

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

Direktor: Prof. Dr. med. R. Ludwig

Die Rolle des Haarfollikels in Antikörpertransfer induzierter Epidermolysis bullosa acquisita

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Ayleen Fokuhl
aus Bad Oldesloe
Lübeck 2026

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. vet. Jennifer E. Hundt

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. Peter König

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.01.2026

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ayleen Fokuhl, geboren am 10.01.1992 in Bad Oldesloe, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel verwendet habe.

Lübeck, 13.11.2024

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Aufbau und Funktionen der Haut	1
1.2 Aufbau und Funktionen des Haarfollikels	4
1.2.1 Haarfollikelzyklus	5
1.2.2 Immunprivileg	6
1.3 Epidermolysis bullosa acquisita	7
1.4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 Reagenzien und Kits	14
2.1.3 Verbrauchsmaterial	15
2.1.4 Antikörper und Seren	17
2.1.5 Puffer und Lösungen	17
2.1.6 Software	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Genehmigung der Tierversuche	20
2.2.2 Untersuchte Mausstämme	20
2.2.2.1 B6.Cg-Tyr ^{c-2J} Hr ^{Hr} /J (<i>Hairless</i> -Maus)	21
2.2.2.2 B6.Cg-Foxn1 ^{nu} /J (<i>Nude</i> -Maus)	23
2.2.3 Autoantikörpertransfer induziertes Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita	25
2.2.4 Versuchsablauf (Injektionsschema) und Probengewinnung	26
2.2.5 Thermografische Analysen	28
2.2.6 Histologische Analysen	30
2.2.6.1 Anfertigung von Gefrierschnitten	30
2.2.6.2 Anfertigung von Paraffinschnitten	30
2.2.6.3 Histochemische Färbung	31
2.2.6.4 Immunfluoreszenzfärbungen	32
2.2.6.5 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Komplementfaktor 3 und gewebegebundenes Immunglobulin G	32
2.2.6.6 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für den Endothelzellmarker <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> und gewebegebundene Antikörper	35
2.2.7 Bestimmung der mittleren Epidermisdicke an der Rückenhaut	38
2.2.8 Statistische Auswertung	39
2.2.8.1 <i>Clinical Score</i> (von Läsionen betroffene Körperoberfläche)	39
2.2.8.2 Bestimmung der mittleren Epidermisdicke	39
2.2.8.3 Oberflächliche Körpertemperatur	40
2.2.9 Verblindung der Auswertung	40
3 Ergebnisse	41
3.1 B6.Cg-Tyr ^{c-2J} Hr ^{Hr} /J (<i>Hairless</i> -Mäuse)	41
3.1.1 <i>Hairless</i> -Mäuse zeigen einen signifikant niedrigeren <i>Clinical Score</i> als die behaarten Wurfgeschwister	41
3.1.2 Die Oberflächentemperatur von <i>Hairless</i> -Mäusen ist signifikant höher als die von behaarten Wurfgeschwistern	48

3.1.3	Die oberflächliche Körpertemperatur von <i>Hairless</i> -Mäusen und rasierten behaarten Wurfgeschwister zeigt keinen signifikanten Unterschied.....	50
3.1.4	Die Epidermis von <i>Hairless</i> -Mäusen ist signifikant dicker als die von behaarten Wurfgeschwistern.....	52
3.1.5	Die Länge des gewebegebundenen Autoantikörpers ist in <i>Hairless</i> -Mäusen signifikant erhöht.....	53
3.1.6	Die Anzahl an Endothelzellen ist in den <i>Hairless</i> -Mäusen signifikant geringer...	56
3.2	B6.C _G -Foxn1 ^{nu} /J – <i>Nude</i> -Mäuse	59
3.2.1	<i>Nude</i> -Mäuse zeigen einen signifikant niedrigeren <i>Clinical Score</i> als die behaarten Wurfgeschwister.....	59
3.2.2	Die Oberflächentemperatur von <i>Nude</i> -Mäusen in Narkose ist signifikant höher als die von behaarten Wurfgeschwistern	66
3.2.3	Die oberflächliche Körpertemperatur der <i>Nude</i> -Mäuse ist im Vergleich zu der behaarter Wurfgeschwister signifikant niedriger	70
3.2.4	Die Epidermis von <i>Nude</i> -Mäusen ist signifikant dicker als die von behaarten Wurfgeschwistern.....	72
3.2.5	In der Rückenhaut von <i>Nude</i> -Mäusen ist die Immunreaktivität und die Länge der an der Basalmembran gebundenen Antikörper tendenziell am höchsten	73
3.2.6	Die Immunreaktivität des endothelialen Gefäßmarkers <i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i> ist in der Rückenhaut der <i>Nude</i> -Mäuse signifikant erhöht	76
4	Diskussion.....	78
4.1	Fazit und Ausblick	98
5	Zusammenfassung	100
	Abbildungsverzeichnis	VI
	Tabellenverzeichnis	VIII
	Literaturverzeichnis	IX
	Anhang.....	XVII
	Danksagung.....	XXXII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest.	Destilliertes Wasser
(pathogenes) anti-mCol7c-IgG	Spezifisch gegen murines Kollagen Typ VII gerichtete Immunglobuline der Klasse G
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
B6-Maus/-Mäuse	C57BL/6J Maus/Mäuse
Behaarte WG	Behaarte Wurfgeschwister
BP	Bullöses-Pemphigoid-Antigen
bzw.	Beziehungsweise
C3	Komplementfaktor 3
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i> (auch PECAM-1)
Col7	Kollagen Typ VII
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Deutschland
DEJ	Dermo-epidermale Junktionszone, Verbindung der Basalzellen zur darunter gelegenen Dermis
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ET	<i>Exposure Time</i> ; Belichtungszeit am Fluoreszenzmikroskop
et al.	Und weitere
EtOH	Ethanol, vergällt
FITC	Fluorescein Isothiocyanat; grün fluoreszierendes Protein
Foxn1	Forkhead box N1; Genbezeichnung
Foxn1 ^{nu/nu}	Homozygot depletiert für das Foxn1-Gen

g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft
<i>Hairless</i> -Maus/-Mäuse	B6.Cg-Tyr ^{c-2J} Hr ^{Hr} / J-Maus/-Mäuse
Hr ^{Hr}	<i>Hairless</i> -Allel
Hr ^{d/d}	Homozygot depletiert für das <i>Hairless</i> -Allel
Hr ^{d/+}	Heterozygot depletiert für das <i>Hairless</i> -Allel
Hr ^{+/+}	Homozygot nicht depletiert für das <i>Hairless</i> -Allel
Tyr ^{c-2J}	Albino-Allel
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF	Haarfollikel
IgG	Immunglobulin G
JPN	Japan
LIED	Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
mCOL7c	NC1-Fragment C des murinen Kollagen Typ VII, Zielantigen des pathogenen IgG
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter
NC-Domäne	<i>Non-collagenous</i> domain
NC16A	<i>Non-collagenous</i> Domäne 16 A, Bestandteil der DEJ
NE	Niederlande
Neutrophile	Neutrophile Granulozyten

Nude-Maus/-Mäuse	B6.Cg-Foxn1 ^{nu} /J-Maus/-Mäuse
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered saline, wenn nicht anders angegeben in 1-facher Konzentration (PBS 1x)
PECAM-1	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i> (auch CD31)
pH	<i>Pondus hydrogenii</i> (Gewicht des Wasserstoffs)
p-Wert	Signifikanzwert
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
TBS	Tris buffered saline
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TSchG	Tierschutzgesetz
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
USA	United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika
VF	<i>Visual field</i> ; nicht überlappender Bildausschnitt
ZNS	Ziegennormalserum

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1 Aufbau und Funktionen der Haut

Die Haut ist das größte (Sinnes-)Organ des menschlichen Körpers. Neben der Wahrnehmung von Temperatur, Druck und Berührung erfüllt sie eine wichtige Funktion als Schutzbarriere gegen das Eindringen von Pathogenen (beispielsweise Chemikalien oder Bakterien) in den Körper, gegen den Verlust von Wärme und gegen einen unkontrollierten Verlust von Flüssigkeit aus dem Körper [1, 2, 3, 4, 5].

Anatomisch unterscheidet man bei Menschen generell die Felder- von der Leistenhaut. Die Felderhaut nimmt dabei den größten Anteil der Haut ein und ist durch das Vorkommen von Drüsen und Haaren gekennzeichnet. Die Haut ist grundsätzlich in Schichten aufgebaut. Man unterscheidet die Oberhaut (*Epidermis*) von der Lederhaut (*Dermis*) und der in der Tiefe liegenden Unterhaut (*Subkutis*) [5].

Histologisch handelt es sich bei der *Epidermis* um mehrschichtig verhornendes Plattenepithel. Unmittelbar auf der *Dermis* befinden sich die epidermalen Stammzellen (sogenannte Basalzellen) im gleichnamigen *Stratum basale*. Diese Stammzellen sorgen für die lebenslange Erneuerung der darüber liegenden Epidermisschichten. Auf dem *Stratum basale* befindet sich das *Stratum spinosum* – mehrere Schichten junger Keratinozyten (Hornzellen), die mit fortschreitender Differenzierung durch Degradierung des Zellkerns, Verlust von Wasser und Ablagerung von Keratohyalin, nach außen hin abflachen. Oberhalb des *Stratum spinosum* befindet sich das mehrschichtige *Stratum granulosum*. Aufgrund der zunehmenden Einlagerung von Keratohyalin in den Zellen erscheinen sie granuliert, was namensgebend für diese Zellschicht ist. Die äußerste Schicht der *Epidermis* (*Stratum corneum*) besteht aus ausdifferenzierten, abgestorbenen Hornzellen (*Keratinozyten*) und erfüllt eine wichtige Barrierefunktion. Die lammellenartige Hornschicht wird fortwährend nach außen abgeschilfert und durch die tiefer gelegenen Zellschichten der Epidermis erneuert [3, 6, 4, 5] (siehe **Abbildung 1.1**).

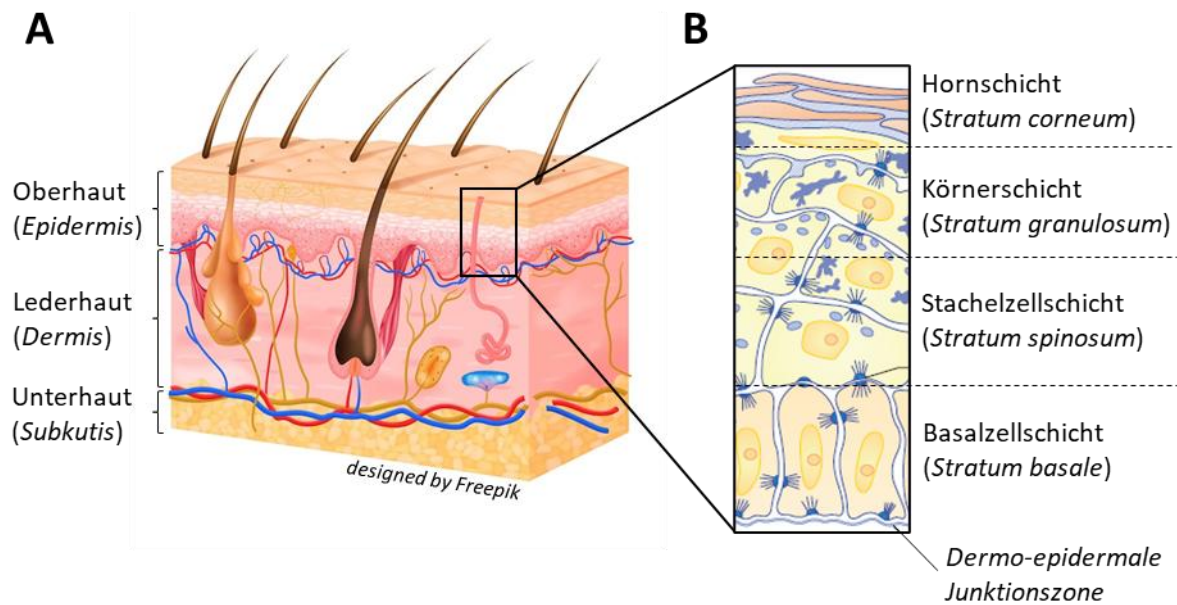


Abbildung 1.1: Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut ist in Schichten aufgebaut (**A**). Man unterscheidet von außen nach innen die Oberhaut (*Epidermis*) von der Lederhaut (*Dermis*) und der Unterhaut (*Subkutis*). Die Hautanhangsgebilde (Talgdrüsen, Haarfollikel) sind überwiegend in der *Dermis* lokalisiert. Abbildung aus [7] (*designed by Freepik*). Abbildung aus [5]. Die *Epidermis* besteht ihrerseits aus mehreren Zellschichten, die lebenslang durch die Basalzellschicht (*Stratum basale*) erneuert werden. Über die dermo-epidermale Junktionszone ist die *Epidermis* mit der darunter gelegenen *Dermis* verbunden (**B**). Abbildung modifiziert nach [1]. Die *Epidermis* ist ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel. Unmittelbar an die *Dermis* angrenzend, befinden sich die epidermalen Stammzellen (sogenannte Basalzellen) im gleichnamigen *Stratum basale*. Auf dem *Stratum basale* befindet sich das *Stratum spinosum* – mehrere Schichten junger Keratinozyten (Hornzellen), die mit fortschreitender Differenzierung nach außen hin abflachen. Oberhalb des *Stratum spinosum* befindet sich das mehrschichtige *Stratum granulosum*. Die äußerste Schicht der *Epidermis* (*Stratum corneum*) besteht aus ausdifferenzierten, abgestorbenen Hornzellen (*Keratinozyten*) und erfüllt eine wichtige Barrierefunktion. Die lammellenartige Hornschicht wird fortwährend nach außen abgeschilfert.

Die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) stellt die Verbindung der Basalzellen durch die Basallamina mit der darunterliegenden Dermis dar. Die DEJ besteht aus unterschiedlichen, eng vernetzten Faserproteinen, die über Hemidesmosomen mit den Basalzellen verbunden sind [8]. Innerhalb der DEJ unterscheidet man die *Lamina lucida*, die *Lamina densa* und die *Sublamina densa*. *Lamina lucida* und *Lamina densa* bilden die Basallamina. Über die Integrine $\alpha 6$ und $\beta 4$ sind die

Hemidesmosomen mit Laminin 332 verbunden. Laminin 332 ist Bestandteil der *Lamina lucida* und interagiert über Kollagen Typ VII (Col7) mit der (*Sub*-)*Lamina densa*. Über das Kollagen Typ XVII (BP180 = *Bullöses-Pemphigoid-Antigen 180*) sind die Hemidesmosomen direkt mit der *Lamina densa* verbunden [8, 9] (siehe **Abbildung 1.2**).

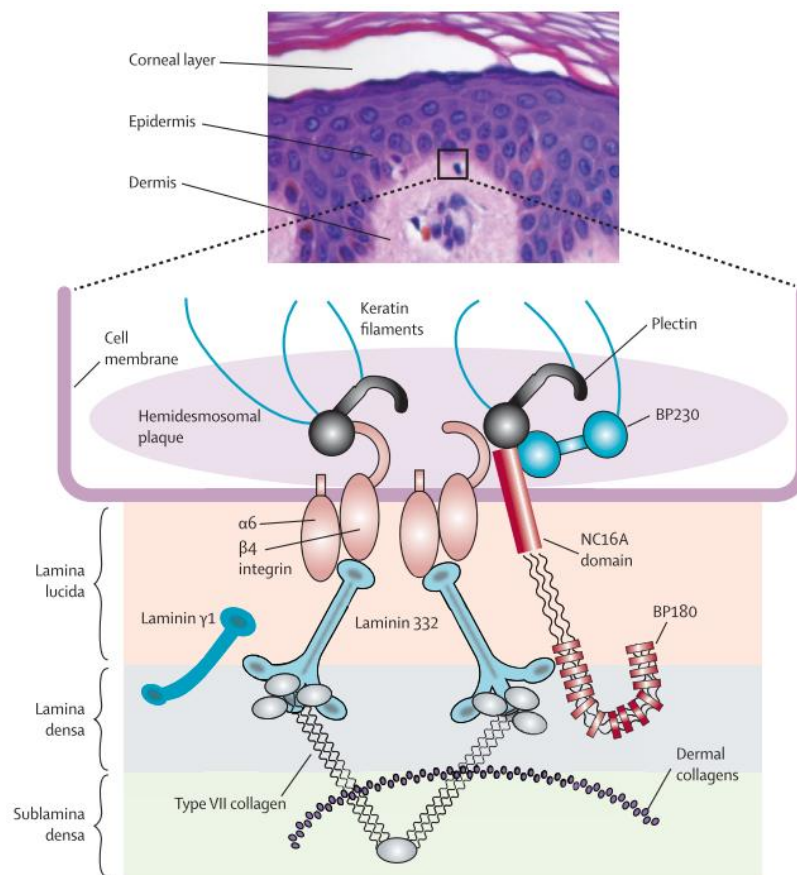


Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau der dermo-epidermalen Junctionszone

BP: Bullöses-Pemphigoid-Antigen, NC16A: *non-collagenous* Domäne 16A (aus Schmidt, Zillikens 2013) [9]. Die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ) stellt die Verbindung der Basalzellen der Oberhaut (*Epidermis*) durch die Basallamina mit der darunterliegenden Lederhaut (*Dermis*) dar. Die DEJ besteht aus unterschiedlichen, eng vernetzten Faserproteinen, die über Hemidesmosomen mit den Basalzellen verbunden sind [8]. Innerhalb der DEJ unterscheidet man die *Lamina lucida*, die *Lamina densa* und die *Sublamina densa*. *Lamina lucida* und *Lamina densa* bilden die Basallamina. Über die Integrine $\alpha 6$ und $\beta 4$ sind die Hemidesmosomen mit Laminin 332 verbunden. Laminin 332 ist Bestandteil der *Lamina lucida* und interagiert über Kollagen Typ VII mit der (*Sub*-)*Lamina densa*.

Die Lederhaut (*Dermis*) besteht hauptsächlich aus Bindegewebsfasern wie Kollagenen und Elastin und Molekülen der extrazellulären Matrix, die in einer Art Netzwerk aufgebaut sind. Fibroblasten, Adipozyten und Makrophagen sind ebenfalls Bestandteil der *Dermis*. Der Hauptteil der Bindegewebsfasern besteht aus den Kollagenen Typ I und III und wird von den Fibroblasten (Stammzellen des Bindegewebes) produziert. In der *Dermis* finden sich mehrere Sinnesrezeptoren der Haut, unter anderem Meissner-Tastkörperchen (für die Wahrnehmung von Berührung), freie Nervenendigungen zur Wahrnehmung von Temperatur und mechanischen Reizen sowie Schweiß- und Talgdrüsen, Blutgefäße und Haarfollikel (HF) [10, 11, 4]. Die *Dermis* ist mechanisch recht beansprucht und wird durch arterielle, venöse und lymphatische Gefäße versorgt, die dem Austausch von Botenstoffen, Stoffwechselprodukten und der Abwehr von Fremdorganismen und Antigenen dienen [5].

Lockerer Bindegewebe und Fettzellen sind Hauptbestandteil der Unterhaut (*Subkutis*). Das Unterhautfettgewebe fungiert als Wärme- und Energiespeicher und dient der Verschieblichkeit der Haut gegenüber der tiefer gelegenen Körperfazie. Die Ausprägung der Fettgewebsschicht variiert je nach Körperregion. In der *Subkutis* verlaufen darüber hinaus die die Haut versorgenden Blutgefäße und Nervenenden [4, 12].

1.2 Aufbau und Funktionen des Haarfollikels

HF gehören neben Schweißdrüsen und Talgdrüsen zu den sogenannten Hautanhangsgebilden. Haare kommen, abgesehen von der Leistenhaut, am gesamten Körper in unterschiedlicher Dichte vor. HF und die durch sie gebildeten Haarschäfte (ausdifferenzierte Keratinozyten) erfüllen, insbesondere bei Säugetieren als Fell, eine wichtige Rolle bei der Thermoregulation, als Schutz und als Sinnesorgan zur Wahrnehmung von Berührung. Strukturell besteht der HF des Menschen aus dem Haarbulbus, der inneren Wurzelscheide, die aus drei verhornenden Schichten Keratin besteht und in Höhe der Einmündung der Talgdrüse endet, und der äußeren Wurzelscheide, die oberhalb der Talgdrüseneinmündung verhornt [12]. Bei Menschen nehmen Haare eine hauptsächlich ästhetische Funktion ein, wohingegen die Haare in Mäusen das Fell,

eine wichtige Isolationsschicht, bilden. Der Haarbulbus (Haarzwiebel) ist in der Dermis oder der Subkutis lokalisiert und wird von unten durch die dermale Papille mit Blut versorgt. Durch die basalen Epithelzellen des Bulbus wird der Haarschaft gebildet [12].

1.2.1 Haarfollikelzyklus

Der gesunde HF unterliegt sowohl im Menschen als auch in Mäusen einem stetigen dreiphasigen Zyklus. Die zeitlich längste Phase ist das Anagen (Wachstumsphase). In dieser Phase sind die HF tief in der *Subkutis* verankert. Der Haarschaft nimmt kontinuierlich an Länge zu. Nach dem Anagen folgt das Katagen (Abbauphase). Der HF bildet sich zurück und ist zunehmend in der Lederhaut lokalisiert. Der Haarschaft verbleibt im Haarkanal. Auf das Katagen folgt das Telogen (Ruhephase). Im Verlauf des Haarfollikelzyklus verbleibt der obere Anteil (distaler Teil) des HF stets erhalten, wohingegen der proximale (untere) Anteil einem stetigen Auf- und Abbauprozess unterliegt [13–15, 16] (siehe **Abbildung 1.3**).

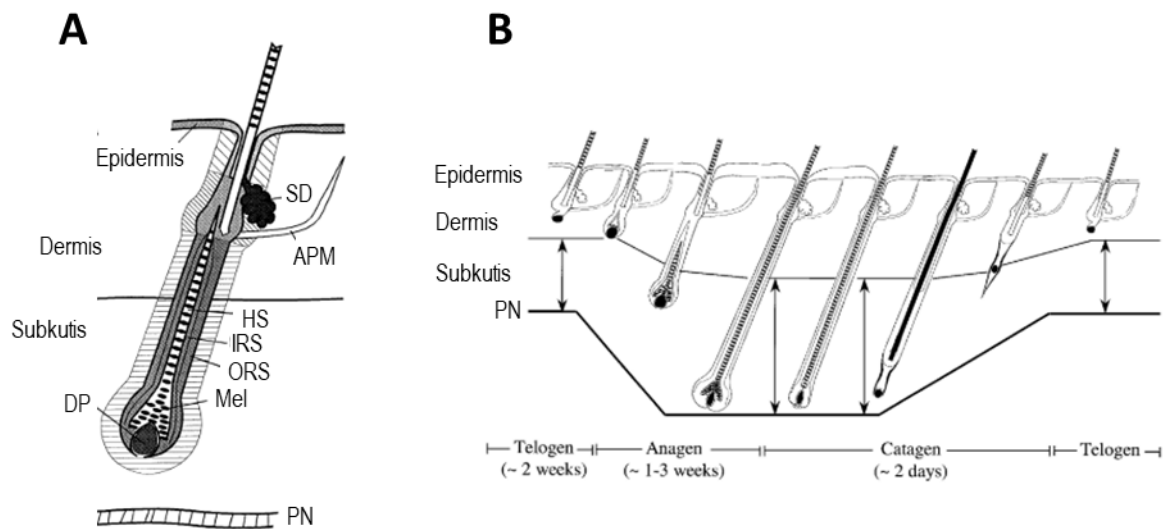


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau des Haarfollikels und Darstellung des Haarfollikelzyklus in Mäusen

Schematischer Aufbau eines Haarfollikels (HF) (**A**) in der anagenen Phase des Haarfollikelzyklus (aus Paus et al., 1999 ([13])). SD = Schweißdrüse, APM = Musculus arector pilii, HS = Haarschaft, IRS = *inner root sheath* (Innere Wurzelscheide); ORS = *outer root sheath*

(Äußere Wurzelscheide); Mel = Melatonin; DP = dermale Papille; PN = *Panniculus carnosus* (Hautmuskelscheide)

Der phasenhafte Verlauf des Haarfollikelzyklus in Mäusen mit Angabe der Dauer der einzelnen Phasen ist in **(B)** dargestellt (aus Müller-Röver *et al.*, 2001 [15]). Die zeitlich längste Phase ist das Anagen (Wachstumsphase). In dieser Phase sind die HF tief in der *Subkutis* verankert. Der Haarschaft nimmt kontinuierlich an Länge zu. Nach dem Anagen folgt das Katagen (Abbauphase). Der HF bildet sich zurück und ist zunehmend in der Lederhaut lokalisiert. Der Haarschaft verbleibt im Haarkanal. Auf das Katagen folgt das Telogen (Ruhephase). Im Verlauf des Haarfollikelzyklus verbleibt der obere Anteil (distaler Teil) des HF stets erhalten, wohingegen der untere Anteil einem stetigen Auf- und Abbauprozess unterliegt [13–15, 16].

1.2.2 Immunprivileg

Der stetige Auf- und Abbau des HF erfordert, unter anderem, die ungehinderte Migration von Pigment und Zellen. Das Immunsystem der Haut in Mäusen und in Menschen unterscheidet sich von dem des HF, wobei die Bulbusregion des anagenen HF ein relatives Immunprivileg darstellt [17, 18]. Andere immunprivilegierte Bereiche des Körpers sind beispielsweise das Gehirn und das Auge [19].

Verschiedene immunologische Mechanismen wie die Herunterregulierung des MHC-Klasse-I-Komplexes (*major histocompatibility complex I*) sichern den Schutz des proximalen Anteils des HF vor autoaggressiven Immunreaktionen [20, 21], die normalerweise als Reaktion auf ortsfremde Zellen oder Pigment eingeleitet werden würden [17, 22]. Störungen des Immunsystems des HF sind Ausgangspunkt entzündlich bedingter Erkrankungen wie *Alopecia areata*, entzündlich bedingter Haarausfall [23].

1.3 Epidermolysis bullosa acquisita

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) gehört, wie beispielsweise auch Pemphigus vulgaris und Bullöses Pemphigoid, zu den autoimmunen blasenbildenden Hauterkrankungen (bullöse Dermatosen) [24]. (Blasenbildende) Hauterkrankungen gehen in der Regel für die Betroffenen mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität einher und stellen eine Belastung für die betroffenen Patienten dar [5]. Charakteristisch für die EBA ist die subepidermale Blasenbildung, die durch gegen Col7 gerichtete Autoantikörper verursacht wird. Col7 ist Bestandteil der Ankerfibrillen der DEJ [25, 26, 27]. In der Regel sind die Autoantikörper bei der EBA gegen die NC1-Domäne des Kollagens gerichtet [28, 29, 30, 31].

Durch die Bindung der Autoantikörper kommt es zu einer durch das Komplementsystem vermittelten Immunreaktion an der Basalmembran, in deren Folge Entzündungszellen, vor allem neutrophile Granulozyten zur DEJ migrieren und ihrerseits die lokale Entzündung weiter fördern [28, 32]. Bedingt durch die Entzündung kommt es zu einer Zerstörung der Kollagenverbindung der Basallamina an der Dermis und in der Folge zur Spaltbildung und subepidermalen Blasenbildung [33].

Mit einer jährlichen Inzidenz zwischen 0,5-1 Neuerkrankung pro 1 Million Einwohner und Jahr [24] gehört die EBA zu den sehr seltenen Erkrankungen. Anhand der klinischen Manifestation und der autoantigenen Epitope wird klinisch zwischen der mechano-bullösen (nicht inflammatorischen) Form und der inflammatorischen Form der EBA unterschieden [27].

Die mechano-bullöse Form tritt vorwiegend an mechanisch beanspruchten Hautstellen, an Nägeln und beispielsweise an der Speiseröhre auf und ist primär durch Blasenbildung, Neigung zu Rissen in der Haut, unregelmäßiger Narbenbildung und Pigmentstörungen gekennzeichnet [27, 29].

Die klinischen Symptome der inflammatorischen EBA ähneln denen des Bullösen Pemphigoids und sind nicht vornehmlich an mechanisch belasteten Körperstellen zu finden [34, 35].

Die Ursache von autoimmun bedingten Erkrankungen ist bisher nicht hinreichend geklärt. Die Autoantikörper sind in der Regel vom Typ Immunglobulin G (IgG), wobei auch Immunglobulin Typ A beschrieben wurde [36].

Das alleinige Vorkommen der Autoantikörper gegen Col7 führt bei der EBA noch nicht zur Ausbildung klinischer Symptome. Durch Studien konnte gezeigt werden, dass zugleich eine über die Aktivierung des Komplementsystems und Leukozyten vermittelte Entzündungsreaktion ausgelöst werden muss. Erst dann kommt es, wie oben beschrieben, zur Ausbildung von Läsionen in Form von Spaltbildungen und Blasen [28, 37, 38] (siehe **Abbildung 1.4**). Vermittelt durch die Komplementfaktoren 3 und 5a wird ein inflammatorisches Milieu an der DEJ gebildet. Vermittelt durch Zytokine kommt es zur Invasion neutrophiler Granulozyten. Diese verstärken durch proinflammatorische Zytokine die lokale Entzündungsreaktion und die damit einhergehende Gewebeschädigung. Über Freisetzung von Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies können Neutrophile auch direkte Gewebeschäden verursachen [39, 40, 34].

Die Behandlung der EBA erfolgte vor der Verfügbarkeit gerichteter Immuntherapien zumeist durch den Einsatz genereller Hemmung des Immunsystems. Diese Therapie ist für die betroffenen Patient*innen nebenwirkungsreich und schlecht verträglich [25–27, 42].

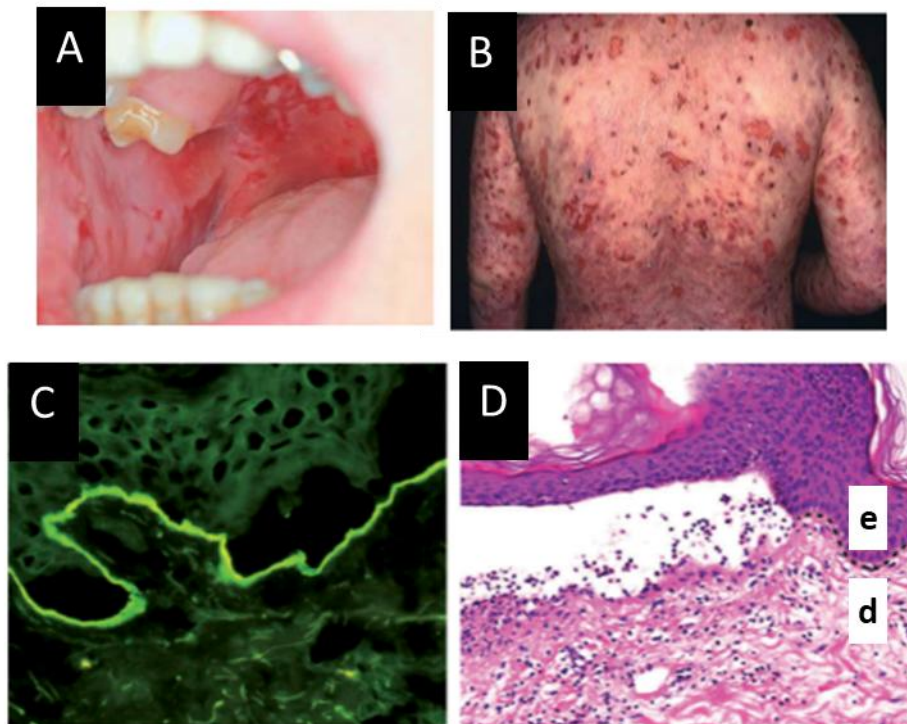


Abbildung 1.4: Klinische Manifestation der Epidermolysis bullosa acquisita

Es werden eine nicht-inflammatorische, mechano-bullöse und eine inflammatorische Form der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) unterschieden. Bei der inflammatorischen Form kommt es klinisch zu Blasenbildung in den Schleimhäuten **(A)** und gespannten Blasen mit Erythem **(B)**. Die Diagnose der EBA wird über den Nachweis der linearen Bindung der Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII an der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ) der Betroffenen bestätigt **(C)**. In **(D)** ist die Spaltbildung zwischen Epidermis (e) und Dermis (d) und eingewanderte Entzündungszellen in der Dermis und angrenzend an der Läsion zu erkennen. Modifiziert aus *Witte et al. 2016, Kim & Kim 2013 und Schmidt & Zillikens 2011 [26, 34, 41]*.

Mit dem Ziel der verbesserten Therapiemöglichkeiten wurde in der Vergangenheit intensiv an der EBA geforscht. Es existieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Modelle [43–45]. *In vitro* werden Hautkulturen oder Gefrierschnitte erforscht [46]. Nachteilig bei *in vitro* Modellen im Allgemeinen ist, dass sie außerhalb des Körpers und somit fern von realistischen immunologischen Bedingungen ablaufen.

In vivo existieren unterschiedliche Mausmodelle der EBA [43]. In dieser Studie wird das von Sitaru *et al.* und Woodley *et al.* 2005 etablierte und weit verbreitete Antikörpertransfer induzierte Modell verwendet (sogenanntes passives EBA-

Mausmodell) [44, 45]. Den Mäusen werden hierbei wiederholt Antikörper gegen murines Kollagen Typ VII (mCol7c) injiziert, die aus Serum von immunisierten Kaninchen aufgereinigt wurden.

1.4 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

In Mäusen des Mausstammes B6.Cg-FoxN1^{nu/nu} (*Nude*-Mäuse) fiel in einer vorausgehenden, bisher unveröffentlichten, Untersuchung auf, dass Läsionen im Antikörpertransfer induzierten Mausmodell der EBA bevorzugt an Bereichen der Haut auftraten, an denen HF in unterschiedlichen Phasen des Haarfollikelzyklus aneinandergrenzten. Ziel dieser experimentellen Studie ist die Charakterisierung der Rolle des HF in experimenteller EBA: Diesbezüglich sind bisher keine anderweitigen Studien vorhanden.

Dafür sollen zum einen die bereits erwähnten *Nude*-Mäuse einbezogen werden. Bei ihnen ist die Morphogenese der HF normal. Die HF unterliegen dem Haarfollikelzyklus. Auffällig ist der abnorm gestaltete Haarschaft, der aufgrund eines Keratinisierungsdefektes nur gering aus der Epidermis auswächst, was den nackten Phänotyp begründet [47, 48]. Zum anderen sollen zur Charakterisierung der Rolle des HF Mäuse des Stamms B6.Cg-Tyr^{c-2J}Hr^{Hr}/J (*Hairless*-Mäuse) verwendet werden. Bei diesem Mausstamm unterliegen die HF zunächst einer regelrechten Morphogenese, treten dann jedoch nicht in den Haarfollikelzyklus ein, sondern bilden sich zu Zysten und Utriculi um [49, 50, 51].

Der Vergleich der Mausstämme ermöglicht also eine Beurteilung hinsichtlich der Rolle des HF in experimenteller EBA. Darüber hinaus ist die EBA in diesen *Hairless*-Mäusen nach Studienlage bisher gering bis gar nicht erforscht.

Die erfolgreiche Induktion der EBA durch Antikörpertransfer soll durch Erfassung der von Läsionen betroffenen Körperoberfläche in Prozent klinisch und durch den Nachweis der Bindung des injizierten pathogenen, spezifisch gegen mCol7c gerichtete Immunglobuline der Klasse G [(pathogenes) anti-mCol7c-IgG] und Komplementfaktor 3 (C3) in den EBA-Gruppen durch Immunfluoreszenzfärbung belegt werden.

Zur weiteren Charakterisierung der Einflussfaktoren auf die Entwicklung und den Verlauf der Entzündung in der Haut soll die Expression von *platelet endothelial adhesion molecule 1* (PECAM-1) mittels Immunfluoreszenz untersucht werden.

Um einen Einfluss der mit dem Phänomen „Nacktheit“ in der Maus einhergehenden Unterschiede in der Thermoregulation zu beurteilen, sollen thermografische Untersuchungen der Temperatur an der Körperoberfläche mittels Infrarotthermografie erfolgen.

Nicht zuletzt, soll für weiterführende Untersuchungen im Versuchsverlauf zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine umfassende Probensammlung erfolgen, um die Rolle des HF in experimenteller EBA möglichst genau charakterisieren zu können.

Die vorliegende Studie soll die folgenden Kernfragen beantworten:

1. Ist experimentelle EBA durch passiven Antikörpertransfer in *Hairless*-Mäusen induzierbar?
2. Ergeben sich Unterschiede hinsichtlich der Krankheitsausprägung (*Clinical Score*) zwischen *Hairless*-Mäusen und behaarten Wurfgeschwistern (behaarte WG) und zwischen *Nude*-Mäusen und behaarten WG?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Materialauflistung – Geräte

DE = Deutschland; GmbH = Gesellschaft mit beschränkter Haftung; GmbH & Co. KG = Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft; Inc./INC. = Incorporated; JPN = Japan; NE = Niederlande; UG & Co. KG =Unternehmergesellschaft und Compagnie Kommanditgesellschaft; UK = United Kingdom; Vereinigtes Königreich; USA = United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika.

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Cryostat	Leica CM-3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE
Eindeckautomat	Leica CV 5030	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE
Färbekammer	Lichtundurchlässige Feuchtkammer für 30 Objektträger (OT)	LabArt UG & Co.KG; Waldbüttelbrunn, DE
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000 BIOREVO	Keyence; Osaka, JPN
Gefrierschrank -20°C		Liebherr-International Deutschland; Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -80°C	TSX400V	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank +4°C	KS95	Liebherr-International Deutschland; Biberach an der Riß, DE
Magnetrührer	RSM-04H	Phoenix Instrument GmbH; Garbsen, DE
Mikrotom	Leica RM2125 RTS	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, DE
Paraffin-Ausgieß-Konsole	Tissue-Tek®TEC™5	Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, NE
Paraffin-Streckbad	MEDAX WB24	MEDAX GmbH & Co.KG
pH-Meter	Labor pH-Meter inoLab® pH 7110	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & CO. KG.; Weilheim, DE

pH-Meter	Hanna HI 208	Hanna Instruments; Woonsocket, Rhode Island, USA
Photometer	BioPhotometer plus mit Drucker	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Photometer	NanoPhotometer NP80	Implen GmbH; München, DE
Pipette	Research plus 0,5-10 µL	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Pipette	Research plus 2-20 µL	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Pipette	Research plus 20-200 µL;	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Pipette	Research plus 100-1000 µL	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Schüttler	Schüttler Hecht Assistant	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Röhn
Sterile Werkbank	NUAIRE NU-425- 600E A/B3 Klasse II	NUAIRE; Plymouth, USA
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, INC.; Bohemia, New York, USA
Waage	Highland HCB3001	Adam Equipment Ltd.; Milton Keynes, UK
Wärmebildkamera	FLIR ThermoCam™ B 360	FLIR Systems Inc., Wilsonville, Oregon, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge	Centrifuge 5427 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE

2.1.2 Reagenzien und Kits

Tabelle 2: Reagenzien und Kits

DE = Deutschland; GmbH = Gesellschaft mit beschränkter Haftung; GmbH & Co. KG = Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft; USA = United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika.

Material	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluormount-G®	Southern Biotech; Birmingham, USA
Destilliertes Wasser	Klinisch Experimentelle Forschungseinrichtung; Universität zu Lübeck
Dinatriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Eosin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, DE
Ethanol vergällt (70%; 96%; 100%)	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Eukitt®-Eindeckmedium	ORSAtec GmbH, Bobingen, DE
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide, Düsseldorf, DE
Glycin-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin	Merck; Darmstadt, DE
Immersionsöl	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Ketamin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck; Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Polyethylenglykol (PEG 20.000)	Serva Serving scientists, Heidelberg, DE
Protein G Resin	GenScript Biotech; Piscataway Township, New Jersey, USA
RNAlater™ Stabilization Solution	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, DE
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	SERVA serving scientists, Heidelberg, DE
TRIS Hydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ * HCl)	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, DE
Xylazin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, DE
Xylol	Merck, Darmstadt, DE
Ziegennormalserum	Agilent; Santa Clara, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

AG & Co. = Aktiengesellschaft und Compagnie Kommanditgesellschaft; DE = Deutschland; GmbH & Co. KG = Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft; NE = Niederlande; UK = United Kingdom; Vereinigtes Königreich; USA = United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika.

Material	Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie		Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Aufreinigungssäule	Crystal Cruz® Chromatography Column, 2,5 cm x 20 cm	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Texas, USA
Cryomolds	4566 Intermediate (18 x 18 mm)	Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, NE
Deckgläschen	LH25.1	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Dialysierschlauch	Membra Cell™ Flat width 44 mm	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, DE
Einbettkassetten	Tissue-Tek® Uni- Cassette ®	Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, NE
Einfriermedium	TissueTek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V.; Alphen aan den Rijn, NE
Einmalspritzen	Discarit ® (5 mL, 20 mL)	Becton Dickonson GmbH, Heidelberg, DE
Einmalspritzen	U-100 Insulin 1 mL	BD Biosciences, San Jose, USA

Faltenfilter	Whatman® Folded Filters (270 mm)	GE Health Care Life Sciences; Buckinghamshire, UK
Fettstift	DAKO Pen S2002	Agilent, Santa Clara, USA
Filterpapier	Filterpapier für Einbettkassetten	Medite GmbH; Burgdorf, DE
Küvetten	UV-Küvette mikro (8,5 mm; 15 mm)	Brand GmbH & Co.KG; Wertheim, DE
Objektträger	SuperFrost® Plus	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Paraffin	Paraplast Plus Paraffin	Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch, DE
Pipettenspitzen	10 µL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen	200 µL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen	1000 µL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße	Biosphere® Safe Seal 0,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße	Biosphere® Safe Seal 1,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße	Biosphere® Safe Seal 2 mL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße	Schraubröhre 15 mL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße	Schraubröhre 50 mL	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S 0,2	Sarstedt AG & Co. KG; Nümbrecht, DE
Zentrifugationsfilter	Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (30K)	Merck Milipore, Burlington, USA

2.1.4 Antikörper und Seren

Tabelle 4: Antikörper und Seren

Anti-mCol7c-IgG = Spezifisch gegen murines Kollagen Typ VII gerichtete Immunglobuline der Klasse G; BE = Belgien; CAN = Kanada; FITC = Fluorescein Isothiocyanat; IgG = Immunglobulin der Klasse G; PECAM-1 = *Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1* (auch CD31); UK = United Kingdom; Vereinigtes Königreich.

Antikörper	Hersteller
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson Immuno Research; Cambridgeshire, UK
Kaninchen anti-mCOL7c-IgG (auch: spezifisches IgG, pathogenes IgG)	Eigene Herstellung
Ratte anti-Maus Komplement 3 IgG	Cedarlane; Burlington, CAN
Ratte anti-Maus-PECAM-1 IgG, aufgereinigt, Klon MEC 13.3	BD Biosciences; San Jose, USA
Rhodamin-konjugiertes Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	Jackson Immuno Research; Cambridgeshire, UK
Seren gegen mCOL7c immunisierter Kaninchen	Eurogentec, Lüttich, BE
Seren nicht immunisierter Kaninchen	Eurogentec, Lüttich, BE

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Aufreinigung von spezifischen Antikörpern gegen murines Kollagen Typ VIIc aus Kaninchenserum

A. dest. = Destilliertes Wasser; g = Gramm; HCl = Salzsäure; L = Liter; mL = Milliliter; Na₂HPO₄ * 2H₂O = Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat; NaCl = Natriumchlorid; PBS = Phosphate buffered saline; pH = *Pondus hydrogenii* (Gewicht des Wasserstoffs); TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ethanol 20%	285,7 mL Ethanol 70%, mit A. dest. auf 1 L auffüllen.
NaCl 1 M	58,44 g NaCl gelöst in 1 L A. dest.

