

Aus dem  
Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie  
Leiter Prof. Dr. Ralf Ludwig

## **Etablierung eines humanen 3D Hautmodells für Pemphigus**



Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-  
vorgelegt von

Edda Luise Viktoria Janusch  
aus Eutin

Lübeck 2025

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

Ko-Betreuer\*in: PD Dr.med. Dr. rer. nat. Christoph Hammers

2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. rer. nat. Kathrin Kalies

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.12.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# 1 Inhaltsverzeichnis

1.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	5
1.2	TABELLENVERZEICHNIS .....	7
1.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	8
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
2.1	AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT .....	10
2.1.1	<i>Epidermis</i> .....	11
2.1.2	<i>Dermis</i> .....	17
2.1.3	<i>Subcutis</i> .....	17
2.2	AUTOIMMUNITÄT .....	18
2.2.1	<i>Aufbau und Funktion von Immunglobulinen</i> .....	18
2.2.2	<i>PX43 als Einzelkettenfragment</i> .....	19
2.3	PEMPHIGUS VULGARIS .....	21
2.3.1	<i>Epidemiologie</i> .....	21
2.3.2	<i>Ätiologie</i> .....	21
2.3.3	<i>Klinische Symptome</i> .....	23
2.3.4	<i>Diagnostik</i> .....	23
2.3.5	<i>Therapie</i> .....	25
2.3.6	<i>Prognose</i> .....	25
2.4	PEMPHIGUS FOLIACEUS .....	26
2.4.1	<i>Epidemiologie</i> .....	26
2.4.2	<i>Ätiologie</i> .....	26
2.4.3	<i>Klinische Symptome</i> .....	27
2.4.4	<i>Diagnostik</i> .....	27
2.4.5	<i>Therapie</i> .....	28
2.4.6	<i>Prognose</i> .....	28
2.5	PROJEKTBEZOGENE VORARBEITEN .....	29
2.6	HAUTMODELLE .....	30
2.7	ZIELE MEINER FORSCHUNGSARBEIT .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>32</b>
3.1	GERÄTE .....	32
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	34
3.3	REAGENZIEN.....	36
3.4	NÄHRMEDIEN.....	38
3.5	ANTIKÖRPER.....	38
3.6	SOFTWARE .....	40
3.7	ETHIKVOTUM.....	40
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>41</b>
4.1	KULTIVIERUNG DER KERATINOZYTEN UND FIBROBLASTEN .....	41
4.1.1	<i>Isolation der Keratinozyten</i> .....	42
4.1.2	<i>Isolation der Fibroblasten</i> .....	44
4.1.3	<i>Passagieren der Keratinozyten</i> .....	45
4.1.4	<i>Passagieren der Fibroblasten</i> .....	46
4.1.5	<i>Kryokonservierung der Keratinozyten</i> .....	48
4.1.6	<i>Kryokonservierung der Fibroblasten</i> .....	48
4.1.7	<i>Aussaat der kryokonservierten Keratinozyten</i> .....	49
4.1.8	<i>Aussaat der kryokonservierten Fibroblasten</i> .....	50
4.2	HUMANES 3D HAUTMODELL .....	51
4.2.1	<i>Versuchsaufbau und Durchführung</i> .....	51
4.2.2	<i>Applikation von PX43</i> .....	55
4.3	HISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN .....	56
4.3.1	<i>Hämatoxylin- Eosin Färbung</i> .....	57
4.4	DIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG .....	59
4.4.1	<i>Direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43</i> .....	60
4.5	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN .....	62

4.5.1	BP180.....	63
4.5.2	BP230.....	66
4.5.3	Desmoglein 1.....	68
4.5.4	Desmoglein 3.....	70
4.5.5	Filaggrin.....	72
4.5.6	Ki-67/ TUNEL.....	75
4.5.7	Loricrin.....	77
4.5.8	Zytokeratin 6.....	79
4.5.9	Zytokeratin 10.....	81
4.5.10	Zytokeratin 15.....	83
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>86</b>
5.1	ERFOLGREICHES HERSTELLEN EINER 3D HAUT .....	86
5.1.1	Vergleichbarkeit von 3D Haut und normaler humaner Haut.....	86
5.1.2	Nachweis epidermaler Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	88
5.2	PX43 BINDET IN DER EPIDERMIS DER 3D HAUT.....	93
5.3	PX43 VERURSACHT EIN LÖSEN DER ZELLADHÄSION IN DER 3D HAUT .....	96
5.4	UNTERSCHIEDE DER AUSWIRKUNG VON PX43 IN 3D HAUT ZUM HUMANEN HAUTORGANKULTURMODELL FÜR PEMPHIGUS VULGARIS.....	98
5.5	UNTERSCHIEDE DER AUSWIRKUNG VON PX43 IN 3D HAUT ZUM PEMPHIGUS FOLIACEUS .....	99
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>100</b>
6.1	DER VERGLEICH VON 3D HAUT UND NORMALER HUMANER HAUT.....	100
6.2	DAS HUMANE 3D HAUTMODELL FÜR PEMPHIGUS .....	104
6.3	VORZÜGE UND NACHTEILE DES 3D HAUTMODELLS FÜR PEMPHIGUS .....	107
6.4	MÖGLICHE FEHLER DES VERSUCHSAUFBAUS/-ABLAUFS .....	109
6.5	AUSBLICK.....	111
6.6	FAZIT.....	113
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>ANHÄNGE.....</b>	<b>126</b>
9.1	POSTER .....	126
9.2	ETHIKVOTUM.....	127
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>128</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>129</b>

## 1.1 Abkürzungsverzeichnis

#	Katalognummer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
3D	Dreidimensional
BP	Bullöses Pemphigoid
bzw.	beziehungsweise
CK	Zytokeratin
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DIF	Direkte Immunfluoreszenzfärbung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
g	Gewichtskraft (g-Kraft)
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution (10x)</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSOC	Humanes Hautorgankulturmodell ( <i>Human skin organ culture</i> )
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IIF	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung
Ig	Immunglobulin
KBM2	<i>Keratinocyte Basal Medium 2</i>
KGM2	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>
KGM2-Mix	<i>Keratinocyte Growth Medium 2-Mix</i>

Ki-67	Kiel-67
L	Liter
LIED	Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
NGS	Normales Ziegenserum ( <i>normal goat serum</i> )
NHS	Normale humane Haut ( <i>normal human skin</i> )
OT	Objektträger
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PF	Pemphigus foliaceus
PV	Pemphigus vulgaris
scFv	Einzelkettenfragment ( <i>single chain variable fragment</i> )
sec	Sekunde
SKDM	<i>Supplemented keratinocyte defined medium</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TUNEL	<i>Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
WB	<i>Washing buffer</i>

## 1.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1. Geräte.</b> .....	32
<b>Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien.</b> .....	34
<b>Tabelle 3. Reagenzien.</b> .....	36
<b>Tabelle 4. Zellnährmedien.</b> .....	38
<b>Tabelle 5. Antikörper.</b> .....	38
<b>Tabelle 6. Software.</b> .....	40
<b>Tabelle 7. Information zu den verwendeten Hautspender*innen.</b> .....	41
<b>Tabelle 8. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE).</b> .....	57
<b>Tabelle 9. Herzustellende Lösungen für die direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43.</b> .....	60
<b>Tabelle 10. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von BP 180.</b> .....	63
<b>Tabelle 11. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von BP 230.</b> .....	66
<b>Tabelle 12. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Desmoglein 1.</b> .....	68
<b>Tabelle 13. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Desmoglein 3.</b> .....	70
<b>Tabelle 14. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Filaggrin.</b> .....	72
<b>Tabelle 15. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Ki-67/TUNEL.</b> .....	75
<b>Tabelle 16. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Loricrin.</b> .....	77
<b>Tabelle 17. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin 6.</b> .....	79
<b>Tabelle 18. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin 10.</b> .....	81
<b>Tabelle 19. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin 15.</b> .....	83

### 1.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1. Schematische Abbildung der humanen Haut im Querschnitt.....</b>	<b>11</b>
<b>Abbildung 2. Aufbau der Epidermis dargestellt durch eine schematische Abbildung und eine Hämatoxylin-Eosin Färbung von normaler humaner Haut. ....</b>	<b>12</b>
<b>Abbildung 3 Schematische Darstellung eines humanen Desmosoms. ....</b>	<b>13</b>
<b>Abbildung 4. Schematische Darstellung eines Immunglobulin (Ig) G.....</b>	<b>19</b>
<b>Abbildung 5. Schematische Darstellung eines Immunglobulin (Ig) G und eines Einzelkettenfragments (scFv). ....</b>	<b>20</b>
<b>Abbildung 6. Desmoglein-Kompensation in Pemphigus.....</b>	<b>22</b>
<b>Abbildung 7. Klinische und histologische Präsentation eines Pemphigus vulgaris.....</b>	<b>23</b>
<b>Abbildung 8. Immunhistologische Färbung von Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus. ....</b>	<b>24</b>
<b>Abbildung 9. Klinische und histologische Präsentation eines Pemphigus foliaceus.....</b>	<b>27</b>
<b>Abbildung 10. Isolierte Keratinozyten. ....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 11. Isolierte Fibroblasten.....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 12. Kultivierte Keratinozyten.....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 13. Kultivierte Fibroblasten.....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 14. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des humanen 3D Hautmodells. ....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 15. Fotografie der 3D Häute in den Inserts unter der sterilen Werkbank. ....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 16. Schematische Abbildung der Applikationswege in die 3D Häute in meiner Forschungsarbeit. ....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 17 Hämatoxylin-Eosin Färbung von normaler humaner Haut. ....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 18. Schematische Darstellung von A direkten und B indirekten Immunfluoreszenzfärbungen. ....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 19. Direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43 eines Hautorgankulturmodells von Pemphigus vulgaris. ....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 20. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf humaner Haut von BP 180. ....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 21. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf humaner Haut von BP 230. ....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 22. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Desmoglein (DSG) 1. ....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 23. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Desmoglein (DSG)3. ....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 24. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Filaggrin.....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 25. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Ki-67/TUNEL. ....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 26. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Loricrin.....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 27. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Zytokeratin (CK) 6.....</b>	<b>81</b>

<b>Abbildung 28. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Zytokeratin (CK) 10.</b>	83
<b>Abbildung 29. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Zytokeratin (CK) 15.</b>	85
<b>Abbildung 30. Hämatoxylin-Eosin Färbung von normaler humaner Haut und 3D Haut.</b>	87
<b>Abbildung 31. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Desmoglein (DSG) 1.</b>	88
<b>Abbildung 32. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf humaner Haut und 3D Haut von Desmoglein (DSG) 3.</b>	89
<b>Abbildung 33. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Filaggrin.</b>	89
<b>Abbildung 34. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Loricrin.</b>	90
<b>Abbildung 35. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Zytokeratin (CK) 6.</b>	91
<b>Abbildung 36. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Zytokeratin (CK) 10.</b>	91
<b>Abbildung 37. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Zytokeratin (CK) 15.</b>	92
<b>Abbildung 38. Direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43.</b>	94
<b>Abbildung 39. Hämatoxylin-Eosin Färbung von 3D Haut.</b>	96
<b>Abbildung 40. Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Hautorgankulturmodells.</b>	98
<b>Abbildung 41. Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Patienten mit Pemphigus foeliaceus.</b>	99

