untersucht. Initial wurde ein Auszuchtstamm in einem Antikörpertransfermodell und später ein Immunisierungs-induziertes Modell im Inzuchtstamm verwendet. So konnten zwei sich ergänzende neue Mausmodelle auf Basis des rekombinanten mCol7^{vWFA2} etabliert werden. Im Antikörpertransfer-induzierten Modell der EBA wurden Mäuse aus verschiedenen Generationen verwendet und die Untersuchung der Pharmaka zeigte signifikante Wirkungen der Medikamente Dapson und mPSL in einer prophylaktischen Anwendung. Im klinischen Score der Generation G14 zeigt die Behandlung mit mPSL sowie in der G16 die Behandlung mit Dapson signifikante Verbesserungen des klinischen Scores im Vergleich zur Kontrollgruppe. Colchicin zeigte in der G16 keine signifikanten Unterschiede. In G19 zeigte der klinische Score an Tag 4 signifikante Unterschiede bei der Behandlung mit Colchicin und Dapson, jeweils bezogen auf die Kontrollgruppe. Da hier in G19 aber nur insgesamt marginale Krankheitsaktivität bestand, sind diese Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren. Durch den Vergleich der Kontrollgruppen mehrerer Generationen konnte eine signifikante Reduktion der Krankheitsaktivität mit Zunahme der Generationszahl festgestellt werden. Dieses verhinderte die Vergleichbarkeit der Medikamente unter den einzelnen Generationen. Weiterhin wurde ein Immunisierungs-induziertes Modell neu etabliert und der therapeutische Nutzen von mPSL in diesem Modell validiert. Hierin konnten signifikante Unterschiede im klinischen Score und auch in dem Antikörperspiegel der Subklasse IgG1 bei der Therapie mit mPSL festgestellt werden. Es konnte die Funktionalität der Modelle bewiesen werden, auch wenn es Verbesserungspotential in der Effektivität gibt. mPSL und Dapson wirken in einer experimentellen EBA der Maus. Dieses ist ein Hinweis, der die aktuelle Therapie durch eine Evidenz stützt. Aber weitere Forschung und auch die Translation zum Menschen ist nötig, um die Therapiemethoden weiter zu evaluieren und letztendlich zu verbessern.

Literaturverzeichnis

- [1] Abramovici, A. und Wolfmann, M.: *Inbred Strains of Laboratory Animals: Superior to Outbred Mice?* Journal of the National Cancer Institute, 87(12):933–933, 1995.
- [2] Adachi, A., Komine, M., Suzuki, M., Murata, S., Hirano, T., Ishii, N., Hashimoto, T. und Ohtsuki, M.: *Oral colchicine monotherapy for epidermolysis bullosa acquisita: Mechanism of action and efficacy.* The Journal of Dermatology, 43(11):1389–1391, 2016.
- [3] Adams, A. B., Pearson, T. C. und Larsen, C. P.: *Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance.* Immunological Reviews, 196(1):147–160, 2003.
- [4] Alexandre, M., Brette, M. D., Pascal, F., Tsianakas, P., Fraitag, S., Doan, S., Caux, F., Dupuy, A., Heller, M., Lièvre, N., Lepage, V., Dubertret, L., Laroche, L. und Prost-Squarcioni, C.: *A prospective study of upper aerodigestive tract manifestations of mucous membrane pemphigoid.* Medicine, 85:239–252, 2006.
- [5] Antoine, J. C., Maurice, M., Feldmann, G. und Avrameas, S.: *In vivo and in vitro effects of colchicine and vinblastine on the secretory process of antibody-producing cells.* The Journal of Immunology, 125(5):1939–1949, 1980.
- [6] Aratani, Y.: *Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 640:47–52, 2018.
- [7] Avrameas, S. und Guilbert, B.: *A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies.* European Journal of Immunology, 1(5):394–396, 1971.
- [8] Bach, J. F.: *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.* The New England journal of medicine, 347:911–920, 2002.
- [9] Bach, J. F.: *The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals.* Nature Reviews Immunology, 18(2):105–120, 2017.

- [10] Bang, S. Y., Lee, K. H., Cho, S. K., Lee, H. S., Lee, K. W. und Bae, S. C.: *Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of RF and ACPA*. Arthritis and Rheumatism, S. NA–NA, 2010.
- [11] Becker, M., Schumacher, N., Schmidt, E., Zillikens, D. und Sadik, C. D.: *Evaluation and Comparison of Clinical and iLaboratory Characteristics of Patients With IgA Epidermolysis Bullosa Acquisita, Linear IgA Bullous Dermatitis, and IgG Epidermolysis Bullosa Acquisita*. JAMA Dermatol, 157(8):917, 2021.
- [12] Beek, N., Weidinger, A., Schneider, S. W., Kleinheinz, A., Gläser, R., Holt-sche, M. M., Georg, A., Hammers, C. M., Hübner, F., Lima, A. L., Gola, D., Sadik, C. D., Zillikens, D., Katalinic, A., Schmidt, E. und König, I. R.: *Incidence of pemphigoid diseases in Northern Germany in 2016 – first data from the Schleswig-Holstein Registry of Autoimmune Bullous Diseases*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 35(5):1197–1202, 2021.
- [13] Beer, A.: *Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten*. Annalen der Physik und Chemie, 162(5):78–88, 1852.
- [14] Bermudez, L. E., Inderlied, C. B., Kolonoski, P., Petrofsky, M. und Young, L. S.: *Clarithromycin, dapsone, and a combination of both used to treat or prevent disseminated Mycobacterium avium infection in beige mice*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 38(12):2717–2721, 1994.
- [15] Bernard, P., Vaillant, L., Labeille, B., Bedane, C., Arbeille, B., Denoeux, J. P., Lorette, G., Bonnetblanc, J. M. und Prost, C.: *Incidence and distribution of sub-epidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions*. Archives of dermatology, 131(1):48, 1995.
- [16] Bertram, F., Bröcker, E. B., Zillikens, D. und Schmidt, E.: *Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany*. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 7(5):434–439, may 2009.
- [17] Bethyl Laboratories, Inc.: *Mouse IgG1 - ELISA Quantitation Set*. <https://www.bethyl.com/datasheet/E90-105>, Abrufdatum 23.09.2021.
- [18] Bethyl Laboratories, Inc.: *Mouse IgG2a - ELISA Quantitation Set*. <https://www.bethyl.com/datasheet/E90-109>, Abrufdatum 23.09.2021.

- [19] Bethyl Laboratories, Inc.: *Mouse IgG2b - ELISA Quantitation Set*. <https://www.bethyl.com/datasheet/E90-107>, Abrufdatum 23.09.2021.
- [20] Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Haining, W. N., Jameson, S. C. und Masopust, D.: *Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice*. *Nature*, 532(7600):512–516, 2016.
- [21] Bhat, A., Naguwa, S. M., Cheema, G. S. und Gershwin, M. E.: *Colchicine Revisited*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1173(1):766–773, 2009.
- [22] Bieber, K., Koga, H. und Nishie, W.: *In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases*. *Experimental Dermatology*, 26(12):1163–1170, 2017.
- [23] Bieber, K., Kridin, K., Emtenani, S., Boch, K., Schmidt, E. und Ludwig, R. J.: *Milestones in Personalized Medicine in Pemphigus and Pemphigoid*. *Front Immunol*, 11, 2021.
- [24] Bieber, K. und Ludwig, R.: *Drug Development in Pemphigoid Diseases*. *Acta Derm Venereol*, 100(5):adv00055–114, 2020.
- [25] Bieber, K., Sun, S., Ishii, N., Kasperkiewicz, M., Schmidt, E., Hirose, M., Westermann, J., Yu, X., Zillikens, D. und Ludwig, R. J.: *Animal models for autoimmune bullous dermatoses*. *Experimental Dermatology*, 19(1):2–11, 2010.
- [26] Bieber, K., Sun, S., Witte, M., Kasprick, A., Beltsiou, F., Behnen, M., Laskay, T., Schulze, F. S., Pippi, E., Reichhelm, N., Pagel, R., Zillikens, D., Schmidt, E., Sparwasser, T., Kalies, K. und Ludwig, R. J.: *Regulatory T Cells Suppress Inflammation and Blistering in Pemphigoid Diseases*. *Frontiers in Immunology*, 8, 2017.
- [27] Bieber, K., Witte, M., Sun, S., Hundt, J. E., Kalies, K., Dräger, S., Kasprick, A., Twelkmeyer, T., Manz, R. A., König, P., Köhl, J., Zillikens, D. und Ludwig, R. J.: *T cells mediate autoantibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita*. *Scientific Reports*, 6(1), 2016.
- [28] Binnewies, M., Finze, M., Jäckel, M., Schmidt, P., Willner, H. und Rayner-Canham, G.: *Allgemeine und Anorganische Chemie*, Kap. 12 Komplexeaktionen, S. 339–340. Springer Berlin Heidelberg, 2016.