Glycinpuffer 0,1 M	7,52 g Glycin-HCl gelöst in 1 L A. dest., pH mit HCl auf 2,8 einstellen.
PBS 10x	450 g NaCl + 87 g Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O + 10,17 g NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O in zu 4,8 L A. dest. geben, vermischen und mit A. dest. auf 5 L auffüllen.
PBS 1x	500 mL PBS 10x in 5 L A. dest. lösen, pH mit HCl auf 7,2 einstellen.
TrisBase 1M	60,55 g TRIS Base gelöst in 500 mL A. dest., pH mit HCl auf 9,0 einstellen.
Tris Puffer 20 mM	3,15 g Glycin-HCl gelöst in 1 L A. dest., pH mit HCl auf 7,2 einstellen.
Tris Puffer 20 mM + NaCl 0,5 M	3,15 g Glycin-HCl und 29,22 g NaCl gelöst in 1 L A. dest., pH mit HCl auf 7,2 einstellen.
850 mM NaCl + 0,1% Triton™ in PBS	24,85 g NaCl und 0,5 mL Triton™-X lösen in 500 mL PBS 1x.

Tabelle 6: Puffer für Immunfluoreszenzfärbungen

A. dest. = Destilliertes Wasser; g = Gramm; HCl = Salzsäure; L = Liter; mL = Milliliter; Na₂HPO₄ * 2H₂O = Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat; NaCl = Natriumchlorid; PBS = Phosphate buffered saline; pH = *Pondus hydrogenii* (Gewicht des Wasserstoffs); TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS 10x	450 g NaCl + 87 g Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O + 10,17 g NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O in zu 4,8 L A. dest. geben, vermischen und mit A. dest. auf 5 L auffüllen.
PBS 1x	500 mL PBS 10x in 5 L A. dest. lösen, pH mit HCl auf 7,2 einstellen.
TBS 10x	61 g Tris Base und 88 g NaCl in 1 L A. dest. lösen.
TBS 1x	6,1 g Tris Base und 8,8 g NaCl in ~990 mL A. dest. lösen, pH mit HCl auf 7,6 einstellen, mit A. dest. auf 1 L auffüllen.

2.1.6 Software

Tabelle 7: Software

JPN = Japan; NE = Niederlande; USA = United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika.

Software	Hersteller
BZII Viewer	Keyence; Osaka, JPN
BZII Analyzer	Keyence; Osaka, JPN
GraphPad Prism Version 7	GraphPad Software; San Diego, USA
ImageJ	Public domain
GIMP	Freie Software
Mendeley	Elsevier B.V., Amsterdam, NE
MS Office	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Genehmigung der Tierversuche

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TSchG) in der Fassung vom 18. Mai 2006, zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014, genehmigt.

Der entsprechende Tierversuchsantrag mit dem Aktenzeichen V 242 – 69981/2015 (93-7/15) wurde vor der Durchführung der Versuche durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (siehe Anhang).

Die Erlangung der entsprechenden Sachkunde nach § 16 der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) zur Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten wurde durch Teilnahme am Tierschutz- und Versuchstierkunde-Kurs der Universität zu Lübeck sichergestellt (siehe Anhang).

2.2.2 Untersuchte Mausstämme

Zur Charakterisierung der Rolle des murinen HF im Antikörpertransfer-induzierten Mausmodell der EBA wurden Mäuse des Stamms B6.Cg-Tyr^{c-2J}Hr^{Hr}/J (*Hairless*-Mäuse) und B6.Cg-Foxn1^{nu}/J (*Nude*-Mäuse) untersucht.

Den Mausstämmen gemein ist der genetische Hintergrund basierend auf C57BL/6J (B6-Maus). B6-Mäuse sind einer der meistverwendeten Inzucht-Mausstämme. Sie sind zuchtfreundlich, langlebig und empfänglich für spontane und transgene Mutationen. Phänotypisch weist die B6-Maus schwarzes Fell auf, was auch zu der Bezeichnung *Black 6* geführt hat [52]. In B6-Mäusen wurde erfolgreich über passiven Antikörpertransfer experimentelle EBA induziert [44], weshalb in dieser Arbeit Mausstämme ausgesucht wurden, die genetisch auf B6-Mäusen basieren.

2.2.2.1 B6.Cg-Tyr^{c-2J}Hr^{Hr}/J (*Hairless*-Maus)

Hairless-Mäuse, auch als *B6 albino* bezeichnet, sind charakterisiert durch zwei natürlich auftretende, spontane Mutationen [49].

Die Mutation des *Hairless*-Allels (Hr^{Hr}) führt bei homozygot depletierten Tieren (Hr^{d/d}) zur Ausprägung des namensgebenden haarlosen Phänotyps. Der HF wird in der embryonalen Phase normal angelegt, tritt allerdings nach Abschluss der Morphogenese nicht in den Haarfollikelzyklus ein. Es kommt zur Ausbildung irreversibler Anomalien im Katagen [53].

Diese Veränderungen imponieren bei adulten Tieren als strukturelle Veränderungen der Haut in Form von dermalen Zysten als Residuen der rückgebildeten HF, wie in **Abbildung 2.1** dargestellt [49][53][51]. *Hairless*-Mäuse weisen im Vergleich zu behaarten Tieren eine dickere Cutis, epidermale Hyperplasie, vergrößerte Talgdrüsen und eine vermehrte Hornschicht (Hyperkeratose) auf [49]. Neben den morphologisch sichtbaren Veränderungen führt die Mutation im *Hairless*-Allel auch zu Veränderungen des Immunsystems. Für *Hairless*-Mäuse sind in diesem Zusammenhang Veränderungen im Thymusepithel beschrieben, die zu einer verminderten T-Zell-Proliferation führen [49]. Eine verminderte Anzahl an T-Zellen kann durch eine veränderte Verfügbarkeit von Zytokinen zu weniger intensiven Immunreaktionen und somit zu verminderten autoantikörperinduzierten Gewebeschäden führen [54].

Phänotypisch behaarte Tiere, also heterozygote (Hr^{d/+}) und homozygot nicht-depletierte Tiere (Hr^{+/+}), haben aufgrund der bei diesem Mausstamm zusätzlich vorhandenen Mutation des Albino-Allels (Tyr^{c-2J}) weißes Fell durch eine fehlende Pigmentierung der Haut und der Haare [49]. Die HF der homozygot nicht-depletierten Tiere unterliegen dem normalen Haarfollikelzyklus.

Als Kontrolltiere wurden in dieser Arbeit für das *Hairless*-Allel homozygot nicht-depletierte Mäuse (behaarte WG) verwendet.

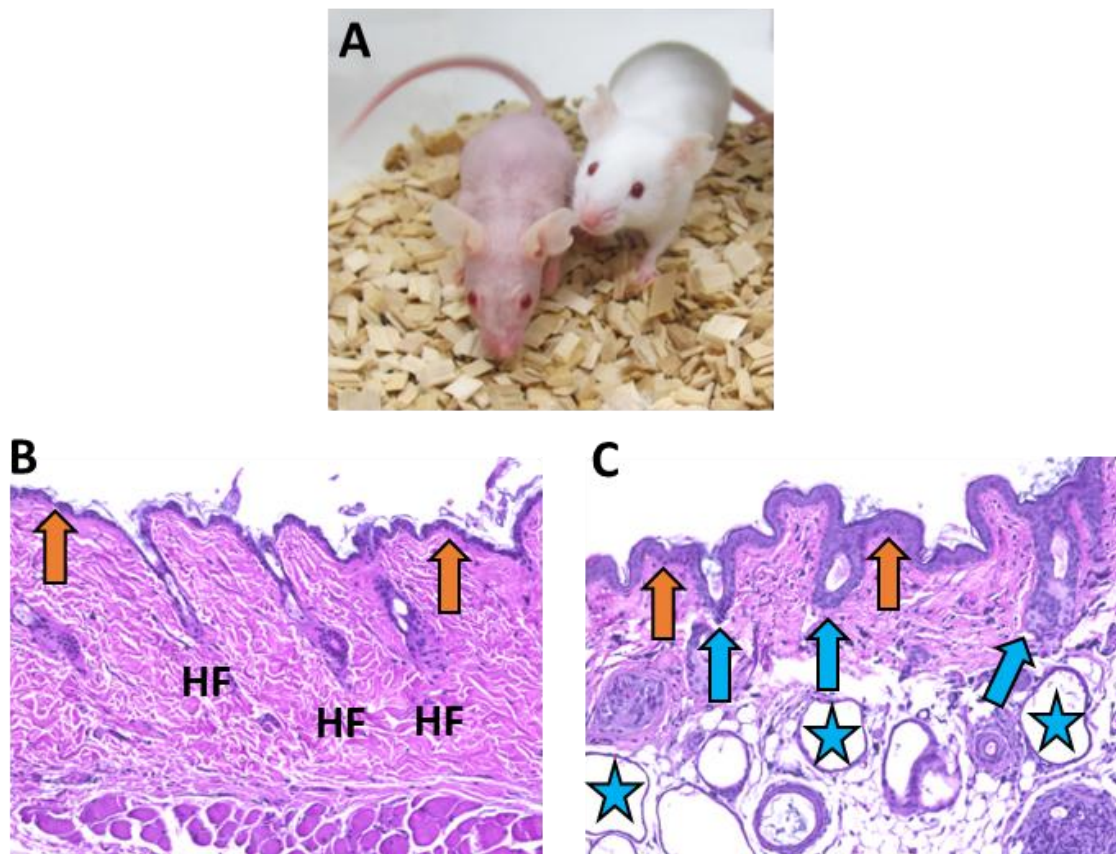


Abbildung 2.1: Makroskopischer und histologischer Phänotyp der *Hairless*-Maus (B6.Cg-Tyr^{c-2J}Hr^{Hr/J})

Makroskopischer Phänotyp einer homozygot depletierten *Hairless*-Maus (links) und eines behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG, rechts) [A]. In der HE-Färbung (200x) der Haut von *Hairless*-Mäusen [C] und behaarten WG [B] sind die strukturellen Unterschiede der Architektur der Haut deutlich erkennbar. *Hairless*-Mäuse weisen im Gegensatz zu den normal angelegten Haarfollikeln (HF) zurückgebildete Residuen (blaue Pfeile) auf. Die dermalen Zysten (exemplarisch mit blauen Sternen markiert), die vergrößerten Talgdrüsen und die im Vergleich zu den behaarten WG dickere Epidermis mit Hyperplasie (orange Pfeile) sind deutlich zu erkennen. Aufnahmen aus eigenen Versuchen.

Die in dieser Dissertation verwendeten *Hairless*-Mäuse und die behaarten WG wurden in der hauseigenen Zucht der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gezüchtet. Zur Zucht wurden hierbei homozygot depletierte (Hr^{d/d}) Männchen mit heterozygoten (Hr^{d/+}) Weibchen verpaart. Vor Einschluss in den Tierversuch wurde durch individuelle Phänotypisierung (Durchführung durch Frau C. Kauderer) sichergestellt, dass nur homozygot depletierte (Hr^{d/d}) oder homozygot nicht-depletierte (Hr^{+/+}) Tiere als behaarte WG eingeschlossen wurden. Dieses

Vorgehen ermöglicht eine selektive Betrachtung des Einflusses der *Hairless*-Mutation und somit der HF auf die Ausprägung der EBA. Die Mäuse waren zu Versuchsbeginn zwischen 7 und 25 Wochen alt.

2.2.2.2 B6.C_g-Foxn1^{nu}/J (*Nude-Maus*)

Bei B6.C_g-Foxn1^{nu}/J (*Nude-Mäuse*) handelt es sich um einen kongenen Mausstamm basierend auf der B6-Maus. Durch die natürlich auftretende, spontane Mutation im Gen Foxn1 (forkhead box N1) kommt es in diesem Mausstamm zur Veränderung der HF und zu einer fehlenden Ausbildung des Thymus. Homozygot depletierte Tiere (Foxn1^{nu/nu}) weisen regelrecht entwickelte HF auf, die dem Haarfollikelzyklus unterliegen. Aufgrund eines Keratinisierungsdefektes kommt es jedoch zur Bildung missgestalteter Haarschäfte. Der Haarschaft von homozygot depletierten Tieren ist im Infundibulum des HF gekräuselt und durchbricht nur selten (im anagenen Stadium) sichtbar die Epidermis [48]. Dadurch erscheinen homozygot depletierte Tiere (Foxn1^{nu/nu}) phänotypisch haarlos.

Durch die genetisch bedingte Thymusaplasie leiden homozygot depletierte Tiere unter einem angeborenem Mangel an T-Zellen und damit einhergehend Einschränkungen der zellulären Immunreaktivität, was sich in einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionserkrankungen äußert [47].

Nude-Mäuse weisen im Gegensatz zu den *Hairless-Mäusen* keine Mutation im Albino-Gen auf, weshalb sie phänotypisch schwarzes Fell aufweisen. Homozygot depletierte Tiere zeigen eine unterschiedliche Färbung der Haut an verschiedenen Körperstellen, abhängig vom Haarfollikelzyklusstadium. Die sichtbare Färbung der Haut hängt hierbei maßgeblich von der Ausbildung des pigmentierten Haarschafts ab. HF, die sich im Ruhestadium (Telogen) befinden, besitzen einen stark zurückgebildeten oder gar keinen Haarschaft, die Haut erscheint hier rosa. An grauen Hautstellen befindet sich der Haarschaft im Abbau (Katagen). Tiefschwarze Hautareale mit kurzen, aus der Haut herausstehenden Haarschäften kennzeichnen das Anagen [55] (siehe **Abbildung 2.2**).

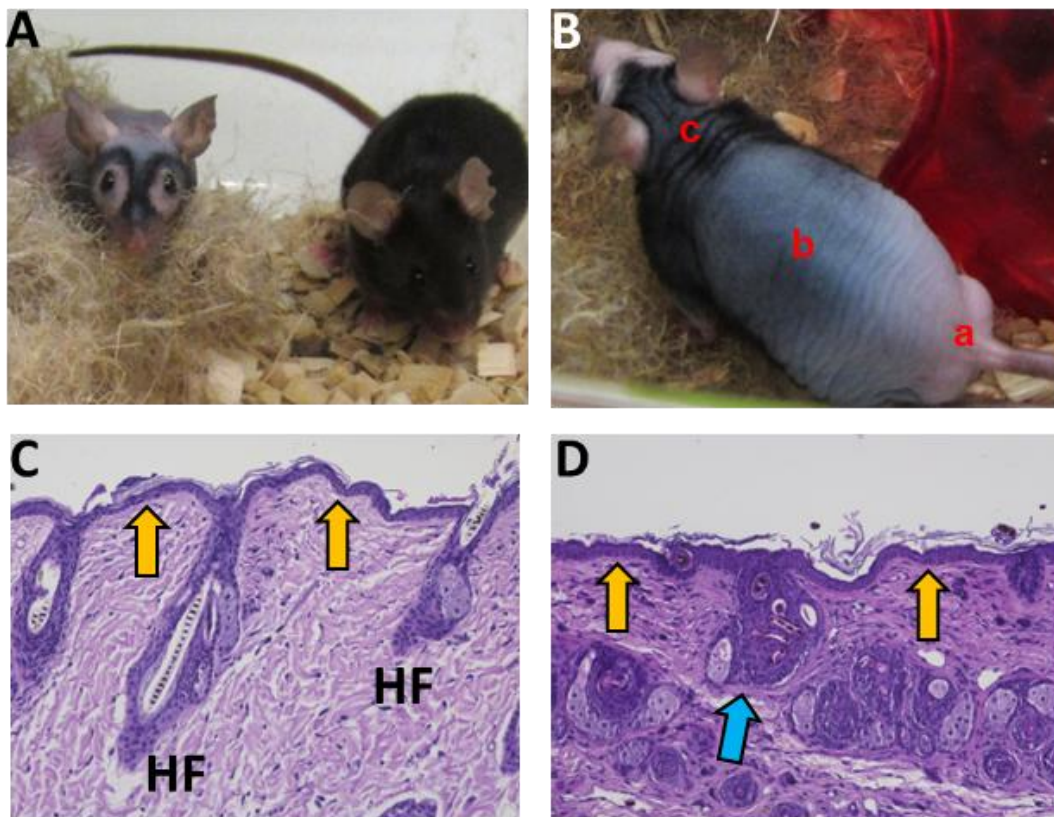


Abbildung 2.2: Makroskopischer und histologischer Phänotyp der *Nude*-Maus (B6.Cg-Foxn1^{nu}/J)

Makroskopischer Phänotyp einer homozygot depletierten *Nude*-Maus (links) und eines behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) (rechts) [A]. Die Haut von *Nude*-Mäusen ist entsprechend des Stadiums des Haarfollikelzyklus von rosa (a), grauer (b) oder schwarzer Farbe (c) [B]. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (200x) der Haut von *Nude*-Mäusen [D] und behaarten WG [C] sind die strukturellen Unterschiede der Architektur der Haut verdeutlicht. *Nude*-Mäuse weisen im Gegensatz zu der normalen Architektur eines Haarfollikels (HF) mit gerade aus der Haut auswachsendem Haarschaft aufgrund von Keratinisierungsstörungen gekräuselte Haarschäfte auf, die nicht aus der Epidermis auswachsen (exemplarisch: D, blauer Pfeil) auf. Die Epidermis ist im Vergleich zu der behaarter WG dicker (C, D gelbe Pfeile). Aufnahmen aus eigenen Versuchen.

In dieser Arbeit wurden acht B6.Cg-Foxn1^{nu}/J Mäuse, fünf homozygot nicht depletierte behaarte WG und drei C57BL/6J Mäuse (beide im Folgenden: behaarte WG) untersucht. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 11 und 20 Wochen alt.

2.2.3 Autoantikörpertransfer induziertes Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita

Die Induktion der experimentellen EBA in den Mäusen erfolgte in dieser Arbeit basierend auf dem Antikörpertransfer-induzierten Tiermodell von Sitaru *et al.* [44] und Woodley *et al.* [56, 45]. Dafür wurden zunächst pathogene Antikörper, die gegen murines Col7 gerichtet sind (anti-mCol7c-IgG), durch Immunisierung in Kaninchen produziert. Die Immunisierung der Kaninchen selbst ist nicht Teil dieser Arbeit, es wurden die zuvor gewonnenen Seren der Kaninchen verwendet. Aus dem gewonnenen Serum der immunisierten Kaninchen wurde dann zunächst das gesamte Immunglobulin G (IgG) mittels Säulenaффinitätschromatographie isoliert. In einem zweiten Schritt wurden aus dem Eluat mittels erneuter Affinitätschromatographie die Antikörper isoliert, die spezifisch gegen das murine Col7 gerichtet sind. Nach jeder Aufreinigung erfolgte (als Qualitätskontrolle) eine Immunfluoreszenzfärbung mit der aufgereinigten Antikörperlösung in unterschiedlichen Konzentrationen an Hautproben unbehandelter B6 Mäuse (*in vitro*). Zeigte sich hierbei histologisch eine Bindung der Antikörper an die DEJ, wurde das aufgereinigte IgG für die Versuche verwendet. Die Injektion der aufgereinigten Antikörperlösung in die Mäuse (*in vivo*) führt zur Initiierung einer Bindung des pathogenen anti-mCol7c-IgG an der DEJ.

Durch die darauffolgende Immunreaktion in der Maus kommt es, vermittelt durch das Komplementsystem und vornehmlich neutrophiler Granulozyten, zu einer Entzündungsreaktion der Haut mit subepidermaler Spalt- und Blasenbildung [57, 58, 39]. Die so in den Mäusen induzierten klinischen, histologischen und immunpathologischen Veränderungen gleichen den Krankheitsmerkmalen bei Patienten mit EBA [26].

2.2.4 Versuchsablauf (Injektionsschema) und Probengewinnung

Zur Untersuchung der Rolle des murinen HF in experimenteller EBA wurde in den zuvor beschriebenen Mausstämmen durch Antikörpertransfer experimentell EBA ausgelöst.

Um die Ergebnisse zwischen den Mausstämmen möglichst vergleichbar zu machen, erhielten alle Gruppen die gleiche Menge pathogenes IgG (anti-mCol7c-IgG) nach demselben Injektionsschema (**Abbildung 2.3**). Den Kontrollgruppen wurden analoge Mengen an nicht-pathogenem IgG verabreicht.

Aufgrund des bei den *Hairless*-Mäusen und bei den *Nude*-Mäusen vorbeschriebenen Immundefekts und, weil bisher wenig Erfahrungswerte zur Induktion der experimentellen EBA in diese Mausstämmen vorlag, sollte in Vorversuchen zunächst die zur Induktion notwendige Dosis der injizierten Antikörper ermittelt werden.

Im Vorversuch wurde dafür in vier *Hairless*-Mäusen und vier behaarten WG durch intraperitoneale Injektion von insgesamt 150 µg anti-mCol7c-IgG verteilt auf 3 Einzeldosen (Tag 0, 2 und 4) EBA induziert (siehe Anhang). Weil die verwendete Gesamtmenge von 150 µg anti-mCol7c-IgG makroskopisch nicht zur Ausbildung sichtbarer Läsionen in *Hairless*-Mäusen führte, wurde die Dosis auf insgesamt 600 µg mCol7c-IgG, verteilt auf sechs Einzeldosen, erhöht. In dieser Arbeit werden im Folgenden nur die Ergebnisse der Versuche der höheren Dosis berücksichtigt.

In den Versuchen mit einer Kumulativdosis von 600 µg anti-mCol7c-IgG wurde EBA in 12 *Hairless*-Mäusen und 12 behaarten WG induziert. Nicht-pathogenes IgG wurde zusätzlich jeweils vier *Hairless*-Mäusen und vier behaarten WG als Kontrollgruppen in analoger Dosierung zur Beurteilung unspezifischer Immunreaktionen auf xenogene IgG intraperitoneal verabreicht. Die verwendeten Tiere waren zu Beginn des Versuches zwischen 7 und 25 Wochen alt. Wie in **Abbildung 2.3** dargestellt, wurde den Mäusen über einen gesamten Zeitraum von 12 Tagen sechsmal (Tag 0, 1, 2, 3, 4, 5) je 100 µg anti-mCol7c-IgG oder in den Kontrollgruppen nicht-pathogenes IgG intraperitoneal gespritzt.

Die Induktion der EBA erfolgte in *Nude*-Mäusen analog zu dem oben genannten Versuchsablauf. Es wurden fünf *Nude*-Mäuse und fünf B6-Mäuse in die Versuchsgruppen und jeweils drei *Nude*-Mäuse und drei behaarte WG in die Kontrollgruppen eingeschlossen.

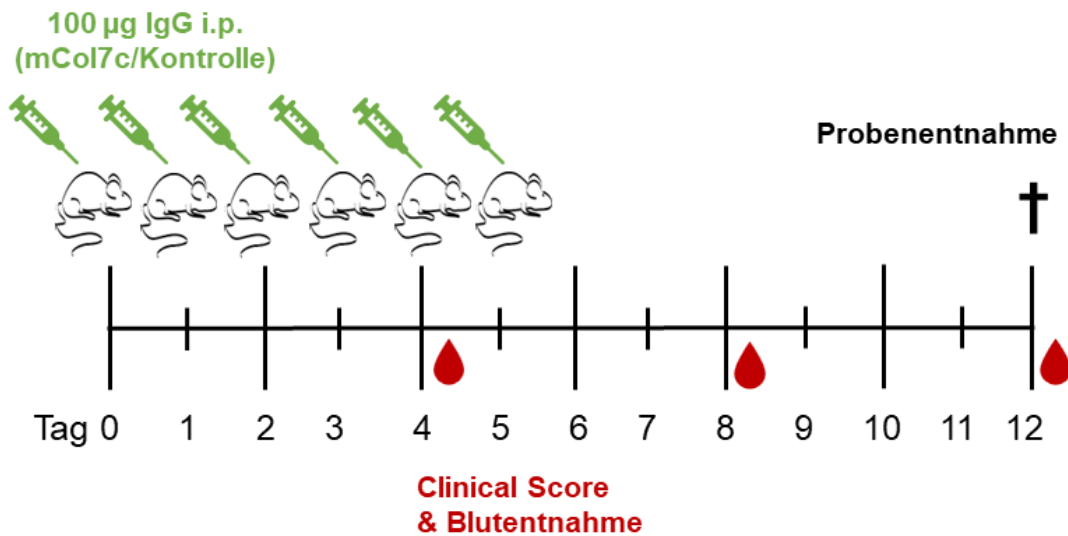


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Induktion der experimentellen Epidermolysis bullosa acquisita durch passiven Antikörpertransfer

An den Tagen 0, 1, 2, 3, 4 und 5 wurde den Mäusen jeweils 100 µg pathogenes anti-mCol7c-Immunglobulin G (pathogenes IgG) oder nicht-pathogenes IgG intraperitoneal (i.p.) gespritzt, um die experimentelle Epidermolysis bullosa acquisita zu induzieren. An den Tagen 4, 8 und 12 wurden die Tiere in Narkose gelegt. Es erfolgte die Erhebung der von Läsionen betroffenen Körperoberfläche in % (*Clinical Score*) nach einem definierten Scoring-Schema und eine Blutentnahme. Am Versuchsende (Tag 12) wurden die Tiere nach der Blutentnahme und der Erhebung des *Clinical Score* tierschutzgerecht getötet und verschiedene Proben zur weiteren Untersuchung entnommen und asserviert. Icons in Anlehnung an die Darstellung von K. Bieber *et al.* [43].

Zur Beurteilung der Krankheitsausprägung wurden die Tiere an den Tagen 4, 8 und 12 in Narkose (200 µL Ketamin (10 mg/mL) /Xylazin (1,5 mg/mL)) gelegt und anhand eines institutionsinternen, definierten Scoring-Schemas die von Läsionen betroffene Körperoberfläche in % (*Clinical Score*) bestimmt. Als Läsionen werden hierbei Krusten, gerötete Hautstellen, Haarausfall (bei behaarten WG), Schürfungen und ulzerierende Hautstellen gewertet [59]. An den Tagen 4, 8 und 12 erfolgte zudem

jeweils eine Blutprobenentnahme. Über den gesamten Versuchsablauf wurde regelmäßig der Allgemeinzustand und das Körpergewicht der Tiere erfasst.

Am Versuchsende (Tag 12) erfolgte im Anschluss an die tierschutzgerechte Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation in Narkose eine umfangreiche Probenasservierung. Gewebeproben aus läsionalen und nicht-läsionalen Bereichen der Haut an unterschiedlichen Körperregionen (Ohr, Rücken, Schwanz) wurden zu gleichen Teilen in einer pH-stabilen Lösung aus Formaldehyd fixiert und nach erfolgter Fixierung in Paraffin eingebettet oder nativ in Tissue-Tek®-Medium eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Einfrieren wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Proben ausgewählter innerer Organe (Milz, Niere, Lymphknoten) wurden für weiterführende Untersuchungen asserviert und bei -80°C, teilweise in RNAlater™-Lösung, eingefroren.

Alle Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme (Tag 4, 8, 12) zentrifugiert und das so gewonnene Serum bei -80°C zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

Alle Versuche an den Tieren wurden unterstützt durch und mit Hilfe von Frau Prof. Dr. med. vet. J. E. Hundt und die Probenentnahme und Aufarbeitung zusammen mit Frau Nadine Merg durchgeführt.

2.2.5 Thermografische Analysen

Zur Bestimmung der oberflächlichen Körpertemperatur bei den *Hairless*-Mäusen, den *Nude*-Mäusen und den behaarten WG wurde an mehreren Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten exemplarisch Messungen mittels Infrarot-Thermografie durchgeführt.

Die Messungen wurden an den *Hairless*- und den *Nude*-Mäusen am Rücken und am Ohr vorgenommen. Bei den behaarten WG wurde zum einen an der Felloberfläche am Rücken und am Ohr gemessen, zum anderen für eine bessere Vergleichbarkeit an Hautstellen am Rücken, an denen das Fell zuvor an einer kleinen Stelle beim Scoring an Tag 4 oder 8 durch Rasur verkürzt wurde, sodass eine Messung direkt auf der freiliegenden Hautoberfläche möglich war.

Bei der Messung der Oberflächentemperatur wurden die Tiere gruppenweise in den Käfigen beobachtet, weitere Messungen erfolgten während des Scorings in Narkose.

Für die Thermografie wurde eine Infrarot-Wärmebildkamera (Flir ThermaCam B360) zur Aufzeichnung verwendet. Die Kamera wurde freundlicherweise durch den Gutachter Herr Dr. Peter Hofmann zur Verfügung gestellt. Die Kamera wurde auf den Emissionsgrad $\epsilon=0,98$ für (menschliche) Haut [60] eingestellt. Nach Abschluss der Bildaufnahmen (siehe **Abbildung 2.4**) wurde die Kamera durch Herrn Dr. P. Hofmann ausgelesen und die ausgelesenen Bilder mit den entsprechenden Metadaten übersandt. Die Messwerte pro Tier wurden tabellarisch erfasst und statistisch ausgewertet.

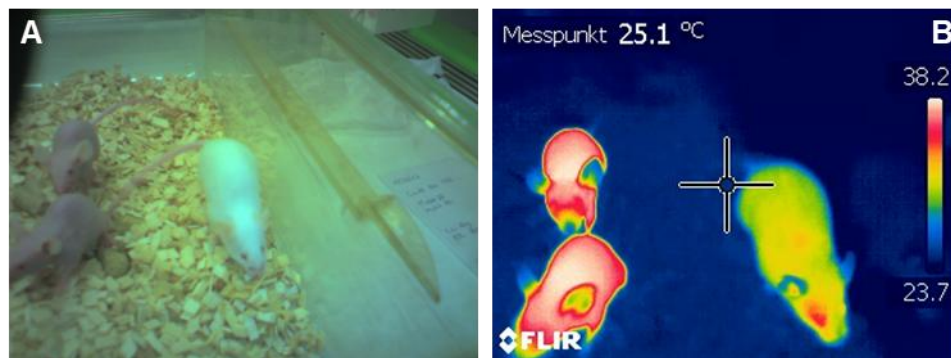


Abbildung 2.4: Exemplarische Darstellung der thermografischen Aufnahmen an *Hairless*-Mäusen

Durch die verwendete Wärmebildkamera wurde mit minimalem zeitlichem Versatz ein Lichtbild (**A**) und eine thermografische Aufnahme erstellt (**B**). In der thermografischen Aufnahme erkennt man rechts im Bild eine Wärmeskala, die sich an den abgebildeten Temperaturen orientiert. Wärmere Temperaturen werden in den Farben Gelb, Rot und Weiß abgebildet, kältere in den Farben Grün, Hell- und Dunkelblau. Im Fadenkreuz (hier zentral im Bild B) ist eine punktuelle Temperaturmessung möglich. Die Temperatur im Fokus des Fadenkreuzes beträgt in diesem exemplarischen Bild 25,1 °C. Vergleichend ist zu erkennen, dass die zwei abgebildeten *Hairless*-Mäuse an der Oberfläche eine höhere Temperatur aufweisen als das behaarte Wurfgeschwister.

In die Auswertung wurden nur die Messungen aus Bildern eingeschlossen, die insgesamt scharf waren und bei denen das Zentrum des Fadenkreuzes auf einer Maus beziehungsweise (bzw.) an der rasierten Haustelle lag. Thermografische

Aufnahmen von Tieren, die in Narkose angefertigt wurden, wurden nicht mit solchen von nicht narkotisierten Tieren verglichen.

2.2.6 Histologische Analysen

Histologische Analysen der Haut nehmen einen hohen Stellenwert bei der Diagnostik der EBA ein. Im Mausmodell dienen sie nicht zuletzt der Überprüfung der korrekten Bindung des injizierten Antikörpers an die Basalmembran in der Haut. Durch histochemische Färbungen, die der Übersicht dienen, kann morphologisch die für die EBA typische subepidermale Spaltbildung und die Entzündungsreaktion sichtbar gemacht werden. Immunhistochemische Färbungen dienen der Darstellung und dem Nachweis gewebegebundener Antikörper oder anderer Zielstrukturen. Für histologische Untersuchungen wurden aus den gewonnenen Proben zunächst Schnittpräparate hergestellt.

2.2.6.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Hälfte der asservierten Proben der läsionalen und nicht-läsionalen Rücken- und Schwanzhaut und des läsionalen und nicht läsionalen Ohres wurden unmittelbar nach der Entnahme in Tissue-Tek®-Medium in Einbettkassetten (*Cryomolds*) ausgerichtet und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Aus den so entstandenen Blöckchen wurden am Cryostat 6 µm dicke Gefrierschnitte des nativen Gewebes erstellt und auf Objektträger (je 2-3 Schnitte pro Objektträger) aufgebracht. Die Schnittpräparate wurden bis zur Anfertigung der Färbung bei -80°C gelagert und anschließend für unterschiedliche immunhistochemische Färbungen verwendet.

2.2.6.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die andere Hälfte der asservierten Proben der Rücken- und Schwanzhaut und des Ohres aus läsionalen und nicht läsionalen Bereichen, wurde in Formaldehyd-Lösung fixiert und in Paraffin ausgegossen. Mit dem Mikrotom wurden 4 µm dicke

Paraffinschnitte hergestellt und mittels Wasserbads auf Objektträger fixiert. Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden an den Paraffinschnitten histochemische Färbungen durchgeführt.

2.2.6.3 Histochemische Färbung

Eine der wohl am weitesten verbreiteten histochemischen Übersichtsfärbungen von Geweben ist die Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE). Bei dieser Methode werden Kernstrukturen blau-violett und Zytoplasma rosa angefärbt (siehe **Abbildung 2.1, B, C und Abbildung 2.2, C, D**).

Die luftgetrockneten Paraffinschnitte der Gewebeproben wurden zunächst in einem Xylol-Bad in einer Küvette für 10-20 Minuten entparaffiniert und danach zur Entfernung von Paraffinresten in zwei weiteren Xylol-Bädern geschwenkt. Anschließend durchliefen die Schnitte für je 5 Minuten eine absteigende Alkoholreihe (100% EtOH, 96% EtOH und 70% EtOH) und wurden danach mit destilliertem Wasser (A. dest.) für weitere 5 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Schnitte für 5 Minuten in Hämatoxilin-Lösung gefärbt und dann kurz unter fließendem Leitungswasser gespült, um Farbreste zu entfernen. Nach kurzem Schwenken in einer Lösung aus Essigsäure und Alkohol wurden die Schnitte so lange unter fließendem Leitungswasser gewässert, bis keine Schaumbildung mehr erkennbar war. Nach Schwenken in Ammoniakwasser erfolgte ein erneuter Waschschrift unter fließendem Leitungswasser. Je nach Alter der Eosin-Lösung wurden die Schnitte dann für 20-90 Sekunden in Eosin gefärbt und anschließend kurz in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96% EtOH, 100% EtOH) und 3 Xylol-Bädern geschwenkt. Die so gefärbten Objektträger wurden mittels Eindeckautomat mit Eukitt® und Deckgläsern eingedeckt. Für die hier durchgeführte HE-Färbung durfte freundlicherweise das Routinelabor der Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) in Lübeck mitbenutzt werden.

2.2.6.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Bei Immunfluoreszenzfärbungen werden mit fluoreszierenden Proteinen gekoppelte Antikörper auf Gewebeschnitte gegeben, um bestimmte Zielstrukturen anzufärben. Die Verwendung verschiedener fluoreszierender Proteine ermöglicht hierbei Mehrfachfärbungen zur zeitgleichen Darstellung mehrerer Antigene. Grundsätzlich können Immunfluoreszenzfärbungen sowohl an Formalin fixiertem Gewebe als auch an nativem Gewebe durchgeführt werden.

2.2.6.5 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Komplementfaktor 3 und gewebegebundenes Immunglobulin G

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für C3 und gewebegebundenem IgG dient zum einen dem Nachweis der Bindung des injizierten anti-mCol7c-IgG an der DEJ und zum anderen dem Nachweis von abgelagertem C3 als Zeichen der Immunreaktion und Entzündung in der Maus, die beide bei experimenteller EBA zu erwarten sind.

Für diese Färbung wurden die nativen Gefrierschnitte zunächst für 10 Minuten auf Raumtemperatur gebracht und dann für weitere 10 Minuten bei -20°C in Aceton fixiert. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur zur Entfernung von Resten des Einbettmediums und zur Rehydrierung der Präparate dreimal für je 5 Minuten mit PBS 1x (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen. Nach Umrandung der einzelnen Schnitte mit DAKO-Fettstift zur Verhinderung des Auslaufens der später aufpipetierten Flüssigkeiten wurde jeder Schnitt mit ca. 50 µL 10%-igem Ziegennormalserum (ZNS) in PBS zur Minderung der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die aufgebrauchte Lösung wurde im Anschluss abgekippt. Die Schnitte wurden dann entweder direkt mit dem Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-C3) in einer Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS oder mit einer Lösung aus 2% ZNS in PBS (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper) für die Dauer von einer Stunde in einer humiden Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Schnitte zur Entfernung des Antikörper-Überschusses erneut dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Nach dem

Waschschritt erfolgte auf allen Schnitten eine 45-minütige Inkubation mit der ersten Sekundärantikörperlösung (Rhodamin-gekoppeltes Ziege anti-Ratten-IgG, zum Nachweis von C3) in einer Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS in der abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Im Anschluss an diesen Inkubationsschritt wurden die Schnitte erneut gewaschen (dreimal 5 Minuten in PBS) und dann für weitere 45 Minuten mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (*Fluorescein-Isothiocyant* (FITC)-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis des gewebegebundenen IgG bei Raumtemperatur in der abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Nach dem abschließenden Waschschritt (dreimal 5 Minuten in PBS) erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount G und Deckgläschen. Anschließend wurden die Präparate für eine gewisse Trocknung des Eindeckmediums im Dunkeln für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert. Die fertig gefärbten Immunfluoreszenzschnitte wurden dann bei -20°C in Mappen gelagert.

Von den C3 und Immunglobulin G doppelgefärbten Schnitten wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht (siehe **Abbildung 2.5**). Für die Aufnahmen wurde das Keyence Biorevo II Fluoreszenzmikroskop mit insgesamt 3 Fluoreszenzkanälen verwendet. Kanal 1 des Mikroskops (blau) diente der Abbildung des 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Signals, also der allgemeinen Hintergrundfärbung. Kanal 2 wurde für das grüne Signal des FITC-konjugierten Antikörpers (Nachweis von gewebegebundenem Kaninchen-IgG in der Maus) und Kanal 3 für das rote Rhodamin-Signal des an C3 gebundenen Antikörpers verwendet. In Kanal 4 erfolgte mit Hilfe der Auswertungssoftware des Mikroskops die digitale Überlagerung der 3 Kanäle zu einem Gesamtbild (*Overlay*). Pro Gewebsschnitt wurden mindestens 2 repräsentative Bilder im Bereich der dermo-epidermalen Junktionszone in einer 200-fachen Vergrößerung und aus jeder Versuchsgruppe repräsentative Aufnahmen in 600-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl angefertigt.

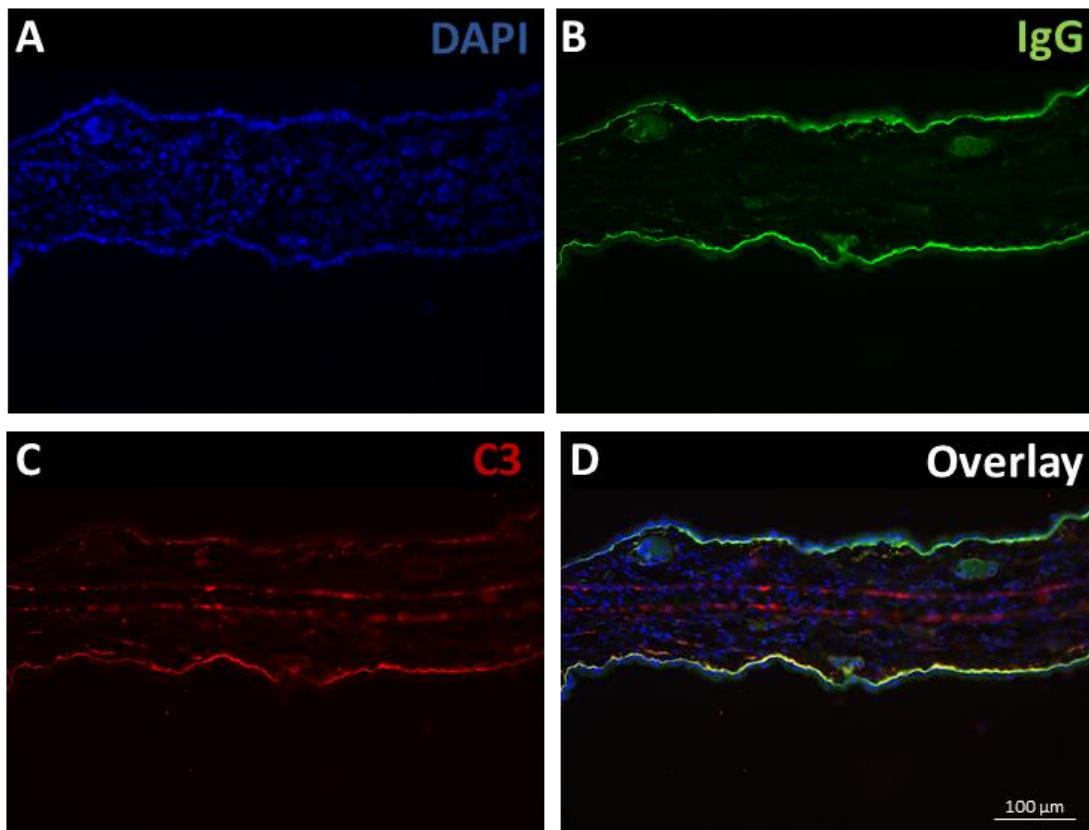


Abbildung 2.5: Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Komplementfaktor 3 und gewebegebundenes Immunglobulin G an Ohrhaut behaarter Wurfgeschwister

Darstellung exemplarischer eigener Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung. Kanal 1 (A) dient der Darstellung des Signals des blau fluoreszierenden 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), also der allgemeinen Hintergrundfärbung der Zellen. Kanal 2 (B) wurde für das grüne Signal des *Fluorescein-Isothiocyant* (FITC)-konjugierten Antikörpers zur Darstellung des gewebegebundenem Kaninchen-IgG und Kanal 3 (C) für das rote Rhodamin-Signal des an Komplementfaktor 3 gebundenen Antikörpers verwendet. In Kanal 4 erfolgte mit Hilfe der Auswertungssoftware des Mikroskops die digitale Überlagerung der 3 Kanäle zu einem Gesamtbild (D, Overlay). Man erkennt in der Ohrhaut eine Anlagerung sowohl von IgG (grün) als auch C3 (rot) korrespondierend zu der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ) und entlang des Ohrknorpels. Im Overlay erscheint in der Überlagerung der Kanäle eine eher gelbe Fluoreszenz an der DEJ.