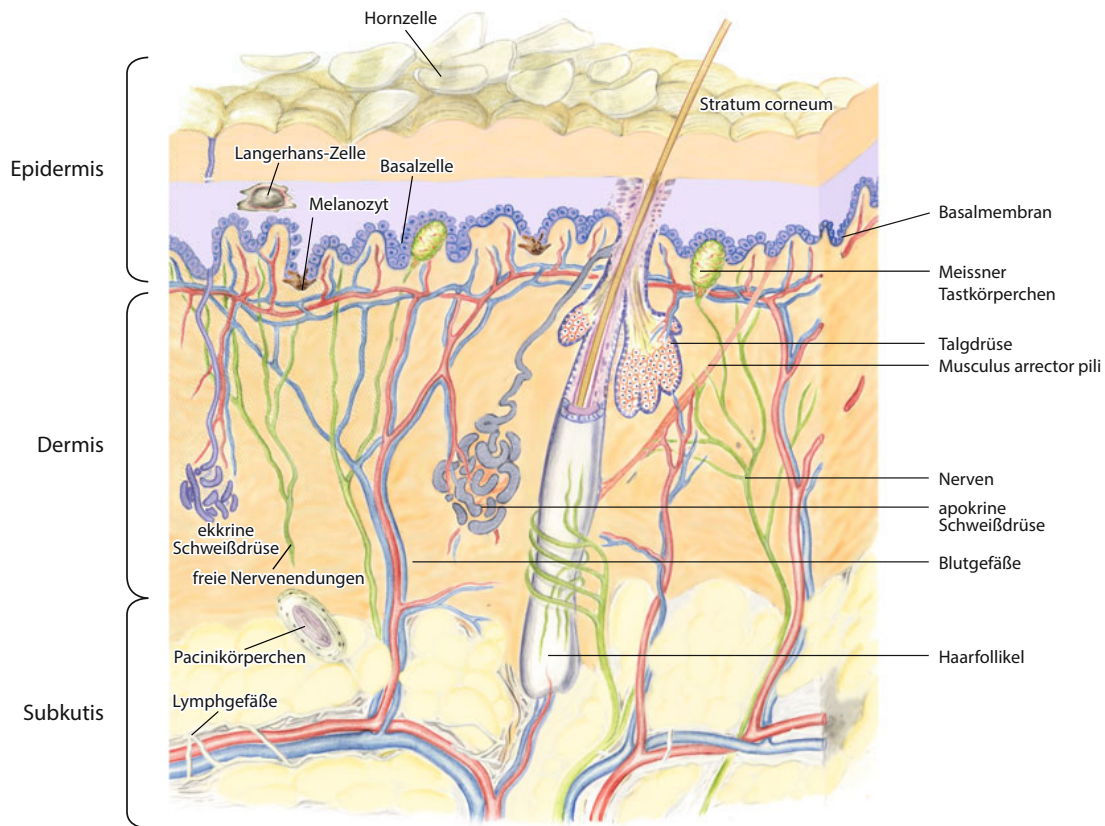
## 2 Einleitung

Im Folgenden ist eine Einleitung in die Thematik inklusive Aufbau und Funktion der Haut, der Krankheitsbilder Pemphigus vulgaris (PV) und Pemphigus foliaceus (PF), projektbezogenen Vorarbeiten und der Ziele meiner Forschungsarbeit aufgeführt.

### 2.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die humane Haut dient als Grenzorgan zur Außenwelt. Sie besitzt zahlreiche komplexe und lebenswichtige Aufgaben, vor allem dient sie als Schutz vor äußeren Einflüssen. Dazu zählen der thermische und mechanische Stress, die Dehydratation, aber auch der Schutz vor Bakterien, Viren, Pilzen und Allergenen (Jensen & Proksch, 2009). Die Haut übernimmt die Thermoregulation des Körpers und ist an der Vitamin-D-Synthese beteiligt (Goebeler & Hamm, 2017). Des Weiteren kann die Haut Stoffe aufnehmen und Sebum abgeben. Auch die Sensorik wird über verschiedene Zelltypen der Haut aufgenommen und weitergeleitet, sodass ein Empfinden der Umwelt stattfindet. Zunehmend steht das Hautmikrobiom im Fokus aktueller Forschung (Schommer & Gallo, 2013).

Die Haut ist von außen nach innen in Epidermis, Dermis und Subcutis (**Abbildung 1**) unterteilt, welche nachfolgend einzeln erläutert werden.



**Abbildung 1. Schematische Abbildung der humanen Haut im Querschnitt.**

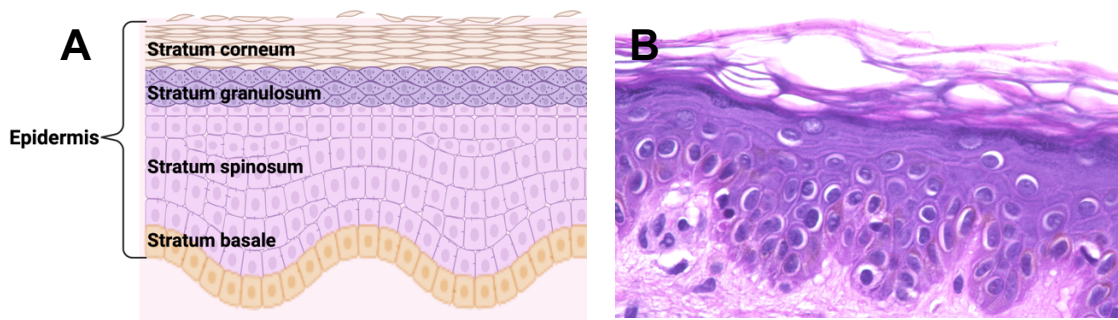
Die humane Haut besteht aus drei Schichten: der Epidermis, der Dermis und der Subcutis. Die Epidermis besteht vorwiegend aus dichten Zelllagen von Keratinozyten. Die Dermis setzt sich zusammen aus Bindegewebe, sowie Drüsen, Haarfollikeln und Nervenendungen. Die Subcutis besteht vorwiegend aus Fettgewebe und lockerem Bindegewebe. Abbildung stammt aus Goebeler & Hamm, 2017

### 2.1.1 Epidermis

Die humane Epidermis besteht aus unterschiedlichen Zellarten, etwa 80% der Zellen sind Keratinozyten. Zudem sind Melanozyten als Pigmentzellen, Langerhans-Zellen, als Zellen des Immunsystems und Merkelzellen, als sensorische Zellen der Haut vorhanden (Kolarsick *et al.*, 2011).

Die Epidermis fungiert als mechanische Barriere und damit als Schutz für den Organismus.

Die Epidermis lässt sich in verschiedene Zellschichten einteilen, Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (**Abbildung 2**). In der Leistenhaut, welche sich an den Handflächen und Fußsohlen befindet, gibt es zusätzlich das Stratum lucidum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum. Die Keratinozyten unterscheiden sich durch ihre Morphologie und ihren Differenzierungsgrad in jeder Schicht (Goleva *et al.*, 2019).



**Abbildung 2. Aufbau der Epidermis dargestellt durch eine schematische Abbildung und eine Hämatoxylin-Eosin Färbung von normaler humaner Haut.**

**A** Der Aufbau der Epidermis ist durch verschiedene Schichten charakterisiert. Von außen nach innen sind das, das Stratum corneum, das Stratum granulosum, das Stratum spinosum und das Stratum basale. **B** In der normalen humanen Haut sind die einzelnen Schichten zu erkennen. Hergestellt mit Biorender.com

Die Keratinozyten durchwandern die Epidermis in etwa 4 Wochen vom Stratum basale über das Stratum spinosum, das Stratum granulosum bis in das Stratum corneum, dieser Vorgang wird als terminale Differenzierung bezeichnet (Gandarillas *et al.*, 1999).

Ausschlaggebend für die Differenzierung der Keratinozyten sind zahlreiche Faktoren unter anderem die Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration innerhalb der jeweiligen Schicht, der pH-Wert (Bikle, 2004) und der Kontaktverlust zur Basalmembran (Jeriha *et al.*, 2020).

Das Stratum basale liegt der Basalmembran auf. Es besteht aus einer einzelnen Zellschicht aus Keratinozyten, welche am wenigsten differenziert und sehr proliferativ sind. Die Keratinozyten des Stratum basale sind mit fokalen Adhäsionen und Hemidesmosomen an der Basalmembran befestigt und bilden hier eine Barrierefunktion (Jeriha *et al.*, 2020).

Das Stratum spinosum liegt oberhalb des Stratum basale und besteht aus 5-8 Zellschichten von vitalen, höher differenzierten Keratinozyten. Diese besitzen stachelartige Ausläufer, welche benachbarte Zellen mittels Desmosomen (**siehe 2.1.1.1**) verbinden (Yousef *et al.*, 2022).

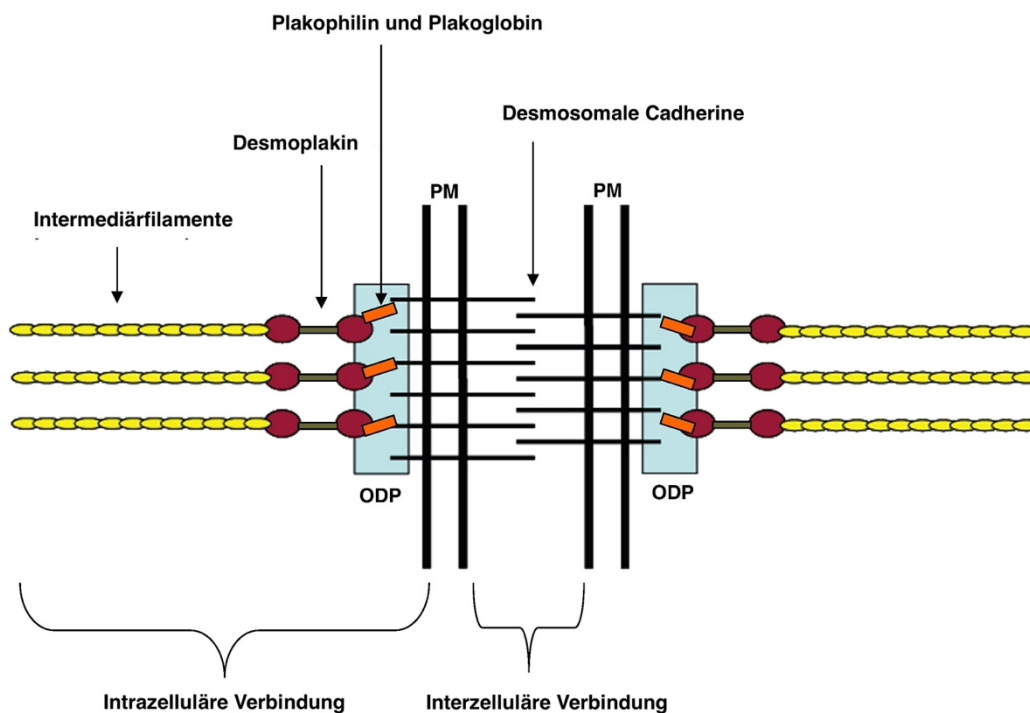
Das Stratum granulosum liegt oberhalb des Stratum spinosum und besteht aus ausdifferenzierten teilweise schon in die Apoptose eingetretenen Keratinozyten. Die Dicke der Zellschicht variiert von 1 bis 3 Zellschichten. Die vorhandenen Zelladhäsionen werden durch *Tight junctions* ergänzt (Bäsler & Brandner, 2017). Die Keratinozyten sind abgeflacht und enthalten hyaline Granula, welche im Verlauf maßgeblich an der Keratinisierung beteiligt sind (Fuchs, 1993).