- [29] Binnewies, M., Finze, M., Jäckel, M., Schmidt, P., Willner, H. und Rayner-Canham, G.: *Allgemeine und Anorganische Chemie*, Kap. 1 Einführung: Regeln und Normen erleichtern die Verständigung, S. 7–9. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [30] Booth, S. A., Moody, C. E., Dahl, M. V., Herron, M. J. und Nelson, R. D.: *Dapsone Suppresses Integrin-Mediated Neutrophil Adherence Function*. The Journal of Investigative Dermatology, 98(2):135–140, 1992.
- [31] Bouguer, P.: *SECT. I*. In: Jombert, C. (Hrsg.): *Essai D’Optique, Sur La Gradation De La Lumiere*, S. 16–22. Claude Jombert Paris, 1729.
- [32] Bozeman, P. M., Learn, D. B. und Thomas, E. L.: *Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone*. Biochemical pharmacology, 44(3):553–563, 1992.
- [33] Briggaman, R. A., Gammon, W. R. und Woodley, D. T.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita of the Immunopathological Type (Dermolytic Pemphigoid)*. Journal of Investigative Dermatology, 85:79s–84s, 1985.
- [34] Buhl, T. und Schön, M. P.: *Lepra*. In: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco’s Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Kap. Mykobakterieninfektionen der Haut, S. 249. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [35] Buhl, T. und Schön, M. P.: *Lepra*. In: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco’s Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Kap. Mykobakterieninfektionen der Haut, S. 253. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [36] Buijsrogge, J. J. A., Diercks, G. F. H., Pas, H. H. und Jonkman, M. F.: *The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy*. British Journal of Dermatology, 165(1):92–98, 2011.
- [37] Burnet, F. M.: *Immunological recognition of self*. Science (New York, N.Y.), 133:307–311, 1961.
- [38] Chen, M., Marinkovich, M. P., Veis, A., Cai, X., Rao, C. N., O’Toole, E. A. und Woodley, D. T.: *Interactions of the amino-terminal noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components. A potential role*

- in epidermal-dermal adherence in human skin.* The Journal of biological chemistry, 272:14516–14522, 1997.
- [39] Chia, E. W., Grainger, R. und Harper, J. L.: *Colchicine suppresses neutrophil superoxide production in a murine model of gouty arthritis: a rationale for use of low-dose colchicine.* British Journal of Pharmacology, 153(6):1288–1295, 2008.
- [40] Chia, R., Achilli, F., Festing, M. F. W. und Fisher, E. M. C.: *The origins and uses of mouse outbred stocks.* Nature Genetics, 37(11):1181–1186, 2005.
- [41] Ching, J. K., Ju, J. S., Pittman, S. K., Margeta, M. und Wehl, C. C.: *Increased autophagy accelerates colchicine-induced muscle toxicity.* Autophagy, 9(12):2115–2125, 2013.
- [42] Chiriac, M. T., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D. und Sitaru, C.: *NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage.* The Journal of Pathology, 212(1):56–65, 2007.
- [43] Cho, S. C., Park, M. C., Keam, B., Choi, J. M., Cho, Y., Hyun, S., Park, S. C. und Lee, J.: *DDS, 4,4'-diaminodiphenylsulfone, extends organismic lifespan.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(45):19326–19331, 2010.
- [44] Choi, G. S., Lee, E. S., Kim, S. C. und Lee, S.: *Epidermolysis bullosa acquisita localized to the face.* The Journal of dermatology, 25:19–22, 1998.
- [45] Choi, Y., Simon-Stoos, K. und Puck, J.: *Hypo-active variant of IL-2 and associated decreased T cell activation contribute to impaired apoptosis in autoimmune prone MRL mice.* European Journal of Immunology, 32(3):677, mar 2002.
- [46] Chung, H. J. und Uitto, J.: *Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa.* Dermatologic Clinics, 28(1):93–105, 2010.
- [47] Church, D. M., Goodstadt, L., Hillier, L. W., Zody, M. C., Goldstein, S., She, X., Bult, C. J., Agarwala, R., Cherry, J. L., DiCuccio, M., Hlavina, W., Kapustin, Y., Meric, P., Maglott, D., Birtle, Z., Marques, A. C., Graves, T., Zhou, S., Teague, B., Potamousis, K., Churas, C., Place, M., Herschleb, J., Runnheim, R., Forrest, D., Amos-Landgraf, J., Schwartz, D. C., Cheng, Z., Lindblad-Toh, K., Eichler, E. E., Ponting, C. P. und Consortium, M. G. S.: *Lineage-specific biology*

- revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS biology*, 7:e1000112, 2009.
- [48] Coleman, M. D.: *Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance*. *British Journal of Dermatology*, 129(5):507–513, 1993.
- [49] Cunningham, B. B., Kirchmann, T. T. T. und Woodley, D.: *Colchicine for epidermolysis bullosa acquisita*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(5):781–784, 1996.
- [50] Dahl, M. G. C.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita-a Sign of Cicatricial Pemphigoid?* *British Journal of Dermatology*, 101(4):475–484, 1979.
- [51] Darvasi, A. und Soller, M.: *Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping*. *Genetics*, 141:1199–1207, 1995.
- [52] Dasgeb, B., Kornreich, D., McGuinn, K., Okon, L., Brownell, I. und Sackett, D. L.: *Colchicine: an ancient drug with novel applications*. *British Journal of Dermatology*, 178(2):350–356, 2018.
- [53] Debol, S. M., Herron, M. J. und Nelson, R. D.: *Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction*. *Journal of Leukocyte Biology*, 62(6):827–836, 1997.
- [54] DeForge, L. E., Fantone, J. C., Kenney, J. S. und Remick, D. G.: *Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood*. *Journal of Clinical Investigation*, 90(5):2123–2129, 1992.
- [55] Demetrius, L.: *Of mice and men*. *EMBO reports*, 6(S1), 2005.
- [56] Dinse, G. E., Parks, C. G., Weinberg, C. R., Co, C. A., Wilkerson, J., Zeldin, D. C., Chan, E. K. L. und Miller, F. W.: *Increasing Prevalence of Antinuclear Antibodies in the United States*. *Arthritis Rheumatol*, 72(6):1026–1035, 2020.
- [57] Doetze, A., Satoguina, J., Burchard, G., Rau, T., Löliger, C., Fleischer, B. und Hoerauf, A.: *Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor- β but not by a Th1 to Th2 shift*. *International Immunology*, 12(5):623–630, 2000.

- [58] Eder, I. B., Wendt, S. und Lipek, T.: *Extraintestinal Oxyuriasis*. Deutsches Ärzteblatt international, 2018, ISSN 1866-0452.
- [59] Ellebrecht, C. T., Srinivas, G., Bieber, K., Banczyk, D., Kalies, K., Künzel, S., Hammers, C. M., Baines, J. F., Zillikens, D., Ludwig, R. J. und Westermann, J.: *Skin microbiota-associated inflammation precedes autoantibody induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of Autoimmunity, 68:14–22, 2016.
- [60] Elliot, G. T.: *Two cases of Epidermolysis Bullosa*. Journal of cutaneous and genito-urinary diseases 1895;13:10., 13:10–18, 1895.
- [61] Emes, R. D., Goodstadt, L., Winter, E. E. und Ponting, C. P.: *Comparison of the genomes of human and mouse lays the foundation of genome zoology*. Human Molecular Genetics, 12(7):701–709, 2003.
- [62] Engineer, L. und Ahmed, A. R.: *Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita*. Journal of the American Academy of Dermatology, 44:818–828, 2001.
- [63] Engvall, E. und Perlmann, P.: *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 8(9):871–874, 1971.
- [64] Ersek, A., Santo, A. I. E., Vattakuzhi, Y., George, S., Clark, A. R. und Horwood, N. J.: *Strain dependent differences in glucocorticoid-induced bone loss between C57BL/6J and CD-1 mice*. Scientific Reports, 6(1), 2016.
- [65] Festing, M. F. und Wolff, G. L.: *Re: Inbred Strains of Laboratory Animals: Superior to Outbred Mice?* Journal of the National Cancer Institute, 87(22):1715–1715, 1995.
- [66] Franke, A., Balschun, T., Sina, C., Ellinghaus, D., Häsler, R., Mayr, G., Albrecht, M., Wittig, M., Buchert, E., Nikolaus, S., Gieger, C., Wichmann, H. E., Sventoraityte, J., Kupcinskis, L., Onnie, C. M., Gazouli, M., Anagnou, N. P., Strachan, D., McArdle, W. L., Mathew, C. G., Rutgeerts, P., Vermeire, S., Vatn, M. H., Krawczak, M., Rosenstiel, P., Karlsen, T. H. und Schreiber, S.: *Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL)*. Nature Genetics, 42(4):292–294, 2010.
- [67] Freissmuth, M., Offermanns, S. und Böhm, S.: *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, 2012.

- [68] Freissmuth, M., Offermanns, S. und Böhm, S.: *Pharmakologie und Toxikologie*, Kap. Immunsuppressiva, Immunmodulatoren, S. 235. Springer Berlin Heidelberg, 2020.
- [69] Freissmuth, M., Offermanns, S. und Böhm, S.: *Pharmakologie und Toxikologie*, Kap. Glucocorticoide, S. 613–617. Springer Berlin Heidelberg, 2020.
- [70] Freissmuth, M., Offermanns, S. und Böhm, S.: *Pharmakologie und Toxikologie*, Kap. Dapson, S. 755. Springer Berlin Heidelberg, 2020.
- [71] Freissmuth, M., Offermanns, S. und Böhm, S.: *Pharmakologie und Toxikologie*, Kap. Colchicin, S. 715–717. Springer Berlin Heidelberg, 2020.
- [72] Fromm, E. und Wittmann, J.: *Derivate des p-Nitrothiophenols*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 41(2):2264–2273, 1908.
- [73] Furue, M., Iwata, M., Yoon, H. I., Kubota, Y., Ohto, H., Kawashima, M., Tsuchida, T., Oohara, K., Tamaki, K. und Kukita, A.: *Epidermolysis bullosa acquisita: Clinical response to plasma exchange therapy and circulating anti-basement membrane zone antibody titer*. Journal of The American Academy of Dermatology, 14(5):873–878, 1986.
- [74] Gammon, W. R., Briggaman, R. A. und Wheeler, C. E.: *Epidermolysis bullosa acquisita presenting as an inflammatory bullous disease*. Journal of the American Academy of Dermatology, 7(3):382–387, 1982.
- [75] Gammon, W. R., Heise, E. R., Burke, W. A., Fine, J. D., Woodley, D. T. und Briggaman, R. A.: *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, 1988.
- [76] Gammon, W. R., Murrell, D. F., Jenison, M. W., Padilla, K. M., Prisayanh, P. S., Jones, D. A., Briggaman, R. A. und Hunt, S. W.: *Autoantibodies to type VII collagen recognize epitopes in a fibronectin-like region of the noncollagenous (NC1) domain*. The Journal of investigative dermatology, 100:618–622, 1993.
- [77] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R. und Bairoch, A.: *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. In: Walker, J. M. (Hrsg.): *The Proteomics Protocols Handbook*, Kap. 52, S. 571–607. Copyright Humana Press, 2005.