Für diese Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden die aus den Gewebeproben erstellten Gefrierschnitte auf Raumtemperatur gebracht und dann in Aceton fixiert. Zur Minderung der unspezifischen Bindung der verwendeten Sekundärantikörper wurde jeder Schnitt mit 10%-igem Ziegennormalserum (ZNS) inkubiert. Die Schnitte wurden entweder direkt mit dem Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-C3) oder mit einer Lösung aus 2% ZNS in PBS (*phosphate*

buffered saline, PBS) (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper, nicht dargestellt) in einer humiden Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte auf allen Schnitten nacheinander zuerst eine Inkubation mit der ersten Sekundärantikörperlösung (Rhodamin-gekoppeltes Ziege anti-Ratten-IgG, Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis von C3 und im Anschluss mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (*Fluorescein-Isothiocyant* (FITC)-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis des gewebegebundenen IgG. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten mehrere Waschschrte. Abschließend wurden die Schnitte DAPI Fluoromount G eingedeckt.

2.2.6.6 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für den Endothelzellmarker *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1* und gewebegebundene Antikörper

Diese Doppelfärbung dient dem Nachweis des an der DEJ gebundenen anti-mCol7c-IgG im Mausgewebe und PECAM-1. PECAM-1 wird vornehmlich auf Endothelzellen und bestimmten Blutzellen (Monozyten, Thrombozyten und Granulozyten) exprimiert und dient der Adhäsion und Migration von Entzündungszellen durch die Gefäßmembran [61,62].

Die nativen Gefrierschnitte des Mausgewebes wurden zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und dann für weitere 10 Minuten in Aceton fixiert. Zum Entfernen des restlichen Einbettmediums und zur Rehydrierung der Präparate wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um ein Herunterlaufen der auf pipettierten Lösungen zu verhindern, wurden die einzelnen Gewebeschnitte mittels DAKO-Fettstift umrandet. Zur Minderung unspezifischer Bindung der Sekundärantikörper wurde jeder Schnitt mit ca. 50 µL 10%-igen ZNS in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung abgekippt und auf die Schnitte entweder der Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-PECAM-1 Antikörper) in einer Verdünnung von 1:2000 in 2% ZNS in PBS oder eine Lösung aus 2% ZNS in PBS (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper) aufgebracht. Nach Inkubation über Nacht in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei 4°C erfolgte zur Entfernung des Antikörper-Überschusses ein erneuter Waschschrte (dreimal 5 Minuten in PBS) bevor dann auf die Schnitte die erste Sekundärantikörperlösung (Rhodamin-gekoppeltes Ziege-anti-Ratten-IgG, zum

Nachweis von PECAM-1) in einer Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur aufgebracht wurde. Um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern, erfolgte der Inkubationsschritt in der dunklen Feuchtkammer. Anschließend wurden die Schnitte erneut gewaschen (3 x 5 Minuten in PBS) und dann für weitere 45 Minuten mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (FITC-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis des gewebegebundenen IgG bei Raumtemperatur in der abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Nach dem abschließenden Waschschrift (3 x 5 Minuten in PBS) erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit DAPI Fluoromount G und Deckgläschen. Die Präparate wurden im Anschluss im Dunkeln für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die fertig gefärbten Immunfluoreszenzschnitte wurden bis zur Auswertung bei -20°C in Mappen gelagert.

Von den wie oben beschrieben gefärbten Immunfluoreszenzschnitten wurden im Anschluss mikroskopische Aufnahmen mit dem Keyence Bioevo II Fluoreszenzmikroskop mit insgesamt 3 Fluoreszenzkanälen angefertigt (siehe **Abbildung 2.6**). Kanal 1 des Mikroskops diente der Abbildung des blau fluoreszierenden DAPI-Signals, also der allgemeinen Hintergrundfärbung. Kanal 2 wurde für das grüne Signal des FITC-konjugierten Antikörpers (Nachweis von gewebegebundenem Kaninchen-IgG in der Maus) und Kanal 3 für das rote Rhodamin-Signal des an PECAM-1 gebundenen Antikörpers verwendet. In Kanal 4 erfolgte mithilfe der Auswertungssoftware des Mikroskops die digitale Überlagerung der 3 Kanäle zu einem Gesamtbild (*Overlay*).

Aus jeder Versuchsgruppe wurden repräsentative Aufnahmen in 600-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl angefertigt. Für die weitere Auswertung wurden dann an der Rückenhaut pro Maus je eine Übersichtsaufnahme in 40-facher Vergrößerung und drei visuelle Felder (VF) in 200-facher Vergrößerung bei gleicher Belichtungszeit (ET, *exposure time*) aufgenommen. Da sich bei der orientierenden Auswertung zeigte, dass um die basalen Zysten der *Hairless*-Mäuse herum PECAM-1 nachweisbar war, erfolgten die Aufnahmen bei den *Hairless*-Mäusen teilweise mittels 2 Bildern (1x Ebene DEJ und 1 x einen Bildausschnitt in

Richtung Subkutis), die im Nachhinein digital zusammengeführt (*Merge* der Keyence-Software) wurden.

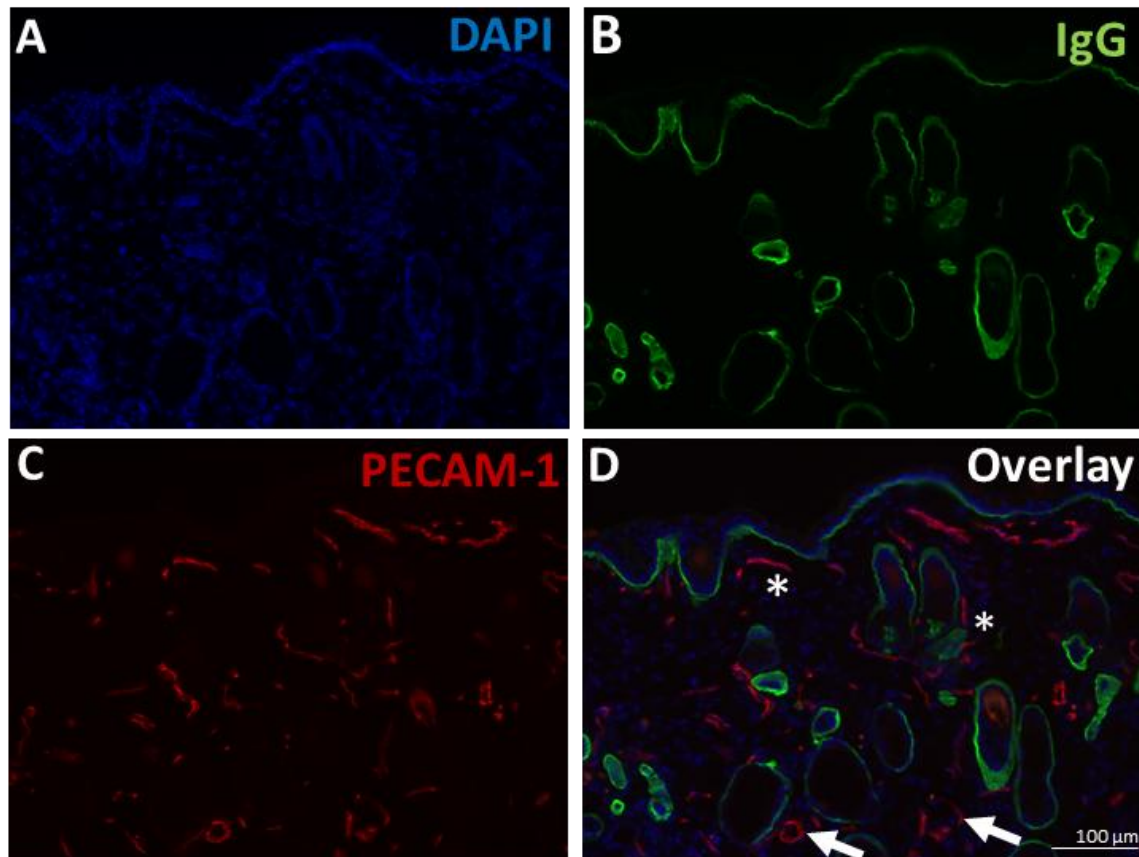


Abbildung 2.6: Exemplarische Abbildung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (CD31; PECAM-1) und gewebegebundenes Immunglobulin G an Rückenhaut einer *Hairless*-Maus

Darstellung exemplarischer eigener Aufnahmen auf Höhe der Epidermis (ohne Merge) in 200-facher Vergrößerung. Kanal 1 (A) dient der Darstellung des Signals des blau fluoreszierenden 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), der allgemeinen Hintergrundfärbung der Zellen. Kanal 2 (B) wurde für das grüne Signal des Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Antikörpers zur Darstellung des gewebegebundenem Kaninchen-IgG in der Maus und Kanal 3 (C) für das rote Rhodamin-Signal des an *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) gebundenen Antikörpers verwendet. In Kanal 4 erfolgte durch die Software des Mikroskops die digitale Überlagerung der 3 Kanäle zu einem Gesamtbild (D, Overlay). Man erkennt in der Haut die Anlagerung von IgG (grün) korrespondierend zu der dermo-epidermalen Junctionszone (DEJ) und entlang der Zystenwand der *Hairless*-Maus. PECAM-1 ist zum einen an einzelnen positiven Zellen (*, exemplarisch) und als ringartige Gefäßstruktur (Pfeil, exemplarisch) angelagert. Im Overlay erkennt

man, dass die Gefäßanschnitte in der Nähe der Zysten lokalisiert sind.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Birte Hell (*Nude-Mäuse*) und der Bachelorarbeit von Frau Inka Alten (*Hairless-Mäuse*), die durch Frau Ayleen Fokuhl teilweise mitbetreut wurden, erfolgte dann, verblindet, eine Auswertung der gefertigten Bilder nach folgenden Kriterien:

- Intensität des grünen IgG-Signals
- Länge der IgG-Ablagerung an der DEJ
- Anzahl der PECAM-1 positiven Zellen
- Anzahl der vaskulären Lumina

Alle Messungen wurden mit ImageJ gemacht und die Daten in Graph Pad Prism statistisch ausgewertet. Beispielhafte Abbildungen aus der entsprechenden Doppelfärbung siehe Anhang.

2.2.7 Bestimmung der mittleren Epidermisdicke an der Rückenhaut

Von den HE-gefärbten Präparaten der Haut wurden am Keyence lichtmikroskopische Bilder angefertigt. Jedes Präparat wurde zunächst in 40-facher Vergrößerung in einzelnen Ausschnitten fotografiert und mittels der BZII-Analyzer-Software zu einem Gesamtbild (*Merge*) zusammengefügt. Im Anschluss wurden von jedem Präparat mindestens 5 möglichst nicht überlappende Aufnahmen (VF) für weiterführende histologische Auswertungen erstellt (s. Anhang). Repräsentative Aufnahmen von EBA-typischen Hautveränderungen wurden exemplarisch angefertigt.

Mittels ImageJ-Software wurde an 3 Stellen pro VF in den HE-Aufnahmen die Epidermisdicke in μm bestimmt (Schema siehe Anhang), zwischen den einzelnen Gruppen verglichen und mittels Graph Pad statistisch ausgewertet.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Graph Pad Prism Version 7 durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn $p \leq 0,05$.

2.2.8.1 *Clinical Score* (von Läsionen betroffene Körperoberfläche)

Zur Analyse der Erkrankungsschwere wurde anhand des an Tag 0, 4, 8 und 12 erhobenen *Clinical Scores* zunächst nach etablierter Formel für jede Maus ein Durchschnittswert und anschließend für jede Gruppe ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Die Gruppen wurden unter Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Da die zu analysierenden Daten aus mehr als zwei Gruppen und innerhalb der Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben wurden, wurde zur statistischen Analyse eine Two-Way-*Analysis of Variance* (ANOVA) mit Sidak's multiplum Post-Hoc-Test verwendet. Werte von Tieren, die vor Erreichen des Versuchsendes verstorben waren, wurden nicht berücksichtigt.

Aus dem *Clinical Score* wurde die entsprechende *Area under the Curve* (AUC) für die EBA-Testgruppen ermittelt und mittels Mann-Whitney-U-Testes analysiert.

2.2.8.2 Bestimmung der mittleren Epidermisdicke

Die Stärke der Epidermis wurde an den HE-Schnitten der Rückenhaut wie in Abschnitt 4.2.7 beschrieben, bestimmt. Aus den ermittelten Daten wurden pro Tier und anschließend pro Gruppe Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Daten von zwei der insgesamt vier Gruppen (Kontrollgruppe behaarte WG, Kontrollgruppe *Hairless*-Mäuse, EBA-Gruppe behaarte WG, EBA-Gruppe *Hairless*-Mäuse) wurden dann zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft und anschließend unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests oder des unverbundenen T-Tests weiter ausgewertet.

2.2.8.3 Oberflächliche Körpertemperatur

Zur statistischen Auswertung der oberflächlichen Körpertemperatur in den einzelnen Versuchsgruppen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Nach Überprüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test erfolgte die Auswertung unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests.

2.2.9 Verblindung der Auswertung

Um eine unbewusste Beeinflussung der Ergebnisse durch eine Erwartungshaltung der durchführenden Personen (sogenannter Rosenthal-Effekt) [63] zu vermeiden, erfolgte die Auswertung der Versuche, insbesondere die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen, teilweise verblindet. Die Ergebnisse der *Hairless*-Mäuse (Länge des an der Basalmembran angelagerten IgG in unterschiedlichen Hautarealen, Auswertung der PECAM-1-Färbung) wurden hierbei durch Frau Inka Alten im Rahmen ihrer Bachelorarbeit [64] und die Versuche der *Nude*-Mäuse (Auswertung der PECAM-1-Färbung) durch Frau Birte Hell in Rahmen ihrer Bachelorarbeit [65], unterstützt durch Frau Friederike Bohne. Frau Birte Hell, Frau Friederike Bohne und (in der Anfangsphase) auch Frau Inka Alten wurden durch Frau Ayleen Fokuhl mitbetreut. Frau Birte Hell und Frau Friederike Bohne wurden in die Durchführung und Mikroskopie der Fluoreszenzfärbungen und der HE-gefärbten Schnitte eingewiesen und führten die ersten eigenen Aufnahmen und Färbungen unter Aufsicht von Frau Ayleen Fokuhl durch. Gemeinsam wurde ergänzend ein Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung des Neutrophilen-Markers Ly6G etabliert, die durch Frau Birte Hell, Frau Friederike Bohne und Frau Inka Alten ausgewertet wurden [64, 65].

3 ERGEBNISSE

3.1 B6.Cg-Tyr^{c-2J}Hr^{Hr}/J (*Hairless*-Mäuse)

Die Auswertung der Ergebnisse der durchgeführten Versuche erfolgte teilweise verblindet im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Inka Alten, die (in der Anfangsphase) durch Frau Ayleen Fokuhl mitbetreut wurde.

3.1.1 *Hairless*-Mäuse zeigen einen signifikant niedrigeren *Clinical Score* als die behaarten Wurfgeschwister

Durch intraperitoneale Injektion von 600 µg pathogenem anti-mCOL7c-IgG konnte erfolgreich die experimentelle EBA in *Hairless*-Mäusen ausgelöst werden. Die Mäuse wiesen nach Injektion EBA-typische Symptome in Form von Hautläsionen und Krusten als Zeichen der kutanen Entzündung auf. Im Vergleich zu den behaarten WG wiesen die *Hairless*-Mäuse jedoch einen signifikant niedrigeren *Clinical Score* auf.

Bereits an Tag vier konnten leichte Entzündungszeichen an der Haut der Mäuse gesehen werden. Im Verlauf war Schorfbildung an Ohren, Schnauze und Pfoten sowohl bei den behaarten WG als auch bei den *Hairless*-Mäusen feststellbar. Die Mäuse zeigten über die Zeit vermehrt Läsionen, die sich über den Körperstamm (Rückenhaut) und den Schwanz erstreckten. Die Symptomaggravation war bei den *Hairless*-Mäusen deutlich weniger stark ausgeprägt. Bei den behaarten WG war an Tag 12 im Mittel 4,6% der Körperoberfläche von Läsionen betroffen, bei den *Hairless*-Mäusen hingegen im Mittel 1,5% (**Abbildung 3.1**). Einzelne Mäuse aus der Gruppe der behaarten WG wiesen an Tag 12 Läsionen an bis zu etwa 9% der Körperoberfläche auf, einzelne *Hairless*-Mäuse zeigten hingegen bis zu Tag 12 sehr geringe Läsionen am Körper. Während die durchschnittliche betroffene Körperoberfläche in behaarten WG im Versuchsverlauf zunahm, nahm sie von Tag 8 zu Tag 12 in *Hairless*-Mäusen gering ab. Im gesamten Versuchsverlauf war in behaarten WG an einzelnen Tieren maximal 9,3% und in *Hairless*-Mäusen an einer Maus maximal 6% der Körperoberfläche von Läsionen betroffen.

Sowohl die behaarten WG als auch die *Hairless*-Mäuse, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (Kontrollgruppe) entwickelten über den gesamten Versuchszeitraum keinerlei mit dem bloßen Auge sichtbaren Läsionen.

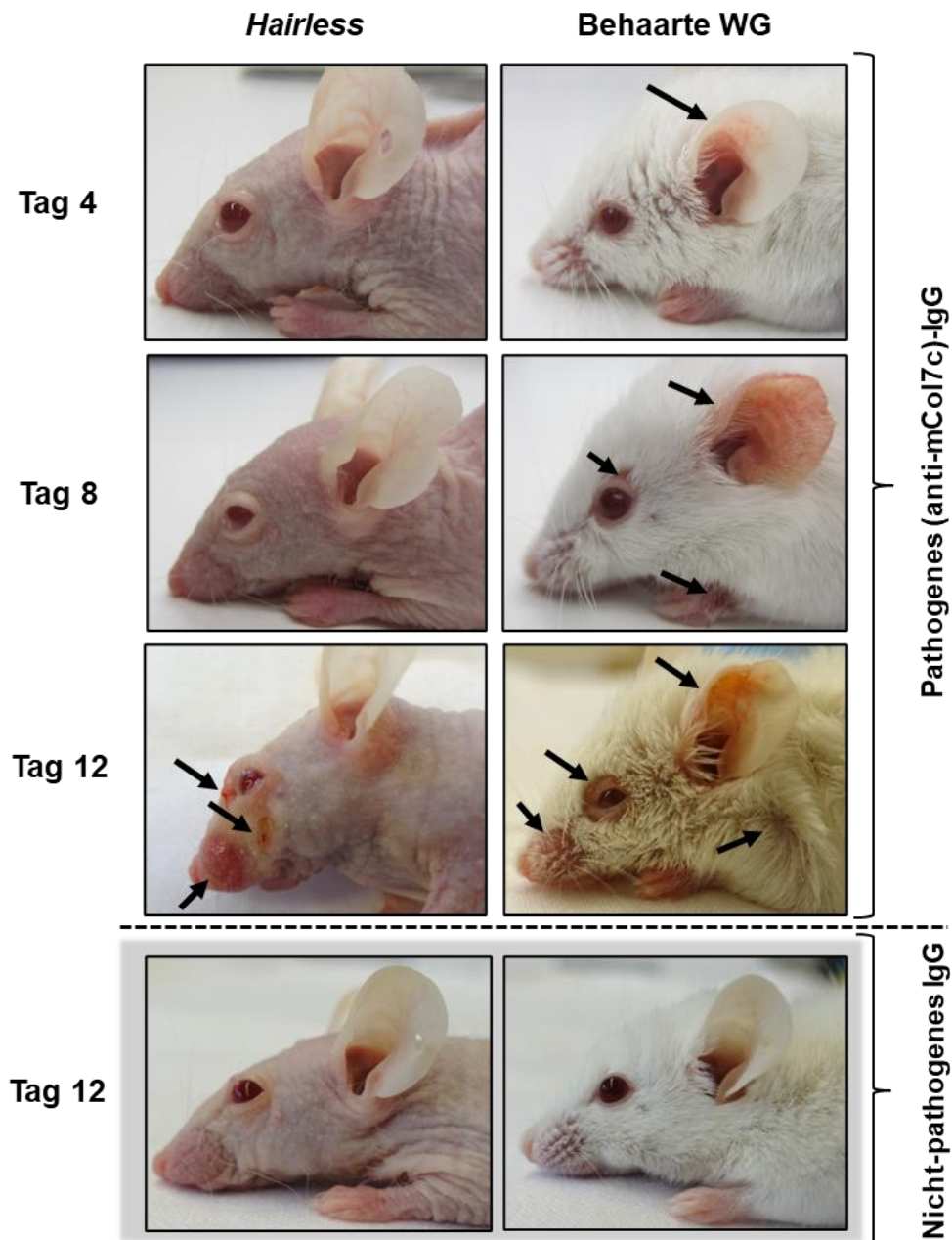


Abbildung 3.1: Klinische Manifestation der Epidermolysis bullosa acquisita in den *Hairless*-Mäusen und den behaarten Wurfgeschwistern

Exemplarische Darstellung der klinischen Symptome der B6.Cg-Tyr^{c-2J}Hr^{Hr}/J (*Hairless*)-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (beharte WG) im Bereich des Kopfes nach Injektion von pathogenem (anti-mCol7c) Immunglobulin G (IgG) an Tag 4, 8 und 12. Vergleichend exemplarische Bilder der Kontrollgruppen nach

Injektion von nicht-pathogenem IgG an Tag 12 (grau hinterlegt). Läsionen sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Symptomaggravation war bei den *Hairless*-Mäusen im Vergleich zu den behaarten WG deutlich weniger stark ausgeprägt. Bei den behaarten WG war zum Versuchsende im Mittel 4,5% der Körperoberfläche von Läsionen betroffen, bei den *Hairless*-Mäusen hingegen nur bis zu 1,5%. Einzelne Mäuse aus der Gruppe der behaarten WG wiesen im Versuchsverlauf Läsionen an bis zu etwa 9% der Körperoberfläche auf, einzelne *Hairless*-Mäuse zeigten hingegen bis zu Tag 12 sehr geringe Läsionen am Körper.

Der im Versuchsverlauf zu mehreren Zeitpunkten bestimmte *Clinical Score* (die von Läsionen betroffene Körperoberfläche in Prozent) ergab für *Hairless*-Mäuse, denen anti-mCol7c-IgG injiziert wurde (EBA-Gruppe) an den Tagen 8 und 12 einen signifikant niedrigeren *Clinical Score* als bei den behaarten WG (siehe **Abbildung 3.2**).

Tiere aus den Kontrollgruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, wiesen zu keinem Zeitpunkt Läsionen an der Körperoberfläche auf.

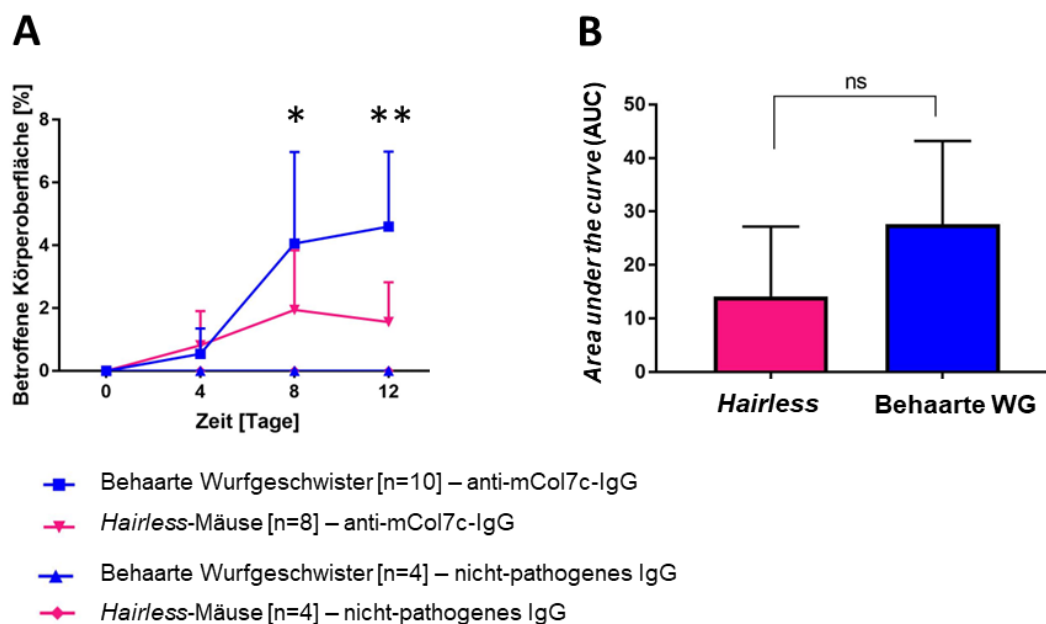


Abbildung 3.2: *Clinical Score* der *Hairless*-Mäuse im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern

Anti-mCol7c-IgG = pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG).

(A) Grafische Darstellung des *Clinical Score* (von Läsionen betroffene Körperoberfläche) [%] der *Hairless*-Mäuse und der

behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 von allen Mäusen, denen pathogenes (anti-mCol7c) Immunglobulin G (IgG) oder nicht-pathogenes IgG injiziert wurde. Dargestellt sind die durchschnittlichen Werte pro Gruppe als Mittelwert und Standardfehler (SEM). * = ($p = 0,0379$), ** = ($p = 0,0012$), Two-Way-ANOVA mit Sidak's multiplem Post-Hoc-Test [Vergleich zwischen *Hairless*-Mäusen ($n=8$) und behaarten WG ($n=10$). Ausgeschlossen wurden Versuchstiere, die vor Ende der Versuchsdurchführung verstorben sind ($n = 2$, *Hairless*-Mäuse)].

(B) Im Vergleich der Gruppen, denen anti-mCol7c-IgG injiziert wurde, ergab sich bei der *Area under the Curve* (AUC) des *Clinical Score* kein signifikanter Unterschied. ns = ($p = 0,0684$), unverbundener T-Test.

Die anschließende histologische Auswertung der Proben aus verschiedenen Hautarealen (Rücken, Ohr und Schwanz) zeigte Wundschorfbildung, Entzündungszellinfiltrate und subepidermale Spaltbildung in läSIONalen Hautproben der Mäuse, denen pathogenes IgG injiziert wurde (**Abbildung 3.3 und Anhang**). Diese histologischen Veränderungen sind EBA-spezifisch und kennzeichnen das Antikörpertransfer induzierte Mausmodell [44,45]. Die histomorphologischen Veränderungen sind sowohl in den Hautproben der behaarten WG als auch in den läSIONalen Hautproben der *Hairless*-Mäuse, denen pathogenes IgG verabreicht wurde, nachzuvollziehen. Die Mäuse, denen nicht pathogenes IgG injiziert wurde zeigten weder makroskopisch noch mikroskopisch sichtbare Krankheitszeichen.

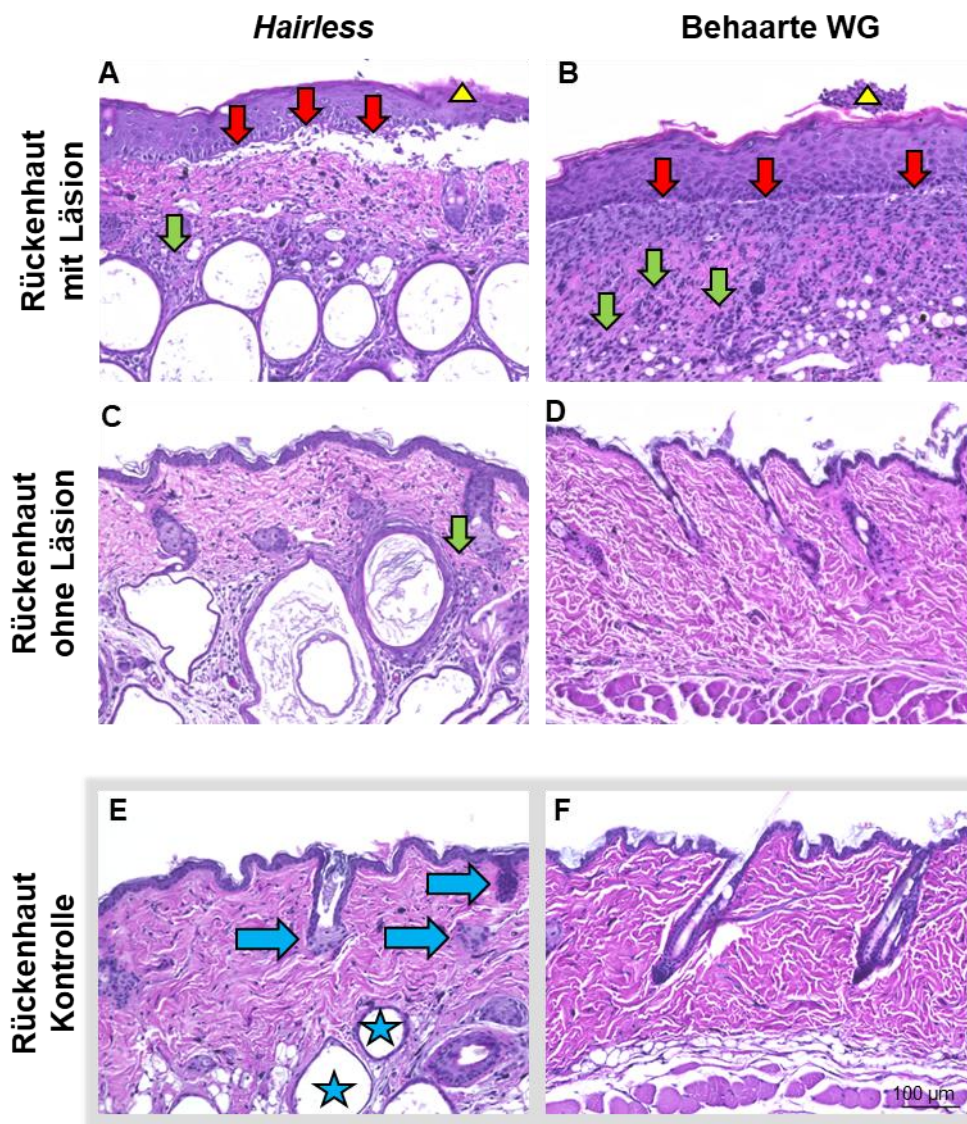


Abbildung 3.3: Histologische Veränderungen bei Antikörpertransfer induzierter Epidermolysis bullosa acquisita in der Rückenhaut der *Hairless*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister in der Hämatoxylin und Eosin-Färbung

Dargestellt sind eine Auswahl der mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Rückenhautproben der *Hairless*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister. Abgebildet sind oben Bilder der läSIONalen und nicht läSIONalen Hautproben von den Gruppen, die mit pathogenem (anti-mCol7c) Immunglobulin G (IgG) behandelt wurden (**A, B, C, D**), unten die Bilder der Kontrollgruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (grau hinterlegt, **E, F**). Die Spaltbildung in der dermoepidermalen Junctionszone (rote Pfeile), die Entzündungszellinfiltrate (migrierte neutrophile Granulozyten) (grüne Pfeile) und die Wundschorfbildung (gelbes Dreieck) in den läSIONalen Bildern sind exemplarisch markiert. Die *Hairless*-typischen Zysten (blauer Stern) und die Reststrukturen der zurückgebildeten Haarfollikel (blaue

Pfeile) sind in der Kontrollgruppe der *Hairless*-Mäuse gekennzeichnet. Ergänzende Abbildungen der histologischen Veränderungen an anderen Lokalisationen (Ohr und Schwanz) siehe Anhang.

Durch Immunfluoreszenzfärbung konnte in den Hautproben der *Hairless*-Mäuse und der behaarten WG nachgewiesen werden, dass das injizierte pathogene IgG an der DEJ gebunden hat und, dass es zu einer Anlagerung des C3 an der Basalmembran (siehe **Abbildung 3.4 und Anhang**) als Zeichen der Entzündungsreaktion in den Mäusen gekommen ist. Sowohl der Nachweis der Antikörperbindung an das Ziel-Antigen (Col7) als auch der Nachweis einer nachfolgenden Aktivierung des Komplementsystems durch C3 sind histomorphologisch spezifische Zeichen einer erfolgreichen Induktion experimenteller EBA in *Hairless*-Mäusen.

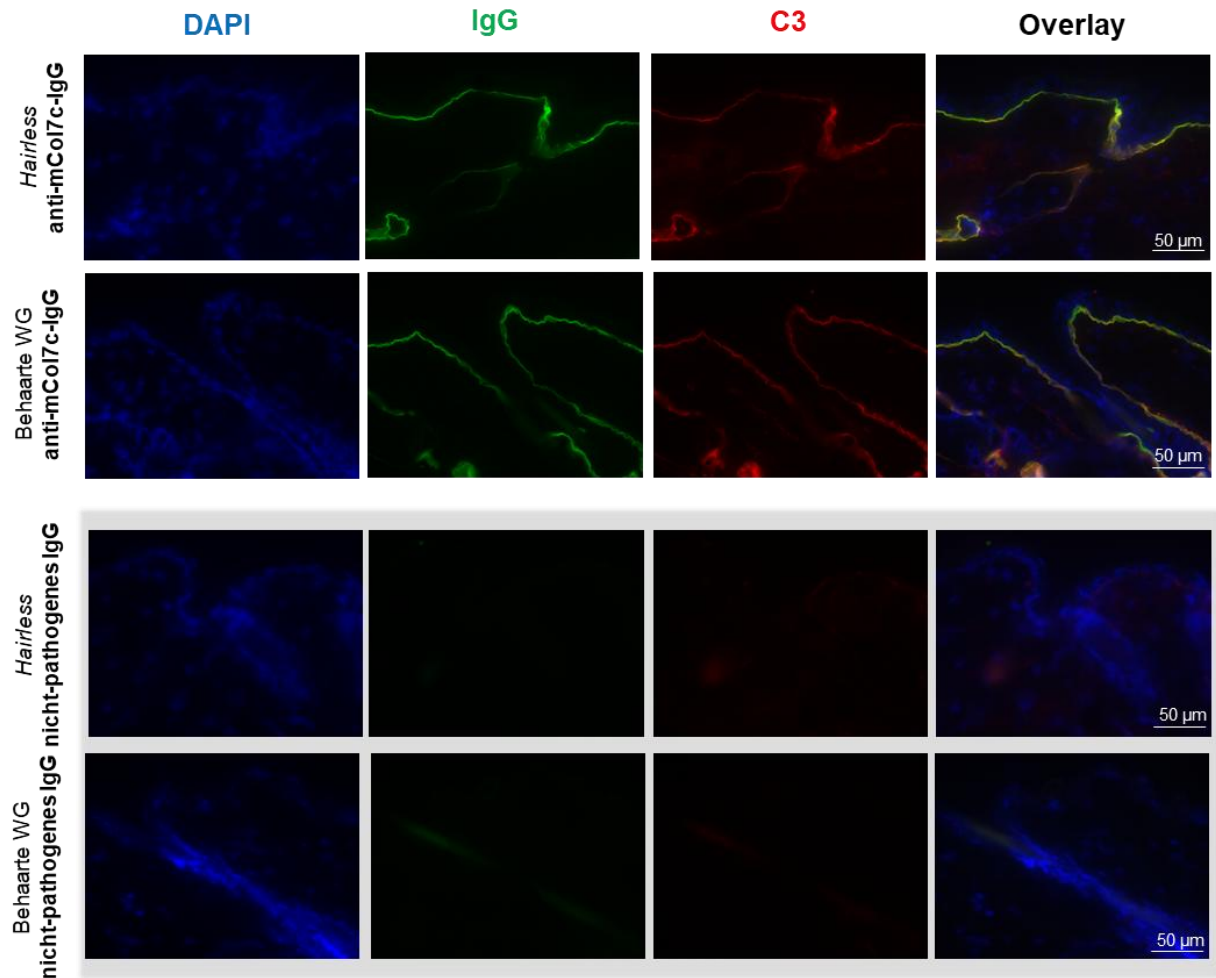


Abbildung 3.4: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) und Komplementfaktor 3 in Rückenhaut von *Hairless*-Mäusen

Anti-mCol7c-IgG = pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG); C3 = Komplementfaktor 3; DAPI = 4,6-Diamidin-2-phenylindol; IgG = Immunglobulin G.

Für diese Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden die aus den Gewebeproben erstellten Gefrierschnitte auf Raumtemperatur gebracht und dann in Aceton fixiert. Zur Minderung der unspezifischen Bindung der verwendeten Sekundärantikörper wurde jeder Schnitt mit 10%-igem Ziegennormalserum (ZNS) inkubiert. Die Schnitte wurden entweder direkt mit dem Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-C3) oder mit einer Lösung aus 2% ZNS in PBS (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper, nicht dargestellt) in einer humiden Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte auf allen Schnitten nacheinander zuerst eine Inkubation mit der ersten Sekundärantikörperlösung (Rhodamingekoppeltes Ziege-anti-Ratten-IgG, Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis von C3 und im Anschluss mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (*Fluorescein-Isothiocyanat* (FITC)-

gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis des gewebegebundenen IgG. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten mehrere Waschschriffe der Präparate mit PBS 1x (*phosphate buffered saline*, PBS). Abschließend wurden die Schnitte mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount G als Hintergrundfärbung eingedeckt.

In der Immunfluoreszenzfärbung ist in den Epidermolysis bullosa acquisita-Gruppen eine Bindung von pathogenem (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) (grün) an die Basalmembran der Rückenhaul der *Hairless*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) erkennbar. Darüber hinaus ist die Bindung von Komplementfaktor 3 (C3, hier rot) an die Basalmembran der Epidermis zu erkennen. Im Overlay ergibt sich aufgrund der Doppelfärbung eine orange-gelbe, der Basalmembran folgendes Fluoreszenzsignal in der Haut der Mäuse, denen pathogenes IgG injiziert wurde. In den Gruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (grau hinterlegt) erkennt man weder eine Anlagerung von Antikörpern noch von C3 entlang der Basalmembran.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass in dieser experimentellen Studie experimentelle EBA durch Antikörpertransfer in *Hairless*-Mäusen erfolgreich induziert wurde.

3.1.2 Die Oberflächentemperatur von *Hairless*-Mäusen ist signifikant höher als die von behaarten Wurfgeschwistern

Zur Klärung der Frage, ob die Nacktheit bzw. der fehlende isolierende Effekt des Fells bei den *Hairless*-Mäusen einen möglichen Einfluss auf die Ausprägung der induzierten EBA hat, wurde mittels Infrarotthermografie die oberflächliche Körpertemperatur gemessen. Aus den gefertigten Bildern wurden nur scharfe Bilder, bei denen das Zentrum des Fadenkreuzes auf einer Maus lag in die weitere Auswertung eingeschlossen. Um eine Beeinflussung des Kreislaufs und damit einhergehend auch der Thermoregulation zu vermeiden, wurden thermografische Aufnahmen von Tieren, die in Narkose angefertigt wurden, nicht berücksichtigt. In die Auswertung eingeschlossen wurden so 30 Messungen an 4 *Hairless*-Mäusen, 39 Messungen an 4 behaarten WG. Die erhobenen Messwerte wurden anschließend untereinander verglichen. Die Infrarotkamera wurde zur Messung auf den Emissionskoeffizienten für menschliche Haut ($\epsilon=0,98$) eingestellt.

Im Vergleich der oberflächlichen Körpertemperatur der *Hairless*-Mäuse zur Temperatur an der Oberfläche behaarter WG zeigte sich hierbei eine signifikant

höhere Körpertemperatur an der Haut der *Hairless*-Mäuse im Vergleich zur Oberfläche (Fell) der behaarten WG (siehe **Abbildung 3.5**). Die oberflächliche Körpertemperatur der *Hairless*-Mäuse betrug im Mittel 35,9 °C (n = 30 Messungen an 4 *Hairless*-Mäusen), die der behaarten WG 31,1 °C (n = 39 Messungen an 4 behaarten WG).

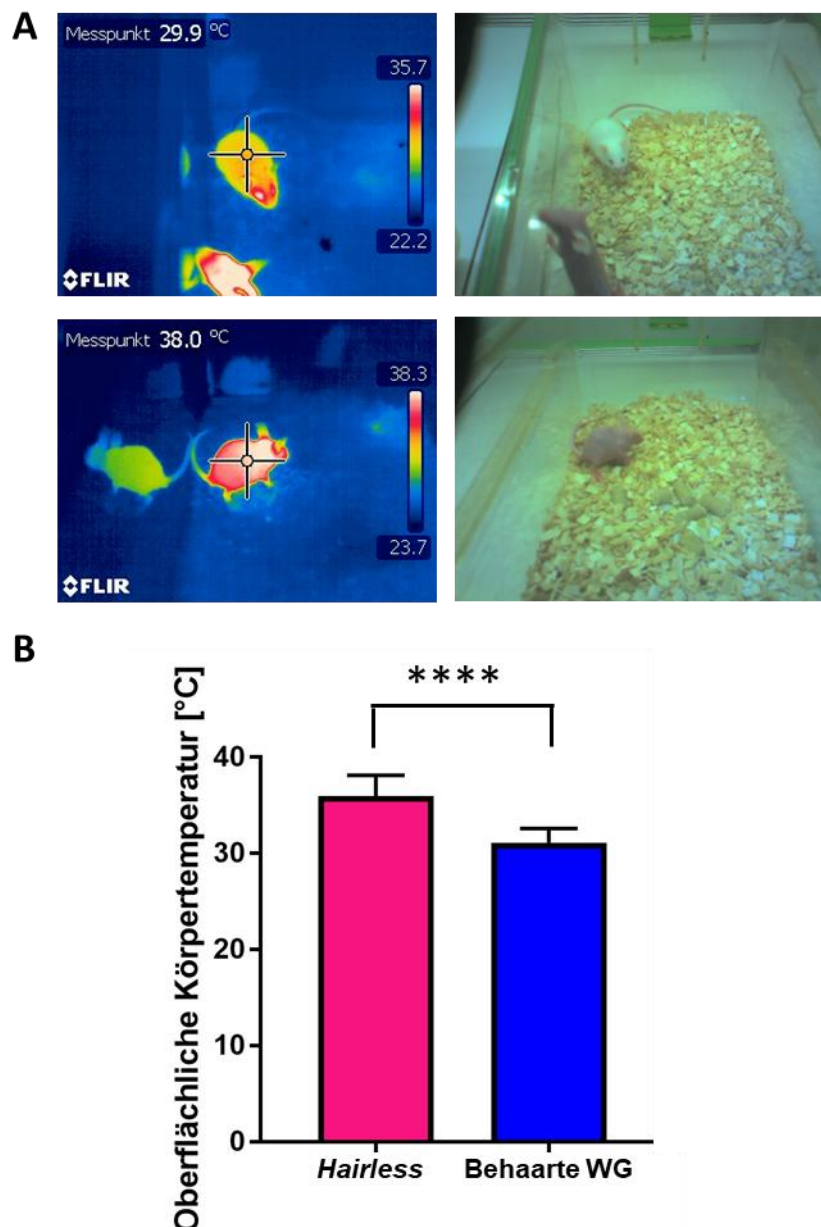


Abbildung 3.5: Thermografische Messungen an der Oberfläche von *Hairless*-Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern

(A) Exemplarische Darstellung repräsentativer Aufnahmen der thermografischen Messungen. Links die Thermografie-Bilder, rechts

der Ausschnitt der parallel durch die Kamera gefertigten Lichtbilder. Durch minimalen zeitlichen Versatz der Aufnahmen bei der Anfertigung (technisch bedingt) kann es zu geringen Unterschieden in der Bildsequenz kommen. In den Infrarot-Bildern ist eine Wärmeskala (rechter Bildrand) und ein Fadenkreuz erkennbar. Die Wärmeskala orientiert sich an den im Bildausschnitt befindlichen Objekten und der daran gemessenen Temperatur. Dunklere, blaue Farbtöne (unterer Bereich) stellen hierbei kältere Temperaturen und hellere, rote bis weiße Farbtöne wärmere Temperaturen dar. Weiß kennzeichnet die wärmsten Stellen. Die Zahlen geben an der Skala den obersten und untersten Messwert an. Die in Zahlen dargestellte Temperatur am linken oberen Bildrand entspricht der gemessenen Temperatur im Zentrum des Fadenkreuzes (Fokus der Infrarotmessung). Im Bildausschnitt links erkennt man eine thermografische Spiegelung der *Hairless*-Maus an der Wand des Käfigs.