Die Keratinisierung beschreibt die Umwandlung von vitalen Keratinozyten über die verhornte Zellhülle der Keratinozyten in avitales Keratin (Smack *et al.*, 1994).

Das Stratum corneum liegt oberhalb des Stratum spinosum und besteht aus flachen, avitalen Keratinozyten ohne Zellorganellen und ohne Zellkern, die auch Korneozyten genannt werden (Pondeljak *et al.*, 2023). Sie stellen das Ergebnis der epidermalen, terminalen Differenzierung dar. Ein intaktes Stratum corneum leistet einen enormen Beitrag zum mechanischen und chemischen Schutz vor der Außenwelt (Murphrey *et al.*, 2024). Dies geschieht mithilfe von extrazellulären Lipiden, welche chemische Stabilität geben und Corneodesmosomen, modifizierte Desmosomen im Stratum corneum, welche mechanische Stabilität geben (Hafttek, 2015).

### 2.1.1.1 Desmosomen

Desmosomen sind Zell-Zellkontakte, die für eine große Stabilität innerhalb eines Gewebes sorgen. Sie kommen vor allem in Geweben mit großer mechanischer Beanspruchung vor, wie der Epidermis und des Myokards und sorgen für eine starke inter- und intrazelluläre Adhäsion.



**Abbildung 3 Schematische Darstellung eines humanen Desmosoms.**

Das Desmosom besteht aus inter- und intrazellulären Verbindungen. Die interzelluläre Verbindung entsteht durch desmosomale Cadherine. Die intrazellulären Verbindungen erfolgt über die Armadillo-Proteine Plakophilin und Plakoglobin, welche an Desmoplakin gebunden sind. Desmoplakin ist mit den Intermediärfilamenten verbunden. ODP – Outer dense plaque, PM – Plasmamembran; Abbildung aus Garrod & Chidgey, 2008 modifiziert.

Für die Stabilität sorgen fünf desmosomale Proteine (**Abbildung 3**), Desmoglein (DSG), Desmocollin (DSC), Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin (Mohammed & Chidgey, 2021). DSG und DSC gehören zu den desmosomalen Cadherinen, diese bilden die extrazelluläre Verbindung zwischen zwei Zellen. Der zytoplasmatische Teil der Cadherine bindet die Armadillo-Proteine Plakophilin und Plakoglobin. Diese wiederum binden Desmoplakin, welches das Desmosom durch Intermediärfilamente am Zytoskelett verankert. (Broussard *et al.*, 2020; Garrod & Chidgey, 2008).

Die desmosomalen Cadherine, DSG und DSC, unterscheiden sich in vier Unterformen der DSG 1-4 und drei Unterformen von DSC 1-3. Je nach Gewebe unterscheidet sich die Ausprägung der desmosomalen Cadherine. In der Epidermis kommen DSG 1 und DSC 1 in den oberen, weiter differenzierten Zellschichten vor. DSG 3 und DSC 3 hingegen, sind in den basalen, weniger differenzierten Zellschichten ausgeprägt und finden sich in großer Zahl in der oralen Schleimhaut. Dort sind DSG 1 und DSC 1 hingegen nur minimal vorhanden. DSG 2 wird unspezifisch in nahezu allen Geweben nachgewiesen, welche Desmosomen enthalten (Miguel *et al.*, 2022). DSG 4 wird stark in Haarfollikeln exprimiert (Moreno-Sosa *et al.*, 2021).

Desmosomen sind keine starren Strukturen, sondern werden auf- und abgebaut. So ist die Zellmigration innerhalb der Epidermis und das Reagieren auf äußere Reize möglich. Desmosomen enthalten vier Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-abhängige Cadherin Wiederholungen (EC 1-4) in den extrazellulären Domänen, so sorgen erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen für eine desmosomale Formation (Kitajima, 2013).

#### 2.1.1.2 Markerproteine

Markerproteine sind Proteine, welche für eine zellbiologische Struktur kennzeichnend sind. Es gibt eine Vielzahl an Markerproteinen in unterschiedlichen Geweben, welche nachgewiesen werden können. In dieser Forschungsarbeit haben wir uns auf DSG 1, DSG 3, Bullöses Pemphigoid (BP) 180, BP 230, Zytokeratin (CK) 6, CK 10, CK 15, Loricrin, Filaggrin, Kiel (Ki)-67 und *Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL) fokussiert. Die Proteine wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht.

Das Vorkommen und die Funktion von DSG 1 und DSG 3 wurde bereits ausführlich in 2.1.1.1 beschrieben, sie zählen jedoch auch zu unseren nachgewiesenen Markerproteinen.

BP 180 ist ein 180 kDa schweres Protein. Es befindet sich in der transmembranen Region und ist auch bekannt als Typ XVII Kollagen oder BP Antigen 2. BP 180 ist ein zentraler Bestandteil der Hemidesmosomen, welche die Keratinozyten an der Basalmembran befestigen. So kann BP 180 auch im Bereich der Basalmembran nachgewiesen werden (Tuusa *et al.*, 2021). Antikörper gegen BP 180 können bei Patient\*innen, welche am BP erkrankt sind, nachgewiesen werden (Mai *et al.*, 2022).

BP 230 ist ein 230 kDa schweres Protein. Es ist wie BP 180 an der Basalmembran lokalisiert an der intrazellulären Plaque der Hemidesmosomen, es wird auch BP Antigen 1 genannt (Cole *et al.*, 2022). Es ist ein zentrales Protein, der Hemidesmosomen und trägt zur Adhäsion der Keratinozyten an der Basalmembran bei. Im Rahmen des BP treten Antikörper gegen BP 230 und BP 180 auf und verursachen eine subepidermale Spaltbildung (Shih *et al.*, 2020).

CK werden von epithelialen Zellen gebildet und gehören zu den Intermediärfilamenten. Sie können aufgrund ihres pH-Wertes in saure (CK 1-8) und in neutral-basische CK (CK 9-20) eingeteilt werden. CK werden in einer sehr spezifischen Anordnung in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten exprimiert (Moll *et al.*, 2008).

CK 6 wird in physiologischer humaner Haut nicht exprimiert. Es kann in den Schleimhäuten, in Haarfollikeln und in den, an eine Wunde grenzenden, Keratinozyten nach einer Verletzung nachgewiesen werden. Hier bewirken sie als Alarmine eine Proliferations-, Zelladhäsions- und Migrationssteigerung (Zhang *et al.*, 2019). Auch in der entzündlichen Hauterkrankung Psoriasis wird CK 6 vermehrt exprimiert (L. Yang *et al.*, 2017).

CK 10 kann in suprabasalen Schichten der Epidermis nachgewiesen werden. Die Keratinozyten exprimieren während der terminalen Differenzierung CK 10 (S. Yang *et al.*, 2016). Zusammen mit CK 1 bildet CK 10 das wichtigste Keratin der

oberen Schichten der Epidermis und sorgt damit für mechanische Stabilität (Lacz *et al.*, 2005). Im Falle einer Mutation des CK 10 Gens kann es zur epidermolytischen Hyperkeratose kommen (Uhlig *et al.*, 2022).

CK 15 ist ein Markerprotein für die das Stratum basale der Epidermis. CK 15 markiert die basalen sich proliferierenden Stammzellen (Bose *et al.*, 2013). Diese Keratinozyten sind nicht differenziert und sobald sie das Stratum spinosum erreichen, kann CK 15 nicht mehr nachgewiesen werden (Moll *et al.*, 2008).

Der Name Filaggrin stammt von der Fähigkeit Intermediärfilamente aggregieren zu können (Ford, 1986). Es entsteht aus seinem Vorläufer Profilaggrin. Filaggrin kann in der äußersten Schicht der Epidermis dem Stratum corneum und der darunter liegenden Schicht, dem Stratum granulosum, nachgewiesen werden. Es ist ein zentraler Bestandteil der verhornten Zellhülle der Keratinozyten (Brown & Irwin McLean, 2012; Harding *et al.*, 2013). Damit verbunden markiert Filaggrin den Übergang von Keratinozyten in Korneozyten (**siehe 2.1.1**). Mutationen im Filaggrin-Gen sorgen für wichtige, weit verbreitete Dermatosen wie die atopische Dermatitis (Stefanovic & Irvine, 2024).

Loricrin ist ebenfalls ein zentraler Bestandteil der verhornten Zellhülle der Keratinozyten beziehungsweise (bzw.) Korneozyten. So befindet sich die Expression im Stratum granulosum und Stratum corneum der Epidermis (Hohl *et al.*, 1991; Ishitsuka & Roop, 2020; Nithya *et al.*, 2015).

Ki-67 ist ein nukleäres DNA (*desoxyribonucleic acid*)-bindendes Protein, welches als weit verbreiteter Proliferationsmarker für Zellen dient (Sun & Kaufman, 2018). In der Epidermis findet die Proliferation in den epidermalen Stammzellen des Stratum basale statt. Ki-67 findet vor allem in der Tumordiagnostik Verwendung zur Klassifikation von Tumoren (S. S. Menon *et al.*, 2019). Ki-67 wird nicht von ruhenden Zellen exprimiert.

Die TUNEL-Färbung ist kein Markerprotein im eigentlichen Sinne, es markiert Brüche innerhalb der Desoxyribonukleinsäure, welche in apoptotischen und nekrotischen Zellen vorkommen (Kyrylkova *et al.*, 2012; Mirzayans & Murray, 2020). Die physiologische Apoptose der Keratinozyten findet innerhalb der Epidermis im

Stratum granulosum statt (Baima & Sticherling, 2002). Sodass als Produkt abgestorbene Keratinozyten, also Korneozyten (**siehe 2.1.1**) im Stratum corneum die wichtige Aufgabe der mechanischen und chemischen Barriere erfüllen können.