- [78] Gebauer, J. M., Flachsenberg, F., Windler, C., Richer, B., Baumann, U. und Seeger, K.: *Structural and biophysical characterization of the type VII collagen vWFA2 subdomain leads to identification of two binding sites*. FEBS open bio, 10:580–592, 2020.
- [79] Gemmell, D. K., Lewis, A. J. und Stimson, W. H.: *Studies on the anti-inflammatory properties of dapsone in a variety of animal models [proceedings]*. British Journal of Pharmacology, 61(3):508P, 1977.
- [80] Gey, M. H.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, Kap. 10 Molekülspektroskopie, S. 275–277. Springer Berlin Heidelberg, 2015.
- [81] Gey, M. H.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, Kap. 14.2.5 Enzymgekoppelter Immunabsorptions-Test, S. 402–404. Springer Berlin Heidelberg, 2015.
- [82] Gijbels, M. J. J., Elliott, G. R., HogenEsch, H., Zurcher, C., Hoven, A. V. D. und Bruijnzeel, P. L. B.: *Therapeutic interventions in mice with chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm)*. Exp Dermatol, 9(5):351–358, 2000.
- [83] Gill, S. C. und Hippel, P. H. von: *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Analytical Biochemistry, 182(2):319–326, 1989.
- [84] Goodson, H. V. und Jonasson, E. M.: *Microtubules and Microtubule-Associated Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 10(6):a022608, 2018.
- [85] Gordon, R. A., Mays, R., Sambrano, B., Mayo, T. und Lapolla, W.: *Antibiotics used in nonbacterial dermatologic conditions*. Dermatologic Therapy, 25(1):38–54, 2012.
- [86] Gupta, R., Woodley, D. T. und Chen, M.: *Epidermolysis bullosa acquisita*. Clinics in Dermatology, 30(1):60–69, 2012.
- [87] Haeberle, S., Wei, X., Bieber, K., Goletz, S., Ludwig, R. J., Schmidt, E., Enk, A. H. und Hadaschik, E. N.: *Regulatory T-cell deficiency leads to pathogenic bullous pemphigoid antigen 230 autoantibody and autoimmune bullous disease*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 142(6):1831–1842, 2018.
- [88] Hammers, C. M., Bieber, K., Kalies, K., Banczyk, D., Ellebrecht, C. T., Ibrahim, S. M., Zillikens, D., Ludwig, R. J. und Westermann, J.: *Complement-Fixing Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Induced in Th1-Polarized Lymph Nodes of*

- Epidermolysis Bullosa Acquisita-Susceptible Mice*. The Journal of Immunology, 187(10):5043–5050, 2011.
- [89] Han, A.: *A practical approach to treating autoimmune bullous disorders with systemic medications*. The Journal of clinical and aesthetic dermatology, 2:19–28, 2009.
- [90] Hartung, T.: *Food for thought ... on animal tests*. ALTEX, S. 3–9, 2008.
- [91] Hartung, T.: *Toxicology for the twenty-first century*. Nature, 460(7252):208–212, jul 2009.
- [92] Hartung, T.: *Opinion versus evidence for the need to move away from animal testing*. ALTEX, S. 193–200, 2017.
- [93] Harvath, L., Yancey, K. und Katz, S.: *Selective inhibition of human neutrophil chemotaxis to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine by sulfones*. Journal of Immunology, 137(4):1305–1311, 1986.
- [94] Hashimoto, T., Ishii, N., Ohata, C. und Furumura, M.: *Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease*. Journal of Pathology, 228:1–7, 2012.
- [95] Hübner, F., Recke, A., Zillikens, D., Linder, R. und Schmidt, E.: *Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany*. Journal of Investigative Dermatology, 136(12):2495–2498, 2016.
- [96] Hellberg, L., Samavedam, U. K. S. R. L., Holdorf, K., Hänsel, M., Recke, A., Beckmann, T., Steinhorst, K., Boehncke, W. H., Kirchner, T., Möckel, N., Solbach, W., Zillikens, D., Schmidt, E., Ludwig, R. J. und Laskay, T.: *Methylprednisolone Blocks Autoantibody-Induced Tissue Damage in Experimental Models of Bullous Pemphigoid and Epidermolysis Bullosa Acquisita through Inhibition of Neutrophil Activation*. Journal of Investigative Dermatology, 133(10):2390–2399, 2013.
- [97] Herold, G. *et al.*: *Innere Medizin 2013. Eine vorlesungsorientierte Darstellung*, Kap. Glukokortikoidsterioide, S. 783. Selbstverl, Köln, 2013.
- [98] Hertl, M.: *Dermatologische Grundlagen*. In: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, S. 6. Springer Berlin Heidelberg, 2018.

- [99] Hertl, M.: *Dermatologische Grundlagen*. In: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, S. 3. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [100] Hirose, M., Brandolini, L., Zimmer, D., Götz, J., Westermann, J., Allegretti, M., Moriconi, A., Recke, A., Zillikens, D., Kalies, K. und Ludwig, R. J.: *The Allosteric CXCR1/2 Inhibitor DF2156A Improves Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, s3, 2013.
- [101] Hirose, M., Kasprick, A., Beltsiou, F., Schulze Dieckhoff, K., Schulze, F. S., Samavedam, U. K. J. S. R. L., Hundt, J. E., Pas, H. H., Jonkman, M. F., Schmidt, E., Kalies, K., Zillikens, D., Ludwig, R. J. und Bieber, K.: *Reduced Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita After Anti-TNF Treatment*. *Molecular Medicine*, 22(1):918–926, 2016.
- [102] Hirose, M., Tiburzy, B., Ishii, N., Papi, E., Wende, S., Rentz, E., Nimmerjahn, F., Zillikens, D., Manz, R. A., Ludwig, R. J. und Kasperkiewicz, M.: *Effects of Intravenous Immunoglobulins on Mice with Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(3):768–775, 2015.
- [103] Hughes, A. P. und Callen, J. P.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita Responsive to Dapsone Therapy*. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery: Incorporating Medical and Surgical Dermatology*, 5(5):397–399, 2001.
- [104] Hundley, J. L. und Smith, D. C.: *Epidermolysis bullosa aquisita*. *Southern Medical Journal*, 34(4):364–371, 1941.
- [105] Iranzo, P., Herrero-González, J. E., Mascaró-Galy, J. M., Suárez-Fernández, R. und España, A.: *Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective analysis of 12 patients evaluated in four tertiary hospitals in Spain*. *The British journal of dermatology*, 171:1022–1030, 2014.
- [106] Ishii, N., Hamada, T., Dainichi, T., Karashima, T., Nakama, T., Yasumoto, S., Zillikens, D. und Hashimoto, T.: *Epidermolysis bullosa acquisita: What's new?* *The Journal of Dermatology*, 37(3):220–230, 2010.
- [107] Ishii, N., Recke, A., Mihai, S., Hirose, M., Hashimoto, T., Zillikens, D. und Ludwig, R. J.: *Autoantibody-induced intestinal inflammation and weight loss in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. *The Journal of Pathology*, 224(2):234–244, 2011.

- [108] Iwata, H., Bieber, K., Hirose, M. und Ludwig, R.: *Animal Models to Investigate Pathomechanisms and Evaluate Novel Treatments for Autoimmune Bullous Dermatoses*. *Curr Pharm Des*, 21(18):2422–2439, 2015.
- [109] Iwata, H., Bieber, K., Tiburzy, B., Chrobok, N., Kalies, K., Shimizu, A., Leineweber, S., Ishiko, A., Vorobyev, A., Zillikens, D., Köhl, J., Westermann, J., Seeger, K., Manz, R. und Ludwig, R. J.: *B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. *Journal of Immunology*, 191:2978–2988, 2013.
- [110] Iwata, H., Vorobyev, A., Koga, H., Recke, A., Zillikens, D., Prost-Squarcioni, C., Ishii, N., Hashimoto, T. und Ludwig, R. J.: *Meta-analysis of the clinical and immunopathological characteristics and treatment outcomes in epidermolysis bullosa acquisita patients*. *Orphanet journal of rare diseases*, 13:153, 2018.
- [111] Iwata, H., Witte, M., Samavedam, U. K. S. R. L., Gupta, Y., Shimizu, A., Ishiko, A., Schröder, T., Seeger, K., Dahlke, M., Rades, D., Zillikens, D. und Ludwig, R. J.: *Radiosensitive Hematopoietic Cells Determine the Extent of Skin Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *The Journal of Immunology*, 195(5):1945–1954, 2015.
- [112] Joly, P., Ruto, F., Thomine, E., Delpech, A., Balguerie, X., Tron, F. und Lauret, P.: *Brunsting-Perry cicatricial bullous pemphigoid: A clinical variant of localized acquired epidermolysis bullosa?* *Journal of the American Academy of Dermatology*, 28(1):89–92, 1993.
- [113] Kablitz, R.: *Ein Beitrag Zur Frage der Epidermolysis bullosa (hereditaria et acquisita)*, 1904.
- [114] Kanno, H., Nose, M., Itoh, J., Taniguchi, Y. und Kyogoku, M.: *Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism*. *Clinical & Experimental Immunology*, 89(1):68–73, jun 2008.
- [115] Kanoh, S., Tanabe, T. und Rubin, B. K.: *Dapsone Inhibits IL-8 Secretion From Human Bronchial Epithelial Cells Stimulated With Lipopolysaccharide and Resolves Airway Inflammation in the Ferret*. *Chest*, 140(4):980–990, 2011.
- [116] 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., Häsler, R., Laskay, T., Westermann, J., Köhl, J.,