(B) Im Vergleich beider Gruppen ergab sich eine signifikant höhere Temperatur an der Oberfläche der *Hairless*-Mäuse im Vergleich zu den behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) [**** = ($p < 0,001$), Mann-Whitney-U-Test]. Die Messwerte wurden, teilweise mehrfach pro Tier erhoben. In die Auswertung eingeschlossen wurden Messungen an *Hairless*-Mäusen (n=30 Messungen an 4 Tieren) und behaarten WG (n=39 Messungen an 4 Tieren). Ausgeschlossen wurden Messungen, die an narkotisierten Tieren erhoben wurden, Messungen, bei denen der Fokus des Fadenkreuzes nicht auf der Maus lag und Bilder, die unscharf waren.

3.1.3 Die oberflächliche Körpertemperatur von *Hairless*-Mäusen und rasierten behaarten Wurfgeschwister zeigt keinen signifikanten Unterschied

Das Fell der behaarten WG erfüllt eine Schutzfunktion der Haut und dient der Wärmespeicherung. Um einen Einfluss dieses Isolationseffektes möglichst auszuschließen, wurde an 2 behaarten WG, die beim *Scoring* teilrasiert wurden, thermografische Messungen durchgeführt. In 7 Messungen waren die Aufnahmen scharf und der Fokus des Fadenkreuzes auf der rasierten Hautstelle. Diese Messungen wurden in die Auswertung eingeschlossen und mit den bereits erhobenen Messwerten in *Hairless*-Mäusen (n = 30 Messwerte an 4 *Hairless*-Mäusen) verglichen. Die Infrarotkamera wurde zur Messung auf den Emissionskoeffizienten für menschliche Haut eingestellt. Um eine Beeinflussung des Kreislaufs und damit einhergehend auch der Thermoregulation zu vermeiden, wurden thermografische Aufnahmen von Tieren, die in Narkose angefertigt wurden, nicht berücksichtigt.

Der Vergleich der oberflächlichen Körpertemperatur am Rücken der *Hairless*-Mäuse zur Temperatur an der Haut (nach Rasur) der behaarten WG zeigte keinen signifikanten Unterschied (siehe **Abbildung 3.6**). Die oberflächliche Körpertemperatur der *Hairless*-Mäuse betrug im Mittel 35,9 °C (n = 30 Messungen an 4 *Hairless*-Mäusen), die der rasierten Stelle der behaarten WG 36,0 °C (n = 7 Messungen an 2 behaarten WG).

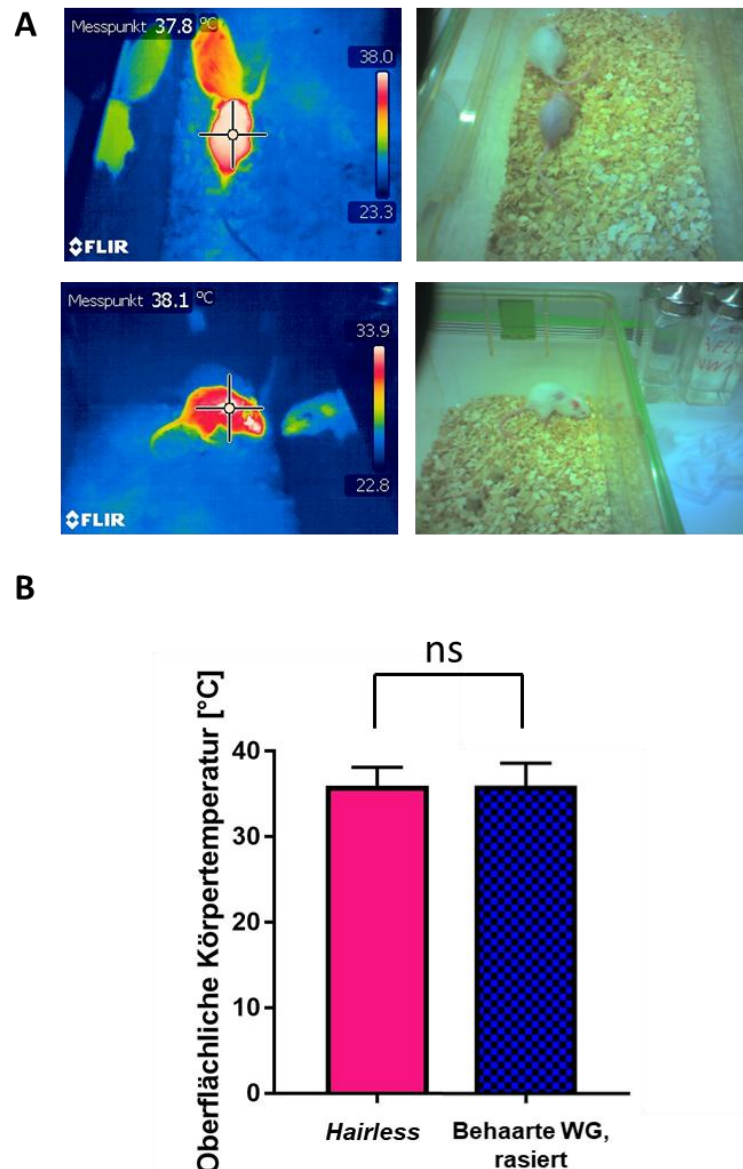


Abbildung 3.6: Thermografische Messungen an der Oberfläche von *Hairless*-Mäusen im Vergleich zu rasierten behaarten Wurfgeschwistern

Exemplarische Darstellung repräsentativer Aufnahmen der thermografischen Messungen (**A**). Links die Thermografie-Bilder,

rechts der Ausschnitt der parallel durch die Kamera gefertigten Lichtbilder. Durch minimalen zeitlichen Versatz der Aufnahmen bei der Anfertigung (technisch bedingt) kann es zu geringen Unterschieden in der Bildsequenz kommen. In den Infrarot-Bildern ist eine Wärmeskala (rechter Bildrand) und ein Fadenkreuz erkennbar. Die Wärmeskala orientiert sich an den im Bildausschnitt befindlichen Objekten und der daran gemessenen Temperatur. Dunklere, blaue Farbtöne (unterer Bereich) stellen hierbei kältere Temperaturen und hellere, rote bis weiße Farbtöne wärmere Temperaturen dar. Weiß kennzeichnet die wärmsten Stellen. Die Zahlen geben an der Skala den obersten und untersten Messwert an. Die in Zahlen dargestellte Temperatur am linken oberen Bildrand entspricht der gemessenen Temperatur im Zentrum des Fadenkreuzes (Fokus der Infrarotmessung). In den Infrarotbildern am Rand erkennt man Spiegelungen der abgebildeten Mäuse an der Seitenwand des Käfigs.

Im Vergleich der oberflächlichen Körpertemperatur zwischen *Hairless*-Mäusen und der rasierten Haut behaarter Wurfgeschwister (behaarte WG) ergab sich kein signifikanter Unterschied [ns = ($p = 0,6832$), Mann-Whitney-U-Test] (**B**). Die ausgewerteten Messwerte wurden, teilweise mehrfach pro Tier, an *Hairless*-Mäusen ($n = 30$ Messungen an 4 Tieren) und behaarten WG ($n = 7$ Messungen an 2 Tieren) erhoben.

3.1.4 Die Epidermis von *Hairless*-Mäusen ist signifikant dicker als die von behaarten Wurfgeschwistern

An HE-gefärbten Schnitten der Rückenhaut von *Hairless*-Mäusen und behaarten WG wurde die mittlere Epidermisdicke bestimmt. Hierzu wurden pro Maus in 5-7 *Visual Fields* an jeweils 3 Stellen mittels ImageJ-Software die Höhe der Epidermis in μm gemessen und die erhobenen Messwerte anschließend statistisch ausgewertet (Auswertungsmatrix siehe Anhang).

Im Ergebnis zeigte sich für die Messwerte der EBA-Gruppen, also der Tiere, denen pathogenes anti-mCol7c-IgG injiziert wurde, ein signifikanter Unterschied zwischen der Epidermisdicke der *Hairless*-Mäuse ($n = 7$) und der behaarten WG ($n = 10$) [**** = ($p < 0,001$), unverbundener T-Test, Messwerte des Kollektivs normalverteilt] (siehe **Abbildung 3.7, A**). Auch in den Tieren der Kontrollgruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, konnte eine signifikant dickere Epidermis [* = ($p = 0,0286$), Mann-Whitney-U-Test, Messwerte des Kollektivs nicht normalverteilt] in den *Hairless*-Mäusen ($n = 4$) im Vergleich zu den behaarten WG ($n = 4$) gesehen

werden (siehe **Abbildung 3.7, B**). Die Verdickung der Epidermis scheint daher unabhängig von der induzierten Erkrankung zu sein.

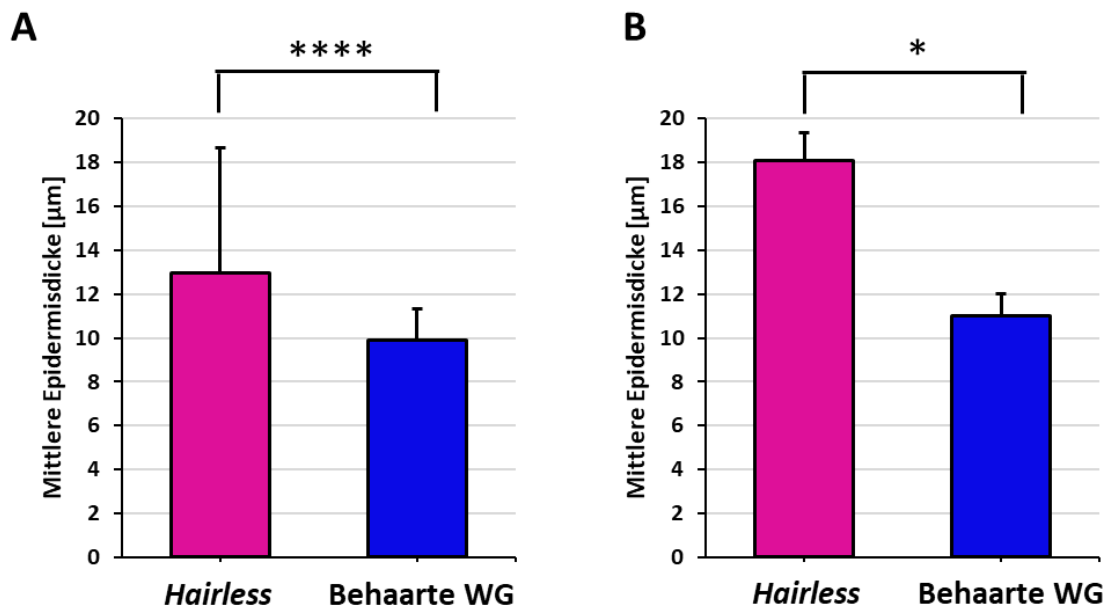


Abbildung 3.7: Epidermisdicke in *Hairless*-Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern

Die Epidermis der *Hairless*-Mäuse ist signifikant dicker als die der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) sowohl in den Gruppen, denen pathogenes anti-mCol7c-Immunglobulin G (IgG) injiziert wurde (**A**) [**** = ($p < 0,001$), unverbundener T-Test, Messwerte des Kollektivs normalverteilt], als auch in den Gruppen, denen nicht-pathogenes IgG verabreicht wurde (**B**) [* = ($p = 0,0286$), Mann-Whitney-U-Test, Messwerte nicht normalverteilt]. Die Messwerte wurden an 3 Stellen der je 5-7 *Visual Fields* der Hämatoxylin und Eosin gefärbten Proben der Rückenhaut von 7 *Hairless*-Mäusen und 10 behaarten WG (pathogenes IgG) und 4 *Hairless*-Mäusen und 4 behaarten WG (nicht-pathogenes IgG) erhoben. Die Verdickung der Epidermis scheint daher unabhängig von der induzierten Erkrankung zu sein.

3.1.5 Die Länge des gewebegebundenen Autoantikörpers ist in *Hairless*-Mäusen signifikant erhöht

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit PECAM-1 und IgG (siehe Abschnitt 4.2.6.6) erfolgte verblindet im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Inka Alten, die (in der Anfangsphase) durch Frau Ayleen Fokuhl mitbetreut wurde.

Zunächst wurde als Korrelat der Immunreaktivität die Fluoreszenzintensität der auf IgG gefärbten Schnitten (grünes Signal) an verschiedenen Hautproben der *Hairless*-Mäuse und der behaarten WG, denen pathogenes anti-mol7c-IgG injiziert wurde, bestimmt. Im Ergebnis der Auswertung konnte durch Frau Inka Alten festgestellt werden, dass in den Proben der Rückenhaut signifikant mehr Immunreaktivität vorhanden war als in den Gewebeproben des Ohres und der Schwanzhaut (siehe **Abbildung 3.8, C**). *Hairless*-Mäuse und die behaarten WG wiesen in der Rückenhaut die stärkste Immunreaktivität auf [**** = ($p \leq 0,0001$), One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test]. Der Vergleich der Rückenhautproben zwischen den behaarten WG und den *Hairless*-Mäusen zeigte keinen Unterschied [64].

Zusätzlich zur Immunreaktivität wurde die Länge des gewebegebundenen Antikörpers gemessen. In den EBA-Gruppen konnte eine Anlagerung des injizierten anti-mCol7c-IgG an die Basalmembran der Epidermis, aber auch an die Zysten der *Hairless*-Mäuse und an die HF der behaarten WG gesehen werden (siehe **Abbildung 3.8, A, B**). In den Rückenhautproben der *Hairless*-Mäuse zeigte sich die längste Strecke mit gewebegebundenem IgG sowohl im Vergleich zu den Rückenhautproben der behaarten WG, als auch verglichen mit der Länge der IgG-Bindung in anderen Körperstellen (Ohr, Schwanzhaut) [**** = ($p \leq 0,0001$), One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test] [64].

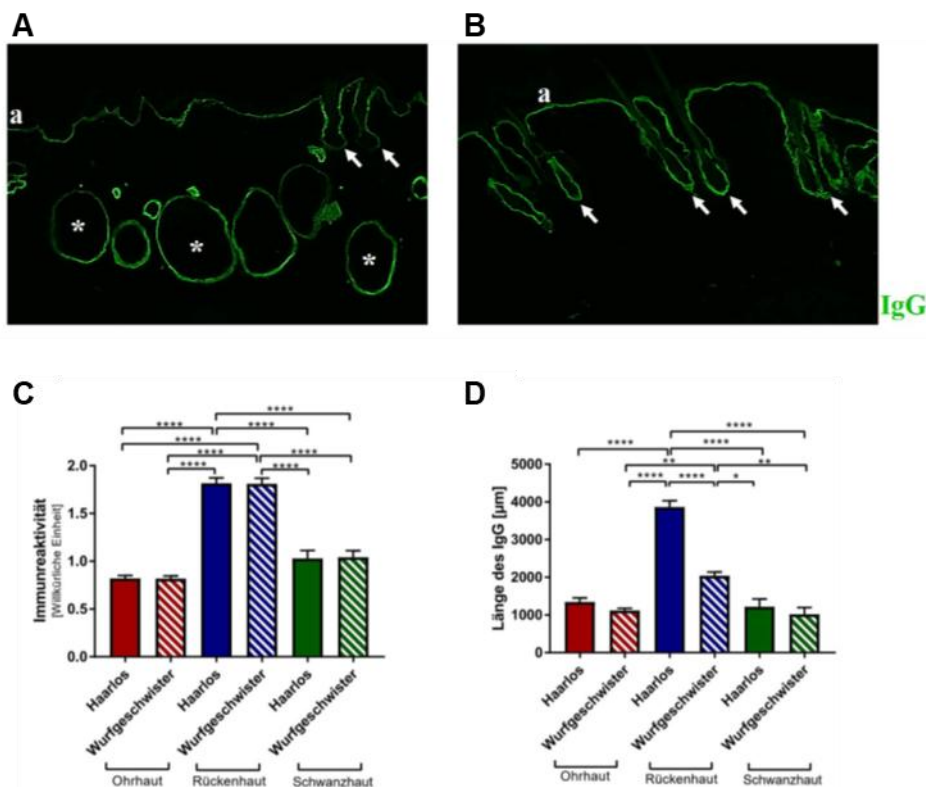


Abbildung 3.8: Immunreaktivität und Länge des gebundenen Immunglobulin G in den *Hairless*-Mäusen und den behaarten Wurfgeschwister

(Abbildung und Beschreibung nach: Alten, I (2019) *Die Rolle des Haarfollikels in der Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita in Hairless-Mäusen* (Bachelorarbeit), S. 29 ff. und Abbildung 4.3 und 4.4)

Immunglobulin G (IgG)-Anlagerung (grünes Signal) an der Epidermis (a), an den Zysten (*) und den Residuen der Haarfollikel (HF, Pfeile) der *Hairless*-Mäuse (A) und an der Epidermis und den HF der behaarten Wurfgeschwister (B).

Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Messung der Immunreaktivität (C) und der Länge des gebundenen pathogenen anti-mCol7c-IgG (D) [µm]. Die durchschnittlichen Werte aus mehreren Aufnahmen sind als Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) gezeigt. * = ($p \leq 0,05$), ** = ($p \leq 0,01$), **** = ($p \leq 0,0001$), One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test).

3.1.6 Die Anzahl an Endothelzellen ist in den *Hairless*-Mäusen signifikant geringer

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für PECAM-1 und das gewebegebundene anti-mCol7c IgG erfolgte, wie in Abschnitt 4.2.6.6 beschrieben, in mehreren Schritten. Die mikroskopische und statistische Auswertung erfolgte verblindet durch Frau Inka Alten im Rahmen ihrer Bachelorarbeit, die durch Ayleen Fokuhl (in der Anfangsphase) mitbetreut wurde [64].

Frau Inka Alten wertete die angefertigten Bildaufnahmen der unterschiedlichen Gewebeproben (Rückenhaut, Ohr, Schwanzhaut) zunächst hinsichtlich der Immunreaktivität (Fluoreszenzintensität) für PECAM-1, was dem roten Signal entspricht, vergleichend aus. Analog zu der Auswertung der Immunreaktivität des gewebegebundenen IgG zeigte sich die höchste Immunreaktivität in den Rückenhautproben, sowohl der *Hairless*-Mäuse als auch der behaarten WG (siehe **Abbildung 3.9**). Die Immunreaktivität von PECAM-1 war in den Proben der Rückenhaut der *Hairless*-Mäuse tendenziell höher als in den Proben der behaarten WG [64].

Darüber hinaus erfolgte die Auswertung hinsichtlich positiv gefärbter Zellen für PECAM-1, die Endothelzellen entsprechen. Hierbei wurden die Einzelzellen pro Bild der Tiere erfasst und zusätzlich die Gefäßlumina gezählt. Im Ergebnis fanden sich in der Rückenhaut der behaarten WG signifikant mehr Zellen als in der Rückenhaut der *Hairless*-Mäuse (siehe **Abbildung 3.9, C**) [64]. Bezüglich der PECAM-1 exprimierenden Gefäßlumina ergaben sich bei der Auswertung weder wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gewebeproben aller Mäuse noch zwischen *Hairless*-Mäusen und behaarten WG (siehe **Abbildung 3.9, D**). Tendenziell konnte, insbesondere um die Zysten herum, eine höhere Anzahl Lumina in den *Hairless*-Mäusen gesehen werden [64].

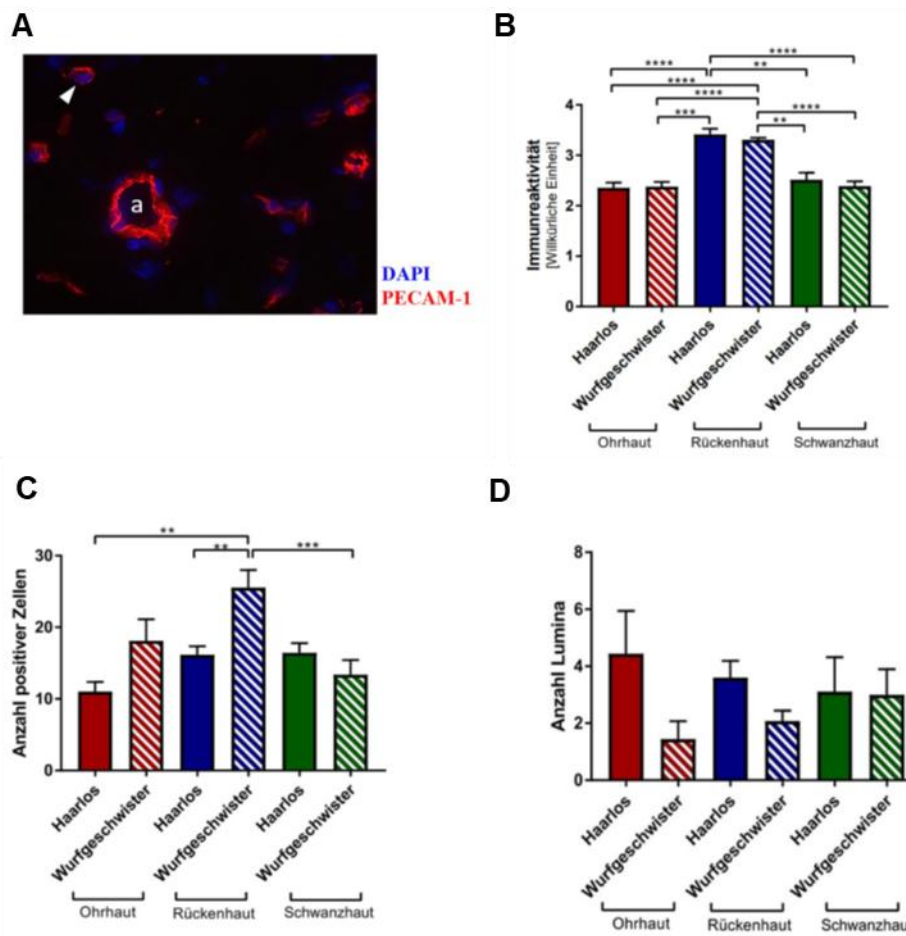


Abbildung 3.9: Anzahl der Endothelzellen und vaskulären Lumina in *Hairless*-Mäusen

(Abbildung und Beschreibung nach: Alten, I (2019) *Die Rolle des Haarfollikels in der Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita in Hairless-Mäusen* (Bachelorarbeit), S. 33 ff. und Abbildung 4.7 und 4.8)

DAPI = 4,6-Diamidin-2-phenylindol; PECAM-1 = *Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*

Exemplarische Darstellung eines Gefäßlumens (a) und einer PECAM-1 exprimierenden Zelle (Pfeilspitze) in der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für *Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) und Immunglobulin G (IgG) in läsionaler Rückenhaut einer *Hairless*-Maus (A).

Statistische Auswertung der Ergebnisse der Immunreaktivität (B) der mit pathogenem (anti-mCol7c)-IgG behandelten Mäuse. Die durchschnittlichen Werte sind als Mittelwerte + Standardfehler (SEM) gezeigt. ** = ($p \leq 0,01$), *** = ($p \leq 0,001$), **** = ($p \leq 0,0001$), One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test (B).

Ergebnisse der Auswertung der PECAM-1 positiven Zellen (C) und der vaskulären Lumina (D) der mit pathogenem IgG behandelten Mäuse (Epidermolysis bullosa acquisita-Gruppen). Angegeben sind die durchschnittlichen Werte als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

** = ($p \leq 0,01$), *** = ($p \leq 0,001$), One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test.

3.2 B6.C_G-Foxn1^{nu}/J – *Nude*-Mäuse

Die Auswertung der Ergebnisse der durchgeführten Versuche an den *Nude*-Mäusen erfolgte teilweise verblindet im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Birte Hell. Die Arbeit von Birte Hell wurde durch Frau Ayleen Fokuhl mitbetreut [65].

3.2.1 *Nude*-Mäuse zeigen einen signifikant niedrigeren *Clinical Score* als die behaarten Wurfgeschwister

Die *Nude*-Mäuse und die behaarten WG entwickelten nach intraperitonealer Injektion von einer Kumulativdosis von 600 µg pathogenem anti-mCOL7c-IgG EBA-typische Symptome in Form von Hautläsionen und Krusten als Zeichen der kutanen Entzündung.

Bereits an Tag 4 konnten erste Entzündungszeichen an der Haut der Mäuse in Form von Krusten an den Ohren (behaarte WG) und an den Pfoten (*Nude*-Mäuse) gesehen werden. Die Mäuse der EBA-Gruppen, denen pathogenes anti-mCol7c-IgG injiziert wurde, zeigten über die Zeit vermehrt Läsionen, die sich über den Körperstamm und den Schwanz erstreckten. Die Symptomzunahme war bei den *Nude*-Mäusen geringer ausgeprägt als bei den behaarten WG (siehe **Abbildung 3.10**).

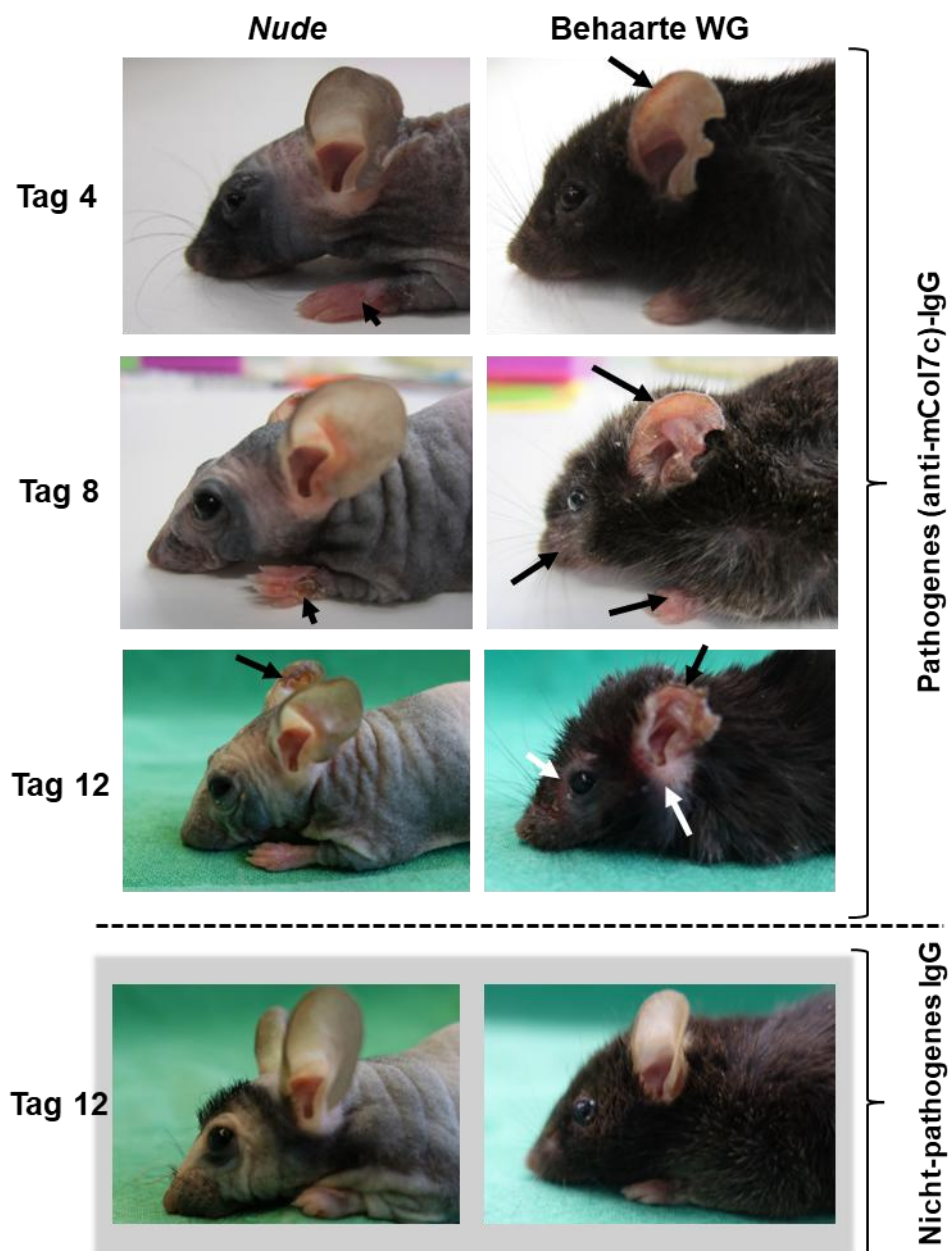


Abbildung 3.10: Klinische Manifestation der Epidermolysis bullosa acquisita in den *Nude*-Mäusen und den behaarten Wurfgeschwistern

Exemplarische Darstellung der klinischen Symptome der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) im Bereich des Kopfes und der Ohren nach Injektion von pathogenem (anti-mCol7c) Immunglobulin G (IgG) an Tag 4, 8 und 12. Vergleichend exemplarische Bilder der Kontrollgruppen nach Injektion von nicht-pathogenem IgG an Tag 12 (grau hinterlegt). Läsionen sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Ausführliche Darstellung der Läsionen an den Ohren und an ausgewählten Körperregionen im Anhang.

Die *Nude*-Mäuse und die behaarten WG entwickelten nach Injektion von pathogenem IgG typische Symptome der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Bereits an Tag 4 konnten erste Entzündungszeichen in Form von Krusten an den Ohren (behaarte WG) und an den Pfoten (*Nude*-Mäuse) gesehen werden. Die Mäuse der EBA-Gruppen, denen pathogenes IgG injiziert wurde, zeigten über die Zeit vermehrt Läsionen, die sich über den Körperstamm und den Schwanz erstreckten. Die Symptomzunahme war bei den *Nude*-Mäusen geringer ausgeprägt als bei den behaarten WG. Am Ende des Versuches war im Mittel 5% der Körperoberfläche der *Nude*-Mäuse von Läsionen betroffen, bei den behaarten WG betrug die betroffene Körperoberfläche bis zu 15%. Mäuse, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, wiesen zu keinem Zeitpunkt sichtbare Läsionen an der Körperoberfläche auf.

Bis zu 15% der Körperoberfläche der behaarten WG wies am Versuchsende makroskopische Zeichen der Entzündung auf. Im Versuchsverlauf nahm die von Läsionen betroffene Körperoberfläche der behaarten WG von ca. 0,9% (Tag 4), über etwa 8,5% (Tag 8) bis zu etwa 15% (Tag 12) zu. Einzelne behaarte WG entwickelten im Versuchsverlauf an bis zu maximal 16% der Körperoberfläche EBA-typische Läsionen. *Nude*-Mäuse zeigten zum Versuchsende einen signifikant geringeren *Clinical Score* als die behaarten WG (siehe **Abbildung 3.11**). Am Ende des Versuches (Tag 12) war im Mittel 4,8% der Körperoberfläche der *Nude*-Mäuse von Läsionen betroffen. Eine Zunahme der betroffenen Körperoberfläche von durchschnittlich etwa 2,1% (Tag 4), über ca. 4,3% (Tag 8) bis auf 4,8% (Tag 12) konnte in *Nude*-Mäusen gesehen werden. Einzelne *Nude*-Mäuse entwickelten an bis zu etwa 11,8% der Körperoberfläche Läsionen, wohingegen wiederum einzelne Tiere im Verlauf nur vereinzelt Läsionen an den Ohren, den Pfoten, oder am Schwanz, die zum Versuchsende makroskopisch nicht mehr nachweisbar waren, aufwiesen. Eine Übersicht der Läsionen an den Ohren und an einzelnen Körperregionen von ausgewählten Versuchstieren befindet sich im Anhang.

Mäuse, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, wiesen zu keinem Zeitpunkt sichtbare Läsionen an der Körperoberfläche auf.

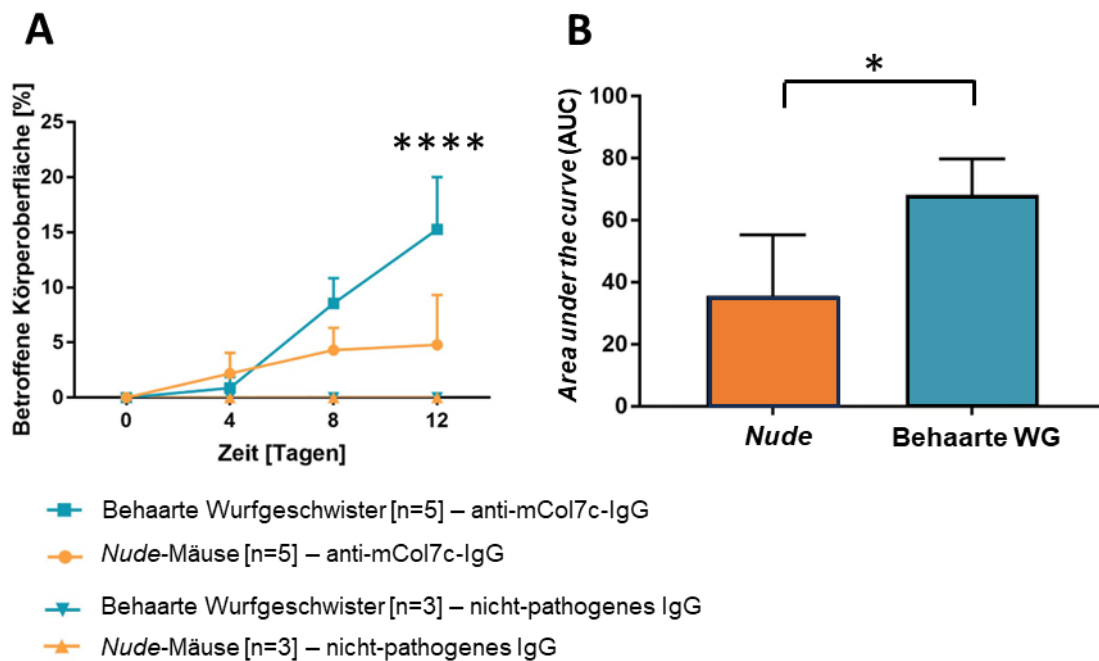


Abbildung 3.11: Clinical Score der Nude-Mäuse im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern

Anti-mCol7c-IgG = pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG).

(A) Grafische Darstellung des *Clinical Score* (von Läsionen betroffene Körperoberfläche) [%] der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) an den Tagen 0, 4, 8 und 12 von allen Mäusen, denen pathogenes (anti-mCol7c) Immunglobulin G (IgG) injiziert wurde. Dargestellt sind die durchschnittlichen Werte pro Gruppe als Mittelwert und Standardfehler (SEM). **** = ($p \leq 0,0001$), Two-Way-ANOVA mit Sidak's multiplum Post-Hoc-Test [Vergleich zwischen *Nude*-Mäusen ($n=5$) und behaarten WG ($n=5$)]. In den Kontrollgruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, war der *Clinical Score* im gesamten Versuchsverlauf bei 0 (*Nude*-Mäuse und behaarte WG, jeweils $n = 3$).

(B) Im Vergleich der Gruppen, denen anti-mCol7c-IgG verabreicht wurde, ergab sich bei der *Area under the Curve* (AUC) des *Clinical Score* ein signifikanter Unterschied [$* = (p = 0,0127)$, unverbundener T-Test] zwischen den *Nude*-Mäusen und den behaarten WG.

Die anschließende histologische Auswertung der Proben aus verschiedenen Hautarealen (Rücken, Ohr und Schwanz) zeigte Wundschorfbildung, Entzündungszellinfiltrate und subepidermale Spaltbildung in läSIONALen Hautproben der Mäuse, denen pathogenes IgG injiziert wurde (**Abbildung 3.12 und Anhang**). Diese histologischen Veränderungen sind EBA-spezifisch und kennzeichnen das Antikörpertransfer induzierte Mausmodell [44, 45].

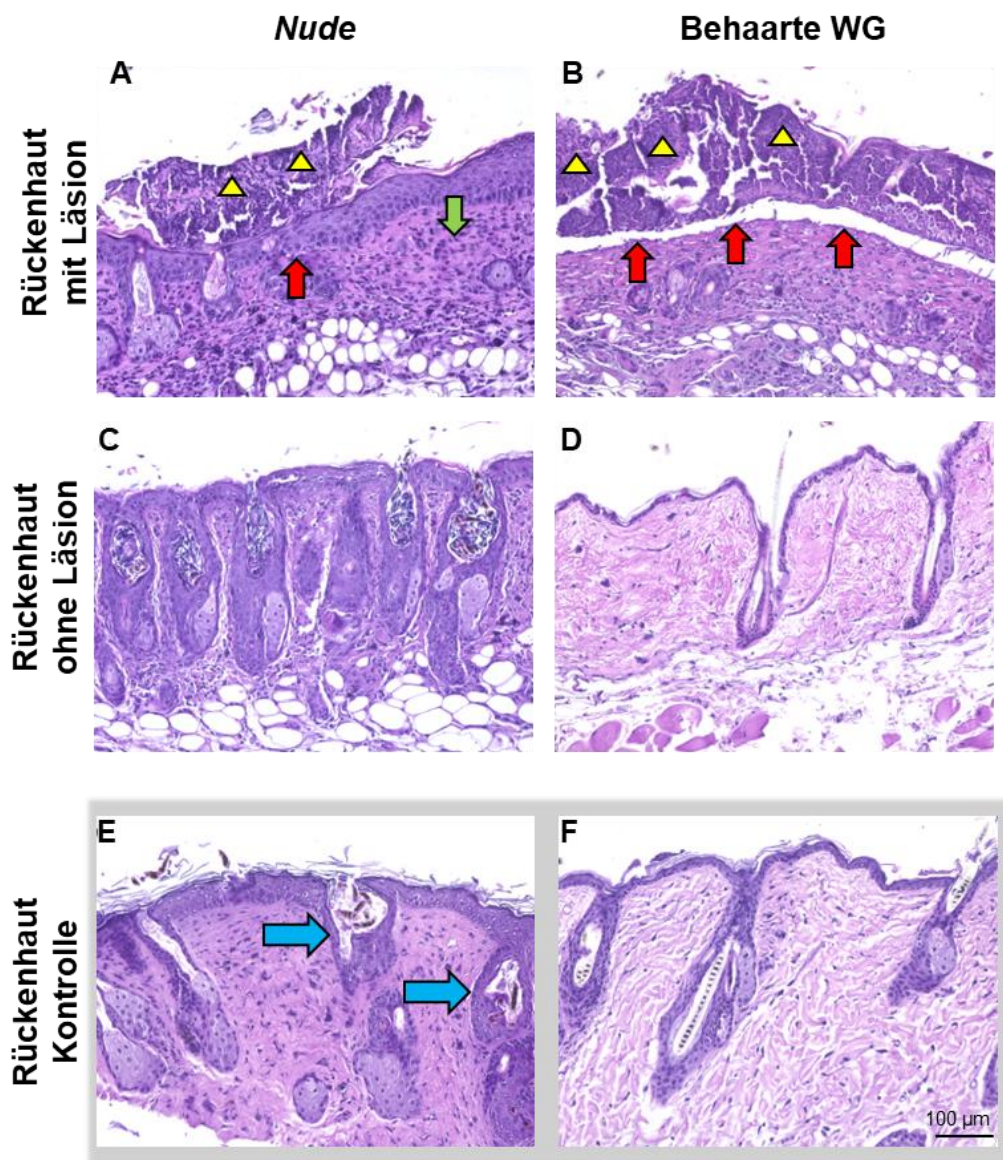


Abbildung 3.12: Histologische Morphologie bei Antikörpertransfer induzierter Epidermolysis bullosa acquisita in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister in der Hämatoxylin und Eosin-Färbung

Dargestellt sind eine Auswahl der mit Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Rückenhautproben der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG). Die Aufnahmen wurden durch Frau Birte Hell und Frau Friederike Bohne gefertigt. Abgebildet sind oben Bilder der läSIONalen und nicht läSIONalen Hautproben von den Gruppen, die mit pathogenen (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) behandelt wurden (**A, B, C, D**), unten die Bilder der Kontrollgruppen (grau hinterlegt, **E, F**). Die Spaltbildung in der dermo-epidermalen Junctionszone (rote Pfeile), die Entzündungszellinfiltrate (migrierte neutrophile Granulozyten) (grüne Pfeile) und die Wundschorfbildung (gelbe Dreiecke) in den läSIONalen Bildern sind exemplarisch

markiert. Die für *Nude*-Mäuse typischen Veränderungen des Haarschaftes (blaue Pfeile) sind in der Kontrollgruppe gekennzeichnet. Ergänzende Abbildungen der histologischen Veränderungen an anderen Lokalisationen (Ohr und Schwanz) siehe Anhang.

Diese EBA-typischen histomorphologischen Veränderungen sind sowohl in den läsionalen Hautproben der *Nude*-Mäuse als auch in den läsionalen Hautproben der behaarten WG, denen pathogenes IgG verabreicht wurde, nachzuvollziehen. Die Mäuse, denen nicht pathogenes IgG injiziert wurde, zeigten weder makroskopisch noch mikroskopisch sichtbare Krankheitszeichen.

Mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung konnte in den Hautproben der *Nude*-Mäuse und der behaarten WG nachgewiesen werden, dass das injizierte anti-mCol7c-IgG an der DEJ gebunden hat und, dass es zu einer Anlagerung des C3 an der Basalmembran (siehe **Abbildung 3.13 und Anhang**) als Zeichen der Entzündungsreaktion in der Haut der Mäuse gekommen ist. Die nachgewiesene Antikörperbindung an das Ziel-Antigen (Col7) und der Nachweis der Aktivierung des Komplementsystems durch C3 sind spezifische histomorphologische Zeichen der erfolgreichen Induktion der experimentellen EBA in *Nude*-Mäusen.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass in dieser experimentellen Studie die EBA durch Antikörpertransfer in *Nude*-Mäusen erfolgreich induziert wurde.