### 2.1.2 Dermis

Die Dermis liegt zwischen der Epidermis und der Subcutis. Sie ist durch die Basalmembran von der Epidermis getrennt (**Abbildung 1**). Am Übergang von Epidermis zu Dermis befindet sich auch die Reteleisten, welche wellenförmige Strukturen darstellen und der mechanischen Stabilität dienen (Shen *et al.*, 2023).

Die Dermis lässt sich in die retikuläre Dermis, welche an die Epidermis grenzt und die papilläre Dermis einteilen. Die am häufigsten vorkommenden Zellen der Dermis sind die Fibroblasten, diese produzieren die extrazelluläre Matrix, welche aus Kollagen und Elastin besteht (Lynch & Watt, 2018).

Des Weiteren beinhaltet die Dermis Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern und Drüsen. Die papilläre Dermis besteht aus lockerem Bindegewebe, neuronalen Zellen, Abwehrzellen und ist von der retikulären Dermis durch einen Gefäßplexus getrennt (Rippa *et al.*, 2019). Die retikuläre Dermis besitzt ein dichtes Fasernetz aus Kollagen-, Elastinfasern, welches der Haut Zugfestigkeit und Elastizität bringt (Losquadro, 2017).

### 2.1.3 Subcutis

Die Subkutis, auch Hypodermis genannt, liegt unter der Dermis und über der angrenzenden Muskulatur. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe, Blutgefäßen sowie Fettzellen. Diese Schicht der Haut dient als Isolator und Energiespeicher. Das Fettgewebe spielt eine Rolle bei der Regulierung der Körpertemperatur und bietet gleichzeitig Polsterung und Schutz für innere Organe (Khavkin & Ellis, 2011).

## 2.2 Autoimmunität

Autoimmunität bedeutet, dass eine Störung des Immunsystems vorliegt. Der Organismus ist nicht in der Lage, körpereigene Bestandteile als diese zu erkennen (Kapsogeorgou & Tzioufas, 2016). Über eine abnorme Reaktivität von B- und T-Zellen führt dies zur Entstehung von Antikörpern gegen zelluläre und extrazelluläre Bestandteile, welche körpereigen sind (Pisetsky, 2023). Dies kann sich als Entzündung und Organdysfunktion im Rahmen einer Autoimmunerkrankung manifestieren. Etwa 5% der Weltbevölkerung sind von Autoimmunerkrankungen betroffen (Bieber *et al.*, 2023).

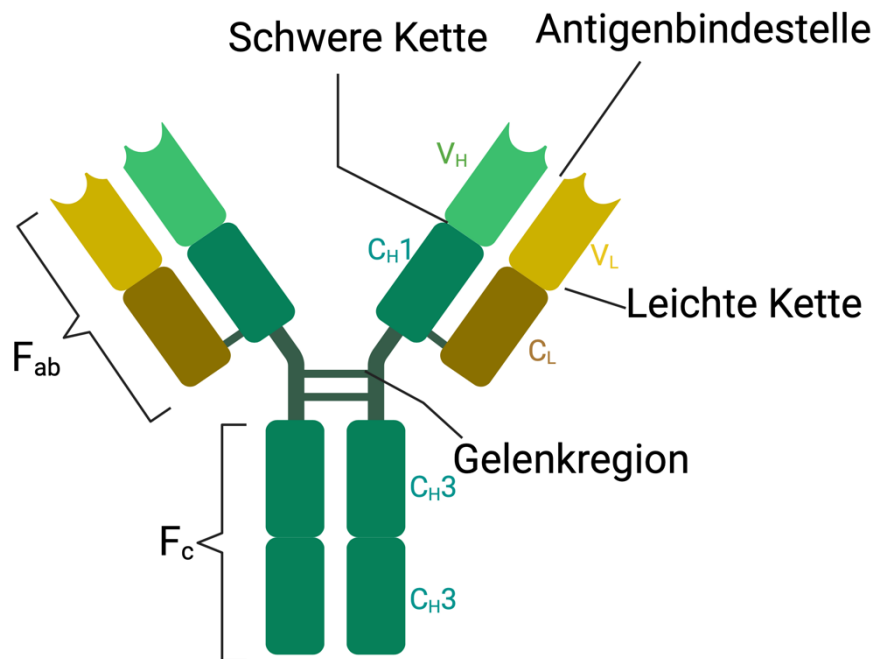
### 2.2.1 Aufbau und Funktion von Immunglobulinen

Immunglobuline (Ig) sind sezernierte Antikörper, welche in der Serumelektrophorese in der  $\gamma$ -fraktion zu finden sind. Diese können in weite Bereiche des Körpers vordringen und an spezifische Antigene binden. So können sie diese direkt neutralisieren oder sind in der Lage das unspezifische Immunsystem zu aktivieren, damit tragen sie einen großen Teil zur Abwehr von Pathogenen bei (Goulet & Atkins, 2020).

Der Aufbau von Immunglobulinen (**Abbildung 4**) ist Y-förmig und sie bestehen aus zwei leichten Ketten (L-Ketten) und zwei schweren Ketten (H-Ketten). Funktionell lassen sie sich in die variable Domäne, welche unter anderem die Aktivierung des Komplementsystems und die Bindung an die  $F_c$ -Rezeptoren festlegt und die konstante Domäne unterteilen. Die konstante Domänen C bestimmt die Antikörperklasse, IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Schroeder & Cavacini, 2010).

IgG können in ein  $F_c$ -Fragment und zwei  $F_{ab}$ -Fragmente geteilt werden. Die Verbindung aus leichter und schwerer Kette besteht aus Disulfidbrücken. Die Verbindung von  $F_c$ - und  $F_{ab}$ -Fragment liegt in der Gelenkregion und besteht auch aus Disulfidbrücken.

Eine relevante Rolle in Bezug auf Autoimmunerkrankungen nehmen vor allem die Subklasse der IgG ein (Ludwig *et al.*, 2017), wie nachfolgend im Krankheitsbild des PV und PF beschrieben.



**Abbildung 4. Schematische Darstellung eines Immunglobulin (Ig) G.**

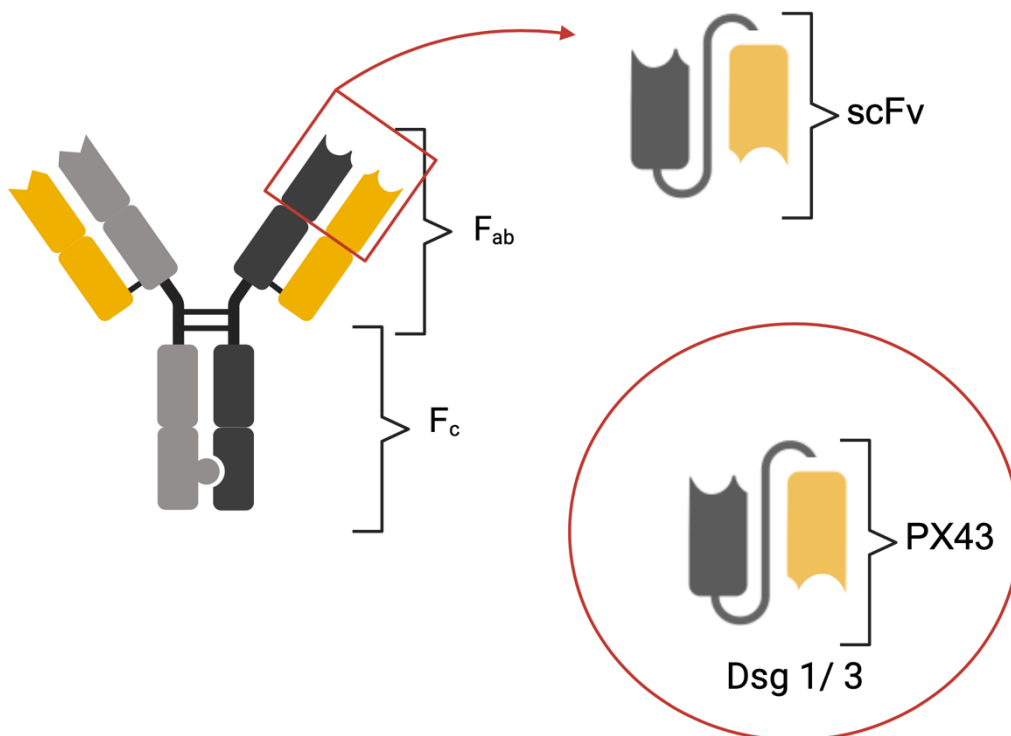
Das IgG besteht aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten. Der  $F_{ab}$ -Teil wird aus beiden Ketten gebildet und der  $F_c$ -Teil nur aus der schweren Kette. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen ( $V_L$ ) und einer konstanten ( $C_L$ ) Domäne. Die  $C_L$  ist über Disulfidbrücken an die schweren Ketten gebunden. Die schweren Ketten bestehen auch aus einer variablen ( $V_H$ ) Domäne und beim IgG aus drei konstanten Domänen ( $C_{H1-3}$ ). Die Gelenkregion besteht aus Disulfidbrücken. Die Antigenbindestellen werden aus leichter und schwerer Kette gebildet. Hergestellt mit BioRender.com

### 2.2.2 PX43 als Einzelkettenfragment

Als Alternative zu herkömmlichen Antikörpern, können Einzelkettenfragmente (scFv) genutzt werden, um beispielsweise eine Erkrankung in einem Modell zu simulieren. scFv sind synthetisierte Proteine, welche aus den variablen Domänen der schweren ( $V_H$ ) und der leichten ( $V_L$ ) Kette bestehen, die durch flexible Linker-Peptide (10-25 Aminosäuren) oder eine Disulfidbrücke verbunden sind (**Abbildung 5**); (Ahmad *et al.*, 2012). Die benötigte, codierte Desoxyribonukleinsäure für ein spezifisches scFv wird mithilfe des Antikörper-Phagendisplays ausgewählt. Die Herstellung erfolgt in *Escherichia coli* mit nachfolgender Proteinaufreinigung (Hammers & Stanley, 2014; Payne *et al.*, 2005). Durch die einfache Struktur, die jahrelange Stabilität und die günstige Herstellungsweise, sind scFv die rekombinanten Antikörper, welche am meisten in der Forschung verwendet werden (Ahmad *et al.*, 2012). Durch das Antikörper-

*Engineering* ist es möglich, sehr spezifische und effiziente scFv herzustellen (Lou & Cao, 2022).