- Zillikens, D. und Ludwig, R. J.: *Genetic identification and functional validation of Fc γ RIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury*. The Journal of Pathology, 228(1):8–19, 2012.
- [117] Kasprick, A., Bieber, K. und Ludwig, R. J.: *Drug Discovery for Pemphigoid Diseases*. Current protocols in pharmacology, 84:e55, 2019.
- [118] Kasprick, A., Hofrichter, M., Smith, B., Ward, P., Bieber, K., Shock, A., Ludwig, R. J. und Schmidt, E.: *Treatment with anti-neonatal Fc receptor (FcRn) antibody ameliorates experimental epidermolysis bullosa acquisita in mice*. Br J Pharmacol, 177(10):2381–2392, 2020.
- [119] Keane, T. M., Goodstadt, L., Danecek, P., White, M. A., Wong, K., Yalcin, B., Heger, A., Agam, A., Slater, G., Goodson, M., Furlotte, N. A., Eskin, E., Nellåker, C., Whitley, H., Cleak, J., Janowitz, D., Hernandez-Pliego, P., Edwards, A., Belgard, T. G., Oliver, P. L., McIntyre, R. E., Bhomra, A., Nicod, J., Gan, X., Yuan, W., Weyden, L. van der, Steward, C. A., Bala, S., Stalker, J., Mott, R., Durbin, R., Jackson, I. J., Czechanski, A., Guerra-Assunção, J. A., Donahue, L. R., Reinholdt, L. G., Payseur, B. A., Ponting, C. P., Birney, E., Flint, J. und Adams, D. J.: *Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation*. Nature, 477(7364):289–294, sep 2011.
- [120] Kemmer, A., Bieber, K., Abadpour, A., Yu, X., Mitschker, N., Roth, S., Kaude-
rer, C., Ludwig, R. J., Seeger, K., Köhl, J., Zillikens, D. und Recke, A.: *A recombinant fusion protein derived from dog hookworm inhibits autoantibody-induced dermal-epidermal separation ex vivo*. Experimental Dermatology, 24(11):872–878, aug 2015.
- [121] Khan, W. I., Blennerhasset, P. A., Varghese, A. K., Chowdhury, S. K., Omsted, P., Deng, Y. und Collins, S. M.: *Intestinal Nematode Infection Ameliorates Experimental Colitis in Mice*. Infection and Immunity, 70(11):5931–5937, 2002.
- [122] Kim, S., Kim, J. und Kim, Y.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita: A Retrospective Clinical Analysis of 30 Cases*. Acta Dermato Venereologica, 91(3):307–312, 2011.
- [123] Kisui, F., Fukami, T., Nakano, M. und Nakajima, M.: *Strain and sex differences in drug hydrolase activities in rodent livers*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 142:105143, 2020.

- [124] Koga, H., Kasprick, A., López, R., Aulí, M., Pont, M., Godessart, N., Zillikens, D., Bieber, K., Ludwig, R. J. und Balagué, C.: *Therapeutic Effect of a Novel Phosphatidylinositol-3-Kinase δ Inhibitor in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *Frontiers in Immunology*, 9, 2018.
- [125] Koga, H., Prost-Squarcioni, C., Iwata, H., Jonkman, M. F., Ludwig, R. J. und Bieber, K.: *Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update*. *Frontiers in medicine*, 5:362, 2018.
- [126] Kolesnik, M., Becker, E., Reinhold, D., Ambach, A., Heim, M. U., Gollnick, H. und Bonnekoh, B.: *Treatment of severe autoimmune blistering skin diseases with combination of protein A immunoadsorption and rituximab: a protocol without initial high dose or pulse steroid medication*. *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology*, 28(6):771–780, 2013.
- [127] Kovacs, B., Tillmann, J., Freund, L. C., Nimmerjahn, F., Sadik, C. D., Bieber, K., Ludwig, R. J., Karsten, C. M. und Köhl, J.: *Fc γ Receptor IIB Controls Skin Inflammation in an Active Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *Front Immunol*, 10, 2020.
- [128] Kridin, K., Kneiber, D., Kowalski, E. H., Valdebran, M. und Amber, K. T.: *Epidermolysis bullosa acquisita: A comprehensive review*. *Autoimmunity Reviews*, 18(8):786–795, 2019.
- [129] Krinke, G. J. und K., W.: *Histology*. In: Hedrich, H. J. (Hrsg.): *The Laboratory Mouse*, S. 187–188. Academic Press, Boston, 2. Aufl., Juli 2012.
- [130] Kubisch, I., Diessenbacher, P., Schmidt, E., Gollnick, H. und Leverkus, M.: *Premonitory Epidermolysis Bullosa Acquisita Mimicking Eyelid Dermatitis*. *American Journal of Clinical Dermatology*, S. 1, 2010.
- [131] Kurzhals, G., Stolz, W., Meurer, M., Kunze, J., Braun-Falco, O. und Krieg, T.: *Acquired epidermolysis bullosa with the clinical feature of Brunsting-Perry cicatricial bullous pemphigoid*. *Archives of dermatology*, 127:391–395, 1991.
- [132] Kushniruk, W.: *The immunopathology of epidermolysis bullosa acquisita*. *Canadian Medical Association journal*, 108:1143–1146, 1973.
- [133] Laboratory, T. J.: *MRL/MpJ*. <https://www.jax.org/strain/000486>, Abrufdatum 17.11.2021.

- [134] Laemmli, U. K.: *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature, 227(5259):680–685, 1970.
- [135] Lally, A., Chamberlain, A., Allen, J., Dean, D. und Wojnarowska, F.: *Dermal-binding linear IgA disease: an uncommon subset of a rare immunobullous disease*. Clinical and experimental dermatology, 32:493–498, 2007.
- [136] Lambert, J. H.: *Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*. sumptibus vidvae Eberhardi Klett..., 1760.
- [137] Lapiere, J. C., Woodley, D. T., Parente, M. G., Iwasaki, T., Wynn, K. C., Christiano, A. M. und Uitto, J.: *Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa*. The Journal of clinical investigation, 92:1831–1839, 1993.
- [138] Lee, C. W.: *Prevalences of subacute cutaneous lupus erythematosus and Epidermolysis bullosa acquisita among Korean/Oriental populations*. Dermatology (Basel, Switzerland), 197:187, 1998.
- [139] Lee, C. W. und Jun, K. M.: *Epidermolysis bullosa acquisita presenting with localized facial blisters*. Clinical and experimental dermatology, 17:363–365, 1992.
- [140] Leineweber, S., Schönig, S. und Seeger, K.: *Insight into interactions of the von-Willebrand-factor-A-like domain 2 with the FNIII-like domain 9 of collagen VII by NMR and SPR*. FEBS Letters, 585(12):1748–1752, 2011.
- [141] Ludwig, R. J.: *Signalling and targeted therapy of inflammatory cells in epidermolysis bullosa acquisita*. Experimental Dermatology, 26(12):1179–1186, 2017.
- [142] Ludwig, R. J., Müller, S., Marques, A. d. C., Recke, A., Schmidt, E., Zillikens, D., Möller, S. und Ibrahim, S. M.: *Identification of Quantitative Trait Loci in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Journal of Investigative Dermatology, 132(5):1409–1415, 2012.
- [143] Ludwig, R. J., Recke, A., Bieber, K., Müller, S., Marques, A. d. C., Banczyk, D., Hirose, M., Kasperkiewicz, M., Ishii, N., Schmidt, E., Westermann, J., Zillikens, D. und Ibrahim, S. M.: *Generation of Antibodies of Distinct Subclasses and Specificity Is Linked to H2s in an Active Mouse Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Journal of Investigative Dermatology, 131(1):167–176, 2010.

- [144] Ludwig, R. J., Vanhoorelbeke, K., Leyboldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., McLachlan, S. M., Komorowski, L., Luo, J., Cabral-Marques, O., Hammers, C. M., Lindstrom, J. M., Lamprecht, P., Fischer, A., Riemekasten, G., Tersteeg, C., Sondermann, P., Rapoport, B., Wandinger, K. P., Probst, C., Beidaq, A. E., Schmidt, E., Verkman, A., Manz, R. A. und Nimmerjahn, F.: *Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology*. *Frontiers in Immunology*, 8, 2017.
- [145] Luke, M. C., Darling, T. N., Hsu, R., Summers, R. M., Smith, J. A., Solomon, B. I., Thomas, G. R. und Yancey, K. B.: *Mucosal Morbidity in Patients With Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *Archives of Dermatology*, 135(8), 1999.
- [146] Lutz, C. M., Linder, C. C. und Davisson, M. T.: *Strains, Stocks and Mutant Mice*. In: Hedrich, H. J. (Hrsg.): *The Laboratory Mouse*, S. 37. Academic Press, Boston, 2. Aufl., Juli 2012.
- [147] Lutz, C. M., Linder, C. C. und Davisson, M. T.: *Strains, Stocks and Mutant Mice*. In: Hedrich, H. J. (Hrsg.): *The Laboratory Mouse*, S. 38–39. Academic Press, Boston, 2. Aufl., Juli 2012.
- [148] Marietta, E., Black, K., Camilleri, M., Krause, P., Rogers, R. S., David, C., Pittelkow, M. R. und Murray, J. A.: *A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8):1090–1097, 2004.
- [149] Mathys, S., Evans, T. C., Chute, I. C., Wu, H., Chong, S., Benner, J., Liu, X. Q. und Xu, M. Q.: *Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation*. *Gene*, 231(1-2):1–13, apr 1999.
- [150] McKisic, M. D., Lancki, D. W., Otto, G., Padrid, P., Snook, S., Cronin, D. C., Lohmar, P. D., Wong, T. und Fitch, F. W.: *Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150:419–428, Jan. 1993, ISSN 0022-1767.
- [151] McKisic, M. D., Paturzo, F. X. und Smith, A. L.: *Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions*. *Transplantation*, 61(2):292–299, jan 1996.