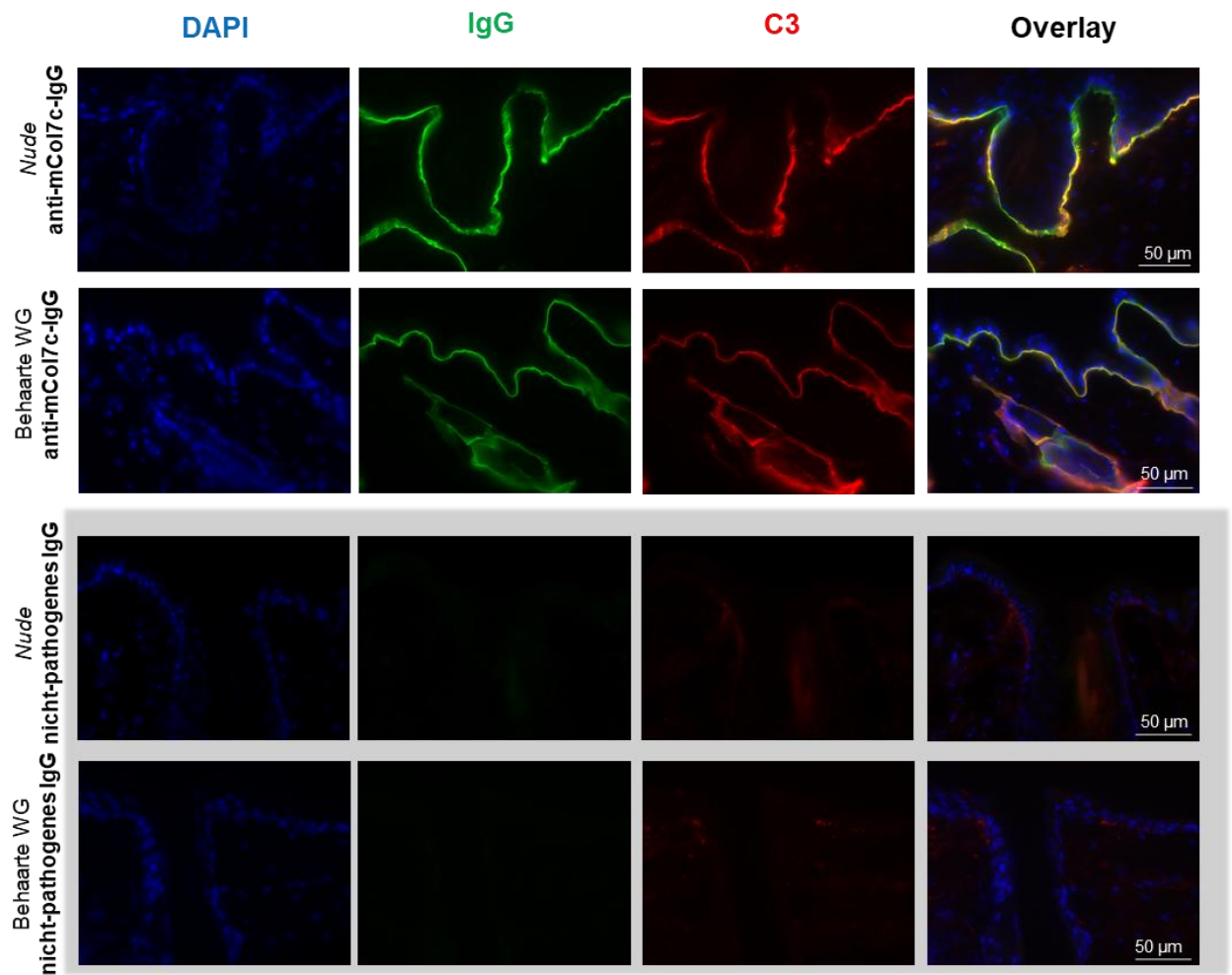


Abbildung 3.13: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für pathogenes anti-mCol7c-Immunglobulin G und Komplementfaktor 3 in Rückenhaut von *Nude*-Mäusen

Anti-mCol7c-IgG = pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG); C3 = Komplementfaktor 3; DAPI = 4,6-Diamidin-2-phenylindol; IgG = Immunglobulin G.

Für diese Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden die aus den Gewebeproben erstellten Gefrierschnitte auf Raumtemperatur gebracht und dann in Aceton fixiert. Zur Minderung der unspezifischen Bindung der verwendeten Sekundärantikörper wurde jeder Schnitt mit 10%-igem Ziegennormalserum (ZNS) inkubiert. Die Schnitte wurden entweder direkt mit dem Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-C3) oder mit einer Lösung aus 2% ZNS in PBS (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper, nicht dargestellt) in einer humiden Dunkelkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte auf allen Schnitten nacheinander zuerst eine Inkubation mit der ersten Sekundärantikörperlösung (Rhodamingekoppeltes Ziege-anti-Ratten-IgG, Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis von C3 und im Anschluss mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (*Fluorescein-Isothiocyanat* (FITC)-

gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis des gewebegebundenen IgG. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten mehrere Waschschriffe der Präparate mit PBS 1x (*phosphate buffered saline*, PBS). Abschließend wurden die Schnitte mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount G als Hintergrundfärbung eingedeckt.

In der Immunfluoreszenzfärbung ist in den Epidermolysis bullosa acquisita-Gruppen eine Bindung von pathogenem anti-mCol7c-Immunglobulin G (IgG) (grün) an die Basalmembran der Rückenhaul der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) erkennbar. Darüber hinaus ist die Bindung von C3 (rot) an die Basalmembran der Epidermis zu erkennen. Im Overlay ergibt sich aufgrund der Doppelfärbung eine orange-gelbe, der Basalmembran folgendes Fluoreszenzsignal in der Haut der Mäuse, denen pathogenes IgG injiziert wurde. In den Gruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (grau hinterlegt), erkennt man weder eine Anlagerung von Antikörpern noch von C3 entlang der Basalmembran.

3.2.2 Die Oberflächentemperatur von *Nude*-Mäusen in Narkose ist signifikant höher als die von behaarten Wurfgeschwistern

Zur Klärung der Frage, ob die Nacktheit bzw. der fehlende isolierende Effekt des Fells bei den *Nude*-Mäusen einen möglichen Einfluss auf die Ausprägung der induzierten EBA hat, wurde mittels Infrarotthermografie die oberflächliche Körpertemperatur gemessen. Aus den gefertigten Bildern wurden nur scharfe Bilder, bei denen das Zentrum des Fadenkreuzes auf einer Maus lag in die weitere Auswertung eingeschlossen. Die thermografischen Messungen erfolgten bei den *Nude*-Mäusen und den behaarten WG in Narkose während des Scorings der Tiere. Um eine Beeinflussung der Körpertemperatur durch die Narkose und die damit einhergehende Auswirkung auf die Thermoregulation und den Kreislauf möglichst gering zu halten, wurden die Messungen unmittelbar nach Wirkungseintritt der Narkose durchgeführt.

In die Auswertung eingeschlossen wurden so 25 Messungen an 8 *Nude*-Mäusen und 32 Messungen an 8 behaarten WG. Die erhobenen Messwerte wurden anschließend untereinander verglichen. Die Infrarotkamera wurde zur Messung auf den Emissionskoeffizienten für menschliche Haut ($\epsilon=0,98$) eingestellt.

Im Vergleich der oberflächlichen Körpertemperatur der *Nude*-Mäuse zur Temperatur an der Oberfläche behaarter WG zeigte sich hierbei eine signifikant

höhere Körpertemperatur an der Haut der *Nude*-Mäuse im Vergleich zur Oberfläche (Fell) der behaarten WG (siehe **Abbildung 3.14**). Die oberflächliche Körpertemperatur der *Nude*-Mäuse betrug im Mittel 35,5 °C (n = 25 Messungen an 8 *Nude*-Mäusen), die der behaarten WG 30,9 °C (n = 32 Messungen an 8 behaarten WG).

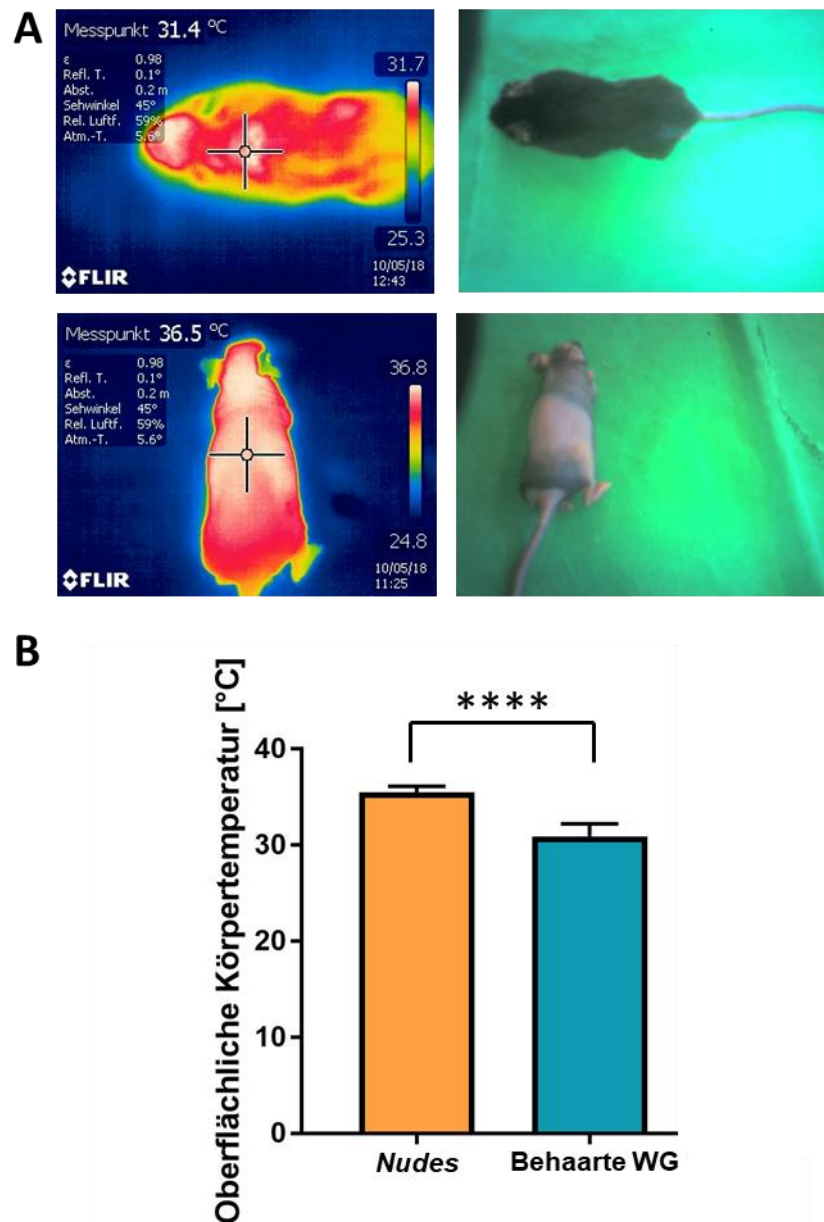


Abbildung 3.14: Thermografische Messungen an der Oberfläche von *Nude*-Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern in Narkose

(A) Exemplarische Darstellung repräsentativer Aufnahmen der thermografischen Messungen der *Nude*-Mäuse und der behaarten

Wurfgeschwister (behaarte WG) in Narkose. Links die Thermografie-Bilder, rechts der Ausschnitt der parallel durch die Kamera gefertigten Lichtbilder. Durch minimalen zeitlichen Versatz der Aufnahmen bei der Anfertigung (technisch bedingt) sind die gezeigten Bildsequenzen nicht ganz deckungsgleich. In den Infrarot-Bildern ist eine Wärmeskala (rechter Bildrand) und ein Fadenkreuz erkennbar. Die Wärmeskala orientiert sich an den im Bildausschnitt befindlichen Objekten und der daran gemessenen Temperatur. Dunklere, blaue Farbtöne (unterer Bereich) stellen hierbei niedrigere Temperaturen und hellere, rote bis weiße Farbtöne höhere Temperaturen dar. Weiß kennzeichnet die wärmsten Stellen. Die Zahlen geben an der Skala den obersten und untersten Messwert an. Die in Zahlen dargestellte Temperatur am linken oberen Bildrand entspricht der gemessenen Temperatur im Zentrum des Fadenkreuzes (Fokus der Infrarotmessung).

(B) Im Vergleich der *Nude*-Mäuse (n = 25 Messungen an 8 Tieren) zu den behaarten WG (n = 32 Messungen an 8 Tieren) ergab sich eine signifikant höhere Temperatur an der Oberfläche der *Nude*-Mäuse im Vergleich zu der Oberfläche (Fell) der behaarten WG [**** = (p < 0,0001), unverbundener T-Test, Messwerte des Kollektivs normalverteilt (D'Agostino & Pearson Normality Test)].

Um den Effekt der Isolierung, bedingt durch das Fell, beurteilen zu können, wurden ergänzende Messungen an im Rahmen des Scorings rasierten Hautstellen von behaarten WG in Narkose durchgeführt (n = 11 Messungen an 5 Tieren). Die Infrarotkamera wurde für alle Messungen auf den Emissionskoeffizienten für menschliche Haut ($\epsilon = 0,98$) eingestellt.

Im Vergleich der oberflächlichen Körpertemperatur am Rücken der *Nude*-Mäuse zu der oberflächlichen Temperatur an der rasierten Hautstelle der behaarten WG konnte eine signifikant höhere oberflächliche Körpertemperatur auf der Haut der *Nude*-Mäuse festgestellt werden (siehe **Abbildung 3.15**). In Narkose betrug die oberflächliche Körpertemperatur der *Nude*-Mäuse im Mittel 35,5 °C (n = 25 Messungen an 8 Tieren), die an der rasierten Hautstelle der behaarten WG im Durchschnitt 34,0 °C (n = 11 Messungen an 5 Tieren).

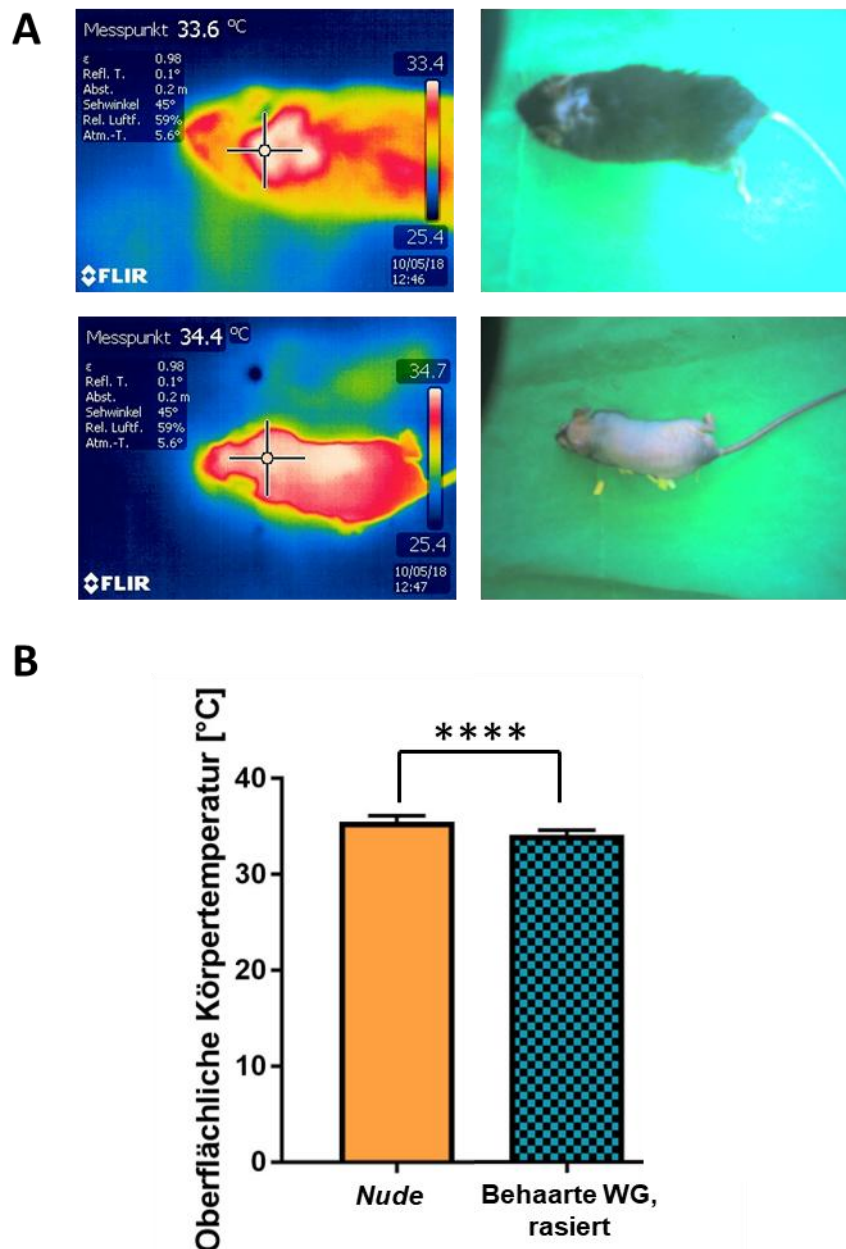


Abbildung 3.15: Thermografische Messungen an der Oberfläche von *Nude*-Mäusen im Vergleich zu rasierten behaarten Wurfgeschwistern in Narkose

(A) Exemplarische Darstellung repräsentativer Aufnahmen der thermografischen Messungen an der Oberfläche von *Nude*-Mäusen und einer rasierten Hautstelle der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) in Narkose. Links die Thermografie-Bilder, rechts der Ausschnitt der parallel durch die Kamera gefertigten Lichtbilder. Durch minimalen zeitlichen Versatz der Aufnahmen bei der Anfertigung (technisch bedingt) kann es zu geringen Unterschieden

in der Bildsequenz kommen. In den Infrarot-Bildern ist eine Wärmeskala (rechter Bildrand) und ein Fadenkreuz erkennbar. Die Wärmeskala orientiert sich an den im Bildausschnitt befindlichen Objekten und der daran gemessenen Temperatur. Dunklere, blaue Farbtöne (unterer Bereich) stellen hierbei niedrigere Temperaturen und hellere, rote bis weiße Farbtöne höhere Temperaturen dar. Weiß kennzeichnet die wärmsten Stellen. Die Zahlen geben an der Skala den obersten und untersten Messwert an. Die in Zahlen dargestellte Temperatur am linken oberen Bildrand entspricht der gemessenen Temperatur im Zentrum des Fadenkreuzes (Fokus der Infrarotmessung).

(B) Im Vergleich ergab sich eine signifikant höhere Temperatur an der Körperoberfläche der *Nude*-Mäuse (n = 25 Messungen an 8 Tieren) im Vergleich zu der rasierten Hautstelle der behaarten WG (n = 11 Messungen an 5 Tieren). **** = ($p < 0,0001$), unverbundener T-Test. Die Messwerte des Kollektivs waren normalverteilt (D'Agostino & Pearson Normality Test),

3.2.3 Die oberflächliche Körpertemperatur der *Nude*-Mäuse ist im Vergleich zu der behaarter Wurfgeschwister signifikant niedriger

Vor Versuchsende wurden thermografische Messungen an der Oberfläche (Fell) behaarter WG (n = 12 Messungen an 8 Tieren) und der *Nude*-Mäuse (n = 19 Messungen an 8 Tieren) ohne Narkose durchgeführt (siehe **Abbildung 3.16**). Im Ergebnis zeigte sich hier eine durchschnittliche Temperatur an der Oberfläche der *Nude*-Mäuse von 36,4 °C und 31,1 °C bei den behaarten WG .

Die Rasur einer Hautstelle am Rücken mit nachfolgender Thermografie der behaarten WG erfolgte im Scoring am letzten Versuchstag (Tag 12) in Narkose. Im Anschluss an dieses Scoring erfolgte die tierschutzgerechte Tötung der Versuchstiere, sodass keine thermografische Messung an der rasierten Hautstelle der behaarten WG ohne Narkose erfolgen konnte.

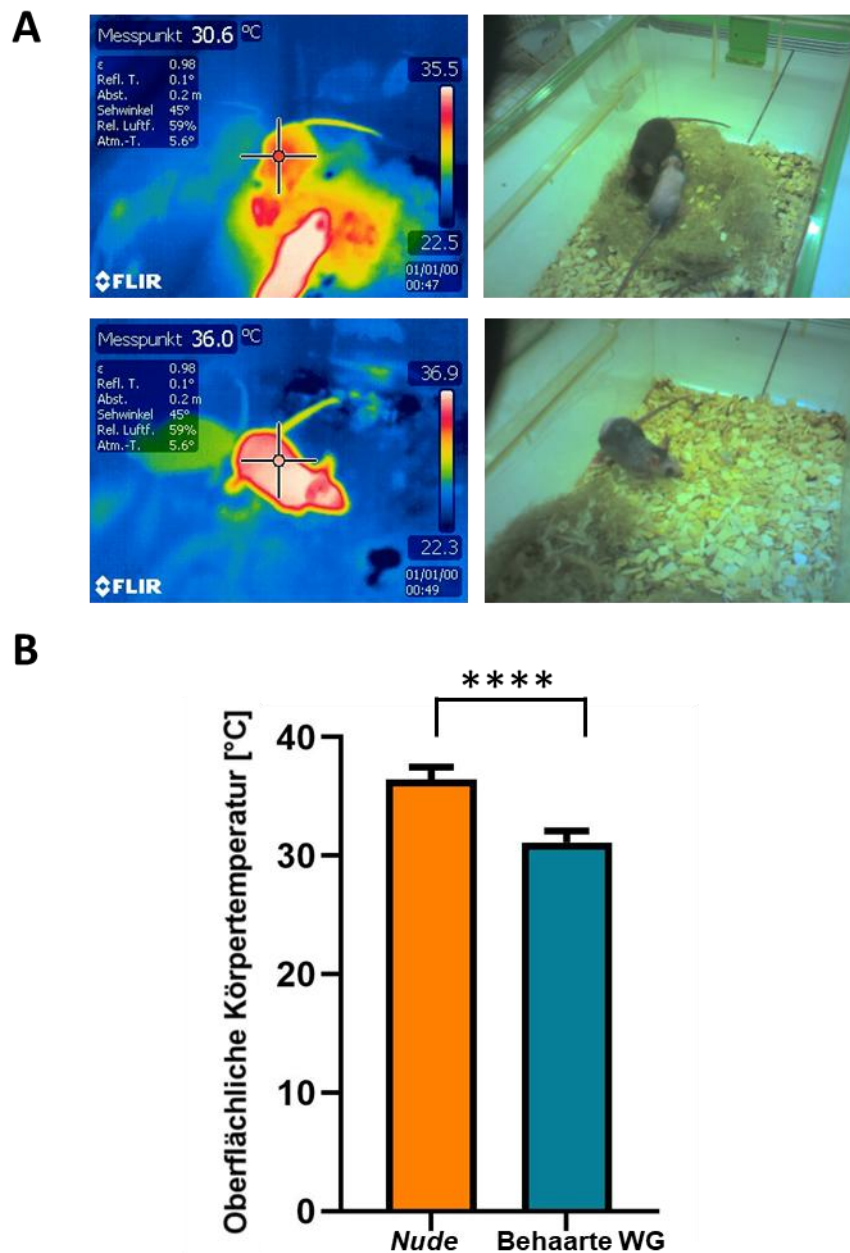


Abbildung 3.16: Thermografische Messungen an der Oberfläche von *Nude*-Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern ohne Narkose

(A) Exemplarische Darstellung repräsentativer Aufnahmen der thermografischen Messungen an der Oberfläche von *Nude*-Mäusen und behaarten Wurfgeschwistern (behaarte WG) ohne Narkose. Links die Thermografie-Bilder, rechts der Ausschnitt der parallel durch die Kamera gefertigten Lichtbilder. Durch minimalen zeitlichen Versatz der Aufnahmen bei der Anfertigung (technisch bedingt) kann es zu geringen Unterschieden in der Bildsequenz kommen. In den Infrarot-Bildern ist eine Wärmeskala (rechter Bildrand) und ein Fadenkreuz erkennbar. Die Wärmeskala orientiert sich an den im

Bildausschnitt befindlichen Objekten und der daran gemessenen Temperatur. Dunklere, blaue Farbtöne (unterer Bereich) stellen hierbei niedrigere Temperaturen und hellere, rote bis weiße Farbtöne höhere Temperaturen dar. Weiß kennzeichnet die wärmsten Stellen. Die Zahlen geben an der Skala den obersten und untersten Messwert an. Die in Zahlen dargestellte Temperatur am linken oberen Bildrand entspricht der gemessenen Temperatur im Zentrum des Fadenkreuzes (Fokus der Infrarotmessung). An der Käfigwand erkennt man links eine thermografische Spiegelung der *Nude*-Maus im unteren linken Bild.

(B) Im Vergleich ergab sich eine signifikant höhere Temperatur an der Körperoberfläche der *Nude*-Mäuse ($n = 19$ Messungen an 8 Tieren) im Vergleich zu behaarten WG ($n = 12$ Messungen an 8 Tieren). **** = ($p < 0,0001$), unverbundener T-Test. Messwerte des Kollektivs normalverteilt (D'Agostino & Pearson Normality Test).

3.2.4 Die Epidermis von *Nude*-Mäusen ist signifikant dicker als die von behaarten Wurfgeschwistern

An HE-gefärbten Schnitten der Rückenhaut von *Nude*-Mäusen und behaarten WG wurde die mittlere Epidermisdicke bestimmt. Hierzu wurden pro Maus in 5-7 *Visual Fields* an jeweils 3 Stellen mittels ImageJ-Software die Höhe der Epidermis in μm gemessen und die erhobenen Messwerte anschließend statistisch ausgewertet (Schema zur Erstellung der *Visual Fields* siehe **Anhang**).

Im Ergebnis zeigte sich für die Messwerte der EBA-Gruppen, also der Tiere, denen pathogenes IgG injiziert wurde ein signifikanter Unterscheid zwischen der Epidermisdicke der *Nude*-Mäuse und der der behaarten WG [$** = (p = 0,0015$, unverbundener T-Test, Messwerte des Kollektivs normalverteilt nach Shapiro-Wilk Normality-Test) (siehe **Abbildung 3.17, A**). Zwischen den *Nude*-Mäusen und den behaarten WG, denn nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, konnte kein signifikanter Unterschied in der mittleren Epidermisdicke [$ns = (p = 0,075)$, unverbundener T-Test, Messwerte des Kollektivs normalverteilt nach Shapiro-Wilk Normality-Test) festgestellt werden (siehe **Abbildung 3.17, B**). Es zeigte sich hier eine Tendenz zu einer dickeren Epidermis der *Nude*-Mäuse.

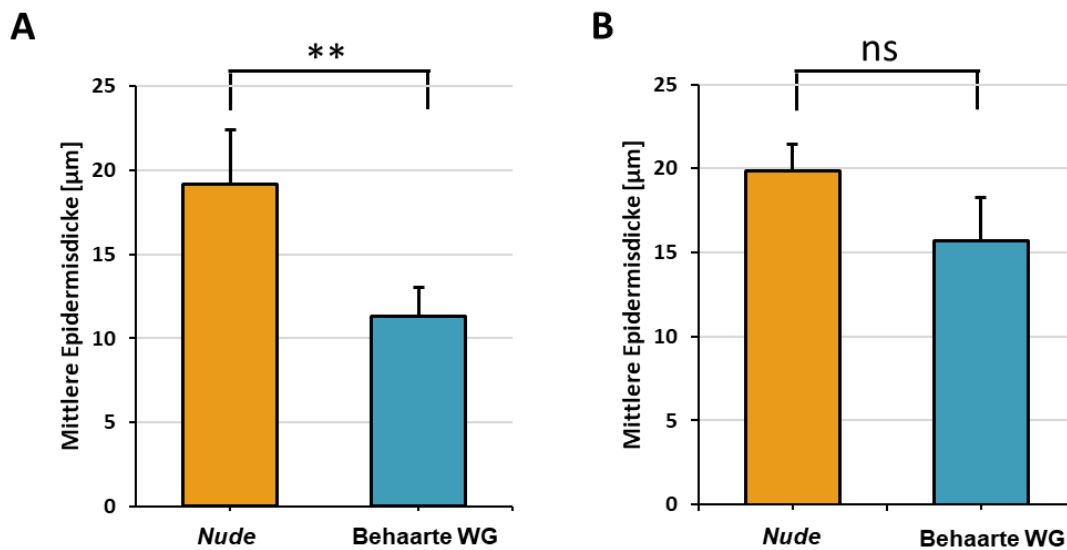


Abbildung 3.17: Statistische Auswertung der Epidermisdicke in *Nude*-Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern

Die Epidermis der *Nude*-Mäuse, denen pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) injiziert wurde (**A**) ist signifikant dicker als die der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) aus der Epidermolysis bullosa acquisita-Gruppe [****** = ($p = 0,0015$), unverbundener T-Test].

Im Vergleich der Epidermisdicke der *Nude*-Mäuse zu behaarten WG in den Versuchsgruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde ergibt sich kein signifikanter Unterschied, jedoch eine Tendenz zu einer dickeren Epidermis in *Nude*-Mäusen [**ns** = ($p = 0,075$), unverbundener T-Test].

3.2.5 In der Rückenhaut von *Nude*-Mäusen ist die Immunreaktivität und die Länge der an der Basalmembran gebundenen Antikörper tendenziell am höchsten

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit PECAM-1 und IgG (siehe Abschnitt 2.2.6.6) erfolgte verblindet im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Birte Hell, die durch Ayleen Fokuhl mitbetreut wurde. Als Korrelat der Immunreaktivität des gebundenen IgG in den Gruppen, denen pathogenes anti-mCol7c-IgG injiziert wurde, wurde die Fluoreszenzintensität an der Rückenhaut, der Schwanzhaut und den Ohren gemessen.

Birte Hell konnte in der Auswertung feststellen, dass die Immunreaktivität (bzw. Fluoreszenzintensität) des gebundenen IgG in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse am

höchsten war (siehe **Abbildung 3.18, A**). Die Immunreaktivität war unter Anwendung einer One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse signifikant erhöht im Vergleich zur Rückenhaut der behaarten WG [$* = (p < 0,05)$], im Vergleich der Ohrhaut, sowohl der *Nude*-Mäuse als auch der behaarten WG [$**** = (p < 0,0001)$] und gegenüber der Schwanzhaut der behaarten WG [$** = (p < 0,01)$] [65].

Zusätzlich zur Immunreaktivität wurde die Länge des gewebegebundenen IgG an der Basalmembran in den EBA-Gruppen gemessen. Im Ergebnis konnte Frau Birte Hell zeigen, dass die Länge des gewebegebundenen IgG in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse tendenziell höher als in den anderen Gewebeproben und in der Rückenhaut der behaarten WG war (siehe **Abbildung 3.18, B**). Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse und der Ohrhaut der behaarten WG gesehen werden [$* = (p < 0,05)$, One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test]. Tendenzuell waren bei den *Nude*-Mäusen und bei den behaarten WG sowohl die Werte der Immunreaktivität als auch die Länge des gewebegebundenen IgG an der Basalmembran in der Ohrhaut niedriger als in den anderen Gewebeproben [65].

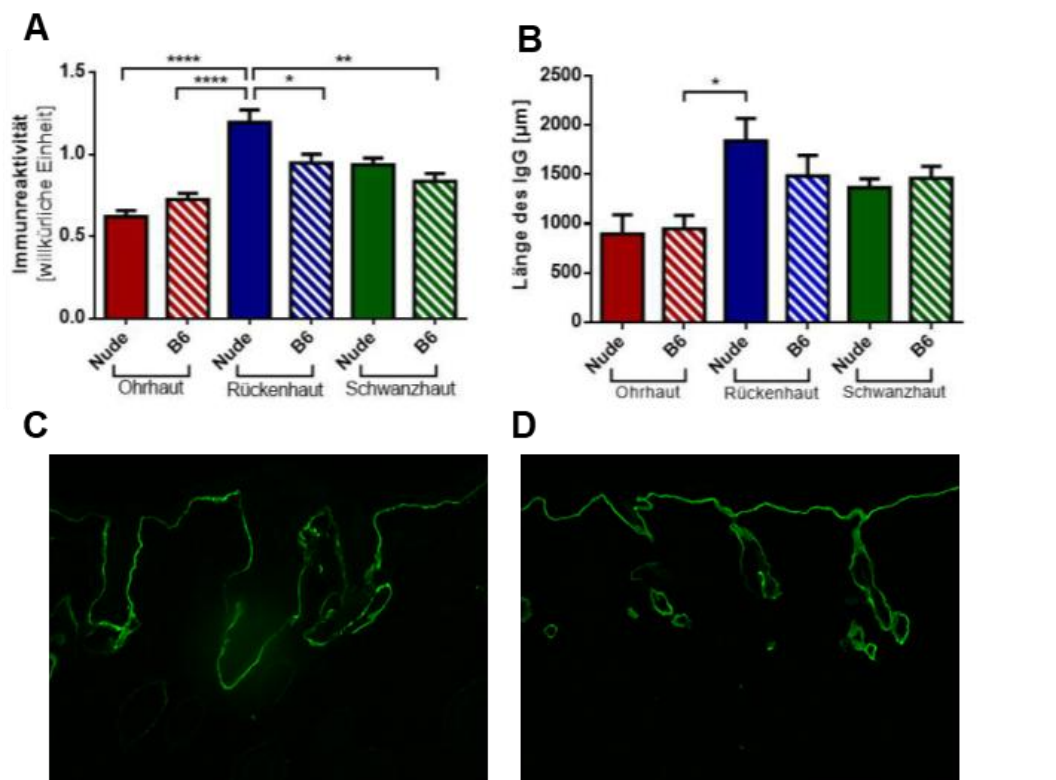


Abbildung 3.18: Immunreaktivität und Länge des gebundenen Immunglobulin G in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister

(Abbildung und Beschreibung nach: Hell, B (2019) *Untersuchung inflammatorischer Zytokine im Entzündungsverlauf der Epidermolysis bullosa acquisita in Foxn1^{nu/nu}-Mäusen*, S. 32 ff und Abbildung 4.7 und 4.8).

B6 = behaarte WG

Grafische Darstellung der statistischen Auswertung der Messung der Immunreaktivität (**A**) und der Länge des gewebegebundenen pathogenen (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) (**B**) [µm]. Die durchschnittlichen Werte aus mehreren Aufnahmen sind als Mittelwerte + SEM (Standardfehler) gezeigt. * = ($p < 0,05$), ** = ($p < 0,01$), **** = ($p < 0,0001$), One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test.

IgG-Anlagerung (grünes Signal) an der Basalmembran der *Nude*-Mäuse (**C**) und an der Epidermis und den Haarfollikeln der behaarten Wurfgeschwister (**D**). Die Immunfluoreszenzbilder in sind 200-facher Vergrößerung dargestellt.

3.2.6 Die Immunreaktivität des endothelialen Gefäßmarkers *Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1* ist in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse signifikant erhöht

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für PECAM-1 und das gewebegebundene anti-mCol7c-IgG erfolgte, wie in Abschnitt 4.2.6.6 beschrieben, in mehreren Schritten. Die mikroskopische und statistische Auswertung erfolgte verblindet durch Frau Birte Hell im Rahmen ihrer Bachelorarbeit, die durch Frau Ayleen Fokuhl mitbetreut wurde [65].

Die angefertigten Bildaufnahmen der unterschiedlichen Gewebeproben (Rückenhaut, Ohr, Schwanzhaut) der *Nude*-Mäuse und der behaarten WG erfolgte hinsichtlich der Immunreaktivität (Fluoreszenzintensität) für PECAM-1. Darüber hinaus wurde die Anzahl der PECAM-1 exprimierenden Zellen und vaskulären Lumina bestimmt.

Im Ergebnis konnte Frau Hell feststellen, dass die Immunreaktivität von PECAM-1 in der Rückenhaut gegenüber der Ohrhaut der *Nude*-Mäuse und der Schwanzhaut der behaarten WG signifikant erhöht war [$* = (p < 0,05)$, $** = (p < 0,01)$, One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test], dargestellt in **Abbildung 3.19, A**.

Die Bestimmung der Anzahl PECAM-1 exprimierender Zellen und der vaskulären Lumina ergab weder zwischen den *Nude*-Mäusen und den behaarten WG noch zwischen den Gewebeproben untereinander signifikante Unterschiede. In der Ohrhaut waren die Zellzahlen bei den *Nude*-Mäusen und den behaarten WG tendenziell höher als in den anderen Geweben (siehe **Abbildung 3.19, B**) ([65]).

Die Anzahl der Gefäßlumina war im Gegensatz dazu in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse tendenziell höher als in den anderen Gewebeproben. Die geringste Anzahl an Lumina konnte in den Proben der Ohrhaut der *Nude*-Mäuse und der behaarten WG gesehen werden (siehe **Abbildung 3.19, C**) [65].

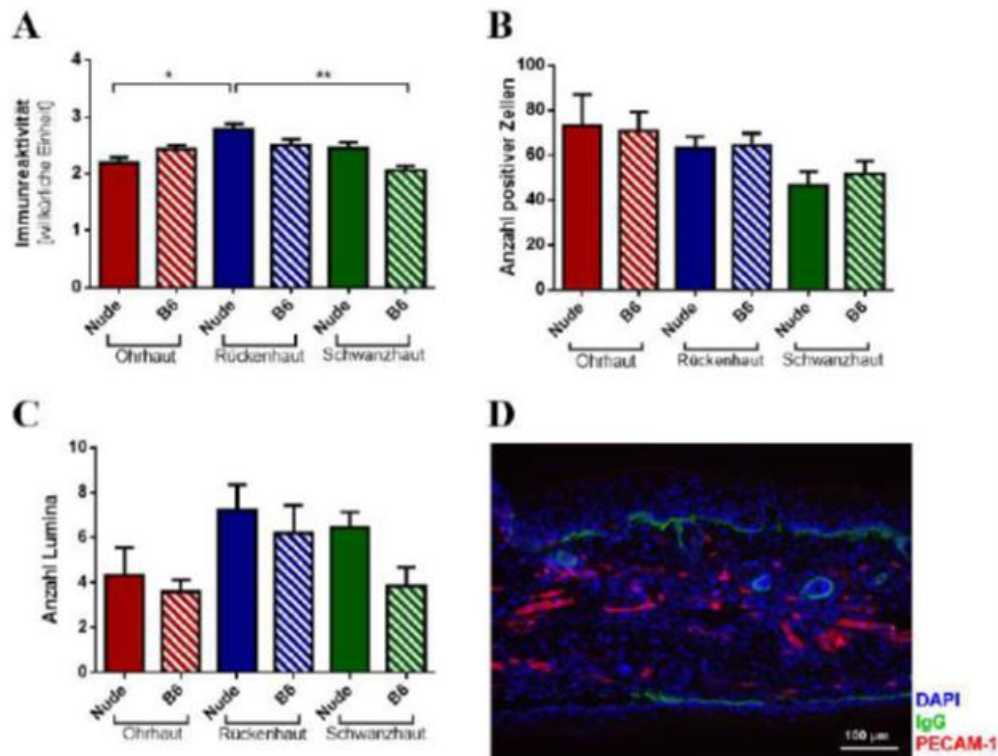


Abbildung 3.19: Immunreaktivität und Anzahl der exprimierenden Zellen von *Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1* und der vaskulären Lumina in *Nude*-Mäusen

(Abbildung aus und Beschreibung nach: Hell, B (2019) *Untersuchung inflammatorischer Zytokine im Entzündungsverlauf der Epidermolysis bullosa acquisita in Foxn1nu/nu-Mäusen*, S. 33 ff und Abbildung 4.8).

B6 = behaarte WG

Statistische Auswertung der erhobenen Daten der mit pathogenes anti-mCol7c-Immunglobulin G (IgG) immunisierten *Nude*-Mäuse ($n = 5$) und der behaarten Wurfgeschwister ($n = 5$). Ausgewertet wurden Proben der Rücken-, der Schwanz- und der Ohrhaut.

Durch Frau Hell wurde die Immunreaktivität des *Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1)-Signals (**A**) gemessen (hier in rot dargestellt). Außerdem wurden die PECAM-1-positiven Einzelzellen (**B**) und die Gefäßlumina (**C**) in den unterschiedlichen Gewebeproben ausgezählt. Die Auswertung erfolgte in mehreren *Visual Fields* (VF) pro Maus ($n = 9-33$ VF pro 5 Mäuse) der PECAM-1-IgG-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung. Messwerte dargestellt als Mittelwerte + SEM (Standardfehler). * = ($p < 0,05$), ** = ($p < 0,01$), One-Way-ANOVA mit Tukey's Post-Hoc-Test. In (**D**) ist exemplarisch eine Probe läSIONALER Ohrhaut einer mit pathogenem anti-mCol7c-IgG behandelten *Nude*-Maus abgebildet. In blau das Signal des 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), in grün das IgG-Signal und in rot das Immunfluoreszenz-Signal für PECAM-1.

4 DISKUSSION

Mit dem Ziel, die Rolle des HF in experimenteller EBA zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit EBA durch Antikörpertransfer in *Hairless*-Mäusen, in *Nude*-Mäusen und in deren behaarten WG durch intraperitoneale Injektion von pathogenem IgG induziert. Die Idee zu dieser Studie entstand, nachdem in *Nude*-Mäusen in diesem Mausmodell beobachtet wurde, dass Läsionen bevorzugt an Hautstellen auftraten, an denen HF in unterschiedlichen Phasen des Haarfollikelzyklus aneinandergrenzten. Eine Besonderheit des HF ist, dass er zu den immunprivilegierten Bereichen des Körpers [19] gehört, das heißt, dass er durch immunologische Mechanismen im Bereich der Bulbusregion vor autoaggressiven Immunreaktionen geschützt ist [17, 20]. Möglicherweise spielen also HF bei der Entstehung von Läsionen in EBA eine Rolle.

Die Pathogenese der (experimentellen) EBA ist gekennzeichnet durch eine durch Autoantikörper gegen Col7 ausgelöste Entzündungsreaktion [31, 33]. Vermittelt durch eine Aktivierung des Komplementsystems [66] und neutrophile Granulozyten [39, 66] kommt es an der DEJ zu Inflammation und durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und anderer gewebeschädigenden Komponenten, beispielsweise Proteasen, zu subepidermaler Spaltbildung [66, 28, 30].

Durch Antikörpertransfer konnte nach der Etablierung des Mausmodells durch Sitaru *et al.* und Woodley *et al.* bereits in zahlreichen Mausstämmen erfolgreich die experimentelle EBA induziert werden [39, 44, 56, 68, 69]. Ein gängiger und häufig verwendeter Mausstamm in der Forschung allgemein und für das EBA-Mausmodell ist die B6-Maus. Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse basieren auf dem genetischen Hintergrund einer B6-Maus [52].

Aufgrund eines Keratinisierungsdefektes wachsen die Haarschäfte bei den *Nude*-Mäusen nicht aus der Haut heraus [47, 48], weshalb sie phänotypisch nackt erscheinen. Anhand der sichtbaren Pigmentierung der Haut der *Nude*-Mäuse ist es möglich, die Phase des Haarfollikelzyklus, in der sich die HF befinden, zu unterscheiden [55]. *Nude*-Mäuse weisen aufgrund ihrer genetischen Eigenschaften (Mutation im *Foxn1*-Gen) neben der Keratinisierungsstörung eine fehlende

Ausbildung des Thymus auf [47], was eine reduzierte Anzahl an T-Zellen und damit eine Beeinflussung des Immunsystems zur Folge hat. In der Forschung werden *Nude*-Mäuse beispielsweise auf dem Gebiet der Tumorforschung unter anderem bei der Untersuchung der Tumorentstehung, von Chemotherapeutika oder in der Stammzellforschung [71] verwendet. Das Fehlen des Thymus ermöglicht hierbei den Einsatz von Transplantaten aus anderen Spezies (Xenografts) ohne Abstoßungsreaktionen [71]. In der dermatologischen Forschung werden *Nude*-Mäuse unter anderem in der Erforschung von Krankheiten der Hautanhangsgebilde [72] und der Wundheilungsforschung eingesetzt. Hier ist beschrieben, dass die Defizienz des Foxn1-Gens zu der Ausbildung eines proregenerativen Milieus führt [73].