In meiner Forschungsarbeit wurde der scFv PX43 (**Abbildung 5**) genutzt, welcher gegen DSG 1 und DSG 3 gerichtet ist. PX43 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Christoph Hammers (Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universität Lübeck; Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universität Regensburg) für meine Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. PX43 wurde mithilfe eines Patientenserum einer Patient\*in mit PV hergestellt, welche Antikörper gegen DSG 1 und DSG 3 hatte. PX43 ist bereits gut etabliert und verursacht im humanen Hautorgankulturmodell (HSOC) für PV nach Injektion und 24 h Inkubation eine Akantholyse (Burmester *et al.*, 2019; Radine *et al.*, 2022).



**Abbildung 5. Schematische Darstellung eines Immunglobulin (Ig) G und eines Einzelkettenfragments (scFv).**

Das scFv besteht aus den variablen Domänen der leichten und der schweren Kette der Antigenbindendestelle eines IgG. PX43 bindet Desmoglein (DSG) 1 und 3.  $F_{ab}$  – Antigenbindendes Fragment,  $F_c$  –konstantes Fragment. Hergestellt mit Biorender.com

## 2.3 Pemphigus vulgaris

PV ist eine schwerwiegende, seltene Autoimmundermatose, welche schlabbe Blasen auf der Haut und den Schleimhäuten hervorruft. Verursacht wird sie durch zirkulierende Autoantikörper, welche hauptsächlich gegen Zelladhäsionsproteine gerichtet sind.

### 2.3.1 Epidemiologie

Die relative Häufigkeit von PV variiert je nach Region und Ethnie, dennoch gibt es ein weltweites Vorkommen dieser Dermato­se (Kridin *et al.*, 2017). PV ist mit anteilig 70% der häufigste Subtyp der Pemphigus-Erkrankungen (Joly & Litrowski, 2011). Die jährliche Inzidenz ist ebenfalls abhängig von Region und Ethnie, so sind es in Finnland 0,76 und in der jüdischen Bevölkerung der Vereinigten Staaten von Amerika bis zu 32,0 Fälle pro 1.000.000 Einwohner\*innen (Kridin & Schmidt, 2021). Die Hauterkrankung manifestiert sich meist zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr (Porro *et al.*, 2019).

### 2.3.2 Ätiologie

PV ist eine blasenbildende Autoimmundermatose, die durch IgG Autoantikörper gegen die desmosomalen Strukturproteine (**siehe 2.1.1.1**) DSG 1 und DSG 3, ausgelöst wird. Die IgG Autoantikörper binden DSG 1 und DSG 3, bewirken einen Funktionsverlust und verursachen somit einen intraepidermalen Adhäsionsverlust (**Abbildung 7B**) (Pollmann *et al.*, 2018). Diese intraepidermale Spaltbildung wird Akantholyse genannt. Medikamente sind ein seltener, aber nachgewiesener auslösender Faktor für das Auftreten von Pemphigus (Ruocco & Pisani, 1982).

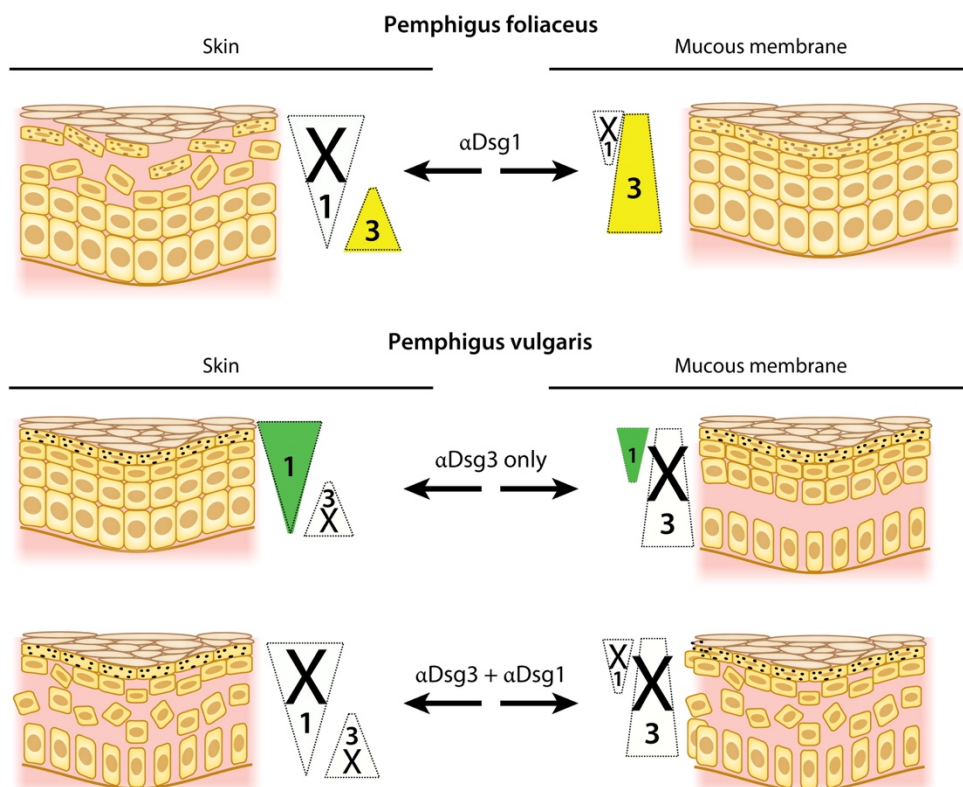
#### 2.3.2.1 Desmoglein-Kompensationstheorie

Die Desmoglein-Kompensations-Theorie von Amagai und Stanley aus 1999 bezieht sich auf die Ausprägung der DSG in der Haut und den Schleimhäuten sowie das Antikörperprofil eines Patienten.

DSG 1 ist in den oberen Schichten der Epidermis ausgeprägt und nur minimal in den Schleimhäuten vorkommend. Antikörper gegen DSG 1 binden vorrangig in der Epidermis und verursachen eine intraepidermale Akantholyse am Integument, aber nicht an den Schleimhäuten (**Abbildung 6**).

DSG 3 ist in den basalen Schichten der Epidermis und stark in allen Schichten der Schleimhaut ausgeprägt. Sind Antikörper gegen DSG 3 vorhanden, binden diese in den Schleimhäuten und der Epidermis und verursachen somit eine intraepidermale Akantholyse an den Schleimhäuten (**Abbildung 6**) (Hammers & Stanley, 2016). Je nachdem welche Antikörper die Patient\*in hat, bzw. in welchem Verhältnis diese vorhanden sind, ergibt sich ein Läsionsphänotyp.

Es gibt drei Läsionsphänotypen: der mukokutane, der muköse und der kutane (PF) Typ (Amagai *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2019). Die Theorie besagt auch, dass sofern es eine Koexpression von DSG 1 und DSG 3 innerhalb der gleichen Zelle gibt, ein DSG die Aufgabe der Zelladhäsion des anderen DSG, welches durch das Binden eines Antikörpers funktionslos geworden ist, kompensieren kann (Stanley & Amagai, 2006).

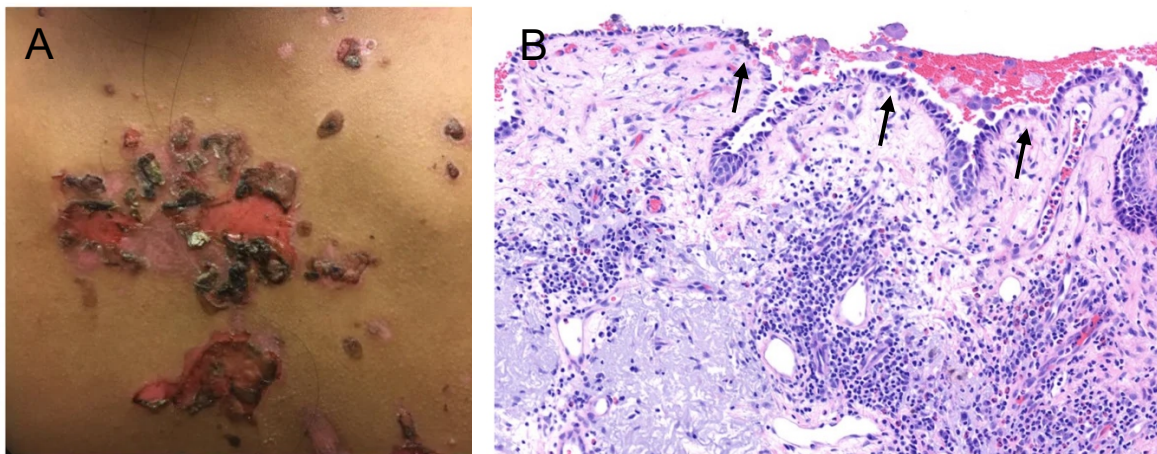


**Abbildung 6. Desmoglein-Kompensation in Pemphigus.**

Die Verteilung der Desmogleine (DSG) in der humanen Haut und den Schleimhäuten kann die entsprechende Lokalisation der Blase im Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus erklären. Skin – Haut, Mucous membrane – Schleimhäute, Abbildung aus Hammers & Stanley, 2016

### 2.3.3 Klinische Symptome

Je nach Antikörperprofil haben die Patient\*innen eine Blasenbildung durch die intraepidermale Spaltbildung am Integument und/oder an den Schleimhäuten. Diese sind schlaff und zeigen sich auch häufig als flächige Erosionen (**Abbildung 7A**) und Enanthema (Malik *et al.*, 2021; Schmidt *et al.*, 2019; Spindler & Waschke, 2018). In aktiven Phasen der Erkrankung zeigt sich ein positives Nikolski Zeichen, was eine mögliche Induktion einer Erosion durch seitliches Verschieben von nicht betroffener Haut beschreibt. Abhängig von der Ausprägung und der Lokalisation der Befunde kann es zu Schmerzen, Brennen oder auch Schluckbeschwerden kommen. Die offenen Erosionen entzünden sich leicht und bedürfen dann weiterer Therapie (Melchionda & Harman, 2019; Porro *et al.*, 2019).