- [152] Megahed, M. und Scharffetter-Kochanek, K.: *Epidermolysis bullosa acquisita - successful treatment with colchicine*. Archives of Dermatological Research, 286(1):35–40, 1994.
- [153] Mekori, Y. A., Baram, D., Goldberg, A. und Klajman, A.: *Inhibition of delayed hypersensitivity reactions in mice by colchicine*. Cellular Immunology, 120(2):330–340, 1989.
- [154] Mekori, Y. A., Chowers, Y., Ducker, I. und Klajman, A.: *Inhibition of delayed hypersensitivity reactions by colchicine. II. Colchicine inhibits interferon-gamma induced expression of HLA-DR on gut epithelial cell line*. Clinical and experimental immunology, 78:230–232, 1989.
- [155] Mihai, S., Chiriac, M. T., Takahashi, K., Thurman, J. M., Holers, V. M., Zillikens, D., Botto, M. und Sitaru, C.: *The Alternative Pathway of Complement Activation Is Critical for Blister Induction in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. The Journal of Immunology, 178(10):6514–6521, 2007.
- [156] Modschiedler, K., Weller, M., Wörl, P. und Driesch, P. von den: *Dapsone and colchicine inhibit adhesion of neutrophilic granulocytes to epidermal sections*. Archives of Dermatological Research, 292(1):32–36, 2000.
- [157] Mogil, J. S.: *Animal models of pain: progress and challenges*. Nature Reviews Neuroscience, 10(4):283–294, mar 2009.
- [158] Morel, L.: *Mapping lupus susceptibility genes in the NZM2410 mouse model*. Advances in immunology, 115:113–139, 2012.
- [159] Morel, L., Croker, B. P., Blenman, K. R., Mohan, C., Huang, G., Gilkeson, G. und Wakeland, E. K.: *Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains*. Proc Natl Acad Sci U S A., 97(12):6670–6675, 2000.
- [160] Mountz, J. D., Yang, P., Wu, Q., Zhou, J., Tousson, A., Fitzgerald, A., Allen, J., Wang, X., Cartner, S., Grizzle, W. E., Yi, N., Lu, L., Williams, R. W. und Hsu, H. C.: *Genetic Segregation of Spontaneous Erosive Arthritis and Generalized Autoimmune Disease in the BXD2 Recombinant Inbred Strain of Mice*. Scandinavian Journal of Immunology, 61(2):128–138, 2005.

- [161] Muramatsu, K., Ujiie, H., Kobayashi, I., Nishie, W., Izumi, K., Ito, T., Yoshimoto, N., Natsuga, K., Iwata, H. und Shimizu, H.: *Regulatory T-cell dysfunction induces autoantibodies to bullous pemphigoid antigens in mice and human subjects*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 142(6):1818–1830, 2018.
- [162] Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Ehrenstein, M., Mauri, C., Mowart, A. und Shaw, A.: *Janeway Immunologie (deutsche Ausgabe)*, Kap. 15, S. 826. Spektrum Akademischer Verlag ein Imprint des Springer Verlages, 2009.
- [163] Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Ehrenstein, M., Mauri, C., Mowart, A. und Shaw, A.: *Janeway Immunologie (deutsche Ausgabe)*, Kap. 8, S. 436. Spektrum Akademischer Verlag ein Imprint des Springer Verlages, 2009.
- [164] Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Ehrenstein, M., Mauri, C., Mowart, A. und Shaw, A.: *Janeway Immunologie (deutsche Ausgabe)*, Kap. 15, S. 827–830. Spektrum Akademischer Verlag ein Imprint des Springer Verlages, 2009.
- [165] Murphy, K. und Weaver, C.: *Janeway Immunologie*, Kap. 15 Autoimmunität und Transplantation, S. 836–838. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [166] Murphy, K. und Weaver, C.: *Janeway Immunologie*, Kap. 16.1, S. 914–917. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [167] Murthy, S., Schilf, P., Patzelt, S., Thieme, M., Becker, M., Kröger, L., Bremer, T., Derenda-Hell, A., Knebel, L., Fagiani, F., Ibrahim, S.M., Schmidt, E., Zillikens, D. und Sadik, C.D.: *Dapsone Suppresses Disease in Preclinical Murine Models of Pemphigoid Diseases*. Journal of Investigative Dermatology, 141(11):2587–2595.e2, 2021.
- [168] Naldi, L., Chatenoud, L., Linder, D., Fortina, A. B., Peserico, A., Virgili, A. R., Bruni, P. L., Ingordo, V., Scocco, G. L., Solaroli, C., Schena, D., Barba, A., Landro, A. D., Pezzarossa, E., Arcangeli, F., Gianni, C., Betti, R., Carli, P., Farris, A., Barabino, G. F. und Vecchia, C. L.: *Cigarette Smoking, Body Mass Index, and Stressful Life Events as Risk Factors for Psoriasis: Results from an Italian Case–Control Study*. Journal of Investigative Dermatology, 125(1):61–67, 2005.
- [169] Nanda, A., Dvorak, R., Al-Saeed, K., Al-Sabah, H. und Alsaleh, Q. A.: *Spectrum of autoimmune bullous diseases in Kuwait*. International Journal of Dermatology, 43(12):876–881, dec 2004.

- [170] New England BioLabs Inc.: *IMPACT™-TWIN - Purification, Ligation and Cyclization of Recombinant Proteins Using Self-Cleavable Affinity Tags - Instruction Manual*, Juli 2008. <https://www.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/impact-twin-manual-e6950-708.pdf?rev=b5d93033cb034cba9987c836e30d3c4e&hash=1D202C22004B16D256C88047FAB2A3D5>, Abrufdatum 15.12.2021.
- [171] Nicklas, W., Bleich, A. und Mähler, M.: *Viral Infections of Laboratory Mice*. In: *The Laboratory Mouse*, S. 439–441. Elsevier, 2012.
- [172] Niebuhr, M., Kasperkiewicz, M., Maass, S., Hauenschild, E., Bieber, K., Ludwig, R. J., Westermann, J. und Kalies, K.: *Evidence for a contributory role of a xenogeneic immune response in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. *Experimental Dermatology*, 26(12):1207–1213, dec 2017.
- [173] Nimmerjahn, F. und Ravetch, J. V.: *Fc γ receptors as regulators of immune responses*. *Nature Reviews Immunology*, 8(1):34–47, 2008.
- [174] Noe, M. H., Chen, M., Woodley, D. T. und Fairley, J. A.: *Familial epidermolysis bullosa acquisita*. *Dermatology online journal*, 14:2, 2008.
- [175] Paller, A. S., Queen, L. L., Woodley, D. T., Lane, A. T., Gammon, W. R. und Briggaman, R. A.: *Organ-Specific, Phylogenetic, and Ontogenetic Distribution of the Epidermolysis Bullosa Acquisita Antigen*. *Journal of Investigative Dermatology*, 86(4):376–379, 1986.
- [176] Pattison, D. I., Davies, M. J. und Hawkins, C. L.: *Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: Differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids*. *Free Radical Research*, 46(8):975–995, 2012.
- [177] Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., Kasimi, K. C. E., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J. und Wynn, T. A.: *Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis*. *PLoS Pathogens*, 5(4):e1000371, 2009.
- [178] Petkov, P. M., Cassell, M. A., Sargent, E. E., Donnelly, C. J., Robinson, P., Crew, V., Asquith, S., Haar, R. V. und Wiles, M. V.: *Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse*. *Genomics*, 83(5):902–911, may 2004.

- [179] Pipi, E., Kasprick, A., Iwata, H., Goletz, S., Hundt, J. E., Sadeghi, H., Schmidt-Jiménez, L. F., Schmidt, E., Sjögren, J., Zillikens, D., Ludwig, R. J., Collin, M. und Bieber, K.: *Multiple Modes of Action Mediate the Therapeutic Effect of Intravenous IgG in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. *Journal of Investigative Dermatology*, nov 2021.
- [180] Pritchett-Corning, K. R. und Clifford, C. B.: *Parasitic Infections of Laboratory Mice*. In: *The Laboratory Mouse*, S. 506–510. Elsevier, 2012.
- [181] Prost-Squarcioni, C., Caux, F., Schmidt, E., Jonkman, M. F., Vassileva, S., Kim, S. C., Iranzo, P., Daneshpazhooch, M., Terra, J., Bauer, J., Fairley, J., Hall, R., Hertl, M., Lehman, J. S., Marinovic, B., Patsatsi, A., Zillikens, D., Group, I. B. D., Werth, V., Woodley, D. T. und Murrell, D. F.: *International Bullous Diseases Group: consensus on diagnostic criteria for epidermolysis bullosa acquisita*. *The British journal of dermatology*, 179:30–41, 2018.
- [182] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: *PubChem Compound Summary for CID 2955, Dapsone*, 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dapsone>, Abrufdatum 03.09.2021.
- [183] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: *PubChem Compound Summary for CID 6167, Colchicine*, 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colchicine>, Abrufdatum 03.09.2021.
- [184] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: *PubChem Compound Summary for CID 6741, Methylprednisolone*, 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylprednisolone>, Abrufdatum 03.09.2021.
- [185] Recke, A., Sitaru, C., Vidarsson, G., Evensen, M., Chiriac, M. T., Ludwig, R. J. und Zillikens, D.: *Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: Induction of dermal–epidermal separation*. *Journal of Autoimmunity*, 34(4):435–444, 2010.
- [186] Rehm, H. und Letzel, T.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Kap. 1.3 Gele, S. 8–11. Springer Berlin Heidelberg, 2016.

- [187] Rehm, H. und Letzel, T.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Kap. 5.3. Affinitätschromatographie, S. 184–189. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [188] Rehm, H. und Letzel, T.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Kap. 6.5 Immunologische Nachweistechiken, S. 213–214. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [189] Reichert, J.M.: *Marketed therapeutic antibodies compendium*. mAbs, 4(3):413–415, 2012.
- [190] Roenigk, H. H., Ryan, J. G. und Bergfeld, W. F.: *Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases*. Archives of dermatology, 103:1–10, 1971.
- [191] Rossant, J. und McKerlie, C.: *Mouse-based phenogenomics for modelling human disease*. Trends in molecular medicine, 7:502–507, 2001.
- [192] Rote Liste® Service GmbH: *Fachinformation für DAPSON-Fatol®*, Dez. 2018. <https://www.rote-liste.de/suche/praep/27257-0/ColchicinTiofarma0,5mgTabletten>, Abrufdatum 05.09.2021.
- [193] Rote Liste® Service GmbH: *Fachinformation für Colchicin Tiofarma 0,5 mg Tabletten*, Okt. 2021. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colchicine#datasheet=LCSS>, Abrufdatum 25.11.2021.
- [194] Rudofsky, U.H., Evans, B.D., Balaban, S.L., Mottironi, V.D. und Gabrielsen, A.E.: *Differences in expression of lupus nephritis in New Zealand mixed H-2z homozygous inbred strains of mice derived from New Zealand black and New Zealand white mice. Origins and initial characterization*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 68:419–426, Apr. 1993, ISSN 0023-6837.
- [195] Sadeghi, H., Gupta, Y., Möller, S., Samavedam, U. K., Behnen, M., Kasprick, A., Bieber, K., Müller, S., Kalies, K., Castro Marques, A. de, Recke, A., Schmidt, E., Zillikens, D., Laskay, T., Mariani, J., Ibrahim, S.M. und Ludwig, R.J.: *The retinoid-related orphan receptor alpha is essential for the end-stage effector phase of experimental epidermolysis bullosa acquisita*. The Journal of Pathology, 237(1):111–122, 2015.