Zur Definition der Rolle des HF sollten Mäuse gewählt werden, deren HF nicht dem Haarfollikelzyklus unterliegen. Die in dieser Studie verwendeten *Hairless*-Mäuse basieren ebenfalls auf dem genetischen Hintergrund von B6-Mäusen [49]. Die *Hairless*-Mutation kommt in mehreren Inzucht- und Auszucht-Mausstämmen vor, der bekannteste Vertreter der *Hairless*-Mäuse ist der Mausstamm SKH1 albino [74]. Die Mutation im *Hairless*-Gen führt dazu, dass die HF nach der Morphogenese nicht in den Haarfollikelzyklus eintreten [53]. Die HF degenerieren und es bleiben in der Haut der *Hairless*-Mäuse Residuen in Form von Utriculi und dermalen Zysten zurück (siehe **Abbildung 2.1**) [49, 51, 70]. Aufgrund der Mutation des *Hairless*-Allels kommt es zu Veränderungen des Immunsystems, beschrieben sind in der Literatur neben Veränderungen der Milz eine verminderte Proliferation von T-Zellen. Die Freisetzung von ROS sowie die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten sind nicht beeinträchtigt [74].

Aufgrund ihrer Eigenschaften werden *Hairless*-Mäuse in der dermatologischen und der immunologischen Forschung bevorzugt in Gebieten wie Wundheilung, UV-induzierte Hautschäden [75], der Erforschung von Alterungsprozessen der Haut und in der Tumorforschung eingesetzt [70, 72]. Die phänotypische Haarlosigkeit bietet hierbei den Vorteil, Veränderungen direkt, ohne den Einfluss von Fell, betrachten zu können.

Zur besseren Einordnung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde hier explizit ein *Hairless*-Mausstamm gewählt, der genetisch auf B6-Mäusen basiert. Neben der Mutation im *Hairless* Gen weist der hier verwendete Mausstamm eine zusätzliche Mutation des Albino-Allels (Tyr^{c-2J}) auf [49]. Um den Einfluss des Albino-Gens auf die Induktion der EBA im vorliegenden Fall möglichst gering zu halten, wurden behaarte WG, die sich von den *Hairless*-Mäusen lediglich in der Mutation des *Hairless*-Gens unterscheiden, verwendet.

In *Nude*-Mäusen wurde die EBA bereits durch Antikörpertransfer erfolgreich induziert (bisher unveröffentlicht). In vergangenen Studien wurde darüber hinaus erfolgreich durch passiven Antikörpertransfer die EBA in anderen haarlosen/nackten Mausstämmen, beispielsweise SKH1 und BALB/c *nude* induziert [44, 56]. In dieser Studie konnte in den verwendeten *Hairless*-Mäusen, die auf dem B6-Hintergrund beruhen, ebenfalls erfolgreich die EBA durch Antikörpertransfer induziert werden. In beiden Mausstämmen (*Nude* und *Hairless*) zeigten sich für die experimentelle EBA typische Läsionen an der Haut und histologisch eine Anlagerung von pathogenem IgG und C3 an der Basalmembran, was charakteristisch für das Mausmodell ist [44, 56, 76].

Der *Clinical Score* war in *Hairless*-Mäusen und in *Nude*-Mäusen signifikant niedriger im Vergleich zu behaarten WG.

In der Literatur ist beschrieben, dass in unterschiedlichen Mausstämmen variierende *Clinical Scores* beobachtet werden konnten. Für B6-Mäuse wurde eine maximal von Läsionen betroffene Körperoberfläche von 30% in einem Studienprotokoll über 20 Tage beschrieben. BALB/c Mäuse waren weniger stark betroffen [27]. Eine andere Studie dokumentierte für B6-Mäuse im Antikörpertransfer induzierten EBA-Mausmodell an Tag 12 eine von Läsionen betroffene Körperoberfläche von im Mittel ca. 10%, die im Versuchsverlauf stetig zunahm [70].

In den behaarten WG der *Nude*-Mäuse, die genetisch B6-Mäusen entsprechen, konnten in dieser Arbeit an Tag 12 des Versuches im Mittel eine von Läsionen betroffene Körperoberfläche von durchschnittlich 15% gesehen werden. Dieser

Wert gliedert sich in die Angaben aus der Literatur ein. Im Versuchsverlauf konnte eine stetige Zunahme der betroffenen Körperoberfläche beobachtet werden.

Nude-Mäuse zeigten ebenfalls über den Versuchsverlauf eine Zunahme der Läsionen, jedoch waren an Tag 12 im Mittel 4,8% der Körperoberfläche der *Nude*-Mäuse von Läsionen betroffen, was deutlich unter dem Wert der behaarten WG liegt. Anzumerken ist, dass einzelne *Nude*-Mäuse *Clinical Scores* von bis zu 11,8% im Versuchsverlauf entwickelten. Nach einer initial stärkeren Zunahme der Symptome, nahmen die Läsionen zwischen Tag 8 und 12 weniger stark zu.

In den *Hairless*-Mäusen nahm die von Läsionen betroffene Körperoberfläche bis zu Tag 8 auf im Durchschnitt 2% zu, bis zu Tag 12 war der *Clinical Score* im Mittel dann, entgegen der Beschreibungen des Antikörpertransfer induzierten EBA-Mausmodells, gering rückläufig auf im Schnitt 1,5%. Bei den behaarten WG der *Hairless*-Mäuse zeigte sich eine Zunahme des *Clinical Score* im Versuchsverlauf, im Mittel waren maximal 4,5% (Tag 12) der Körperoberfläche der behaarten WG von Läsionen betroffen. Dieser Wert liegt im Vergleich zu den Angaben aus der Literatur zu B6-Mäusen mit bis zu 30% [27] deutlich darunter. Vergleichend zu den *Nude*-Mäusen und deren behaarten WG ist der *Clinical Score* der *Hairless*-Mäuse und deren behaarten WG bei gleicher Kumulativdosis des pathogenen IgG auffallend gering.

Ein möglicher Einflussfaktor auf den *Clinical Score* könnte sein, dass die in dieser Studie verwendeten Mäuse am Versuchsbeginn zwischen 7 und 25 Wochen (*Hairless*-Mäuse) und zwischen 11 und 20 Wochen (*Nude*-Mäuse) alt waren. B6-Mäuse, die zur Induktion der EBA verwendet wurden waren nach Literaturangaben zwischen 4 bis 10 und 7 bis 8 Wochen alt [69,70] und somit deutlich jünger, was einen Einfluss auf die Immunreaktivität und damit auf die Induzierbarkeit der EBA haben könnte. Dagegen spricht, dass die behaarten WG der *Nude*-Mäuse in der vorliegenden Studie einen vergleichbaren *Clinical Score* zu Werten aus der Literatur aufwiesen.

Die Erhebung des *Clinical Score* erfolgte in den Versuchen in der Regel subjektiv durch eine Person. „Haarverlust“ stellt im *Clinical Score* hierbei ein Bewertungskriterium dar. Bei haarlosen Tieren ist der angewandte *Clinical Score*

daher möglicherweise nicht uneingeschränkt zu verwenden. Gegebenenfalls müsste eine Anpassung, beispielsweise mittels Korrekturfaktor für haarlose Tiere erfolgen. Nicht zuletzt ist die Erhebung von der Erfahrung des Bewerter abhängig. Eine gewisse Triggerung hinsichtlich der zu erwartenden Versuchsergebnisse kann in diesem Verfahren der Bewertung der Krankheitsschwere nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Idealerweise müsste die Erhebung des *Clinical Scores* verblindet, oder mittels objektiver (technischer) Hilfsmittel erfolgen. Unabhängig von dem Einfluss der Subjektivität könnte im Vergleich von *Hairless*-Mäusen und *Nude*-Mäusen zu behaarten WG aufgrund der Berücksichtigung von „Haarverlust“ als Bewertungskriterium bei behaarten WG in der vorliegenden Studie eine gewisse Verzerrung des *Clinical Score* mit falsch hohen Werten der behaarten WG enthalten sein.

Hairless-Mäuse und *Nude*-Mäuse stellen durch ihre phänotypische Nacktheit erhöhte Ansprüche an die Haltungsbedingungen. Sie benötigen zur Aufrechterhaltung der Homöostase besonders energiereiche Kost und zur Vermeidung von Wärmeverlust, im Sinne einer Auskühlung, sowohl Schutzhäuschen als auch die Anwesenheit behaarter Tiere, die sie wärmen können [47, 49, 77]. Für entzündliche Reaktionen gilt im Allgemeinen ein inhibierender Einfluss durch Kälte. Proinflammatorische Zytokine werden durch lokale Kälteanwendung reduziert [79]. Eine kältere Hautoberfläche könnte folglich die Entzündungsreaktion in der Haut bei EBA beeinflussen. Mittels Infrarotthermografie konnte im vorliegenden Fall festgestellt werden, dass die Oberfläche der Haut der *Hairless*-Mäuse und der *Nude*-Mäuse im Vergleich zu behaarten WG (Fell) signifikant wärmer ist. Ähnliche thermografische Beobachtungen konnten in der Literatur an anderen Säugetieren gemacht werden [80]. Das Fell der behaarten WG erfüllt eine wichtige isolierende Funktion und verhindert physikalisch eine direkte Messung der Temperatur auf der Haut. Die direkt an der Haut rasierter behaarter WG gemessene Oberflächentemperatur zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Temperatur an der Haut der *Hairless*-Mäuse. Somit ist festzuhalten, dass die Temperatur auf der Haut von *Hairless*-Mäusen und behaarten WG keinen relevanten Unterschied zeigt. Eine Beeinflussung der Entzündungsreaktivität in der Haut und somit der Ausbildung von EBA-typischen entzündlichen Veränderungen

in *Hairless*-Mäusen ist daher eher nicht auf einen Effekt der veränderten Thermoregulation zurückzuführen.

Die oberflächliche Körpertemperatur der *Nude*-Mäuse war im Vergleich zur Oberfläche rasierter behaarter WG signifikant erhöht. Nach Rasur war ein geringerer, aber dennoch signifikanter Temperaturunterschied vorhanden. Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Messungen an den rasierten behaarten WG der *Nude*-Mäuse aufgrund des gewählten Messzeitpunktes am letzten Versuchstag in Narkose erfolgten. Grundsätzlich werden durch Narkosen viele Kreislauffunktionen, auch die Thermoregulation, beeinflusst [81]. Eine Abkühlung des Körpers wird begünstigt. *Nude*-Mäuse gelten in Narkose als sehr empfindlich bezüglich einer Auskühlung und Dehydrierung [78]. In der vorliegenden Studie wurden am letzten Versuchstag *Nude*-Mäuse, behaarte WG und rasierte behaarte WG alle in Narkose, also unter den gleichen Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse können daher untereinander, nicht jedoch mit den Ergebnissen der *Hairless*-Mäuse, deren Messung ohne Narkose erfolgte, verglichen werden. Eine Beeinflussung der Ergebnisse der Thermografie durch die Narkose ist wahrscheinlich. Für die *Nude*-Mäuse kann, da der Vergleich zu rasierten behaarten WG ohne Narkose fehlt, keine klare Aussage bezüglich eines möglichen Einflusses der oberflächlichen Körpertemperatur auf die Entzündungsreaktion der Haut bei EBA getroffen werden. Ein entscheidender Einfluss auf die Ausprägung des *Clinical Score* erscheint jedoch eher unwahrscheinlich.

Hairless-Mäuse und *Nude*-Mäuse weisen im Vergleich zu behaarten WG eine signifikant dickere Epidermis auf. Aufgrund der geringen Fallzahl (n=3) war in *Nude*-Mäusen, denen nicht-pathogenes IgG verabreicht wurde, im Vergleich zu behaarten WG lediglich eine Tendenz zu einer dickeren Epidermis festzustellen. Für *Hairless*-Mäuse ist eine epidermale Verdickung als Eigenschaft des Mausstammes beschrieben [51, 73]. *Nude*-Mäuse weisen aufgrund des Keratinisierungsdefektes, die auch die Epidermis betrifft, anatomisch deformierte und missgestaltete Keratinozyten auf, die Strukturveränderungen der Epidermis bedingen [82]. Dennoch könnte man hier vorsichtig interpretieren, dass die Dicke der Epidermis eher Mausstamm-bedingt ist. Eine Verursachung der verdickten Epidermis der *Nude*-Mäuse und der *Hairless*-Mäuse im Vergleich zu behaarten WG allein durch

die Entzündung im Rahmen der EBA erscheint, da die Mäuse in den Kontrollgruppen ebenfalls eine Verdickung der Epidermis aufwiesen, unwahrscheinlich. Vielmehr ist die dickere Epidermisschicht als Ausdruck der Haarlosigkeit im Sinne des erhöhten mechanischen Schutzes vor äußeren Einflüssen zu interpretieren. Eine Beeinflussung des *Clinical Score* wäre insofern denkbar, als dass eine dickere Epidermis möglicherweise das Erkennen von subepidermaler Blasenbildung beim *Scoring* erschwert oder einen Einfluss auf das Verteilungsmuster der Läsionen an der Körperoberfläche haben kann. Histologisch war jedoch in den *Hairless*-Mäusen und in den *Nude*-Mäusen die charakteristische subepidermale Spaltbildung nachvollziehbar.

Auffallend war in der aktuellen Studie, dass eine Anlagerung von IgG und C3 in *Hairless*-Mäusen nicht nur an der Basalmembran, sondern auch entlang der Residuen der Haarfollikel und der dermalen Zysten beobachtet werden konnte.

Die Länge des gewebegebundenen Antikörpers war in der Rückenhaut von *Hairless*-Mäusen signifikant und in *Nude*-Mäusen tendenziell gegenüber der Rückenhaut behaarter WG erhöht. Dies lässt die vorsichtige Schlussfolgerung zu, dass bei gleicher Injektionsdosis die Verteilung der Antikörper am Zielgewebe in *Hairless*-Mäusen und *Nude*-Mäusen verändert ist. Anlagerungen an die Basalmembran konnten in *Hairless*-Mäusen insbesondere um die dermal gelegen Zysten gesehen werden. Als Konsequenz muss hier an eine eher in den tieferen Hautschichten gelegene und somit nach außen hin nicht sichtbare Entzündungsreaktion gedacht werden. In *Nude*-Mäusen sind die HF durch die gekräuselten Haarschäfte im Vergleich zu HF der behaarten WG relativ groß, was die tendenziell längere IgG-Bindungsstrecke erklären würde. Dieses Phänomen der anatomisch bedingten, eher in den tieferen Hautschichten ablaufenden Entzündungsreaktion, ist geeignet, den niedrigeren *Clinical Score*, der nur die von außen sichtbaren Läsionen erfasst, zu erklären.

Die EBA ist eine durch das Immunsystem vermittelte Erkrankung. Unterschiede des *Clinical Score* können daher auch durch Unterschiede im Immunsystem oder der Immunreaktion der Mäuse bedingt sein.

Die Immunreaktivität (Fluoreszenzintensität) war in Rückenhautproben der *Hairless*-Mäuse im Vergleich zu anderen Geweben und im Vergleich zur Rückenhaut der behaarten WG signifikant erhöht. In *Nude*-Mäusen zeigte sich eine signifikant höhere Immunreaktivität in der Rückenhaut im Vergleich zu Gewebeproben der Schwanz- und Ohrhaut und im Vergleich zu der Rückenhaut und der Schwanzhaut behaarter WG. Da die Immunreaktivität mit der Bindung des pathogenen IgG an die Basalmembran korreliert, ist dieser Effekt wahrscheinlich (mit)bedingt durch die Verteilung des gewebegebundenen IgG in den *Hairless*-Mäusen, wobei in der Rückenhaut am meisten IgG gebunden wurde. Obwohl es in den *Hairless*-Mäusen und den *Nude*-Mäusen zu einer nachweisbaren Bindung des pathogenen IgG und des C3 an der Basalmembran gekommen ist und die Bindungslänge des IgG im Vergleich zu behaarten WG signifikant erhöht war, war die klinische Ausprägung der EBA in *Hairless*- und *Nude*-Mäusen im Vergleich zu behaarten WG geringer. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Bindungslänge des IgG, der Immunreaktivität und dem *Clinical Score* ist daher unwahrscheinlich.

In beiden Mausstämmen konnte eine Bindung des Autoantikörpers und eine Aktivierung des Komplementsystems durch Nachweis des C3 an der Basalmembran nachgewiesen werden, was einen entscheidenden ersten Schritt in der Induktion der EBA im Antikörpertransfer-Mausmodell darstellt [28, 43, 82].

Neutrophilen Granulozyten kommt in der Pathogenese der experimentellen EBA eine Schlüsselrolle zu, die in mehreren Studien belegt wurde [27, 39, 57, 66]. Nach Aktivierung des Komplementsystems kommt es zur Rekrutierung von Neutrophilen und lokal zur Freisetzung von ROS, was die Entzündungsreaktion weiter vorantreibt [27]. Durch Frau Inka Alten und Frau Birte Hell wurde eine Immunfluoreszenzfärbung des Markers für neutrophile Granulozyten (Ly6G) an Paraffinschnitten etabliert und in verschiedenen Gewebeproben der *Hairless*- und *Nude*-Mäuse untersucht. Ly6G ist ein membrangebundenes Glykoprotein, das wohl ausschließlich in Neutrophilen zu finden ist [84]. Aufgrund des signifikant niedrigeren *Clinical Scores* der *Nude*-Mäuse im Vergleich zu behaarten WG wurde angenommen, dass die Anzahl Neutrophiler in den Gewebeproben der *Nude*-Mäuse geringer sein muss. Ly6G-positive Zellen sind in läSIONalen Gewebeproben der Ohr- und Rückenhaut von *Nude*-Mäusen signifikant erhöht (siehe **Abbildung**

4.1) [65]. In läSIONalen Proben wurden mehr Neutrophile gefunden als in nicht läSIONalen Proben. Diese Beobachtung erscheint unter Berücksichtigung der zentralen Rolle der Neutrophilen in der Induktion der EBA nachvollziehbar. Neutrophile werden nach Aktivierung des Komplementsystems an der Basalmembran rekrutiert und tragen maßgeblich zur Ausbildung der subepidermalen Blasen bei. In *Nude*-Mäusen und behaarte WG, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, fanden sich in den Gewebeproben einzelne Neutrophile, was am ehesten auf zufällige Abweichungen zurückzuführen sein dürfte [65].

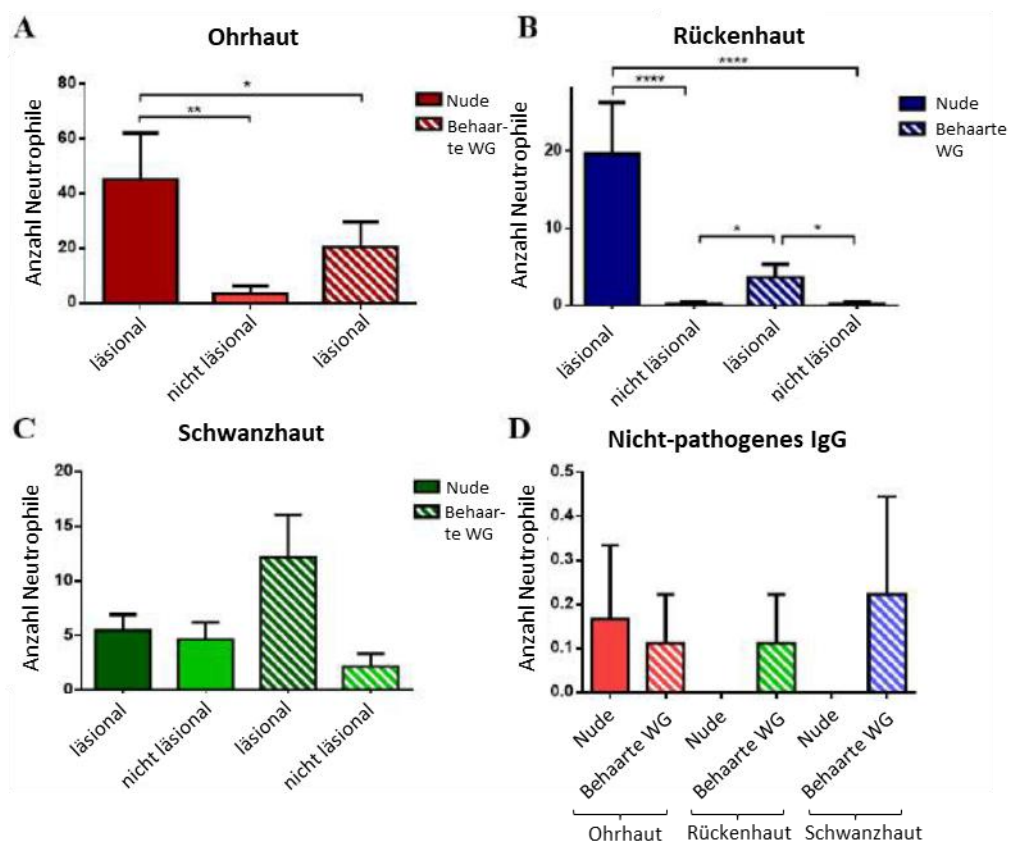


Abbildung 4.1: Anzahl Ly6G-positiver Zellen in Schnitten läSIONaler und nicht läSIONaler Haut von *Nude*-Mäusen und behaarten WG

(Abbildung und Beschreibung angepasst nach: Hell, B (2019) *Untersuchung inflammatorischer Zytokine im Entzündungsverlauf der Epidermolysis bullosa acquisita in Foxn1^{nu/nu}-Mäusen*, S. 34 ff und Abbildung 4.9).

In (A) bis (C) sind jeweils die Ly6G-positiven Zellen aus den Schnitten der mit pathogenem (anti-mCOL7c)-Immunglobulin G (IgG) immunisierten *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (Behaarte WG) (je n = 5) abgebildet, in (D) die Anzahl Ly6G-positiver

Zellen aller mit nicht-pathogenem IgG behandelten *Nude*-Mäuse und behaarter WG (je n=3) aus den drei gefärbten Geweben (Rücken-, Ohr- und Schwanzhaut). Die Zellzahlen aus der Ohrhaut sind in (A), aus der Rückenhaut in (B) und aus der Schwanzhaut in (C) aufgetragen. Durchschnittliche Anzahlen aus mehreren *Visual Fields* (VF) [n=6-18 VF pro 3-5 Mäuse], dargestellt als Mittelwerte + SEM (Standardfehler). * = (p<0,05), ** = (p<0,01), **** = (p<0,0001) im Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-Hoc-Test.

In *Hairless*-Mäusen fand sich der zuvor vermutete signifikante Unterschied der Anzahl neutrophiler Granulozyten zwischen läsionalen und nicht-läsionalen Gewebeproben der Ohr- und Rückenhaut der *Hairless*-Mäuse und der behaarten WG (siehe **Abbildung 4.2**) [64]. Neutrophile werden folglich in *Hairless*-Mäusen durch die Bindung des pathogenen IgG vermehrt in das Gewebe rekrutiert und aktiviert. Obwohl *Hairless*-Mäuse, bedingt durch ihre genetischen Eigenschaften eine verminderte Anzahl an T-Zellen haben, ist die Immunantwort der Neutrophilen nicht eingeschränkt [74]. Im Vergleich zu den behaarten WG fanden sich in den läsionalen Gewebeproben der *Hairless*-Mäuse tendenziell weniger Neutrophile, was in diesem Fall in gewisser Weise den signifikant niedrigeren *Clinical Score* der *Hairless*-Mäuse gegenüber der behaarten WG widerspiegelt und für eine stärkere Immunreaktion in den behaarten WG spricht. Mit im Durchschnitt 113 Neutrophilen pro Ausschnitt wiesen die läsionalen Proben der Rückenhaut der *Hairless*-Mäuse jedoch mehr Neutrophile als läsionale Rückenhautproben der behaarten WG (im Mittel 89 Neutrophile) auf. Die Rückenhaut wies in den *Hairless*-Mäusen auch die längste IgG-Bindungsstrecke auf, was diese erhöhte Tendenz erklären könnte, aber in gewissem Widerspruch zu den Ergebnissen des *Clinical Score* steht. Berücksichtigt man, dass in *Hairless*-Mäusen die Entzündungsreaktion der Haut anatomisch bedingt eher in den tieferen Hautschichten abzulaufen scheint, kann diese tendenziell höhere Anzahl Neutrophiler in den läsionalen Rückenhautproben auch Ausdruck dessen sein, dass diese stärkere Entzündung nicht als äußerlich sichtbare Läsion auftritt und so im *Clinical Score* von außen betrachtet schlichtweg nicht sichtbar ist. In Gewebeproben der Mäuse, denen nicht-pathogenes IgG verabreicht wurde, fanden sich vereinzelte Neutrophile.

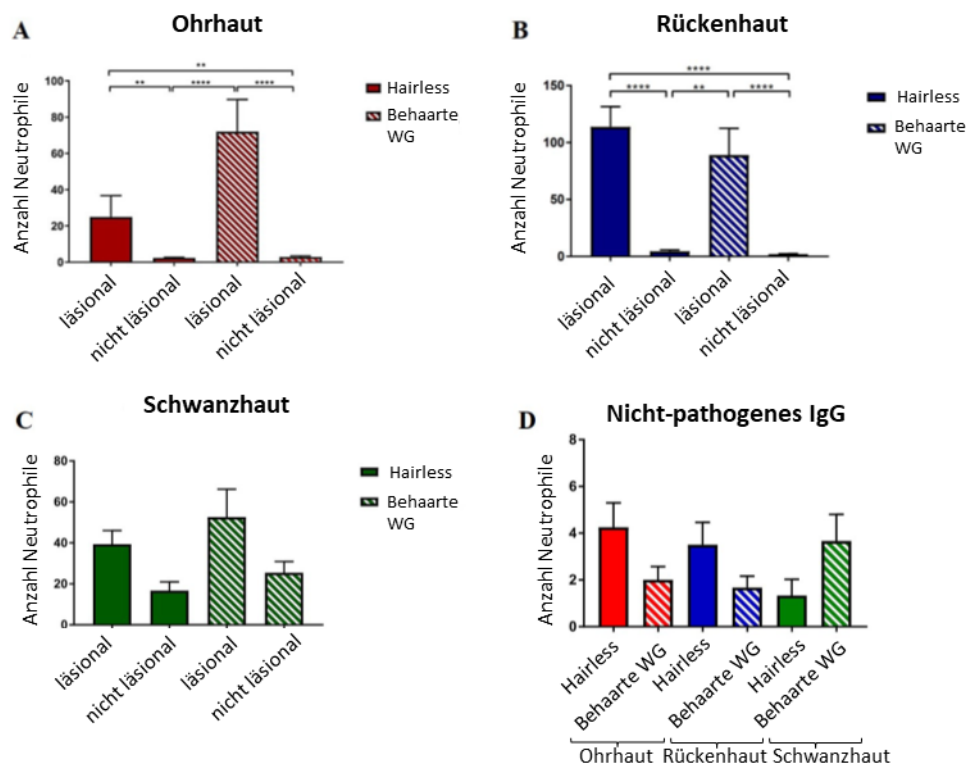


Abbildung 4.2: Anzahl Ly6G-positiver Zellen in Schnitten läsionaler und nicht läsionaler Haut von *Hairless*-Mäusen und behaarten WG

(Abbildung und Beschreibung angepasst nach: Alten, I (2019) *Die Rolle des Haarfollikels in der Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita in Hairless-Mäusen* (Bachelorarbeit), S. 32 ff. und Abbildung 4.5)

Haarlos = *Hairless*-Maus; Wurfgeschwister = behaarte WG.

Dargestellt ist die Anzahl der Ly6G-positiven Zellen der läsionalen und nicht-läsionalen Gewebeproben der mit pathogenem (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) behandelten *Hairless*-Mäuse und der behaarten WG. Die positiven Zellen wurden aus den gefärbten Gewebeschnitten mittels ImageJ Software gezählt.

Abgebildet sind in (A) die Zahlen aus der Ohrhaut, in (B) aus der Rückenhaut und in (C) aus der Schwanzhaut. (D) zeigt Proben der Mäuse, die mit nicht-pathogenem IgG behandelt wurden.

Die Ly6G-positiven Zellen wurden. Die durchschnittliche Anzahl aus mehreren Bildern ist dargestellt als Mittelwerte + SEM (Standardfehler). ** = ($p \leq 0,01$), **** = ($p \leq 0,0001$) im Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-Hoc-Test.

Eine andere mögliche Erklärung des Unterschiedes in der Immunreaktivität und der Anzahl Neutrophiler in *Hairless*-Mäusen im Vergleich zu behaarten WG kann die genetisch bedingte Anomalie des Thymusepithels, bedingt durch die *Hairless*-Mutation, sein.

Nach der Aktivierung der Neutrophilen kommt es in *Hairless*-Mäusen durch diese genetischen Besonderheiten am ehesten zu einer geringeren T-Zell-vermittelten Immunantwort, was eine Erklärung für den niedrigeren *Clinical Score* bei hohen Neutrophilenzahlen darstellt.

Auch um die dermalen Zysten der *Hairless*-Mäuse wurden vermehrt Neutrophile gefunden. Dies kann zum einen Ausdruck des EBA-Modells sein, zum anderen weisen *Hairless*-Mäuse physiologisch Entzündungszellinfiltrate auf [50, 51, 73]. Unter Berücksichtigung dessen, dass in den Gewebeproben der Mäuse, denen nicht-pathogenes IgG verabreicht wurde, nur einzelne Neutrophile in *Hairless*-Mäusen und behaarten WG nachweisbar waren, ist die Anzahl Neutrophiler in den Gewebeproben am ehesten Ausdruck der erfolgreichen Induktion experimenteller EBA.

Neben den *Hairless*-Mäusen weisen auch die *Nude*-Mäuse aufgrund ihrer Genetik neben des Keratinisierungsdefektes eine eingeschränkte Thymusfunktion bis hin zum Fehlen des Thymus auf. Dies hat in *Nude*-Mäusen zur Folge, dass die T-Zell-abhängige Immunreaktion eingeschränkt ist und *Nude*-Mäuse generell empfindlicher für pathogene Krankheitserreger sind [78]. Diese Beeinflussung des Immunsystems könnte sich in *Nude*-Mäusen, ähnlich wie zuvor für *Hairless*-Mäuse beschrieben, auf den *Clinical Score* und somit die Krankheitsschwere auswirken. In diesem Zusammenhang fällt jedoch auf, dass im Vergleich zu behaarten WG der *Nude*-Mäuse, behaarte WG der *Hairless*-Mäuse, die den T-Zell-Defekt auslösenden *Hairless*-Mutation nicht tragen, einen deutlich niedrigeren *Clinical Score* aufweisen. Ein Einfluss der Mutation des Albino-Gens sollte daher in Bezug auf die *Hairless*-Mäuse hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Krankheitsentwicklung in künftigen Studien näher untersucht werden.

In Studien sowohl im Immunisierungsmodell (aktives Mausmodell) und im Antikörpertransfer induzierten (passiven) Mausmodell der EBA konnte an unterschiedlichen Mausstämmen gezeigt werden, dass in der Pathogenese der EBA T-Zellen, insbesondere NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen [37, 54]. Zur Differenzierung, ob der hier beobachtete, niedrigere *Clinical Score* der *Hairless*-Mäuse und der *Nude*-Mäuse bedingt ist durch einen Einfluss des

HF bzw. des fehlenden Haarfollikelzyklus oder durch einen immunologischen Effekt des bekannten T-Zell-Defektes muss in weiterführenden Untersuchungen weiter erforscht werden. Ein möglicher Ansatz kann hierbei die Betrachtung der molekularen Wege, die die Pathogenese der EBA charakterisieren, sein. In dieser Arbeit wurden zwar explizit zur Minimierung des Einflusses des genetischen Hintergrundes behaarte WG eingesetzt, dennoch kann ein Defekt der T-Zellen als mögliche Ursache einer veränderten Immunreaktion im Vergleich zu B6-Mäusen nicht ausgeschlossen werden.

Zytokine sind als Botenstoffe in die Pathogenese der EBA eingebunden [85]. Im Antikörpertransfer induzierten Mausmodell der EBA wurden bisher zahlreiche Zytokine untersucht. In B6-Mäusen wurden signifikant erhöhte Werte der Zytokine und Mediatoren TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-17(A), IL-6 und GM-CSF gemessen [85].

Sie sind wichtig zur Initiierung und Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Milieus und haben nachweislich einen Einfluss auf die Krankheitsschwere. So führt die Inhibition des Zytokins IL-6 zu einer Zunahme des *Clinical Score* in B6-Mäusen [70]. Birte Hell führte in ihrer Bachelorarbeit neben mehreren histologischen Auswertungen Untersuchungen an Serumproben der *Nude*-Mäuse und deren behaarten WG mittels des sogenannten „*LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel with V-bottom Plate*“-Kits durch. Hierbei handelt es sich kurz gesagt um einen Immunoassay zur Bestimmung der Konzentration insgesamt 13 verschiedener Serumzytokine. Auf diese Weise wurden durch Frau Birte Hell die Zytokinspiegel für IFN- γ (Interferon γ), MCP-1 (*Monocyte chemo-attractant protein 1*), IL-12p70 (Interleukin 12p70), IL-1 α (Interleukin 1 α), IL-1 β (Interleukin 1 β), GM-CSF (Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor), IL-17A (Interleukin 17A), TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor α), IL-23 (Interleukin 23), IL-6 (Interleukin 6), IL-10 (Interleukin 10), IL-27 (Interleukin 27) und IFN- β (Interferon β) zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Versuchsverlauf bestimmt. Eine orientierende Übersicht über die Funktion der einzelnen Zytokine ist in Anlehnung an die Bachelorarbeit von Birte Hell in **Tabelle 8** dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht der untersuchten Zytokine

IFN- γ = Interferon γ , MCP-1 = *Monocyte chemo-attractant protein 1*, IL-12p70 = Interleukin 12p70, IL-1 α = Interleukin 1 α , IL-1 β = Interleukin 1 β , GM-CSF = Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor, IL-17A = Interleukin 17A, TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor α , IL-23 = Interleukin 23, IL-6 = Interleukin 6, IL-10 = Interleukin 10, IL-27 = Interleukin 27, IFN- β = Interferon β . EBA = Epidermolysis bullosa acquisita.

Zytokin	Funktion / vermitteltler Effekt	
IFN-γ	➤ IFN- γ wird von Th1-Lymphozyten ausgeschüttet [86].	proinflammatorisch
MCP-1	➤ MCP-1 ist ein Chemokin, das primär Monozyten und verschiedene T-Lymphozyten zur Extravasation ins Gewebe anregt [85, 86].	proinflammatorisch
IL-12p70	➤ IL-12p70 stimuliert Th1-Lymphozyten [86]. ➤ Th1-Lymphozyten sind an der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt.	proinflammatorisch
IL-1α	➤ Die genaue Rolle von IL1- α ist unklar [89]. ➤ Vermutlich Verstärkung proinflammatorischer Prozesse	(am ehesten) proinflammatorisch
IL-1β	➤ Rekrutierung und späte Degranulierung neutrophiler Granulozyten [90]. ➤ Blockade von IL-1 β führt im EBA-Mausmodell zu einer Besserung der klinischen Symptome [91].	proinflammatorisch
GM-CSF	➤ GM-CSF wirkt wachstums- und proliferationsfördernd auf Zellen myeloiden Ursprungs [92]. ➤ GM-CSF-defiziente Mäuse sind langfristig weniger stark von Symptomen experimenteller EBA betroffen [93].	(am ehesten) proinflammatorisch
IL-17A	➤ IL-17A wird von Th17-Lymphozyten produziert [92, 93].	proinflammatorisch
TNF-α	➤ TNF- α ist in Entzündungsvorgängen häufig stark erhöht ➤ TNF- α ist involviert in die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [94, 95].	proinflammatorisch

IL-23	<ul style="list-style-type: none"> ➤ IL-23 bewirkt in Anwesenheit von IL-6 die Produktion von IL-17A in Th17-Lymphozyten, die in verschiedenen Autoimmunkrankheiten eine große Rolle spielen [93, 96, 97]. 	proinflammatorisch
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> ➤ IL-6 kann einen antiinflammatorischen Effekt vermitteln. ➤ In experimenteller EBA führt die Abwesenheit oder eine Hemmung des IL6 zu einer stärkeren Krankheitsausprägung [70] 	antiinflammatorisch (durch Signalwege) [70]
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> ➤ IL-10 inhibiert z.B. die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN-γ [100]. ➤ Treg-depletierte Mäuse wiesen im Antikörpertransfer induzierten EBA-Mausmodell stärker erhöhte IL-10-Werte als Wildtypmäusen auf. Dennoch zeigten die Treg-depletierten Mäuse stärkere klinische Symptome [101]. ➤ Erhöhte Expression in immunprivilegierten Geweben [18]. 	hauptsächlich antiinflammatorisch
IL-27	<ul style="list-style-type: none"> ➤ IL-27 hemmt indirekt die Differenzierung von Th17-Zellen [102,103]. ➤ IL-27 sorgt für eine Induktion von antiinflammatorischem IL-10 in immunpriviligierten Geweben [102]. 	antiinflammatorisch
IFN-β	<ul style="list-style-type: none"> ➤ IFN-β ist primär in die Immunantwort auf virale Infektionen involviert durch Hemmung der immunsuppressiven Wirkung von Tregs und Stärkung von CD8+ und CD4+ T-Effektorzellen [104,105]. ➤ Hierdurch vermehrte Ausschüttung der Zytokine IFN-γ und TNF-α [104]. 	proinflammatorisch

Eine ausführliche Darstellung der umfangreichen Ergebnisse der Arbeit von Frau Birte Hell würde den Rahmen dieser Diskussion sprengen, die Ergebnisse und eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Zytokine sind in der Arbeit von Birte Hell [65] detailliert zu entnehmen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in *Nude*-Mäusen und behaarten WG die Zytokin-Konzentrationen im Versuchsverlauf tendenziell erhöht sind. Trotz der genetisch bedingten Einflüsse auf das Immunsystem reagiert das Immunsystem der *Nude*-Mäuse und der behaarten WG auf die Induktion der EBA.

Zwischen *Nude*-Mäusen und behaarten WG zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, aber ein tendenzieller Anstieg der meisten untersuchten Zytokine. Die Serumkonzentrationen waren an Tag 12 tendenziell am höchsten.

Einige Ergebnisse unterscheiden sich von den bisher bekannten Verläufen der Serumkonzentrationen der Zytokine bei Antikörpertransfer induzierter EBA in Mäusen [85].

Entgegen der Erwartung, dass aufgrund der hohen Anzahl Neutrophiler in den läsionalen Proben der EBA-Gruppen in *Nude*-Mäusen und behaarten WG eine hohe Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- α zu erwarten sein dürfte, war die Konzentration des TNF- α in den Gruppen, denen pathogenes IgG injiziert wurde nicht generell höher als in den Gruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde. In einer systematischen Untersuchung beteiligter Zytokine im Antikörpertransfer induzierten EBA-Mausmodell waren in den Gruppen, denen pathogenes IgG verabreicht worden war, deutlich erhöhte Werte für TNF- α feststellbar [85]. Hier ist anzumerken, dass Birte Hell darauf hinweist, dass dieser Unterschied möglicherweise durch hohe Abweichungen zwischen den Messungen der technischen Replikate bedingt sein kann.

In *Nude*-Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den behaarten WG, dass Zytokine, die für die Aktivität der Th17-Lymphozyten wichtig sind (IL-6, IL-17A, IL-23) tendenziell geringere Konzentrationen im Serum der *Nude*-Mäuse aufwiesen. T-Zell-abhängige Zytokine scheinen folglich in *Nude*-Mäusen weniger stark exprimiert zu werden. Dies spricht in der Gesamtschau dafür, dass der signifikant niedrigere *Clinical Score* der *Nude*-Mäuse durch den genetisch bedingten Thymusdefekt und damit einen Mangel an T-Zellen erklärt werden könnte.

Durch Vermittlung von IFN- γ kommt es über T-Zellen zu einer erhöhten Ausschüttung der Zytokine IFN- γ und TNF- α [104]. IFN- γ und TNF- α waren jedoch

in *Nude*-Mäusen nicht erhöht. Die mittleren Serumkonzentrationen von IFN- γ ist bei den mit anti-mCOL7c-IgG immunisierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen tendenziell stark erhöht. Auffällig ist, dass die Werte in der Analyse von Birte Hell in beiden Gruppen der behaarten WG jeweils etwa doppelt so hoch waren wie die der entsprechenden *Nude*-Mäuse. Dieser Effekt ist am ehesten durch den Mangel an T-Zellen der *Nude*-Mäuse zu erklären, der in der Induktion der EBA in *Nude*-Mäusen eine nicht unwichtige Rolle zu spielen scheint.

Nicht zuletzt ist aus der Untersuchung der beteiligten Zytokine auch ein möglicher Ansatz zur näheren Untersuchung der Rolle des Immunprivilegs in HF und dessen Einfluss auf die Ausprägung der EBA in *Nude*-Mäusen aufgefallen.

Die mittlere Konzentration des antiinflammatorischen IL-10 war vor allem in Mäusen, die mit anti-mCOL7c-IgG erhielten, deutlich erhöht im Vergleich zu *Nude*-Mäusen und behaarten WG, denen nicht-pathogenes IgG verabreicht wurde. Im Bereich der Wurzel muriner und humaner HF im Anagen existiert ein relatives Immunprivileg, dort wurde unter anderem eine erhöhte Expression von IL-10 festgestellt [18].

Darüber hinaus war die mittlere Konzentrationen von IL-27 in den behaarten WG, unabhängig von der Versuchsgruppe, im Vergleich zu *Nude*-Mäusen je etwa doppelt so hoch [65]. Werte, der mit anti-mCOL7c-IgG behandelten Mäuse lagen deutlich über denen, der mit nicht-pathogenem IgG behandelten Mäuse. Im Auge, einem immunprivilegierten Gewebe sorgt IL-27 für eine Induktion von antiinflammatorischem IL-10 [102], sodass sich hier vielleicht Marker herauskristallisieren, für die sich eine detailliertere Untersuchung in weiterführenden zukünftigen Studien anbieten würde. So könnte die Rolle des HF in der experimentellen EBA, auch unter Berücksichtigung des Thymusdefektes näher erforscht werden.

Eine Untersuchung der Seren der *Hairless*-Mäuse ist derzeit noch ausstehend. Im Hinblick auf die Ergebnisse der *Nude*-Mäuse dürfte diese jedoch helfen, den Einfluss des genetisch bedingten Immundefektes und möglicherweise auch des HF und des Immunprivilegs weiter zu beleuchten.

Um an das Zielantigen binden zu können, müssen die in die Bauchhöhle injizierten pathogenen Antikörper zur Basalmembran gelangen. Dies geschieht physiologischerweise über die Blutgefäße. In Entzündungen kommt es regelhaft im Rahmen der Einwanderung der Immunzellen in das Gewebe auch zu einer vermehrten Angiogenese [106]. PECAM-1 ist ein Endothelzellmarker, der vermehrt in vaskulären Lumina bei Angiogenese exprimiert wird und an der Regulation der Migration der Blutzellen in das Gewebe beteiligt ist [61]. PECAM-1 wird auf myeloiden Zellen (Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten) exprimiert [105, 61]. Eine verstärkte Angiogenese ist auch in anagenen HF [108] und bei der Wundheilung [109] beschrieben. Es kann angenommen werden, dass durch die in Entzündungsprozessen verstärkte Angiogenese vermehrt PECAM-1-positive Zellen in das Gewebe einwandern können. Darüber hinaus kann die Lokalisation der vaskulären Lumina im Gewebe möglicherweise auf den Ort der höchsten angiogenetischen Aktivität hinweisen.