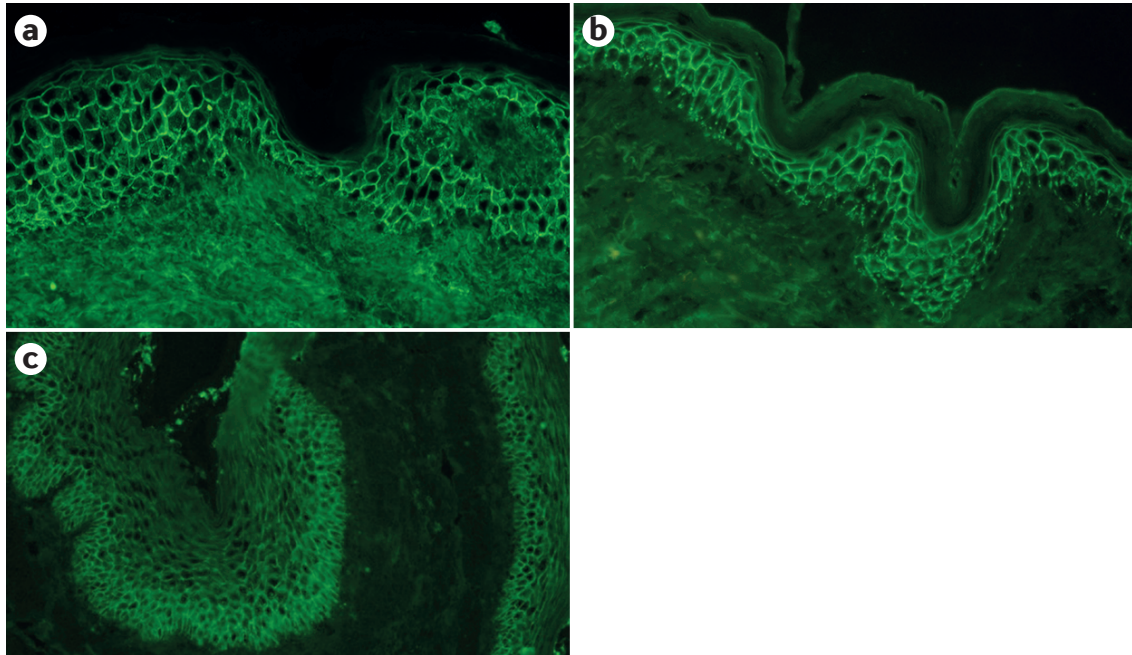


**Abbildung 7. Klinische und histologische Präsentation eines Pemphigus vulgaris.**  
**A** Große flache Läsion am Rücken eines Patienten mit Krusten belegt. **B** Suprabasale Akantholyse mit persistierender basaler Zellreihe aus Keratinozyten. Pfeilmarkierung auf Spaltbildung, Abbildung modifiziert aus Malik *et al.*, 2021

### 2.3.4 Diagnostik

Die Diagnostik erfolgt durch die gezielte Anamnese, die Inspektion des Integuments, die Blutentnahme und die Probebiopsien. Es sind zwei Probebiopsien durchzuführen. Für die histologische Untersuchung ist eine Probe aus dem Blasenrand zu nehmen, diese wird im Verlauf mit HE (**siehe 4.3.1**) gefärbt. Es ist eine intraepidermale Spaltbildung (**Abbildung 7B**) zu sehen. Das Stratum basale persistiert und darüber kommt es zum Adhäsionsverlust der Keratinozyten, sodass das Blasendach aus den suprabasalen Schichten besteht (Malik *et al.*, 2021).

Immunhistochemisch, hierfür wird eine Probebiopsie aus dem periläsionalen Bereich benötigt, kann die direkte Immunfluoreszenzfärbung (DIF) (**siehe 4.4**) durchgeführt werden. Dort ist das Bindeverhalten der IgG-Antikörper zu sehen, welches ein honigwabenartiges Muster zeigt (**Abbildung 8a**) (Kasperkiewicz *et al.*, 2017).



**Abbildung 8. Immunhistologische Färbung von Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus.**

Direkte Immunfluoreszenz-Färbung von einer periläsionalen Hautprobe einer Patient\*in mit Pemphigus vulgaris **a** und einer Patient\*in mit Pemphigus foliaceus **b**. Die Immunglobulin G Antikörper sind deutlich interzellulär zu erkennen, es zeigt sich das honigwabenartige Verteilungsmuster. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf Affenösophagus **c**, dem das Serum einer Patient\*in mit Pemphigus vulgaris hinzugefügt wurde. Modifiziert aus Kasperkiewicz *et al.*, 2017.

Die Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)-Färbung (**siehe 4.5**) vom Patientenserum wird auf Affenösophagus durchgeführt. Es wird nach Antikörpern gegen die Oberflächenproteine der Keratinozyten gesucht. Das regelmäßige Muster wird als honigwabenartig beschrieben (**Abbildung 8c**).

Alternativ oder zusätzlich zur IIF kann auch ein *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) gemacht werden (Joly *et al.*, 2020).

### 2.3.5 Therapie

PV ist eine potenziell lebensbedrohliche Erkrankung, welche in vielen Fällen der medikamentösen Therapie bedarf. Die Intensität der Therapie hängt von der Ausprägung und der Phase der Erkrankung ab. Nach einer beginnenden Induktionstherapie wird beim Ausbleiben neuer Läsionen in die Konsolidierungsphase übergegangen und anschließend folgt die Erhaltungstherapie.

Mögliche medikamentöse Therapieoptionen sind: Prednisolon, Rituximab (monoklonaler anti-CD20 Antikörper), Azathioprin, Mycophenolat mofetil, Mycophenolsäure und Dapson (Schmidt *et al.*, 2020).

Die angebotenen Therapieoptionen sind unspezifische Immunsuppressiva, mit möglichen starken Nebenwirkungen, wie beispielsweise schweren Infektionen. Aus diesem Grund braucht es dringend ein näheres Verständnis der Erkrankung, um neue spezifischere Angriffspunkte der medikamentösen Therapie zu finden.

### 2.3.6 Prognose

Die Prognose der PV Patient\*innen hat sich dramatisch verbessert. Während in den 1950ern die Mortalität noch bei 75% lag, sank diese zuletzt stark. Aufgrund intensiver Forschung, eines verbesserten Verständnisses und wirkungsvollerer Therapien liegt die Mortalität heute bei unter 5% (Kridin, 2018).

## 2.4 Pemphigus foliaceus

PF ist eine schwerwiegende, seltene Autoimmundermatose, welche schlabbe Blasen ausschließlich auf der Haut hervorruft. Verursacht wird sie durch zirkulierende Autoantikörper, welche gegen das Zelladhäsionsprotein DSG 1 gerichtet sind. Zu unterscheiden ist der idiopathische PF und der endemische PF.

### 2.4.1 Epidemiologie

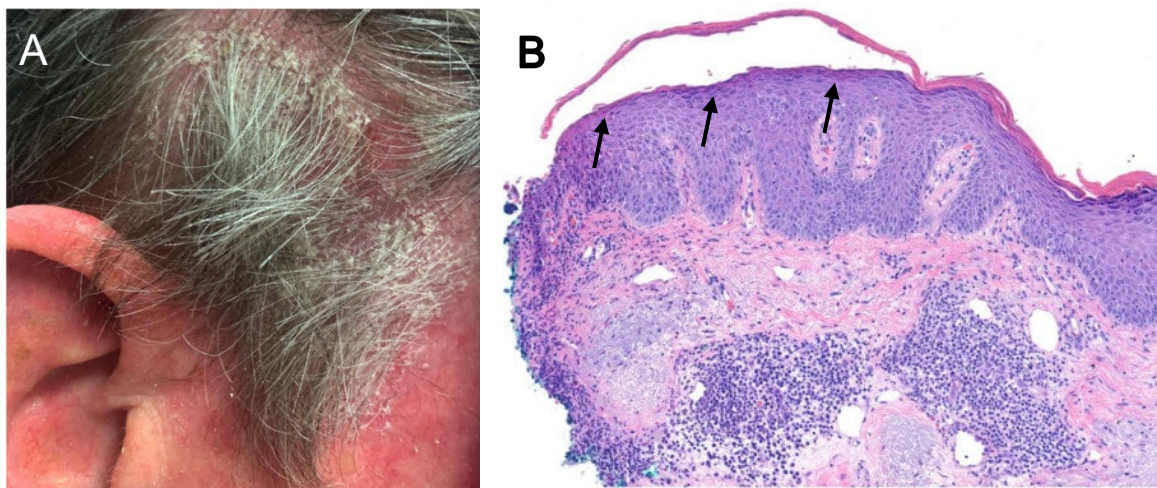
PF ist die zweithäufigste Unterform der Pemphigus-Erkrankungen. Die weltweite Inzidenz ist sehr gering, da es eine seltene Erkrankung ist (James *et al.*, 2011). Aufgrund des endemischen PF variieren die Inzidenzen abhängig von der Region. So liegt beispielsweise in Tunesien, welches vom endemischen PF betroffen ist, die Inzidenz für PF unter Frauen im Alter von 25 bis 34 bei 6,7 auf 1.000.000 Einwohner pro Jahr (Bastuji-Garin *et al.*, 1995). Die Dermatose manifestiert sich meist zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr (James *et al.*, 2011).

### 2.4.2 Ätiologie

PF ist eine blasenbildende Autoimmundermatose, die durch IgG Autoantikörper gegen das desmosomale Strukturprotein (**siehe 2.1.1.1 und 2.3.2.1**) DSG 1, ausgelöst wird. Im Vergleich zum PV gibt es keine Antikörper gegen DSG 3. Die IgG Autoantikörper binden DSG 1, welches vor allem im Stratum granulosum der Epidermis exprimiert wird. Dadurch bewirken sie eine Zerstörung der Zelladhäsion und verursachen somit eine subcorneale Spaltbildung (Malik *et al.*, 2021).

### 2.4.3 Klinische Symptome

Aufgrund der subcornealen Lage der Blasen, sind diese oft noch fragiler als beim PV, sodass man häufig keine intakten Blasen sehen kann. Da beim PF nur Antikörper gegen DSG 1 gebildet werden, sind die Schleimhäute nicht betroffen (**siehe 2.3.2.1**). Neben Blasen treten auch Erosionen und Krusten (**Abbildung 9A**) am Integument auf. Zusätzlich können die Läsionen von Schmerzen und Brennen begleitet werden (James *et al.*, 2011; Melchionda & Harman, 2019).



**Abbildung 9. Klinische und histologische Präsentation eines Pemphigus foliaceus.**  
**A** Flache Erosionen und Krusten an der Kopfhaut eines Patienten. **B** Hämatoxylin-Eosin Färbung einer läsionalen Hautprobe. Es ist eine superfizielle Akantholyse zu sehen, zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum. Pfeilmarkierung auf Spaltbildung. Modifiziert aus Malik *et al.*, 2021

### 2.4.4 Diagnostik

Analog zum PV erfolgt die Diagnostik des PF durch die gezielte Anamnese, die Inspektion des Integuments, die Blutentnahme und die Probenbiopsien.

Die beiden genommenen Hautbiopsien werden für die histologische und die immunhistochemische Untersuchung genutzt. Die HE-Färbung zeigt eine intraepidermale Spaltbildung (**Abbildung 9B**). Der Spalt befindet sich zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum, die Lokalisation wird subcorneal genannt (Malik *et al.*, 2021).

In der DIF ist das Bindeverhalten der IgG-Antikörper zu sehen, welches ein honigwabenartiges Muster zeigt (**Abbildung 8B**). Die IIF-Färbung mithilfe des Patientenserum wird äquivalent zum PV (**siehe 2.3.4**) durchgeführt (Joly *et al.*, 2020).