- [196] Sadeghi, H., Lockmann, A., Hund, A. C., Samavedam, U.K.S.R.L., Pipi, 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.: *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(8):3656–3663, 2015.
- [197] Sadik, C., Zillikens, D. und Hertl, M.: *Dermatitis herpetiformis*. In: Gerd Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Kap. Bullöse Autoimmundermatosen, S. 871. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [198] Sadik, C., Zillikens, D. und Hertl, M.: *Einführung*. In: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Kap. Bullöse Autoimmundermatosen, S. 839–840. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [199] Sadik, C., Zillikens, D. und Hertl, M.: *Epidermolysis bullosa acquisita*. In: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Kap. Bullöse Autoimmundermatosen, S. 866–868. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [200] Sadik, C., Zillikens, D. und Hertl, M.: *Epidermolysis bullosa acquisita*. In: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (Hrsg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Kap. Bullöse Autoimmundermatosen, S. 847–872. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [201] Sadik, C.D., Langan, E.A., Gutzmer, R., Fleischer, M.I., Loquai, C., Reinhardt, L., Meier, F., Göppner, D., Herbst, R.A., Zillikens, D. und Terheyden, P.: *Retrospective Analysis of Checkpoint Inhibitor Therapy-Associated Cases of Bullous Pemphigoid From Six German Dermatology Centers*. Frontiers in Immunology, 11, 2021.
- [202] Samavedam, U.K., Mitschker, N., Kasprick, A., Bieber, K., Schmidt, E., Laskay, T., Recke, A., Goletz, S., Vidarsson, G., Schulze, F.S., Armbrust, M., Schulze Dieckhoff, K., Pas, H.H., Jonkman, M.F., Kalies, K., Zillikens, D., Gupta, Y., Ibrahim, S.M. und Ludwig, R. J.: *Whole-Genome Expression Profiling in Skin Reveals SYK As a Key Regulator of Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Frontiers in immunology, 9:249, 2018.

- [203] Samavedam, U.K.S.R.L., Iwata, H., Müller, S., Schulze, F.S., Recke, A., Schmidt, E., Zillikens, D. und Ludwig, R. J.: *GM-CSF Modulates Autoantibody Production and Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Journal of Immunology, 192(2):559–571, 2013.
- [204] Schmidt, E. und Zillikens, D.: *Pemphigoid diseases*. The Lancet, 381(9863):320–332, 2013.
- [205] Schmidt, E. und Zillikens, D.: *Immunfluoreszenztechniken*. In: Cerroni, L., Garbe, C., Metze, D., Kutzner, H. und Kerl, H. (Hrsg.): *Histopathologie der Haut*, S. 37. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [206] Schärer, L.: *Histologische Techniken*. In: Cerroni, L., Garbe, C., Metze, D., Kutzner, H. und Kerl, H. (Hrsg.): *Histopathologie der Haut*, Kap. 3, S. 7–13. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [207] Schwarm, C., Gola, D., Holtsche, M. M., Dieterich, A., Bhandari, A., Freitag, M., Nürnberg, P., Toliat, M., Lieb, W., Wittig, M., Franke, A., Worm, M., Sticherling, M., Ehrchen, J., Günther, C., Gläser, R., Peitsch, W.K., Sárdy, M., Eming, R., Hertl, M., Benoit, S., Goebeler, M., Pföhler, C., Kunz, M., Kreuter, A., Beek, N. van, Erdmann, J., Busch, H., Zillikens, D., Sadik, C. D., Hirose, M., König, I. R., Schmidt, E. und Ibrahim, S. M.: *Identification of two novel bullous pemphigoid-associated alleles, HLA-DQA1*05:05 and -DRB1*07:01, in Germans*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 16(1), 2021.
- [208] Sebaratnam, D. F., Hanna, A. M., Chee, S., Frew, J. W., Venugopal, S. S., Daniel, B. S., Martin, L. K., Rhodes, L. M., Tan, J. C. K., Wang, C. Q., Welsh, B., Nijsten, T. und Murrell, D. F.: *Development of a Quality-of-Life Instrument for Autoimmune Bullous Disease*. JAMA Dermatology, 149(10):1186, 2013.
- [209] Selin, L. K., Brehm, M. A., Naumov, Y. N., Cornberg, M., Kim, S. K., Clute, S. C. und Welsh, R. M.: *Memory of mice and men: CD8+ T-cell cross-reactivity and heterologous immunity*. Immunological Reviews, 211(1):164–181, 2006.
- [210] Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., Richards, D. R., McDonald-Smith, G. P., Gao, H., Hennessy, L., Finnerty, C. C., López, C. M., Honari, S., Moore, E. E., Minei, J. P., Cuschieri, J., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Jeschke, M. G., Klein, M. B., Gamelli, R. L., Gibran, N. S., Brownstein, B. H.,

- Miller-Graziano, C., Calvano, S.E., Mason, P.H., Cobb, J.P., Rahme, L.G., Lowry, S.F., Maier, R.V., Moldawer, L.L., Herndon, D.N., Davis, R.W., Xiao, W. und Tompkins, R.G.: *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(9):3507–3512, feb 2013.
- [211] Seta, V., Aucouturier, F., Bonnefoy, J., Le Roux-Villet, C., Pendaries, V., Alexandre, M., Grootenboer-Mignot, S., Heller, M., Lièvre, N., Laroche, L., Caux, F., Titeux, M., Hovnanian, A. und Prost-Squarcioni, C.: *Comparison of 3 type VII collagen (C7) assays for serologic diagnosis of epidermolysis bullosa acquisita (EBA)*. Journal of the American Academy of Dermatology, 74:1166–1172, 2016.
- [212] Sewell, D.: *Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization*. International Immunology, 15(1):59–69, 2003.
- [213] Sezin, T., Krajewski, M., Wutkowski, A., Mousavi, S., Chakievska, L., Bieber, K., Ludwig, R. J., Dahlke, M., Rades, D., Schulze, F.S., Schmidt, E., Kalies, K., Gupta, Y., Schilf, P., Ibrahim, S. M., König, P., Schwudke, D., Zillikens, D. und Sadik, C.D.: *The Leukotriene B₄ and its Receptor BLT1 Act as Critical Drivers of Neutrophil Recruitment in Murine Bullous Pemphigoid-Like Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Journal of Investigative Dermatology, 137(5):1104–1113, 2017.
- [214] Shi, Y., Li, J., Yang, P., Niu, Z., Wei, L., Chen, L. und Gao, L.: *Colchicine increases intestinal permeability, suppresses inflammatory responses, and alters gut microbiota in mice*. Toxicology Letters, 334:66–77, 2020.
- [215] SIB: *Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Lausanne Switzerland, Expasy ProtParam tool*. Website. <https://web.expasy.org/protparam/>, Abrufdatum 05.09.2021.
- [216] Sitaru, A. G., Sesarman, A., Mihai, S., Chiriac, M. T., Zillikens, D., Hultman, P., Solbach, W. und Sitaru, C.: *T Cells Are Required for the Production of Blister-Inducing Autoantibodies in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. The Journal of Immunology, 184(3):1596–1603, 2009.
- [217] Sitaru, C., Chiriac, M. T., Mihai, S., Büning, J., Gebert, A., Ishiko, A. und Zillikens, D.: *Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice*. The Journal of Immunology, 177(5):3461–3468, 2006.

- [218] Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Bröcker, E. B. und Zillikens, D.: *Autoantibodies to Type VII Collagen Mediate Fc γ -Dependent Neutrophil Activation and Induce Dermal-Epidermal Separation in Cryosections of Human Skin*. The American Journal of Pathology, 161(1):301–311, 2002.
- [219] Sitaru, C., Mihai, S., Otto, C., Chiriac, M. T., Hausser, I., Dotterweich, B., Saito, H., Rose, C., Ishiko, A., Zillikens, D. *et al.*: *Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen*. Journal of Clinical Investigation, 115(4):870–878, 2005.
- [220] Sjöbring, U., Björck, L. und Kastern, W.: *Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties*. The Journal of biological chemistry, 266:399–405, 1991.
- [221] Srinivas, G., Möller, S., Wang, J., Künzel, S., Zillikens, D., Baines, J. F. und Ibrahim, S. M.: *Genome-wide mapping of gene-microbiota interactions in susceptibility to autoimmune skin blistering*. Nature Communications, 4(1), 2013.
- [222] Stendahl, O., Molin, L. und Dahlgren, C.: *The Inhibition of Polymorphonuclear Leukocyte Cytotoxicity by Dapsone*. Journal of Clinical Investigation, 62(1):214–220, 1978.
- [223] Stephan, P.: *How economics shapes science*, Kap. The Production of Research: Equipment and Materials, S. 100–102. Harvard University Press, Cambridge, Mass, 2012.
- [224] Strachan, D.: *Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'*. Thorax, 55(90001):2S–10, 2000.
- [225] Strachan, D. P.: *Hay fever, hygiene, and household size*. BMJ, 299(6710):1259–1260, 1989.
- [226] Sun, J. C., Ugolini, S. und Vivier, E.: *Immunological memory within the innate immune system*. The EMBO Journal, 2014.
- [227] Taurog, J. D., Richardson, J. A., Croft, J. T., Simmons, W. A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J. L., Balish, E. und Hammer, R. E.: *The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats*. Journal of Experimental Medicine, 180(6):2359–2364, 1994.