In den Gewebeproben der *Hairless*-Mäuse, der *Nude*-Mäuse und der behaarten WG wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für PECAM-1 und gewebegebundenes IgG durchgeführt. Die Auswertung der Färbung erfolgte verblindet unter Berücksichtigung mehrerer Kriterien. Es erfolgte über die Fluoreszenzintensität eine Messung der Immunreaktivität des PECAM-1-Signals in den Gewebeproben. PECAM-1-positive Zellen und vaskuläre Lumina wurden gezählt.

Frau Inka Alten konnte in der Auswertung für die *Hairless*-Mäuse zeigen, dass die Rückenhautproben in der PECAM-1-Färbung die höchste Immunreaktivität aufwies. Behaarte WG wiesen um die HF vermehrt eine unspezifische Immunfluoreszenz in der PECAM-1-Färbung auf, die die Ergebnisse der Immunreaktivität beeinflusst haben könnte. *Hairless*-Mäuse zeigten eine vermehrte Anzahl von Gefäßlumina um die dermalen Zysten herum. Dies spricht für eine im Vergleich zu den behaarten WG erhöhte Durchblutung und kann die hohe Immunreaktivität in den Rückenhautproben für IgG erklären. Das zeitgleiche Auftreten einer hohen Immunreaktivität von IgG und PECAM-1 spricht dafür, dass durch die Bindung des pathogenen IgG in *Hairless*-Mäusen Angiogenese und die Rekrutierung von Immunzellen erfolgt. Beides sind Zeichen der Pathogenese der

EBA [27]. Gleichzeitig lässt diese Beobachtung die Schlussfolgerung zu, dass eine erhöhte IgG-Bindungslänge sich auf die Stärke der initiierten Immunantwort auswirkt.

Stellvertretend für die Anzahl der eingewanderten Endothelzellen wurden in den Gewebeproben die PECAM-1 positiven Einzelzellen gezählt. In der Rückenhaut der behaarten WG konnte eine signifikant höhere Anzahl positiver Zellen im Vergleich zu den *Hairless*-Mäusen gesehen werden. Diese Ergebnisse spiegeln in gewisser Weise den signifikant niedrigeren *Clinical Score* der *Hairless*-Mäuse und unterstreicht die Tatsache, dass eine stärkere Entzündungsreaktion (in den behaarten WG) assoziiert ist mit einer vermehrten Einwanderung von Endothelzellen in das Gewebe.

Neben den Einzelzellen wurden auch die vaskulären Lumina ausgezählt. Vaskuläre Lumina als Korrelat der Blutgefäße stellen in der PECAM-1-Färbung ein Marker für gesteigerte Angiogenese dar. Eine gesteigerte Angiogenese konnte im Zusammenhang mit anagenen HF beobachtet werden [108] und spielt somit auch im Haarfollikelzyklus eine Rolle.

Im Vergleich zwischen *Hairless*-Mäusen und behaarten WG fanden sich tendenziell mehr vaskuläre Lumina in den Proben der *Hairless*-Mäuse. Unabhängig davon, ob den *Hairless*-Mäusen pathogenes oder nicht-pathogenes IgG injiziert worden war, waren die vaskulären Lumina in der Nähe der dermalen Zysten lokalisiert. Möglicherweise kommt es in *Hairless*-Mäusen bedingt durch die Degeneration der HF bereits ohne Induktion der EBA zu einer erhöhten Angiogenese. Eine vermehrte Ansammlung von Blutgefäßen an den Zysten wäre zudem geeignet, die Bindung des pathogenen IgG entlang der Zysten zu begünstigen.

Die Auswertung der PECAM-1-Färbung erfolgte verblindet im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Birte Hell. In *Nude*-Mäusen und deren behaarten WG erbrachte die Messung der Immunreaktivität (Fluoreszenzintensität) in der PECAM-1-Färbung signifikant höhere Werte in der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse gegenüber der Ohrhaut der *Nude*-Mäuse und der Schwanzhaut der behaarten WG. Analog zu der Immunreaktivität des IgG war die Immunreaktivität für PECAM-1 in Rückenhautproben tendenziell am höchsten. In der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse

ist die Immunreaktivität für PECAM-1 gegenüber anderen Geweben der *Nude*-Mäuse signifikant höher.

Für PECAM-1-positive Zellen und vaskuläre Lumina konnten in den Gewebeproben keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der Ohrhaut der *Nude*-Mäuse und der behaarten WG, denen pathogenes IgG verabreicht wurde, war die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen tendenziell höher als in den anderen Geweben. In der Rückenhaut der *Nude*-Mäuse fanden sich im Vergleich zu anderen Geweben und zu behaarten WG tendenziell mehr vaskuläre Lumina. Die Parallelität zu den Ergebnissen der Ly6G-Färbung kann analog zu den Ergebnissen der *Hairless*-Mäuse am ehesten dadurch erklärt werden, dass PECAM-1 auf Granulozyten, zu denen auch neutrophile Granulozyten gehören, exprimiert wird, wohingegen Ly6G ein Neutrophilen spezifischer Marker ist [106, 83].

Sowohl PECAM-1-positive Zellen als auch Neutrophile waren zahlenmäßig am häufigsten in der läsionalen Ohrhaut zu finden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Mäuse sich an den Ohren leicht kratzen können. Dieser mechanische Reiz kann zusätzlich die Ausbildung von Läsionen fördern. Die durch das Mausmodell imitierte inflammatorische Form der EBA ist zudem häufig begleitet von Juckreiz [27,34], was ein Kratzen verständlicherweise triggert.

Wie bereits beschrieben, besteht ein Zusammenhang zwischen der Angiogenese und dem HF [108]. Bei den *Nude*-Mäusen befanden sich viele HF im Anagen, was eine Erklärung für die hohe Anzahl vaskulärer Lumina sein könnte. Anzumerken ist, dass die Untersuchungen bei den behaarten WG der *Hairless*-Mäuse und der *Nude*-Mäuse nicht explizit unter Berücksichtigung der einzelnen Phasen des HF Zyklus wie in Müller-Röver *et al.* dargestellt [15], erfolgten. Eine solche detailliertere Betrachtung ist hinsichtlich einer Aussage zur Rolle des HF in EBA notwendig.

Zusammenfassend erscheint ein Zusammenhang zwischen der Haarlosigkeit und somit einer Rolle des HF und der Ausprägung von Läsionen im EBA-Mausmodell wahrscheinlich, auch wenn die Rolle des HF und des Immunprivilegs noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Hierfür müssen in Zukunft weitere Untersuchungen erfolgen.

4.1 Fazit und Ausblick

Abschließend muss für *Hairless*-Mäuse und für *Nude*-Mäuse festgehalten werden, dass die EBA durch Antikörpertransfer erfolgreich induziert werden konnte.

Der *Clinical Score* war in *Nude*-Mäusen und in *Hairless*-Mäusen im Vergleich zu behaarten WG signifikant niedriger. Physikalische Ursachen (Kälte, Epidermisdicke) konnten als ursächlich in der vorliegenden Studie eher ausgeschlossen werden. In *Hairless*-Mäusen kam es bereits um die dermalen Zysten herum zu einer Entzündungsreaktion. In der Folge kann es sein, dass die Entzündung an der Hautoberfläche nicht sichtbar ist. Hier muss evaluiert werden, ob die alleinige Erhebung des *Clinical Score*, der äußerlich sichtbare Läsionen erfasst, zur Beurteilung der Krankheitsausprägung in *Hairless*-Mäusen ausreichend ist oder ob eine Anpassung mit zusätzlichen histologischen Kriterien erfolgen muss. In diesem Zusammenhang sollte das Bewertungskriterium „Haarverlust“ im *Clinical Score* überdacht werden.

Belegt durch die Zytokinanalysen von Birte Hell, zeichnete sich in *Nude*-Mäusen, ein möglicherweise nicht unerheblicher Zusammenhang zwischen dem genetisch bedingten Thymusdefekt und der Ausprägung der EBA in *Nude*-Mäusen ab. Analoge Zytokinuntersuchungen für die *Hairless*-Mäuse erfolgten bisher nicht. In weiterführenden Projekten gilt es daher besonders, den genauen Ablauf der Entzündungsreaktion in den Mausstämmen beispielsweise auf molekularer Ebene weiter zu erforschen.

Mit IL-10 und IL-23 existieren nichtsdestotrotz potentielle Marker, die hinsichtlich eines Zusammenhangs der Krankheitsausprägung und des Immunprivilegs des HF beachtet werden sollten.

Bezugnehmend auf die Rolle des HF in experimenteller EBA muss klar gesagt werden, dass die definitive Rolle des HF weiter unklar ist. Detailliertere Untersuchungen der Entzündungsreaktion der EBA an HF in unterschiedlichen Phasen des Haarfollikelzyklus, wie durch Müller-Röver *et al.*, beschrieben sollten in Betracht gezogen werden.

Erst die weitere Charakterisierung hinsichtlich des Einflusses des T-Zelldefektes zusammen mit der Untersuchung EBA-typischer Krankheitszeichen auf histologischer und molekularer Ebene abhängig von den Phasen des HF und die nähere Betrachtung spezifischer Einflüsse des Immunprivilegs kann den Weg hin zur Definition der Rolle, die der HF bei experimenteller EBA in Mäusen einnimmt, ebnen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) ist eine blasenbildende, autoimmun bedingte Hauterkrankung, gekennzeichnet durch Autoantikörper gegen Kollagen Typ VII. Es kommt an der dermo-epidermalen Junktionszone unter Beteiligung neutrophiler Granulozyten und der Aktivierung des Komplementsystems zu der charakteristischen subepidermalen Blasenbildung. Haarfollikel (HF) gehören zu den immunprivilegierten Geweben und durchlaufen lebenslang den Haarfollikelzyklus, der durch Aufbau- (Anagen), Abbau- (Katagen) und Ruhephase (Telogen) gekennzeichnet ist. In *Nude*-Mäusen fiel im EBA-Mausmodell auf, dass Läsionen bevorzugt an Hautarealen auftraten, an denen HF in unterschiedlichen Phasen des Haarfollikelzyklus nebeneinander lagen (bisher unveröffentlicht). *Nude*-Mäuse weisen einen Keratinisierungsdefekt auf, weshalb sie phänotypisch nackt erscheinen. *Hairless*-Mäuse sind charakterisiert durch eine normale HF-Morphogenese. Die HF treten jedoch nicht in den Haarfollikelzyklus ein, sie degenerieren. Unter Verwendung dieser Mausstämme sollte in dieser Arbeit der Einfluss des HF auf die Induktion experimenteller EBA näher charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass in *Hairless*-Mäusen durch Antikörpertransfer EBA induziert werden kann. Die von Läsionen betroffene Körperoberfläche ist sowohl in *Nude*-Mäusen als auch in *Hairless*-Mäusen signifikant niedriger als in behaarten Wurfgeschwistern (behaarte WG). Die oberflächliche Körpertemperatur, gemessen auf der Haut, zeigt zwischen *Hairless*- und *Nude*-Mäusen im Vergleich zu behaarten WG keinen signifikanten Unterschied – eine Beeinflussung des *Clinical Score* durch den entzündungshemmenden Effekt von Kälte, erscheint daher unwahrscheinlich. Die Anlagerung des pathogenen IgG entlang der dermalen Zysten der *Hairless*-Mäuse führt zu einer nach außen unsichtbaren Entzündungsreaktion in der Haut und kann zu dem niedrigeren *Clinical Score* beitragen. Ergänzende Zytokinanalysen am Serum der *Nude*-Mäuse legen nahe, dass der Thymusdefekt eine nicht unerhebliche Rolle bei der Induktion der EBA in *Nude*-Mäusen spielt. Abschließend kann ein Einfluss des HF und des Immunprivilegs auf die Ausprägung der EBA in den untersuchten Mäusen nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung der Rolle des HF müssen weitere Untersuchungen an den Mausstämmen unter Berücksichtigung der einzelnen Phasen des HF und des Immunprivilegs erfolgen.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Aufbau der menschlichen Haut	2
Abbildung 1.2:	Struktureller Aufbau der dermo-epidermalen Junctionszone	3
Abbildung 1.3:	Schematischer Aufbau des Haarfollikels und Darstellung des Haarfollikelzyklus in Mäusen	5
Abbildung 1.4:	Klinische Manifestation der Epidermolysis bullosa acquisita	9
Abbildung 2.1:	Makroskopischer und histologischer Phänotyp der <i>Hairless</i> -Maus (B6.Cg-Tyr ^{c-2J} Hr ^{Hr} /J)	22
Abbildung 2.2:	Makroskopischer und histologischer Phänotyp der <i>Nude</i> -Maus (B6.Cg-Foxn1 ^{nu} /J)	24
Abbildung 2.3:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Induktion der experimentellen Epidermolysis bullosa acquisita durch passiven Antikörpertransfer	27
Abbildung 2.4:	Exemplarische Darstellung der thermografischen Aufnahmen an <i>Hairless</i> -Mäusen	29
Abbildung 2.5:	Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für Komplementfaktor 3 und gewebegebundenes Immunglobulin G an Ohrhaut behaarter Wurfgeschwister	34
Abbildung 2.6:	Exemplarische Abbildung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> (CD31; PECAM-1) und gewebegebundenes Immunglobulin G an Rückenhaut einer <i>Hairless</i> -Maus	37
Abbildung 3.1:	Klinische Manifestation der Epidermolysis bullosa acquisita in den <i>Hairless</i> -Mäusen und den behaarten Wurfgeschwistern	42
Abbildung 3.2:	<i>Clinical Score</i> der <i>Hairless</i> -Mäuse im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern	43
Abbildung 3.3:	Histologische Veränderungen bei Antikörpertransfer induzierter Epidermolysis bullosa acquisita in der Rückenhaut der <i>Hairless</i> -Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister in der Hämatoxylin und Eosin-Färbung	45
Abbildung 3.4:	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) und Komplementfaktor 3 in Rückenhaut von <i>Hairless</i> -Mäusen	47
Abbildung 3.5:	Thermografische Messungen an der Oberfläche von <i>Hairless</i> -Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern	49
Abbildung 3.6:	Thermografische Messungen an der Oberfläche von <i>Hairless</i> -Mäusen im Vergleich zu rasierten behaarten Wurfgeschwistern	51
Abbildung 3.7:	Epidermisdicke in <i>Hairless</i> -Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern	53
Abbildung 3.8:	Immunreaktivität und Länge des gebundenen Immunglobulin G in den <i>Hairless</i> -Mäusen und den behaarten Wurfgeschwistern ..	55
Abbildung 3.9:	Anzahl der Endothelzellen und vaskulären Lumina in <i>Hairless</i> -Mäusen	57

Abbildung 3.10: Klinische Manifestation der Epidermolysis bullosa acquisita in den <i>Nude</i> -Mäusen und den behaarten Wurfgeschwistern	60
Abbildung 3.11: <i>Clinical Score</i> der <i>Nude</i> -Mäuse im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern	62
Abbildung 3.12: Histologische Morphologie bei Antikörpertransfer induzierter Epidermolysis bullosa acquisita in der Rückenhaut der <i>Nude</i> -Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister in der Hämatoxylin und Eosin-Färbung	63
Abbildung 3.13: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für pathogenes anti-mCol7c-Immunglobulin G und Komplementfaktor 3 in Rückenhaut von <i>Nude</i> -Mäusen.....	65
Abbildung 3.14: Thermografische Messungen an der Oberfläche von <i>Nude</i> -Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern in Narkose.....	67
Abbildung 3.15: Thermografische Messungen an der Oberfläche von <i>Nude</i> -Mäusen im Vergleich zu rasierten behaarten Wurfgeschwistern in Narkose.....	69
Abbildung 3.16: Thermografische Messungen an der Oberfläche von <i>Nude</i> -Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern ohne Narkose.....	71
Abbildung 3.17: Statistische Auswertung der Epidermisdicke in <i>Nude</i> -Mäusen im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern	73
Abbildung 3.18: Immunreaktivität und Länge des gebundenen Immunglobulin G in der Rückenhaut der <i>Nude</i> -Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister	75
Abbildung 3.19: Immunreaktivität und Anzahl der exprimierenden Zellen von <i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i> und der vaskulären Lumina in <i>Nude</i> -Mäusen.....	77
Abbildung 4.1: Anzahl Ly6G-positiver Zellen in Schnitten läsionaler und nicht läsionaler Haut von <i>Nude</i> -Mäusen und behaarten WG.....	86
Abbildung 4.2: Anzahl Ly6G-positiver Zellen in Schnitten läsionaler und nicht läsionaler Haut von <i>Hairless</i> -Mäusen und behaarten WG	88

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Materialauflistung – Geräte.....	12
Tabelle 2: Reagenzien und Kits.....	14
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial.....	15
Tabelle 4: Antikörper und Seren.....	17
Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Aufreinigung von spezifischen Antikörpern gegen murines Kollagen Typ VIIc aus Kaninchenserum.....	17
Tabelle 6: Puffer für Immunfluoreszenzfärbungen.....	18
Tabelle 7: Software	19
Tabelle 8: Übersicht der untersuchten Zytokine	91

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Fritsch P, Schwarz T. "*Aufbau und Funktionen der Haut*". In: Dermatologie Venerologie. Springer Berlin Heidelberg; 2018. S. 5–68.
- [2] Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, Darling N, Ritchie P, Määttä A, Karakesisoglou I, Nelson G, von Zglinicki T, Dicolandrea T, Isfort R, Bascom C, Przyborski S. "*Bioengineering the microanatomy of human skin*". J Anat. 1. April 2019;234(4):438–55.
- [3] Nguyen A V., Soulika AM. "*The dynamics of the skin's immune system*". Int J Mol Sci. 2. April 2019;20(8).
- [4] Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG. "*Haut und Hautanhangsgebilde*". In: Bob A, Bob K, Herausgeber. Duale Reihe Anatomie. MLP; 2007. S. 1286–300.
- [5] Hertl M. "*Dermatologische Grundlagen*". In: Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Springer Berlin Heidelberg; 2018. S. 3–21.
- [6] Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M. "*Skin barrier immunity and ageing*". Bd. 160, Immunology. Blackwell Publishing Ltd; 2020. S. 116–25.
- [7] "*Freepik Abbildung Haut*" [Internet]. [zitiert 17. Februar 2024]. Verfügbar unter: https://www.freepik.com/free-vector/realistic-skin-structure-with-its-layers-hairs-vector-illustration_26760948.htm#query=skin&position=5&from_view=search&track=ais&uuid=4cd10be3-1db1-4dc1-ac18-dda570bf706b
- [8] Briggaman RA, Wheeler CE. "*The epidermal-dermal junction*". J Invest Dermatol. 1975;65(7):71–84.
- [9] Schmidt E, Zillikens D. "*Pemphigoid diseases*". Bd. 381, The Lancet. Elsevier B.V.; 2013. S. 320–32.
- [10] Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. "*Regeneration of dermis: Scarring and cells involved*". Cells. 2019;8(6).
- [11] Brown TM, Krishnamurthy K. Bde. 2024, Jan., StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2022 [zitiert 21. Oktober 2024]. Histology, Dermis. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>
- [12] Welsch U. "*Haut*". In: Welsch (Hrsg.) U, Kummer (Hrsg.) W, Deller T, Herausgeber. Histologie - Das Lehrbuch. Elsevier GmbH, Deutschland; 2018. S. 563–82.
- [13] Paus R, Van Der Veen C, Eichmüller S, Kopp T, Hagen E, Müller-Röver S, Hofmann U. "*Generation and cyclic remodeling of the hair follicle immune system in mice*". J Invest Dermatol. 1998;111(1):7–18.
- [14] Paus R, Müller-Röver S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmüller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L, Handjiski B. "*A Comprehensive Guide for the Recognition and Classification of Distinct Stages of Hair Follicle Morphogenesis*". J Invest Dermatol. 1999;113:523–32.
- [15] Müller-Röver S, Handjiski B, Van Der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA,

- Stenn KS, Paus R. "A Comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages". *J Invest Dermatol*. 2001;117(1):3–15.
- [16] Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. "The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan". Bd. 19, *Current Biology*. 2009.
- [17] Paus R, Bertolini M. "The Role of Hair Follicle Immune Privilege Collapse in Alopecia Areata: Status and Perspectives". *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1. Dezember 2013;16(1):S25–7.
- [18] Meyer KC, Klatte JE, Dinh H V., Harries MJ, Reithmayer K, Meyer W, Sinclair R, Paus R. "Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles". *Br J Dermatol*. November 2008;159(5):1077–85.
- [19] Hong S, Van Kaer L. "Immune Privilege: Keeping an Eye on Natural Killer T Cells". *J Exp Med* [Internet]. 1999 [zitiert 17. Februar 2024];190(9). Verfügbar unter: <http://www.jem.org>
- [20] Paus R, Ito N, Takigawa M, Ito T. "The hair follicle and immune privilege". In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Blackwell Publishing Inc.; 2003. S. 188–94.
- [21] Paus R, Nickoloff BJ, Ito T. "A „hairy“ privilege". Bd. 26, *Trends in Immunology*. 2005. S. 32–40.
- [22] Westgate GE, Craggs RI, Gibson WT. "Immune Privilege in hair growth". *J Invest Dermatol*. 1991;97:417–20.
- [23] Park JM, Jun MS, Kim JA, Nanda •, Mali M, Hsi TC, Cho A, Kim JC, Jun •, Kim Y, Seo I, Kim • Jungmin, Kim M, Oh JW. "Restoration of Immune Privilege in Human Dermal Papillae Controlling Epithelial-Mesenchymal Interactions in Hair Formation". *Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2022 [zitiert 17. Februar 2024];(1):19. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00392-7>
- [24] Sadik C, Zillikens D, Hertl M. "Bullöse Autoimmundermatosen". In: *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2018. S. 839–73.
- [25] Jainta S, Schmidt E, Bröcker EB, Zillikens D. "Diagnostik und Therapie bullöser Autoimmunerkrankungen der Haut". *Dtsch Arztebl*. 2001;98(20):1320–5.
- [26] Schmidt E, Zillikens D. "Diagnostik und Therapie bullöser Autoimmundermatosen". Bd. 108, *Deutsches Arzteblatt*. 2011. S. 399–405.
- [27] Ludwig RJ. "Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita". *ISRN Dermatol*. 15. Juli 2013;2013:1–25.
- [28] Ludwig RJ, Zillikens D. "Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita". Bd. 29, *Dermatologic Clinics*. 2011. S. 493–501.
- [29] Mustafa MB, Porter SR, Smoller BR, Sitaru C. "Oral mucosal manifestations of autoimmune skin diseases". Bd. 14, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier; 2015. S. 930–51.
- [30] Miyamoto D, Gordilho JO, Santi CG, Porro AM. "Epidermolysis bullosa acquisita". *An Bras Dermatol*. 1. Juli 2022;97(4):409–23.
- [31] Vorobyev A, Ujije H, Recke A, Buijsrogge JJA, Jonkman MF, Pas HH, Iwata H,

- Hashimoto T, Kim SC, Kim JH, Groves R, Samavedam U, Gupta Y, Schmidt E, Zillikens D, Shimizu H, Ludwig RJ. "Autoantibodies to multiple epitopes on the non-collagenous-1 domain of type VII collagen induce blisters". *J Invest Dermatol*. 1. Januar 2015;135(6):1565–73.
- [32] Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T. "Epidermolysis bullosa acquisita: What's new?". Bd. 37, *Journal of Dermatology*. 2010. S. 220–30.
- [33] Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Brö EB, Zillikens D. "Autoantibodies to Type VII Collagen Mediate Fc-Dependent Neutrophil Activation and Induce Dermal-Epidermal Separation in Cryosections of Human Skin". *Am J Pathol*. 2002;161(1):301–11.
- [34] Kim JH, Kim SC. "Epidermolysis bullosa acquisita". *J Eur Acad Dermatology Venereol*. Oktober 2013;27(10):1204–13.
- [35] Gammon WR, Briggaman RA, Woodley DT, Heald PW, Wheeler CE. "Epidermolysis bullosa acquisita - a pemphigoid-like disease". *J the Am Acad od Dermatology*. 1984;11(5):820–32.
- [36] Recke A, Trog LM, Pas HH, Vorobyev A, Abadpour A, Jonkman MF, van Zandbergen G, Kauderer C, Zillikens D, Vidarsson G, Ludwig RJ. "Recombinant Human IgA1 and IgA2 Autoantibodies to Type VII Collagen Induce Subepidermal Blistering Ex Vivo". *J Immunol*. 15. August 2014;193(4):1600–8.
- [37] Sitaru AG, Sesarman A, Mihai S, Chiriac MT, Zillikens D, Hultman P, Solbach W, Sitaru C. "T Cells Are Required for the Production of Blister-Inducing Autoantibodies in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita". *J Immunol*. 1. Februar 2010;184(3):1596–603.
- [38] Müller R, Dahler C, Möbs C, Wenzel E, Eming R, Messer G, Niedermeier A, Hertl M. "T and B cells target identical regions of the non-collagenous domain 1 of type VII collagen in epidermolysis bullosa acquisita". *Clin Immunol*. April 2010;135(1):99–107.
- [39] Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C. "NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage". *J Pathol*. Mai 2007;212(1):56–65.
- [40] Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker EB, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C. "Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid". *J Pathol*. Dezember 2004;204(5):519–27.
- [41] Schmidt E. "Therapieoptimierung bei schweren bullösen Autoimmundermatosen". Bd. 60, *Hautarzt*. 2009. S. 633–40.
- [42] Witte M, Koga H, Hashimoto T, Ludwig RJ, Bieber K. "Discovering potential drug-targets for personalized treatment of autoimmune disorders - what we learn from epidermolysis bullosa acquisita". Bd. 20, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Taylor and Francis Ltd; 2016. S. 985–98.
- [43] Bieber K, Sun S, Ishii N, Kasperkiewicz M, Schmidt E, Hirose M, Westermann J, Yu X, Zillikens D, Ludwig RJ. "Animal models for autoimmune bullous dermatoses". Bd. 19, *Experimental Dermatology*. 2010. S. 2–11.

- [44] Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D. "*Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen*". J Clin Invest. April 2005;115(4):870–8.
- [45] Woodley DT, Chang C, Saadat P, Ram R, Liu Z, Chen M. "*Evidence that Anti-Type VII Collagen Antibodies Are Pathogenic and Responsible for the Clinical, Histological, and Immunological Features of Epidermolysis Bullosa Acquisita*". J Invest Dermatol. 2005;124:958–64.
- [46] Wetzels RHW, Robben HCM, Leigh IM, Schaafsma HE, Peter Vooijs G, Ramaekerst FCS. "*Distribution Patterns of Type VII Collagen in Normal and Malignant Human Tissues Address reprint requests to*". Am J Pathol. 1991;139(2):451–9.
- [47] The Jackson Laboratory. "<https://www.jax.org/strain/000819>" [Internet]. [zitiert 12. Juni 2023]. Verfügbar unter: <https://www.jax.org/strain/000819>
- [48] Mecklenburg L, Tychsen B, Paus R. "*Learning from nudity: lessons from the nude phenotype*". Exp Dermatol. 2005;14:797–810.
- [49] The Jackson Laboratory. "<https://www.jax.org/strain/017840>" [Internet]. [zitiert 12. Juni 2023]. Verfügbar unter: <https://www.jax.org/strain/017840>
- [50] Panteleyev AA, Van Der Veen C, Rosenbach T, Muller-Rover S, Sokolov VE, Paus R. "*Towards defining the pathogenesis of the hairless phenotype*". J Invest Dermatol. 1998;110(6):902–7.
- [51] Montagna W, Chase HB, Melaragno HP. "*The skin of hairless mice. I. The formation of cysts and the distribution of lipids*". J Invest Dermatol. 1952;19(1):83–94.
- [52] The Jackson Laboratory. "[C57BL/6 J mouse strain datasheet - 000664](https://www.jax.org/strain/000664)" [Internet]. Verfügbar unter: <https://www.jax.org/strain/000664>
- [53] Panteleyev AA, Botchkareva N V, Sundberg JP, Christiano AM, Paus R. "*The Role of the Hairless (hr) Gene in the Regulation of Hair Follicle Catagen Transformation*". Am J Pathol. 1999;155(1):159–71.
- [54] Bieber K, Witte M, Sun S, Hundt JE, Kalies K, Dräger S, Kasprick A, Twelkmeyer T, Manz RA, König P, Köhl J, Zillikens D, Ludwig RJ. "*T cells mediate autoantibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita*". Sci Rep. 5. Dezember 2016;6.
- [55] Plikus M V., Chuong CM. "*Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents*". J Invest Dermatol. 2008;128(5):1071–80.
- [56] Woodley DT, Ram R, Doostan A, Bandyopadhyay P, Huang Y, Remington J, Hou Y, Keene DR, Liu Z, Chen M. "*Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients*". J Invest Dermatol. Juni 2006;126(6):1323–30.
- [57] Sitaru C, Zillikens D. "*Mechanisms of blister induction by autoantibodies*". Exp Dermatol. Dezember 2005;14(12):861–75.
- [58] Panelius J, Meri S. "*Complement system in dermatological diseases - Fire under the skin*". Bd. 2, Frontiers in Medicine. Frontiers Media S.A.; 2015.
- [59] Pfündl R. "*Die Rolle der zirkadianen Uhr in der Entwicklung der Epidermolysis bullosa acquisita*". Vet. Med. Diss. Universität Gießen; 2020.

-
- [60] Dittrich L. "*Thermographische Verlaufsbeobachtung der Wundheilung nach Operationen an der Brust- und Lendenwirbelsäule*". 2011.
- [61] Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman III PJ. "*Molecular and Cellular Properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): A Novel Vascular Cell-Cell Adhesion Molecule*". 1991.
- [62] Radeke HH, Ludwig RJ, Boehncke WH. "*Experimental approaches to lymphocyte migration in dermatology in vitro and in vivo*". *Exp Dermatol.* 2005;14:641–66.
- [63] "*Definition Rosenthal-Effekt*" [Internet]. [zitiert 13. Oktober 2024]. Verfügbar unter: <https://lexikon.stangl.eu/7260/rosenthal-effekt>
- [64] Alten I. "*Die Rolle des Haarfollikels in der Pathogenese der Epidermolysis bullosa acquisita in Hairless-Mäusen*". Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie - Bachelorarbeit; 2019.
- [65] Hell B. "*Untersuchung inflammatorischer Zytokine im Entzündungsverlauf der Epidermolysis bullosa acquisita an FoxN1^{nu/nu}-Mäusen*". Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie - Bachelorarbeit; 2019.
- [66] Lessey E, Li N, Diaz L, Liu Z. "*Complement and cutaneous autoimmune blistering diseases*". Bd. 41, *Immunologic Research.* 2008. S. 223–32.
- [67] Guerrero-Juarez CF, Schilf P, Li J, Zappia MP, Bao L, Patel PM, Gieseler-Tillmann J, Murthy S, Cole C, Sverdlov M, Frolov M V., Hashimoto T, Ishii N, Rüllicke T, Bieber K, Ludwig RJ, Sadik CD, Amber KT. "*C-type lectin receptor expression is a hallmark of neutrophils infiltrating the skin in epidermolysis bullosa acquisita*". *Front Immunol.* 2023;14.
- [68] Sitaru C. "*Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita*". Bd. 16, *Experimental Dermatology.* 2007. S. 520–31.
- [69] Chen M, Doostan A, Bandyopadhyay P, Remington J, Wang X, Hou Y, Liu Z, Woodley DT. "*The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita*". *Am J Pathol.* 2007;170(6):2009–18.
- [70] Samavedam UKSRL, Kalies K, Scheller J, Sadeghi H, Gupta Y, Jonkman MF, Schmidt E, Westermann J, Zillikens D, Rose-John S, Ludwig RJ. "*Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1 α induction*". *J Autoimmun.* 2013;40(1):74–85.
- [71] Szadvari I, Krizanova O, Babula P. "*Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment*". Bd. 65, *Physiological Research.* Czech Academy of Sciences; 2016. S. S441–53.
- [72] Mecklenburg L, Paus R, Halata Z, Bechtold LS, Fleckman P, Sundberg JP. "*FOXN1 is critical for onycholemmal terminal differentiation in nude (Foxn1^{nu}) mice*". *J Invest Dermatol.* 2004;123(6):1001–11.
- [73] Gawronska-Kozak B, Grabowska A, Kur A, Kopcewicz M. "*Foxn1 transcription factor regulates wound healing of skin through promoting Epithelial- Mesenchymal transition*". *PLoS One.* 1. März 2016;11(3).
- [74] Benavides F, Oberyszyn TM, VanBuskirk AM, Reeve VE, Kusewitt DF. "*The hairless mouse in skin research*". Bd. 53, *Journal of Dermatological Science.* 2009. S. 10–8.
- [75] Choi SI, Han HS, Kim JM, Park G, Jang YP, Shin YK, Ahn HS, Lee SH, Lee KT.
-

- "Eisenia bicyclis extract repairs uvb-induced skin photoaging in vitro and in vivo: Photoprotective effects"*. Mar Drugs. 1. Dezember 2021;19(12).
- [76] Wulf HC, Al-chaer RN, Glud M, Philipsen PA, Lerche CM. "A skin cancer prophylaxis study in hairless mice using methylene blue, riboflavin, and methyl aminolevulinate as photosensitizing agents in photodynamic therapy". *Pharmaceuticals*. 1. Mai 2021;14(5).
- [77] Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S. "Induction of Complement-Fixing Autoantibodies against Type VII Collagen Results in Subepidermal Blistering in Mice". *J Immunol* [Internet]. 28. April 2010;177(2006):3461–8. Verfügbar unter: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/177/5/3461><http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/177/5/3461#otherarticle4onlinearticlesthatcitethisarticlecanbeaccessedat:http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/177/5/3461#BIBL>
- [78] Charles River Laboratories. "Nude Mice" [Internet]. [zitiert 8. Juli 2024]. Verfügbar unter: <https://www.criver.com/products-services/research-models-services/animal-models/mice/immunodeficient-mice/nude-mice?region=23>
- [79] Nemet D, Meckel Y, Bar-Sela S, Zaldivar F, Cooper DM, Eliakim A. "Effect of local cold-pack application on systemic anabolic and inflammatory response to sprint-interval training: A prospective comparative trial". *Eur J Appl Physiol*. 2009;107(4):411–7.
- [80] Okada K, Takemura K, Sato S. "Investigation of various essential factors for optimum infrared thermography". *J Vet Med Sci*. 2013;75(10):1349–53.
- [81] Caro AC, Hankenson FC, Marx JO. "Comparison of Thermoregulatory Devices Used during Anesthesia of C57BL/6 Mice and Correlations between Body Temperature and Physiologic Parameters". 2013;
- [82] Köpf-Maier P, Mboneko V, Merker H. "Nude mice are not hairless. A morphological study.". *Acta Anat (Basel)*. 1990;139(2):178–90.
- [83] Iwata H, Bieber K, Hirose M, Ludwig RJ. "Animal Models to Investigate Pathomechanisms and Evaluate Novel Treatments for Autoimmune Bullous Dermatoses". *Curr Pharm Des*. 2015;21:1–18.
- [84] Lee P, Wang J, Parisini E, Dascher C, Nigrovic P. "Ly6 family proteins in neutrophil biology.". *Journal Leukoc Biol*. 2013;94(4):585–94.
- [85] Samavedam U. "Contribution of cytokines to the pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita". [Lübeck]: Universität zu Lübeck; 2013.
- [86] Romagnani S. "Th1/Th2 cells. , 5(4), 285–294.". *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5(4):285–94.
- [87] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview". Bd. 29, *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2009. S. 313–25.
- [88] Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barrose R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, López-Bravo M, Joven J, Ardavin C, Rodríguez-Fernández J, Sánchez-Torres C, Mellado M, Corbí A. "CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile.". *J Immunology (Maltimore, Md 1950)*. 2014;192(8):3858–67.
- [89] Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. "Interleukin 1 α and the inflammatory process". *Nat*

- Immunol. 19. Juli 2016;17(8):906–13.
- [90] Naegelen I, Beaume N, Plançon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Brécharde S. "Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting". J Immunol Res. 2015;2015.
- [91] Sadeghi H, Lockmann A, Hund AC, Samavedam UKSRL, Pipi E, Vafia K, Hauenschild E, Kalies K, Pas HH, Jonkman MF, Iwata H, Recke A, Schön MP, Zillikens D, Schmidt E, Ludwig RJ. "Caspase-1–Independent IL-1 Release Mediates Blister Formation in Autoantibody-Induced Tissue Injury through Modulation of Endothelial Adhesion Molecules". J Immunol. 15. April 2015;194(8):3656–63.
- [92] Shiomi A, Usui T, Mimori T. "GM-CSF as a therapeutic target in autoimmune diseases". Inflamm Regen. 2016;36(1).
- [93] Samavedam U, Iwata H, Müller S, Schulze F, Recke A, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig R. "GM-CSF modulates autoantibody production and skin blistering in experimental epidermolysis bullosa acquisita". J Immunol. 2014;192(2):559–71.
- [94] Jin W, Dong C. "IL-17 cytokines in immunity and inflammation". Bd. 2, Emerging Microbes and Infections. Nature Publishing Group; 2013.
- [95] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. "Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities". Immunology. 1. März 2015;144(3):343–51.
- [96] Kastl L, Sauer SW, Ruppert T, Beissbarth T, Becker MS, Süss D, Krammer PH, Gülow K. "TNF- α mediates mitochondrial uncoupling and enhances ROS-dependent cell migration via NF- κ B activation in liver cells". FEBS Lett. 3. Januar 2014;588(1):175–83.
- [97] Falk RJ, Terrell RS, Charlest LA, Jennett JC. "Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro". Bd. 87, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990.
- [98] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. "IL-6 in inflammation, Immunity, And disease". Cold Spring Harb Perspect Biol. 1. Oktober 2014;6(10).
- [99] Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. "Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine". Nat Rev Drug Discov. 2018;17(6):395–412.
- [100] Fiorentino D, Zlotnik A, Mosmann T, Howard M, O'Garra A. "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages". J Immunol. 1991;147(11):3815–22.
- [101] Bieber K, Sun S, Witte M, Kasprick A, Beltsiou F, Behnen M, Laskay T, Schulze FS, Pipi E, Reichhelm N, Pagel R, Zillikens D, Schmidt E, Sparwasser T, Kalies K, Ludwig RJ. "Regulatory T cells suppress inflammation and blistering in pemphigoid diseases". Front Immunol. 24. November 2017;8(NOV).
- [102] Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE. "Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease". Bd. 75, Cytokine. Academic Press; 2015. S. 249–55.
- [103] Meka RR, Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. "IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential". Bd. 14, Autoimmunity Reviews. Elsevier B.V.; 2015. S. 1131–41.
- [104] Gangaplara A, Martens C, Dahlstrom E, Metidji A, Gokhale AS, Glass DD, Lopez-

- Ocasio M, Baur R, Kanakabandi K, Porcella SF, Shevach EM. "*Type I interferon signaling attenuates regulatory T cell function in viral infection and in the tumor microenvironment*". PLoS Pathog. 1. April 2018;14(4).
- [105] González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. "*Immunomodulatory functions of type I interferons*". Bd. 12, Nature Reviews Immunology. 2012. S. 125–35.
- [106] Huggenberger R, Detmar M. "*The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation*". In: Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. 2011. S. 24–32.
- [107] Mandyam CD, Villalpando EG, Steiner NL, Quach LW, Fannon MJ, Somkuwar SS. "*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and oligodendrogenesis: Significance in alcohol use disorders*". Bd. 7, Brain Sciences. MDPI AG; 2017.
- [108] Mecklenburg L, Tobin DJ, Müller-Röver S, Handjiski B, Wendt G, Peters EMJ, Pohl S, Moll I, Paus R. "*Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis*". J Invest Dermatol. 2000;114(5):909–16.
- [109] Ansell DM, Kloepper JE, Thomason HA, Paus R, Hardman MJ. "*Exploring the hair growth-wound healing connection: Anagen phase promotes wound re-Epithelialization*". J Invest Dermatol. 2011;131(2):518–28.

ANHANG

Teilnahmebescheinigung „Einführung in die Versuchstierkunde“



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
GEMEINSAME TIERHALTUNG

Leitung
Dr. med. vet. Barthel Schmelting, Ph.D.
Fachtierarzt für Versuchstierkunde
Tierschutzbeauftragter der Universität
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck
Tel. +49 451 3101 2500
Fax +49 451 500 4193
schmelting@gth.uni-luebeck.de

Teilnahmebescheinigung

Frau Ayleen Fokuhl,

hat vom 18.04. – 25.04.2016 an einem 40-stündigen Kurs der Universität zu Lübeck

„Einführung in die Versuchstierkunde“

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

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

Einführung in die Versuchstierkunde /Tierschutz und Tierversuche

Ersatz- und Ergänzungsmethoden

Biologie der wichtigsten Versuchstierarten

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

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

Pflege und Haltung

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

Hygiene in Versuchstierhaltungen

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

Ethische Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

Rechtliche Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

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

Durchführung und Planung von Tierversuchen

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

Lübeck, den 02.05.2016

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

IM FOCUS DAS LEBEN
WISSEN SCHÜTZT TIERE

Genehmigung des Tierversuches:

Schleswig-Holstein
Der echte Norden



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

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

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

Ihr Zeichen:
Ihr Antrag vom: 22.07.2015
Mein Zeichen: V 242 - 69981/2015 (93-7/15)
Meine Nachricht vom: /

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

nachrichtlich:
Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

15. Oktober 2015

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

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

Die Rolle der Haarfolikelenentwicklung bei Antikörpertransfer-induzierter Epidermolysis bullosa acquisita

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 120 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Oktober 2018 befristet.
3. Ort der Durchführung:
Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung

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

- 2 -

4. Leiterin des Versuchsvorhabens:
Frau Dr. Katja Bieber
5. Stellvertreterin:
Frau Dr. Jennifer Klöpffer
6. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihre Stellvertreterin, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
7. Verantwortlicher Tierarzt nach § 28 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125):
Herr Dr. B. Schmelting
8. Weitere Nebenbestimmungen:
Keine.

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

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

Rechtsbehelfsbelehrung

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

Hinweis:

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

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Sekulla

Genehmigung Mitarbeit am genehmigten Tierversuch - Fokuhl

Schleswig-Holstein
Der echte Norden



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

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

Frau
Dr. Katja Bieber
Lübecker Institut für Experimentelle
Dermatologie
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

Ihr Zeichen:
Ihr Antrag vom: 27.02.2017
Mein Zeichen: V 242 - 12960/2017 (93-7/15)
Meine Nachricht vom: /

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

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

21. März 2017

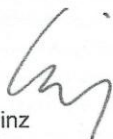
Durchführung eines Tierversuchsvorhabens

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gegen die Mitwirkung von Frau Ayleen Fokuhl an dem bereits genehmigten
Tierversuchsvorhaben „Die Rolle der Haarfolikelenwicklung bei Antikörpertransfer-
induzierter Epidermolysis bullosa acquisita“ erhebe ich keine Einwände.

Bezüglich der beantragten Ausnahmegenehmigung gem. § 16 Abs. 1 Satz 5
TierSchVersV für Frau Fokuhl ergeht ein gesonderter Bescheid.