#### 2.4.5 Therapie

Auch die Intensität der Therapie des PF hängt von der Ausprägung und der Phase der Erkrankung ab. Von der Induktionstherapie geht man über in die Konsolidierungsphase. Abschließend wird die Erhaltungstherapie fortgeführt.

Die medikamentösen Therapieempfehlungen sind: Prednisolon, Rituximab, Azathioprin, Mycophenolat mofetil, Mycophenolsäure und Dapson (Schmidt *et al.*, 2020).

Erneut ist die unspezifische immunsuppressive Medikation, die Therapie der Wahl, dies zeigt auch beim PF den hohen Entwicklungsbedarf nach spezialisierteren Therapien.

#### 2.4.6 Prognose

Die Prognose der PF-Patient\*innen ist besser als die des PV. Die Mortalität für Erkrankte ist im Vergleich zur Normalpopulation nicht signifikant erhöht (Kridin *et al.*, 2017).

## 2.5 Projektbezogene Vorarbeiten

Als projektbezogene Vorarbeit ist insbesondere die Forschung von Paul W. Kunth zu nennen. Als ehemaliger Doktorand in unserer Arbeitsgruppe, etablierte er das 3D Hautmodell aus Wien in Lübeck. Er untersuchte die Struktur und Vergleichbarkeit der 3D Haut mit der normalen humanen Haut (NHS) (Czyz *et al.*, 2023). Zusätzlich untersuchte er, ob die 3D Haut als diagnostisches Mittel den Affenösophagus in der IIF ersetzen könnte. Hierzu wurden in einer IIF-Pilotstudie Patientenseren von PV-Patient\*innen und Kontrollpersonen untersucht. Es wurde eine sehr hohe Sensitivität und eine sehr hohe Spezifität erzielt.

Auch Johannes Bergmann, ein ehemaliger Doktorand optimierte das humane 3D Hautmodell weiter durch Modifikation des Erntezeitpunktes und der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Medium der 3D Haut.

Ein Schwerpunkt unserer Forschungsgruppe ist das HSOC für PV, es ein essenzieller Bestandteil der Forschung am PV. Es imitiert die humane Haut als gut erforschtes *ex vivo* Modell. Auch für das HSOC für PV wurde PX43 (**siehe 2.2.2**) genutzt (Burmester *et al.*, 2019) und es werden aktuell Kinase-Inhibitoren im HSOC für PV als Therapieoption getestet.

## 2.6 Hautmodelle

Die humane Haut steht im Fokus aktueller Forschung. Um die humane Haut und ihre Pathologien besser zu verstehen, werden das Tiermodell, das HSOC und das Hautäquivalenzmodell genutzt. Das übergeordnete Ziel der Hautmodelle besteht darin, ein *in vitro* Modell zu schaffen, welches der *in vivo* Haut in Struktur, Funktion und Resonanz entspricht. So sind gewonnene Ergebnisse auf die humane Haut übertragbar. Des Weiteren ist auch die ständige Verfügbarkeit, Reproduzierbarkeit und Stabilität des Modells wichtig (Roger *et al.*, 2019).

Es gibt weite Bereiche, in denen Hautmodelle erforscht werden, die unter anderem den Schwerpunkt Dermatosen (Ahn *et al.*, 2023), Infektionen (Patiño *et al.*, 2021), Wundheilung (Iljas *et al.*, 2021), Hautalterung (Sanchez *et al.*, 2022), Pharmazeutika und Kosmetika haben (Suhail *et al.*, 2019).

Die Tiermodelle sind ethisch zu diskutieren (Díaz *et al.*, 2021) und die Ergebnisse sind nicht komplett auf die humane Haut übertragbar (Emmert *et al.*, 2020; Hosseini *et al.*, 2022). Das HSOC ist ein gut etabliertes Modell, jedoch besteht eine Abhängigkeit bezüglich der Lieferung von Hautspenden aus elektiven plastischen Operationen.

Die Hautäquivalenzmodelle sind dreidimensionale, *in vitro* hergestellte Hautorgankulturmodelle, welche die humane Haut als Modell nachbilden. Schon seit 1948 wird an der *in vitro* Kultivierung von Zellen geforscht (Medawar, 1948). Es sind zahlreiche verschiedene Methoden etabliert (**siehe beispielsweise 4.2.1**), dennoch fehlt ein Modell, welches die humane Haut optimal imitiert (Czyz *et al.*, 2023).

## 2.7 Ziele meiner Forschungsarbeit

Nachfolgend sind die Ziele meiner Forschungsarbeit mit den jeweiligen Fragestellungen aufgeführt.

### 1. Erfolgreiche Herstellung eines 3D Hautmodells

- Ist die 3D Haut mit der NHS hinsichtlich des Aufbaus, Struktur und Markerproteinen vergleichbar?

### 2. Verbesserung und Nutzbarmachung des 3D Hautmodells

- Gibt es Fortschritte des Modells im Vergleich zu Vorarbeiten?
- Auf welche Weise kann man etwas in die 3D Haut applizieren?

### 3. Erschaffung eines 3D Hautmodells für Pemphigus

- Bindet PX43 in der 3D Haut?
- Kann durch Nutzung des scFv PX43 eine Spaltbildung in der 3D Haut induziert werden?
- Sind die Ergebnisse vergleichbar mit den Ergebnissen des HSOC?
- Ist es möglich ein *in vitro* Modell für Pemphigus-Erkrankungen zu schaffen?

### 3 Materialien

Im Folgenden sind die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Nährmedien, Antikörper und Software tabellarisch aufgelistet.

#### 3.1 Geräte

**Tabelle 1. Geräte.**

*Auflistung der verwendeten Geräte, inklusive Modell und Hersteller. DE – Deutschland, USA – Vereinigte Staaten von Amerika, JPN – Japan, NE - Niederlande*

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
360° Rotator	MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyl Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, DE
CO <sub>2</sub> Inkubator	Model Heracell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eindeckautomat	Leica CV 5030	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
Färbeautomat	Leica Autostainer XL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000 BIOREVO	Keyence, Osaka, JPN
Gefrierschrank -20 °C	LGPV6520	Liebherr-International Deutschland, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -80 °C	TSX 400V	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryostat	Leica CM- 3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
Kühlplatte für Paraffin	Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NE

Kühlschrank +4 °C	KS95	Liebherr-International Deutschland, Biberach an der Riß, DE
Mikroskop	Leitz Biomed	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
Mikroskop Zellkultur	Leica DMI1	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
Mikrotom	Model 1140/Autocut	Reichert-Jung; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE
Paraffin-Ausgießkonsole	Tissue-Tek® TECTM5 embedding station	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NE
Paraffin-Streckbad	25900	Medax Nagel GmbH, Kiel, DE
Pipetten	Research plus (0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Sterile Werkbank	Nuair Class I	NuAire, Plymouth, USA
Vortex Mischgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wasserbad	GFL-Typ 1004	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, DE
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE

## 3.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien.**

Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien inklusive Hersteller und Artikelnummer.  
BE – Belgien, DE – Deutschland, NE – Niederlanden, USA – Vereinigte Staaten von Amerika

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
6-Well-Platte, tief	Corning®, Arizona, USA	#355467
Biopsiestanze 6mm	pfm medical ag., Köln, DE	#48601
Cryomatrix™	epredia, Kalamazoo, USA	#6769006
Cryomold®	Tissue Tek® Sakura Finetke Europe B.V. Alphen aan den Rijn, NE	#4566
CryoPure	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	#72.380
Fettstift	Dako GmbH, Jena, DE	#S2002
Filter 0,45 µM, 500 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	#833941100
Handschuhe Größe S	Ansell Healthcare Europe N.V., Brüssel, BE	#700112
Insulinspritze 1 mL	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA	#324827
Kryostatklingen	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE	#14035838925
Objekträger	epredia, Kalamazoo, USA	#J1800AMNZ
Petrischale	Corning®, Arizona, USA	#430167
Pipettenspitzen 0,5-10 µL 2-20 µL 10-100 µL 100-1000 µL	Eppendorf AG; Hamburg, DE	#3123000020 #3123000039 #3123000047 #3123000063
Reaktionsgefäß 15 mL Falcon 50 mL Falcon	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	#62554502 #62547254

Reaktionsgefäß 1,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	#72706005
Serologische Pipette 5 mL 10 mL 25 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	#861253001 #861254001 #861685001
Steriler Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	#831826001
Steriles Skalpell	pfm medical ag., Köln, DE	#0200130010
Wasserfeste Unterlage	PAUL HARTMANN AG; Heidenheim, DE	#161061
Zellkultureinsatz Falcon ® 3.0 HD	Corning ®, Arizona, USA	#353092
Zellkultur Flaschen T75 T175	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	#833912002 #833911002
Zellsieb Falcon® 40 µm	Corning ®, Arizona, USA	#352340
Zellsieb EASYSTRAINER 100 µM	Greiner Bio-One International, Frickenhausen, DE	#542000

### 3.3 Reagenzien

**Tabelle 3. Reagenzien.**

Auflistung der verwendeten Reagenzien und Lösungen, inklusive der Hersteller sowie der Artikelnummern. DE – Deutschland, USA – Vereinigte Staaten von Amerika

Reagenz	Hersteller	Artikelnummer
Aceton	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#10266481
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	#A8805-(5G)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> 2M)	Acros Organics B.V.B.A., Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#349610025
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O)	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE	#2461.0500
DAPI Fluoromount-G®	Southern Biotech, Birmingham, USA	#0100-20
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE	#23471000
Dispase II (2,4 U/mL)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	#04942078001
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	#10104159001
<i>Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline (DPBS)</i>	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#14190-094
Equilibrationspuffer	Merck, Darmstadt, DE	#S7110
Ethanol	Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE	#22025000
Fetales bovines Serum (FBS)	Bio & Sell GmbH, Feucht, DE	#FBS.GP.0500
Formaldehyd 1%	Merck, Darmstadt, DE	#1040032500

<i>Hank's Balanced Salt Solution (10X)</i>	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#14060-040
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	#A4544-(25G)
Natriumhydroxid (NAOH) (1 mol/L)	Merck, Darmstadt, DE	#1091371000
Penicillin/Streptomycin	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#15140-122
PureCol®	Advanced BioMatrix, Carlsbad, USA	#5005-100ML
Roti®-Histofix 4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	#P0873
Steriles Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, DE	#4801694
<i>Stop-buffer-solution</i>	Merck, Darmstadt, DE	#S7110
TBS (10X)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA	#170-6435
<i>TdT-enzyme-solution</i>	Merck, Darmstadt, DE	#S7110
Trypsin Inhibitor 1 mg/mL	PAN BioTech GmbH, Eidenbach, DE	#P10-033100
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#23300-054
Tween 20	Euroimmun, Lübeck, DE	#F170323DI
Ziegennormalserum	DAKO GmbH, Jena, DE	#X0907