- [228] Taylor, M. D., Harris, A., Babayan, S. A., Bain, O., Culshaw, A., Allen, J. E. und Maizels, R. M.: *CTLA-4 and CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Protective Immunity to Filarial Parasites In Vivo*. The Journal of Immunology, 179(7):4626–4634, 2007.
- [229] Thuong-Nguyen, V., Kadunce, D. P., Hendrix, J. D., Gammon, W. R. und Zone, J. J.: *Inhibition of Neutrophil Adherence to Antibody by Dapsone: A Possible Therapeutic Mechanism of Dapsone in the Treatment of IgA Dermatoses*. The Journal of Investigative Dermatology, 100(4):349–355, 1993.
- [230] Tiburzy, B., Szyska, M., Iwata, H., Chrobok, N., Kulkarni, U., Hirose, M., Ludwig, R. J., Kalies, K., Westermann, J., Wong, D. und Manz, R. A.: *Persistent Autoantibody-Production by Intermediates between Short-and Long-Lived Plasma Cells in Inflamed Lymph Nodes of Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita*. PLoS ONE, 8(12):e83631, 2013.
- [231] Tingle, M. D., Mahmud, R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M. und Park, B. K.: *Comparison of the metabolism and toxicity of dapsone in rat, mouse and man*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 283:817–823, 1997.
- [232] Titford, M.: *The long history of hematoxylin*. Biotechnic & Histochemistry, 80(2):73–78, jan 2005.
- [233] Tjokrowidjaja, A., Daniel, B. S., Frew, J. W., Sebaratnam, D. F., Hanna, A. M., Chee, S., Dermawan, A., Wang, C. Q., Lim, C., Venugopal, S. S., Rhodes, L. M., Welsh, B., Nijsten, T. und Murrell, D. F.: *The development and validation of the Treatment of Autoimmune Bullous Disease Quality of Life questionnaire, a tool to measure the quality of life impacts of treatments used in patients with autoimmune blistering disease*. British Journal of Dermatology, 169(5):1000–1006, 2013.
- [234] Töpfer, G.: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. In: Gressner, A. M. und Arndt, T. (Hrsg.): *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, S. 789. Springer Berlin Heidelberg, 2019.
- [235] Uitto, J., Chung-Honet, L. C. und Christiano, A. M.: *Molecular biology and pathology of type VII collagen*. Experimental dermatology, 1:2–11, 1992.
- [236] Villone, D., Fritsch, A., Koch, M., Bruckner-Tuderman, L., Hansen, U. und Bruckner, P.: *Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone*:

- anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils*. The Journal of biological chemistry, 283:24506–24513, 2008.
- [237] Vodegel, R. M., Jong, M. C. J. M. de, Pas, H. H. und Jonkman, M. F.: *IgA-mediated epidermolysis bullosa acquisita: two cases and review of the literature*. Journal of the American Academy of Dermatology, 47:919–925, 2002.
- [238] Vorobyev, A., Gupta, Y., Sezin, T., Koga, H., Bartsch, Y. C., Belheouane, M., Künzel, S., Sina, C., Schilf, P., Körber-Ahrens, H., Beltsiou, F., Ernst, A. L., Khil’chenko, S., Al-Aasam, H., Manz, R. A., Diehl, S., Steinhaus, M., Jascholt, J., Kouki, P., Boehncke, W. H., Mayadas, T. N., Zillikens, D., Sadik, C. D., Nishi, H., Ehlers, M., Möller, S., Bieber, K., Baines, J. F., Ibrahim, S. M. und Ludwig, R. J.: *Gene-diet interactions associated with complex trait variation in an advanced intercross outbred mouse line*. Nature communications, 10:4097, 2019.
- [239] Vorobyev, A., Ujiie, H., Recke, A., Buijsrogge, J. J. A., Jonkman, M. F., Pas, H. H., Iwata, H., Hashimoto, T., Kim, S. C., Kim, J. H., Groves, R., Samavedam, U., Gupta, Y., Schmidt, E., Zillikens, D., Shimizu, H. und Ludwig, R. J.: *Autoantibodies to Multiple Epitopes on the Non-Collagenous-1 Domain of Type VII Collagen Induce Blisters*. Journal of Investigative Dermatology, 135(6):1565–1573, 2015.
- [240] Wegener, H., Leineweber, S. und Seeger, K.: *The vWFA2 domain of type VII collagen is responsible for collagen binding*. Biochemical and biophysical research communications, 430:449–453, 2013.
- [241] Weiss, S. J.: *Tissue Destruction by Neutrophils*. New England Journal of Medicine, 320(6):365–376, 1989.
- [242] Welzel, J.: *Hauterkrankungen durch Würmer*. In: *Braun-Falco’s Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, S. 429–438. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [243] Whittaker, C. A. und Hynes, R. O.: *Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere*. Molecular biology of the cell, 13:3369–3387, 2002.
- [244] Winterbourn, C. C., Kettle, A. J. und Hampton, M. B.: *Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function*. Annual Review of Biochemistry, 85(1):765–792, 2016.

- [245] Wise, F. und Lautman, M.: *Epidermolysis bullosa beginning in adult life. the acquired form of the disease, with the report of a case and review of the literature.* J Cutan Dis, S. 44, 1915.
- [246] Witte, M., Koga, H., Hashimoto, T., Ludwig, R. J. und Bieber, K.: *Discovering potential drug-targets for personalized treatment of autoimmune disorders - what we learn from epidermolysis bullosa acquisita.* Expert Opinion on Therapeutic Targets, 20(8):985–998, 2016.
- [247] Woodley, D. T., Burgeson, R. E., Lunstrum, G., Bruckner-Tuderman, L., Reese, M. J. und Briggaman, R. A.: *Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen.* Journal of Clinical Investigation, 81(3):683–687, 1988.
- [248] Woodley, D. T., Chang, C., Saadat, P., Ram, R., Liu, Z. und Chen, M.: *Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita.* Journal of Investigative Dermatology, 124(5):958–964, 2005.
- [249] Worp, H. B. van der, Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O'Collins, V. und Macleod, M. R.: *Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies?* PLoS Medicine, 7(3):e1000245, mar 2010.
- [250] Wozel, G. und Blasum, C.: *Dapsone in dermatology and beyond.* Archives of Dermatological Research, 306(2):103–124, 2013.
- [251] Wu, Z., Nagano, I., Asano, K. und Takahashi, Y.: *Infection of non-encapsulated species of Trichinella ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis involving suppression of Th17 and Th1 response.* Parasitology Research, 107(5):1173–1188, 2010.
- [252] Yu, X., Akbarzadeh, R., Pieper, M., Scholzen, T., Gehrig, S., Schultz, C., Zillikens, D., König, P. und Petersen, F.: *Neutrophil Adhesion Is a Prerequisite for Antibody-Mediated Proteolytic Tissue Damage in Experimental Models of Epidermolysis Bullosa Acquisita.* Journal of Investigative Dermatology, 138(9):1990–1998, 2018.
- [253] Zhao, Z. S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P. A. und Cantor, H.: *Molecular Mimicry by Herpes Simplex Virus-Type 1: Autoimmune Disease After Viral Infection.* Science, 279(5355):1344–1347, 1998.

- [254] Ziesing, S., Heim, A. und Vonberg, R. P.: *Methoden der mikrobiologischen Diagnostik*. In: Suerbaum, S., Burchard, G. D., Kaufmann, S. H. E. und Schulz, T. F. (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, S. 140. Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [255] Zillikens, D., Wever, S., Roth, A., Weidenthaler-Barth, B., Hashimoto, T. und Brocker, E. B.: *Incidence of autoimmune subepidermal blistering dermatoses in a region of central Germany*. Archives of dermatology, 131(8):957, 1995.
- [256] Zumelzu, C., Le Roux-Villet, C., Loiseau, P., Busson, M., Heller, M., Aucouturier, F., Pendaries, V., Lièvre, N., Pascal, F., Brette, M. D., Doan, S., Charron, D., Caux, F., Laroche, L., Petit, A. und Prost-Squarcioni, C.: *Black patients of African descent and HLA-DRB1*15:03 frequency overrepresented in epidermolysis bullosa acquisita*. The Journal of investigative dermatology, 131:2386–2393, 2011.
- [257] Zyl, J. M. van, Basson, K., Kriegler, A. und Walt, B. J. van der: *Mechanisms by which Clofazimine and Dapsone inhibit the Myeloperoxidase System*. Biochemical Pharmacology, 42(3):599–608, 1991.

A. Anhang

A.1. Aufbau der Ankerfibrillen aus Kollagen VII

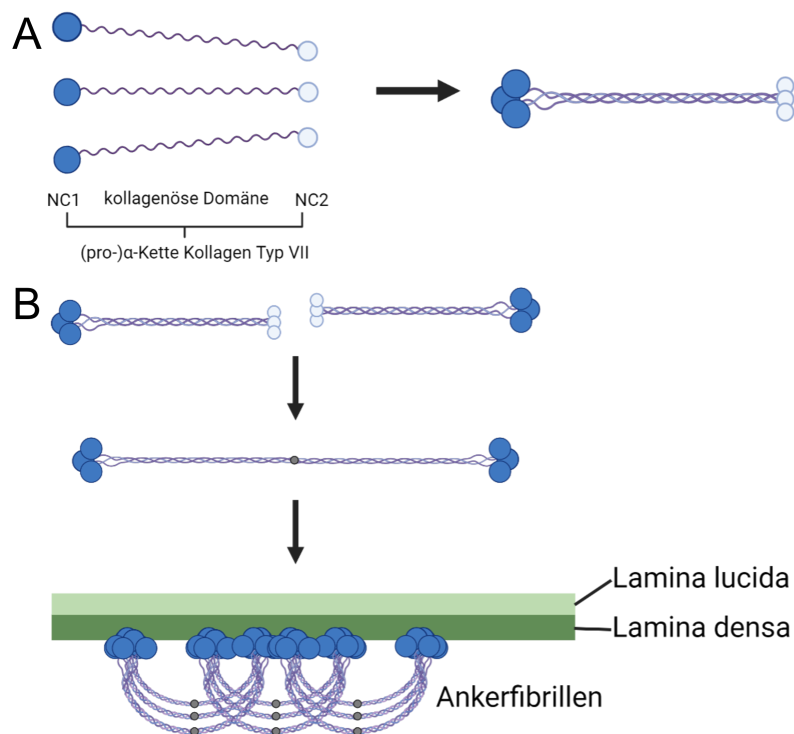


Abbildung A.1.: Aufbau der Ankerfibrillen aus Kollagen VII (Die Grafiken wurden mit Bio-render.com nach [46] erstellt) **A** Aus drei α -Ketten des Kollagen Typ VII, welche aus den nicht kollagenen Teilen NC1 und NC2 und der kollagenösen Domäne bestehen, bildet sich die charakteristische Tripelhelix. **B** Zwei dieser Tripelhelices werden unter proteolytischer Abspaltung von Teilen am C-Terminus durch Disulfidbrücken zu Dimeren stabilisiert. Aus mehreren dieser Dimere setzen sich nun die charakteristischen Ankerfibrillen zusammen, wobei die NC1-Domänen sich an die extrazellulären Makromoleküle der Lamina densa binden. [46]