Mit freundlichen Grüßen


Hinz

Schleswig-Holstein
Der echte Norden



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

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

Frau
Dr. Katja Bieber
Lübecker Institut für Experimentelle
Dermatologie
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

Ihr Zeichen:
Ihr Antrag vom: 27.02.2017
Mein Zeichen: V 242 - 12960/2017 (93-7/15)
Meine Nachricht vom: /

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

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

21. März 2017

Ausnahmegenehmigung für die Durchführung von Tierversuchen

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

aufgrund Ihres o. a. Antrages erweitere ich die am 24. November 2016 erteilte
Ausnahmegenehmigung für

Frau Ayleen Fokuhl

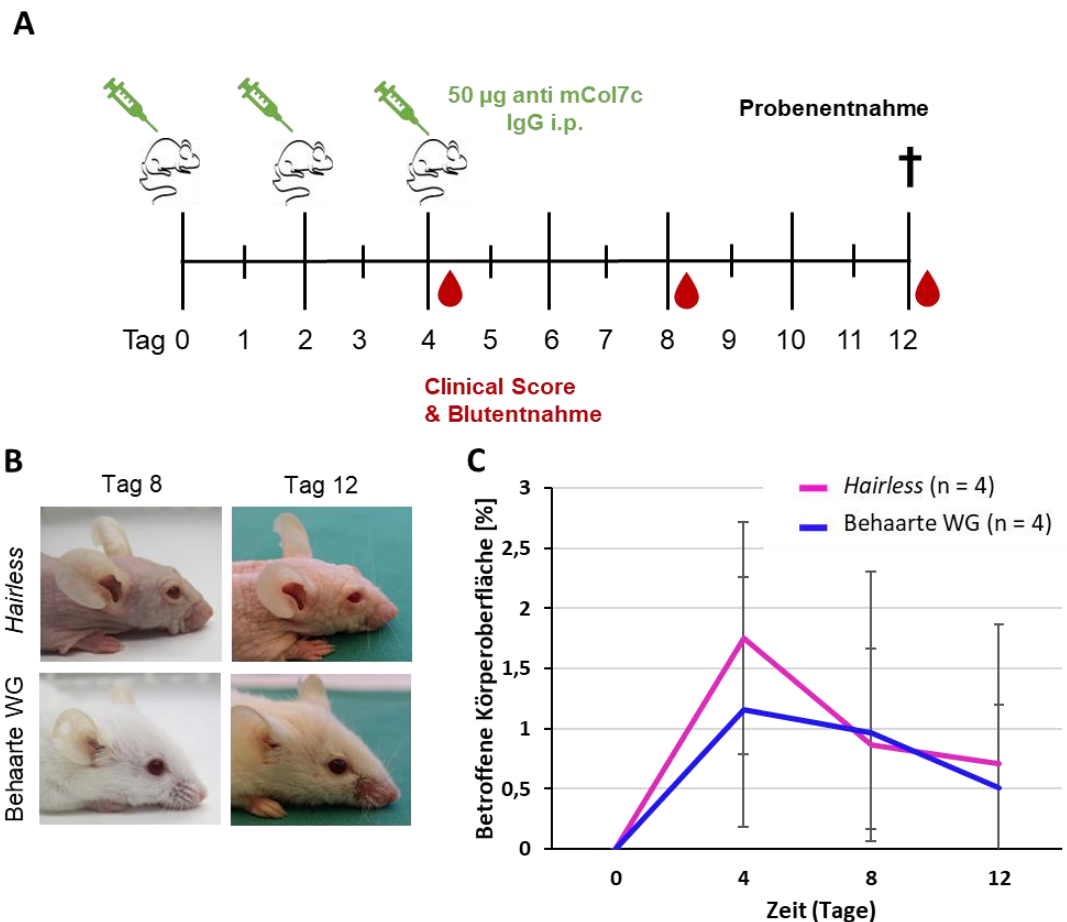
gemäß § 16 Abs. 1 Satz 5 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013
(BGBl. I S. 3125) dahingehend, weitere Eingriffe und Behandlungen an Mäusen
durchzuführen.

Die Genehmigung erstreckt sich nunmehr auch auf die Durchführung von Narkosen unter
Ihrer Aufsicht.

Mit freundlichen Grüßen

Hinz

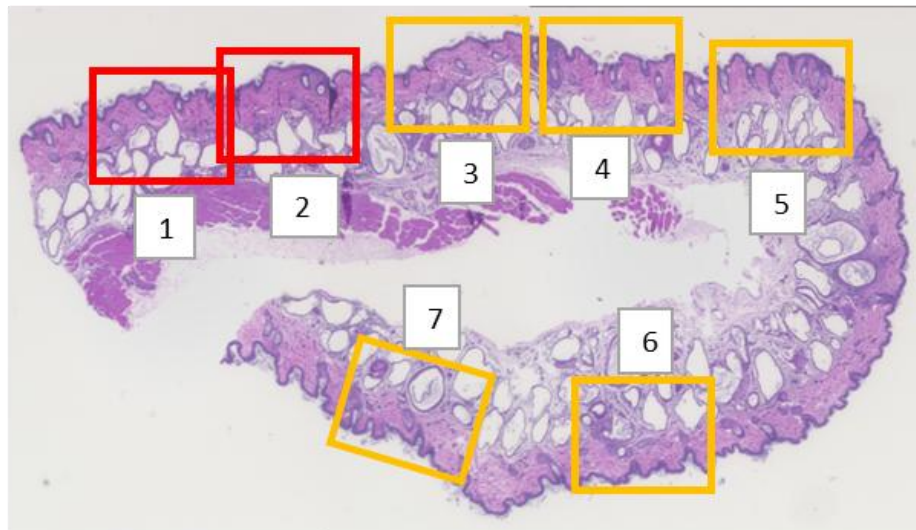
Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |
poststelle@melur.landsh.de | www.melur.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch verschlüsselte
Dokumente.



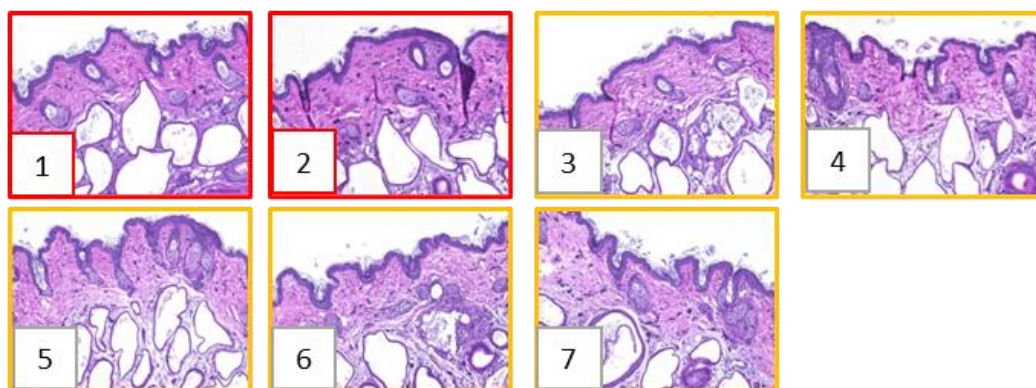
Schematische Darstellung des Versuchsablaufs und exemplarische Ergebnisse des Vorversuchs an *Hairless*-Mäusen und behaarten Wurfgeschwistern

A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: An den Tagen 0, 2 und 4 wurde den *Hairless*-Mäusen (n=4) und den behaarten Wurfgeschwistern (behaarte WG) (n=4) jeweils 50 µg pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) intraperitoneal (i.p.) gespritzt um die experimentelle Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) zu induzieren. An den Tagen 4, 8 und 12 wurden die Tiere in Narkose gelegt. Es erfolgte die Erhebung der von Läsionen betroffenen Körperoberfläche in % (*Clinical Score*) nach einem definierten Scoring-Schema und eine Blutentnahme. Am Versuchsende (Tag 12) wurden die Tiere nach der Blutentnahme und der Erhebung des *Clinical Score* tierschutzgerecht getötet und verschiedene Proben zur weiteren Untersuchung entnommen und asserviert. Icons in Anlehnung an die Darstellung von K. Bieber et al. [43]. **B)** Exemplarische Darstellung von *Hairless*-Mäusen und behaarten WG zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Man erkennt eine gewisse Schwellung der Augenlider und bei den behaarten WG Haarverlust an der Schnauze als Zeichen der Entzündung bei EBA. **C)** Grafische Darstellung der betroffenen Körperoberfläche in % als Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). Mit einer betroffenen Körperoberfläche von maximal 1,5% bis 2,9% in einzelnen Tieren ist die Induktion der EBA sowohl in den *Hairless*-Mäusen als auch in den behaarten WG im Vergleich zu Erfahrungswerten der Versuchsleiter mit der Induktion von EBA in *Black 6* Mäusen eher gering ausgeprägt. Für die weitere Untersuchung wurde daher eine höhere Dosis pathogenes IgG in den Versuchen verwendet.

A) Übersichtsaufnahme Rückenhaut, HE, 40x, *merge*

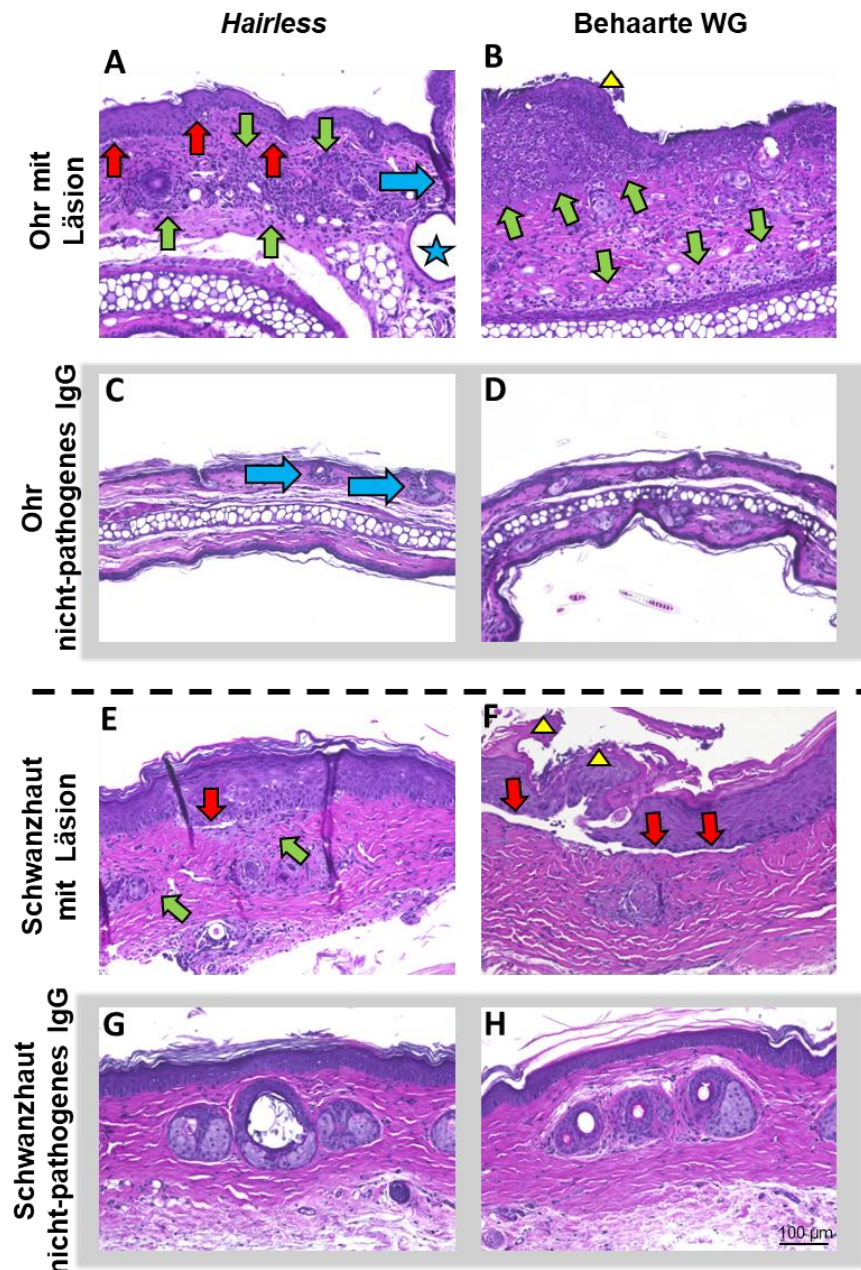


B) Markierte Ausschnitte aus A) in 200x Vergrößerung



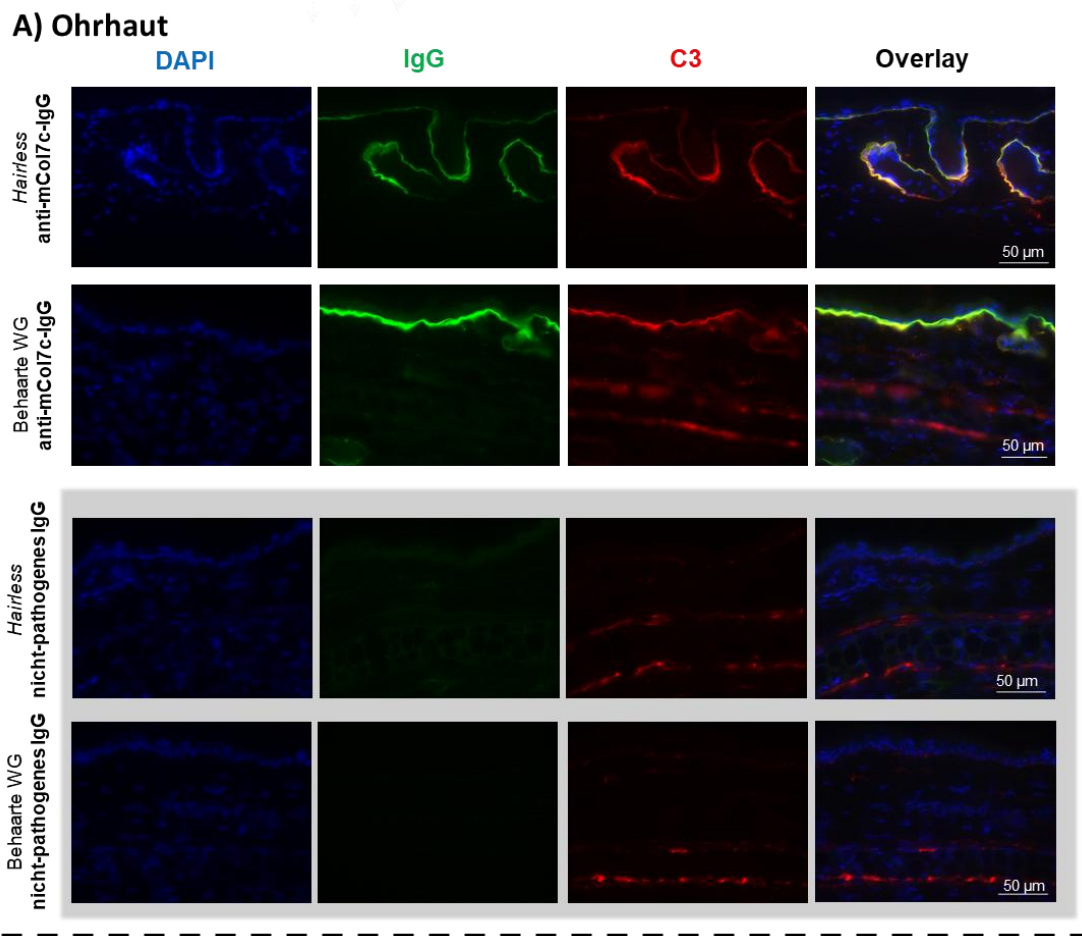
Erstellen nicht überlappender Aufnahmen in 200x Vergrößerung in Hämatoxylin und Eosin-gefärbten Schnitten an Mausgewebe

A) Aufnahme der Rückenhaut einer *Hairless*-Maus in 40-facher Vergrößerung. Es wurden mehrere im Randbereich überlappende Aufnahmen mit dem Keyence BioRevo II angefertigt und mit Hilfe der BZII-Analyzer-Software zu einem Gesamtbild zusammengefügt (*Merge*). In dieser Aufnahme sind die in **B)** dargestellten einzelnen Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung nachträglich markiert. Zeigen sich jetzt Überlappungen der einzelnen *Visual Fields* (VF) (z.B. 1 und 2, rot markiert) so kann nur eines der rot markierten VF für die weitere Auswertung verwendet werden, um eine Doppelerhebung von Messwerten zu vermeiden. **B)** Einzeldarstellung der in **A)** markierten Abschnitte in 200-facher Vergrößerung. Die Bilder in 200-facher Vergrößerung wurden zuvor separat am Keyence Mikroskop angefertigt. Jeweils mindestens 5 VF wurden pro Probe weiter ausgewertet. Unter Verwendung eines mittels BZII-Analyzer Software generierten Maßstabs wurde dann an drei Stellen pro VF die Dicke der Epidermis mittels ImageJ Software gemessen.

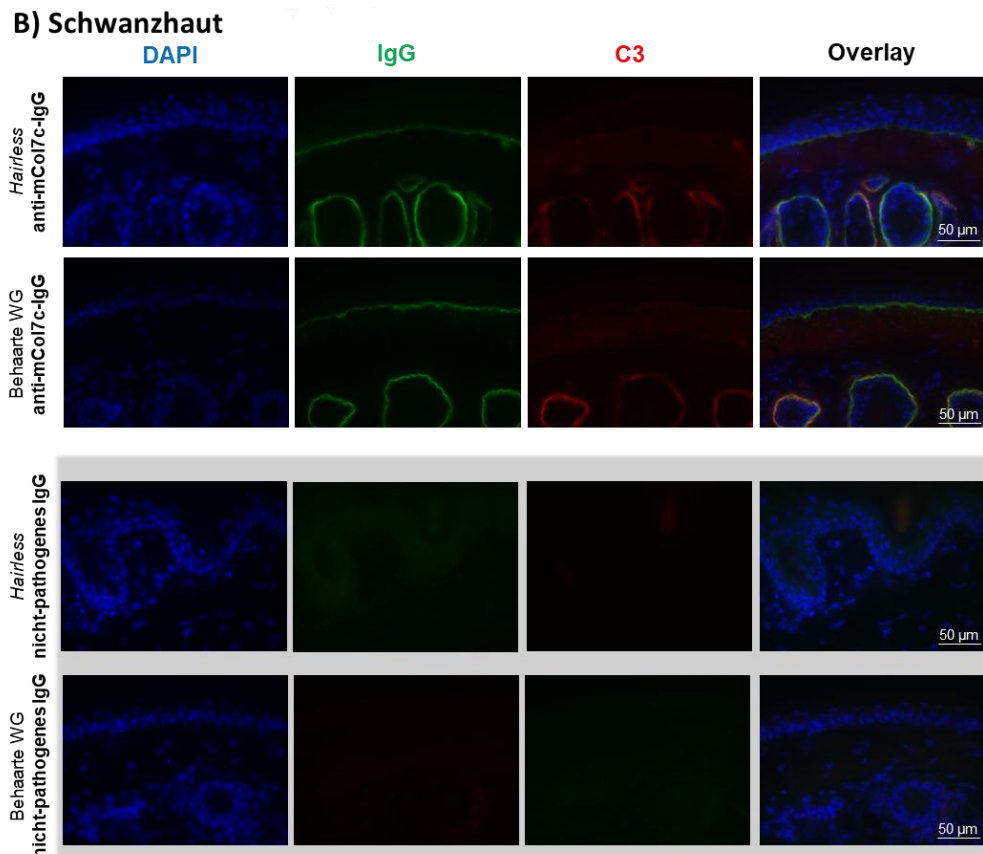


Exemplarische Darstellung der Histomorphologie läSIONaler Hautproben an Ohr und Schwanz der *Hairless*-Mäuse im Vergleich zu behaarten Wurfgeschwistern

Auswahl der mit Hämatoxylin und Eosin-gefärbten Proben der läSIONalen Ohr- (A-D) und der Schwanzhaut (E-G) der *Hairless*-Mäuse (links) und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG, rechts), denen pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) injiziert wurde und Mäusen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (grau hinterlegt). Histologisch erkennt man in den läSIONalen Proben für Epidermolysis bullosa acquisita typische subepidermale Spaltbildung (rote Pfeile), Entzündungszellinfiltrate (migrierte neutrophile Granulozyten) (grüne Pfeile) und vereinzelt Wundschorfbildung (gelbe Dreiecke), die in den Bildern exemplarisch markiert sind. Die für *Hairless*-Mäuse typischen Zysten (blaue Sterne) und die Residuen der Haarfollikel (blaue Pfeile) sind beispielhaft markiert.



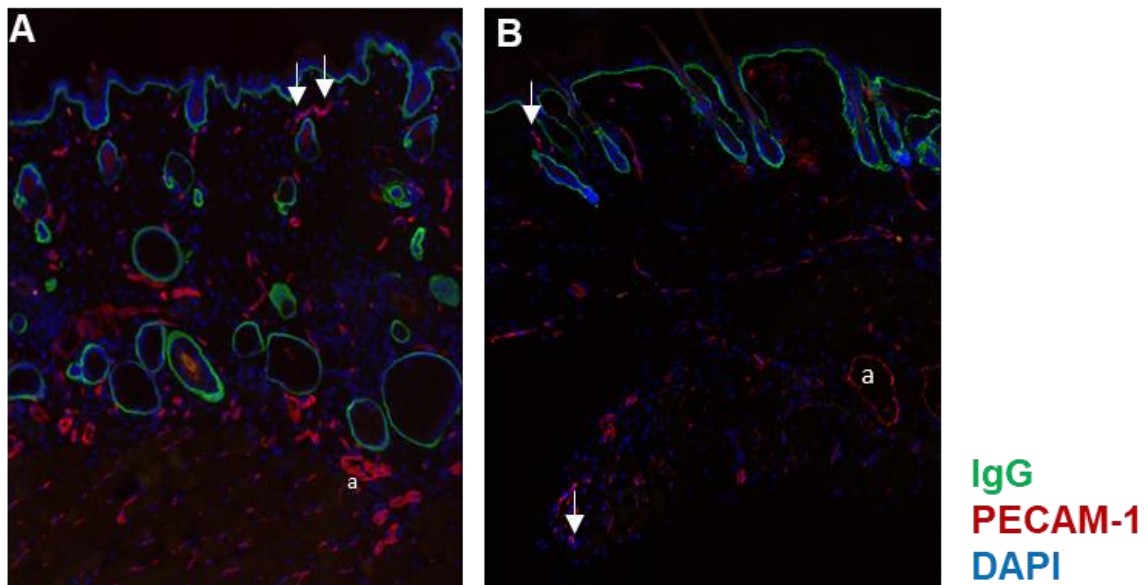
Fortsetzung und Legende auf der nächsten Seite



Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G und Komplementfaktor 3 in Hautproben von *Hairless*-Mäusen

Anti-mCol7c-IgG = pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG); C3 = Komplementfaktor 3; DAPI = 4,6-Diamidin-2-phenylindol; IgG = Immunglobulin G.

Für diese Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden die Gefrierschnitte der Ohr- und Schwanzhaut in Aceton fixiert. Zur Reduktion unspezifischer Bindung der Sekundärantikörper wurde jeder Schnitt mit Ziegennormalserum (ZNS) inkubiert. Die Schnitte wurden entweder direkt mit dem Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-C3) oder mit einer Lösung aus 2% ZNS in PBS (*phosphate buffered saline*) (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper, nicht dargestellt) in einer humiden Dunkelkammer inkubiert. Danach erfolgte auf allen Schnitten nacheinander eine Inkubation mit der ersten Sekundärantikörperlösung (Rhodamin-gekoppeltes Ziege anti-Ratten-IgG, Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis von C3 und im Anschluss mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (*Fluorescein-Isothiocyanat* (FITC)-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis des gewebegebundenen IgG. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten mehrere Waschschriffe der Präparate. Abschließend wurden die Schnitte mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount G eingedeckt. In den Gruppen, denen anti-mCol7c-IgG injiziert wurde ist eine Bindung des IgG und von C3 an die Basalmembran der Ohr- (**A**) und der Schwanzhaut (**B**) der *Hairless*-Mäuse und der behaarten WG erkennbar. Im Overlay ergibt sich aufgrund der Doppelfärbung eine orange-gelbe, der Basalmembran folgendes Fluoreszenzsignal in der Haut der Mäuse, denen pathogenes IgG injiziert wurde. In den Gruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (grau hinterlegt) erkennt man weder eine Anlagerung von IgG noch von C3 entlang der Basalmembran.

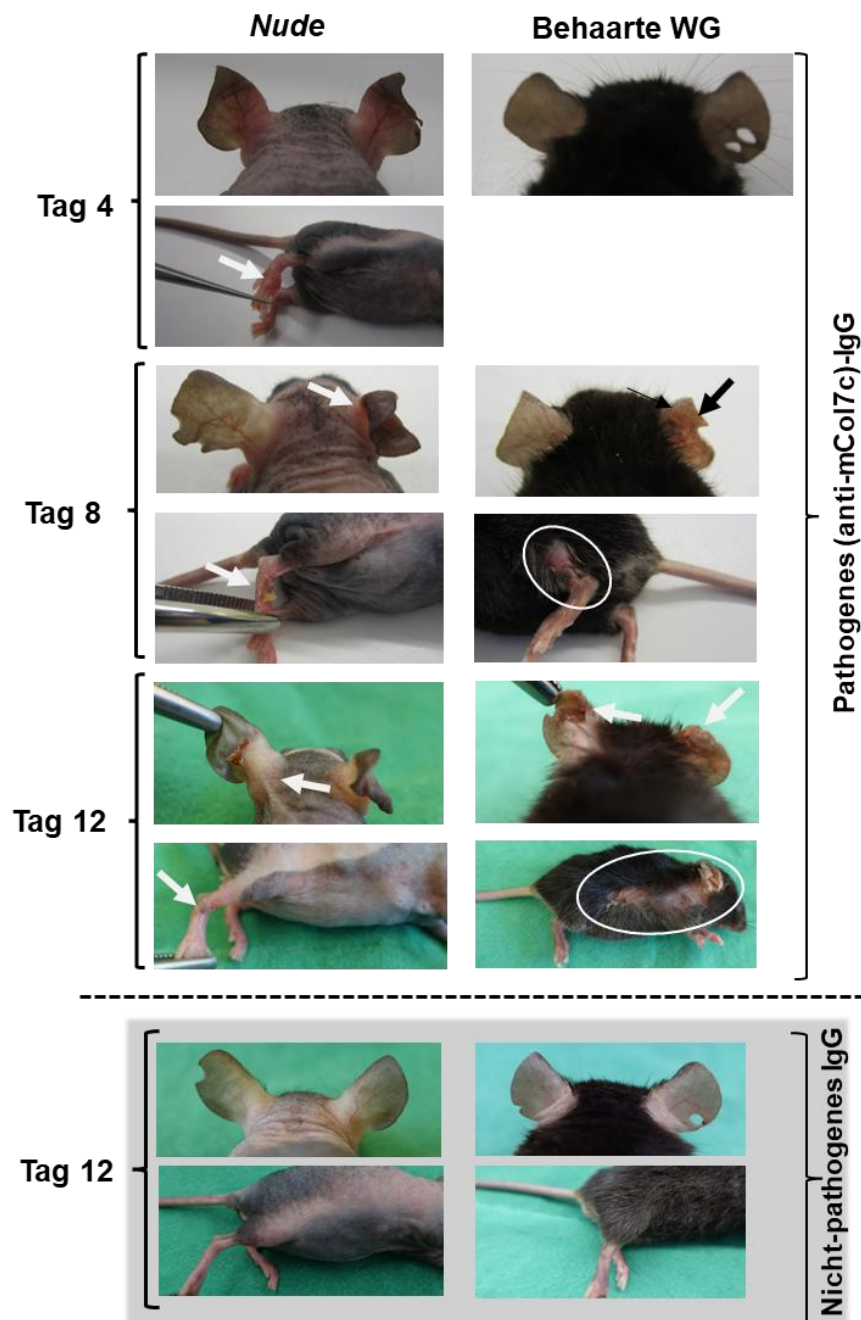


Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für gewebegebundenes Immunglobulin G und *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1* in der Rückenhaut von *Hairless*-Mäusen und behaarten Wurfgeschwistern

Anti-mCol7c-IgG = pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG); DAPI = 4,6-Diamidin-2-phenylindol; IgG = Immunglobulin G; PECAM-1 = *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1*.

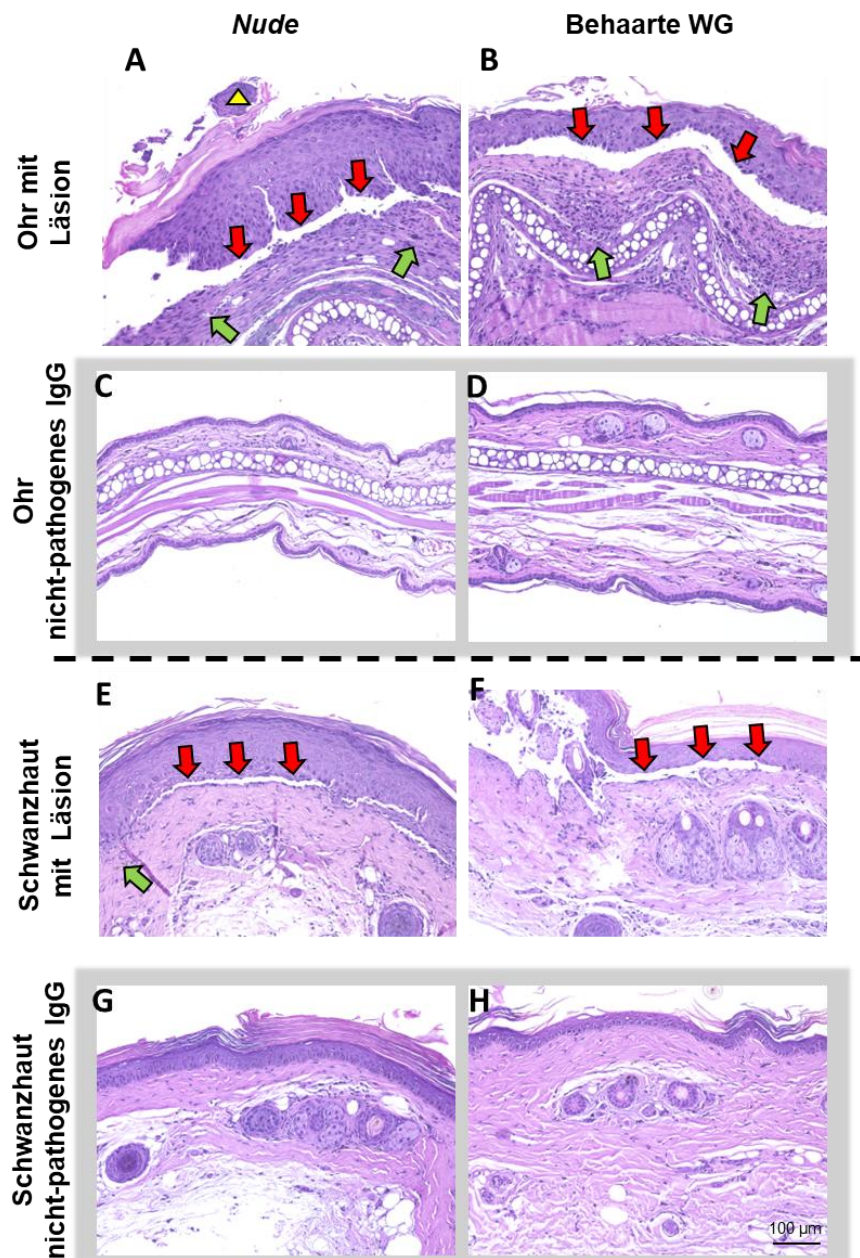
Für diese Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden die Gefrierschnitte der Ohr- und Schwanzhaut in Aceton fixiert. Zur Reduktion unspezifischer Bindung der Sekundärantikörper wurde jeder Schnitt mit Ziegennormalserum (ZNS) inkubiert. Die Schnitte wurden entweder direkt mit dem Primärantikörper [Ratte-anti-Maus-PECAM-1, 1:2000 in 2% ZNS in *phosphate buffered saline* (PBS)] oder mit einer Lösung aus 2% ZNS in PBS (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper, nicht dargestellt) in einer humiden Dunkelkammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte nacheinander die Inkubation in der ersten Sekundärantikörperlösung (Rhodamin-gekoppeltes Ziege anti-Ratten-IgG, zum Nachweis von PECAM-1) in einer Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS und mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (*Fluorescein-Isothiocyanat* (FITC)-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) für je 45 Minuten in der abgedunkelten Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten mehrere Waschschrte der Präparate. Abschließend wurden die Schnitte mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount G eingedeckt.

In der Immunfluoreszenzfärbung ist in den Gruppen, denen anti-mCol7c-IgG injiziert wurde eine Bindung von IgG an die Basalmembran der Haut der *Hairless*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) zu erkennen. Bei den *Hairless*-Mäusen zeigt sich darüber hinaus eine IgG-Bindung entlang der dermalen Zysten und um die Residuen der Haarfollikel herum. In rot dargestellt sind PECAM-1 positive Zellen mit erkennbaren positiven Einzelzellen (Pfeile) und Gefäßlumina (a). Bei den *Hairless*-Mäusen fielen tendenziell mehr Gefäßlumina um die Zysten herum auf. Signifikante Unterschiede zeigten sich in den Rückenhautproben der *Hairless*-Mäuse und der behaarten WG nicht.



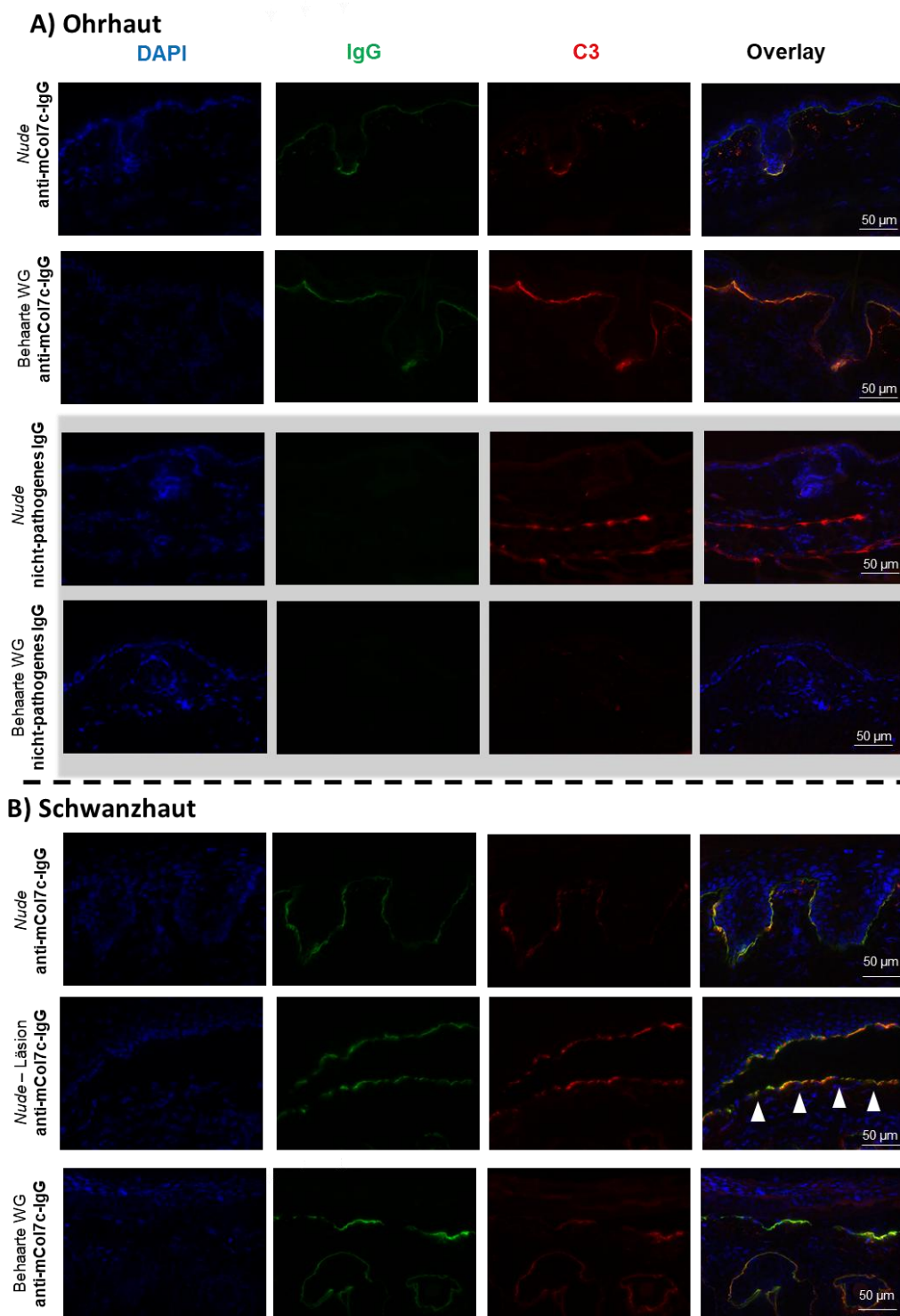
Exemplarische Darstellung Ausprägung der Läsionen zu verschiedenen Versuchszeitpunkten an den Ohren und einzelnen Körperregionen der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister

Die *Nude*-Mäuse zeigten im Vergleich zu den behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) in den Gruppen, denen pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) injiziert wurde, weniger Läsionen an der Körperoberfläche. Hier sind exemplarisch ausgewählte Aufnahmen der Tiere abgebildet, die im Rahmen des Scorings an den Tagen 4, 8 und 12 erhoben wurden. Die Kontrollgruppen (grau hinterlegt), denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde, zeigten zu keinem Zeitpunkt Läsionen an der Körperoberfläche. Läsionen sind exemplarisch mit Pfeilen und Kreisen markiert.



Exemplarische Darstellung läSIONaler Hautproben der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister im Vergleich zu Mäusen, denen nicht-pathogenes Immunglobulin G injiziert wurde

Auswahl der mit Hämatoxylin und Eosin (HE)-gefärbten Proben der Ohr- (**A-D**) und der Schwanzhaut (**E-G**) der *Nude*-Mäuse (links) und der behaarten Wurfgeschwister (behaarte WG) (rechts), denen pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG) oder nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (grau hinterlegt). Histologisch erkennt man in den läSIONalen Proben für die Epidermolysis bullosa acquisita typische subepidermale Spaltbildung (rote Pfeile), Entzündungszellinfiltrate (migrierte neutrophile Granulozyten) (grüne Pfeile) und vereinzelt Wundschorfbildung (gelbes Dreieck), die in den Bildern exemplarisch markiert sind. Die Bilder wurden durch Frau Birte Hell und Frau Friederike Bohne gefertigt. Zur besseren Darstellung wurden die Aufnahmen nachträglich aufgehellt.



Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G und Komplementfaktor 3 in Hautproben von *Nude*-Mäusen und behaarten Wurfgeschwistern

Anti-mCol7c-IgG = pathogenes (anti-mCol7c)-Immunglobulin G (IgG); C3 = Komplementfaktor 3; DAPI = 4,6-Diamidin-2-phenylindol; IgG = Immunglobulin G.

Für diese Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden die Gefrierschnitte der Ohr- und Schwanzhaut in Aceton fixiert. Zur Reduktion unspezifischer Bindung der Sekundärantikörper wurde jeder Schnitt mit Ziegennormalserum (ZNS) inkubiert. Die Schnitte wurden entweder direkt mit dem Primärantikörper (Ratte-anti-Maus-C3) oder mit einer Lösung aus 2% ZNS in PBS (*phosphate buffered saline*) (Spezifitätskontrolle für den Sekundärantikörper, nicht dargestellt) in einer humiden Dunkelkammer inkubiert. Danach erfolgte auf allen Schnitten nacheinander eine Inkubation mit der ersten Sekundärantikörperlösung (Rhodamin-gekoppeltes Ziege-anti-Ratten-IgG, Verdünnung von 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis von C3 und im Anschluss mit der zweiten Sekundärantikörperlösung (*Fluorescein-Isothiocyanat* (FITC)-gekoppeltes Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:200 in 2% ZNS in PBS) zum Nachweis des gewebegebundenen IgG. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten mehrere Waschschriffe der Präparate. Abschließend wurden die Schnitte mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount G eingedeckt. In den Gruppen, denen anti-mCol7c-IgG injiziert wurde ist eine Bindung des IgG und von C3 an die Basalmembran der Ohr- (**A**) und der Schwanzhaut (**B**) der *Nude*-Mäuse und der behaarten Wurfgeschwister erkennbar. Im Overlay ergibt sich aufgrund der Doppelfärbung eine orange-gelbe, der Basalmembran folgendes Fluoreszenzsignal in der Haut der Mäuse, denen pathogenes IgG injiziert wurde. In den Gruppen, denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde (grau hinterlegt) erkennt man ein C3-Signal am Ohrknorpel in den Ohrhautproben, jedoch keine IgG- oder C3-Anlagerung an der Basalmembran. In der läsionalen Schwanzhautprobe der abgebildeten *Nude*-Maus erkennt man exemplarisch die subepidermale Spaltbildung (weiße Dreiecke). Die Aufnahmen wurden teilweise zusammen mit Frau Birte Hell gefertigt.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen (direkt oder indirekt) beteiligten Wegbegleitern meiner Dissertation bedanken, ohne deren Unterstützung die Fertigstellung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonders großer Dank gilt **Frau Prof. Dr. med. vet. Jennifer E. Hundt**, die mich herzlich als Doktorandin in Ihre Arbeitsgruppe aufnahm und so für eine (nicht ganz kurze) Zeit fest integriertes Mitglied einer einzigartigen AG werden durfte. Liebe Jenny, ich danke Dir insbesondere für deine unendliche Geduld und die unzähligen Stunden, die Du in die Betreuung meiner Promotion und die Korrektur der schriftlichen Abfassung investiert hast!

Frau Dr. rer. nat. Katja Bieber danke ich für die Bereitschaft mir dieses „haarige“ Thema zu überlassen und natürlich für die Betreuung der aufwändigen Zucht der verwendeten Mausstämme, ohne die das Projekt gar nicht hätte stattfinden können. **Herrn Dr. Peter Hofmann** danke ich für die Bereitstellung der Wärmebildkamera und die Aufbereitung der erhobenen Daten.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Verantwortlichen und Mitgestaltern des **Lübecker Instituts für experimentelle Dermatologie (LIED)** und des **Graduiertenkollegs 1727 (GRK1727)** bedanken, die mir die Möglichkeit eröffneten, in wissenschaftlich-experimentelles Arbeiten einzusteigen, sowohl im Labor als auch durch die regelmäßigen Fachgespräche und die Möglichkeit an (internationalen) Kongressen teilzunehmen. Ein großer Dank in diesem Zusammenhang auch für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Stipendiums des GRK. Ich danke meinen Mentoren **Frau Dr. rer. nat. Anika Kasprick** und **Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Karsten** für die Unterstützung und den wertvollen Ideenaustausch.

Selbstverständlich möchte ich mich besonders herzlich bei all meinen „**Mitstreitern**“ und **Wegbegleitern aus der AG Hundt und aus Haus 32** bedanken! Insbesondere bei **Frau Nadine Merg** für Ihre physische und psychische Unterstützung innerhalb und auch außerhalb des Laboralltags, die immer eine Lösung parat und ein offenes Ohr für alle Anliegen hatte. Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle auch **Frau Birte Hell, Frau Inka Alten und Frau Friederike Bohne**, die in ihren Arbeiten die verblindete Auswertung dieses Projektes ermöglicht haben!

Am Ende, aber keinesfalls zuletzt, möchte ich mich bei meiner **Familie, meinen Freunden und meiner Fellnase Teoline** für die fortwährende Unterstützung bedanken. Ohne Euch wäre eine Fertigstellung dieses Projektes undenkbar gewesen. **Danke!**