A.2. Expasy Proteinparameter

Expasy

ProtParam

User-provided sequence:

```
      10      20      30      40      50      60
ACSHGPDV DV FLLHATRDNA HNAEAVRRVL ERLVSALGPL GPQAAQVGLL TYSHRPSPLF
      70      80      90     100     110     120
PLNSSHDLGI ILRKIRDIPY VDPSGNNLGT AVTTAHRVLL ASNAPGRRQQ VPGVMVLLVD
      130     140     150     160     170     180
EPLRGDILSP IREAQTSGLK VMALSLVGAD PEQLRRLAPG TDPIQNFFAV DNGPGLDRAV
      190
SDLAVALCQA A
```

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 191

Molecular weight: 20309.30

Theoretical pI: 7.22

Amino acid composition: [CSV format](#)

Ala (A)	22	11.5%
Arg (R)	15	7.9%
Asn (N)	8	4.2%
Asp (D)	12	6.3%
Cys (C)	2	1.0%
Gln (Q)	8	4.2%
Glu (E)	5	2.6%
Gly (G)	15	7.9%
His (H)	6	3.1%
Ile (I)	7	3.7%
Leu (L)	27	14.1%
Lys (K)	2	1.0%
Met (M)	2	1.0%
Phe (F)	4	2.1%
Pro (P)	16	8.4%
Ser (S)	12	6.3%
Thr (T)	7	3.7%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	3	1.6%
Val (V)	18	9.4%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

A.2. Expasy Proteinparameter

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 17
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 17

Atomic composition:

Carbon	C	896
Hydrogen	H	1458
Nitrogen	N	266
Oxygen	O	264
Sulfur	S	4

Formula: $C_{896}H_{1458}N_{266}O_{264}S_4$
Total number of atoms: 2888

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 4595
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.226, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 4470
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.220, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is A (Ala).

The estimated half-life is: 4.4 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 33.74
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 108.27

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.049



Expasy is operated by the [SIB Swiss Institute of Bioinformatics](#) | [Terms of Use](#)

A.3. Zertifikat des Tierkurses



Certificate

We hereby certify that Mr **Tobias Schröder**
participated in the course entitled

Einführung in die VERSUCHSTIERKUNDE UND TIEREXPERIMENTELLE
TECHNIKEN bei der Maus

The course was held on 24.06.2011 at UK-SH Campus Lübeck under supervision of Prof.
Dr. med. vet. Gerhard Schultheiß (FTA Physiologie und Versuchstiere, Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel)

The program consisted of: 3 h lectures in:

- Anatomy and physiology of mice
- Methods of euthanasia
- Breeding schemes and terminology of genetic modified organisms
- Experimental design and biometrical basics

5 h tutorial in:

- Handling, application methods, blood sampling techniques and autopsy of mice
- Humane killing
- Anaesthesia of rodents

Lübeck, 29 June 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Schultheiß', written over a faint circular seal of the university.

Prof. Dr. G. Schultheiß

A.4. Genehmigung des Tierversuchsantrags

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein



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

Herrn
Prof. Dr. Ralf Ludwig
Klinik für Dermatologie, Allergologie
Und Venerologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Antrag vom: 19.03.2012

Mein Zeichen: V 312-72241.122-5
(78-7/10)

Dr. Michaele Sekulla

Telefon: 0431 988-4948
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:
Herrn Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

26 .März 2012

Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Prof. Ludwig,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 6. August 2010 für das Versuchsvorhaben „*Therapeutische Modulation der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)*“ weitere 192 Mäuse für das Teilprojekt „*Vergleichende Untersuchungen ‚etablierter‘ Pharmaka bei experimenteller EBA*“ verwendet werden.

Mit freundlichen Grüßen


Dr. Sekulla

A.5. G12-Daten von Dr. Hiroaki Iwata

Die folgende Tabelle listet die Scores und die daraus berechneten AUCs der einzelnen Mäuse der Generation 12 auf:

Tabelle A.1.: Score und AUC Werte der Generation G12

Maus Nr.	Therapie	Tag						AUC
		0	4	8	12	16	20	
1	PBS	0	1,3	3,3	5,1	5,1	3,4	66
2	PBS	0	2,4	4,3	5,3	6,7	4,6	84
4	PBS	0	5	5,4	6,6	7,7	6,1	111
5	PBS	0	1,5	4,3	5,7	6,1	4,8	80
6	PBS	0	4	4	3,6	4,4	3,9	71,8
7	PBS	0	0	1,7	4,7	4	7,9	57,4
9	PBS	0	0,5	2	0,4	0,2	0,2	12,8
10	PBS	0	0	0,6	0,8	0,8	0,6	10

A.6. AIL

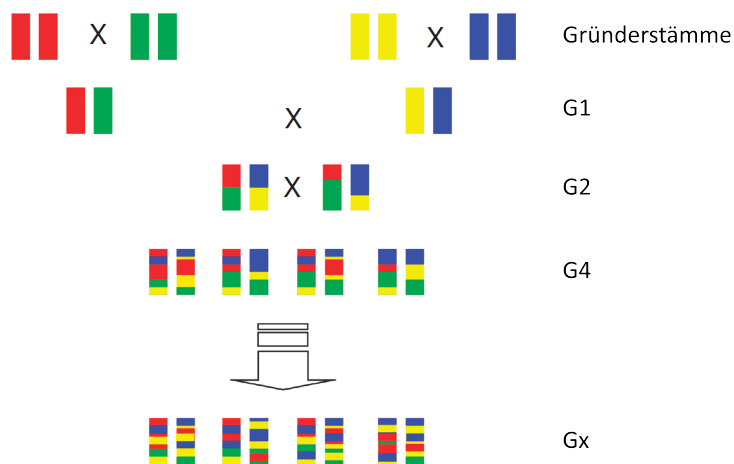


Abbildung A.2.: Schematische Darstellung der genetischen Rekombination in der AIL (Modifizierte Grafik aus Ludwig et al. 2012[142])

Danksagungen

An erster Stelle mochte ich mich bei Frau PD Dr. rer. physiol. K. Bieber, Herrn Prof. Dr. med R. Ludwig und Herrn Dr. med. H. Iwata bedanken, die mich an die spannende experimentelle Dermatologie und dieses ebenso spannende Thema herangeführt und in den verschiedensten Phasen dieser Arbeit begeistert haben. Insbesondere möchte ich Frau PD Dr. Bieber für die ausgezeichnete Betreuung, den kritischen Blick, die niedrigschwellige Kontaktmöglichkeit, das offene Ohr, das Fordern und gleichzeitige Fördern sowie für ihr besonnenes und soniges Gemüt danken. Herrn Dr. med. D. Zillikens sowie Prof. Dr. Ludwig bin ich äußerst Dankbar für die Überlassung des Themas und der Bereitstellung von Labor, Materialien und Personal. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Iwata für Einweisung und Aufsicht in die Tierversuche, die Heranführung und Weiterführung seines Konzeptes sowie Bereitstellung von Daten seiner Arbeit für den Anhang und die kollegiale Zusammenarbeit herzlich bedanken. Bei dem Graduiertenkolleg 1727 „*Modulation of Autoimmunity*“ möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bedanken. Für die freundliche Überlassung von AIL-Mäusen für das Antikörpertransfermodells bedanke ich mich bei Herrn Prof. Saleh M. Ibrahim. Bei Frau Claudia Kauderer und der ärztlichen Kollegin Frau R. Gembicki bedanke ich mich für die freundliche Laboreinführung und die exzellente technische Expertise. Frau S. Schöning M.Sc. und Prof. Dr. rer. nat. Karsten Seeger aus dem Institut für Chemie der Universität Lübeck danke ich für den *E. coli*-Klon und dafür, dass ich dort freundlicherweise sechs Mal(!) Protein aufreinigen durfte. Frau Dr. med. M. Witte für Unterstützung bei der täglichen Therapie und der Probennahme zu einem sehr dunklen Zeitpunkt: Der Durchführung von Generation 19 in der AIL. Ein ebenso großer Dank gilt allen weiteren Mitarbeiter:innen des Lübecker Instituts für experimentelle Dermatologie der Universität zu Lübeck für das äußerst kollegiale Miteinander und für die konstruktiven Anregungen. Es hat mir große Freude bereitet in einem so internationalen Team zu arbeiten. Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. rer. nat. A. Künstler für statistische Beratung und eine multivariate lineare Regression, Frau Dr. med. vet. S. Cohen für ihre fachspezifische Bewertung muriner Parasitosen und meinen Schwiegereltern für die nicht selbstverständliche tatkräftige Unterstützung mir den Rücken freizuhalten danken. Außerdem danke ich Johanna, Fabian und Heidi für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Weiterer und besonderer Dank gilt meiner Ehefrau und meinem Vater. Für alles.

Lebenslauf

Zeitraum der Dissertation

Experimentelle Arbeiten: April 2012 bis Juni 2016

Publikation

Iwata H, Witte M, Samavedam UK, Gupta Y, Shimizu A, Ishiko A, **Schröder T**, Seeger K, Dahlke M, Rades D, Zillikens D, Ludwig RJ: Radiosensitive Hematopoietic Cells Determine the Extent of Skin Inflammation in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Immunol.* (2015)