### 3.4 Nährmedien

**Tabelle 4. Zellnährmedien.**

Auflistung aller verwendeten Nährmedien, inklusive Hersteller sowie der Artikelnummern. DE – Deutschland, USA – Vereinigte Staaten von Amerika

<b>Zellnährmedium</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
<i>DermaLife K Keratinocyte Medium Complete Kit</i>	Lifeline® Cell Technology, Frederick, USA	#LL-0007
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X) (DMEM)</i>	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#41965-039
<i>Keratinocyte basal medium 2 (KBM2)</i>	PromoCell- Human Centered Science, Heidelberg, DE	#C-20211
<i>Keratinocyte growth medium 2 SupplementPack</i>	PromoCell- Human Centered Science, Heidelberg, DE	#C-39011

### 3.5 Antikörper

**Tabelle 5. Antikörper.**

Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper, inklusive der Wirtstiere, Klonalität und Klonbezeichnung, Hersteller sowie der Artikelnummern. DE – Deutschland, UK – Vereinigtes Königreich, USA – Vereinigte Staaten von Amerika

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
<i>Alexa Flour Plus 488 goat anti-mouse IgG (H+L)</i>	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#A11029
<i>Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG (H+L)</i>	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#A11007
<i>Anti-HA-peroxidase high affinity rat monoclonal antibody</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	#12013819001

<i>Antibody scFv 3_14 G anti-BP180</i>	AG Hammers	/
<i>Antibody scFv 4_8G anti-BP230</i>	AG Hammers	/
<i>Cy™ 3-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L)</i>	Jackson Immuno Research, Ely, UK	#115165146
<i>FLEX mouse anti-human Ki-67 antigen</i>	Dako GmbH, Jena, DE	#IS626
<i>Flourescein (FITC)-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L)</i>	Jackson Immuno Research, Ely, UK	#111095144
<i>Flourescein-labelled anti-digoxigenin antibody</i>	Merck, Darmstadt, DE	#S7110
<i>Goat anti-mouse IgG Rhodamine Red</i>	Jackson Immuno Research, Ely, UK	#115295062
<i>Mouse anti-human cytokeratin 15</i>	Abcam, Cambridge, UK	#ab80522
<i>Mouse anti-human cytokeratin 6</i>	PROGEN, Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE	#61090
<i>Mouse anti-human desmoglein 3</i>	OriGene Technologies, Inc., Maryland, USA	#SM2037PS
<i>Mouse anti-human cytokeratin 10</i>	PROGEN, Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE	#11414
<i>Mouse anti-human desmoglein 1</i>	OriGene Technologies, Inc., Maryland, USA	#AM26377PU-N
<i>Mouse anti-human filaggrin</i>	Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	#MA5-13440
<i>Rabbit polyclonal anti-human loricrin</i>	BioLegend®, San Diego, USA	#905104
<i>Rat anti-HA-mAb high affinity</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	#11867423001

### 3.6 Software

**Tabelle 6. Software.**

*Auflistung der verwendeten Software, inklusive der Hersteller. CA – Kanada, DE – Deutschland, JPN – Japan, USA – Vereinigte Staaten von Amerika*

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
BioRender	BioRender, Toronto, CA
BZ-II Analyser	Keyence, Osaka, JPN
BZ-II Viewer	Keyence, Osaka, JPN
Microsoft Office für Mac	Microsoft Corporation, Redmond, USA

### 3.7 Ethikvotum

Die verwendete humane Haut für die experimentelle Forschung stammt von elektiven plastischen Operationen. Dieses Vorgehen wurde durch die Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck bewilligt (Aktenzeichen: 21-191). Die Deklaration von Helsinki wurde jederzeit berücksichtigt. Die Hautspender gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Nutzung für Forschungszecke. Das Ethikvotum befindet sich im Anhang (**siehe 9.2**).

## 4 Methoden

Nachfolgend sind die verwendeten Methoden erläutert und ggf. mit schematischen Darstellungen und/oder Fotos dargestellt.

### 4.1 Kultivierung der Keratinozyten und Fibroblasten

Das Arbeiten mit primären Hautzellen ist ein wichtiger Teil der experimentellen Dermatologie. Durch etablierte Methoden aus Wien, die der ehemalige Doktorand Paul W. Kunth an das Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) brachte, ist es möglich, aus gespendeten Hautstücken Keratinozyten und Fibroblasten zu isolieren. Die Hautspenden stammen von Patient\*innen, welche sich elektiv einer plastischen Operation unterzogen haben.

Das Arbeiten mit primären Zelllinien erforderte eine gründliche Einweisung in die Kultivierung von Zellen.

Die isolierten Zellen waren zu keinem Zeitpunkt mit unsteriler Luft in Kontakt.

Nur die ersten Schritte der Isolation und die Ernte der 3D Haut geschahen ohne Druckablass (sterilen Werkbank). Alle Materialien waren entweder steril verpackt oder wurden mit 70% Alkohol desinfiziert. Die Flüssigkeiten waren steril oder wurden steril filtriert. Die Medien der Zellen wurden mit 1% Penicillin/ Streptomycin versehen, um Kontaminationen vorzubeugen. Die Flüssigkeiten, welche den Zellen zugefügt wurden, wurden vor Gabe für 20 Minuten (min) auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

***Tabelle 7. Information zu den verwendeten Hautspender\*innen.***

*Inklusive Hautspender\*innen-Nummer, Alter, Geschlecht, Entnahmestelle und ob die Kultivierung erfolgreich war.*

<b>Hautspender-Nummer</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Entnahmestelle</b>	<b>Erfolgreiche Kultivierung</b>
22-016	40	weiblich	Abdomen	ja
22-017	42	weiblich	Oberschenkel	nein
22-019	39	männlich	Abdomen	nein
22-020	47	weiblich	Abdomen	nein
22-022	48	weiblich	Abdomen	ja
22-024	65	weiblich	Oberarm	ja

#### 4.1.1 Isolation der Keratinozyten

Aus gespendeten humanen Hautstücken von Patient\*innen, die eine elektive plastische Operation erhielten, wurden Keratinozyten isoliert.

Zu Beginn wurde ein 5 x 10 cm großes Hautstück mit einer Gewebeschere von dem Hautstücken abgetrennt und in *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gelegt, um ein Austrocknen der Haut zu vermeiden. Da die Subcutis nicht benötigt wurde, wurde sie großzügig abgeschnitten und das bearbeitete Hautstück wurde in die sterile Werkbank gebracht. Dort wurde es in 5 x 5 mm große Stücke geteilt und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon) mit 5 mL Dispase II eingelegt. Dieses Röhrchen wurde über Nacht in einen 360 ° Rotator auf 4 °C gestellt.

Unter der sterilen Werkbank wurde das Falcon mit der Dispase II und der Haut geöffnet und in eine sterile Petrischale gefüllt. Die Epidermis wurde mithilfe von zwei sterilen Pinzetten von der Dermis gelöst, dazu wurde das Hautstück mit einer Pinzette fixiert und mit der Zweiten war es möglich die ganze Epidermis abzuziehen. Zur Isolation der Keratinozyten wurde die abgelöste Epidermis in einen 15 mL Falcon mit einer Pinzette transferiert. Nachdem die Flüssigkeit aus dem Falcon abgegossen wurde, wurden 2,5 mL 0,025% Trypsin-EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure) hinzugefügt, sodass alle Stücke mit Trypsin-EDTA bedeckt waren. Trypsin ist eine Serinprotease und spaltet Eiweißketten. Damit das Trypsin die epidermalen Zellen lösen kann, wurde das Falcon für 7 min auf 37 °C in einem 360° Rotator inkubiert.

Das Falcon wurde für 10 Sekunden (sec) gevortext. Es wurden 2,5 mL Trypsin Inhibitor und 5 µL Desoxyribonuklease (DNase) hinzugegeben und alles wurde für 5 sec gevortext.

Die Zellsuspension wurde zunächst durch ein 100 µm Zellsieb, danach durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Das Filtrat wurde zentrifugiert (2 min, 500 x Gewichtskraft [g]) und der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet am Boden des Falcons wurde mit 5 mL PBS resuspendiert und wieder zentrifugiert (2 min, 500 x g).

Für die Keratinozyten wurde als Nährmedium der *DermaLife-Mix* hergestellt, indem das *DermaLife K Medium*, die *LifeFactors®* und 1% Penicillin/Streptomycin vermengt wurden.

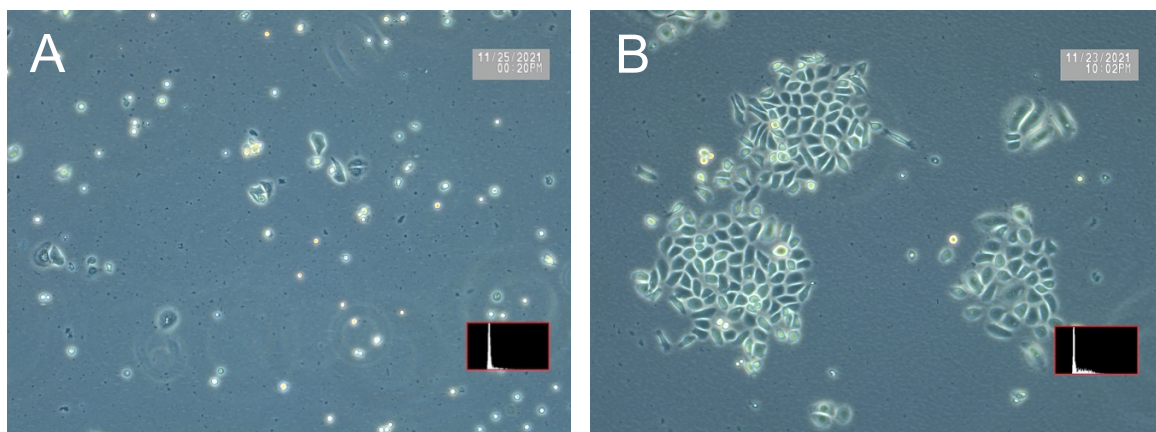
Nachdem der Überstand aus dem Falcon abgesaugt wurde, wurde das Pellet mit 5 mL erwärmten *DermaLife-Mix* resuspendiert und in eine T75 Zellkulturflasche,

welche mit 9 mL *DermaLife-Mix* gefüllt ist, ausgesät. Um eine gleichmäßige Verteilung der Keratinozyten zu erreichen, musste die Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt werden.

Die isolierten Keratinozyten mussten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator gelagert werden. Nach 24 Stunden (h) wechselte man das halbe Medium, indem der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Falcon gefüllt wurde, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen wurden und dann 7 mL *DermaLife Mix* hinzugegeben wurde. Das Falcon wurde zentrifugiert und 7 mL des Überstandes wurden in die Zellkulturflasche zurück pipettiert.

Nach zwei Tagen musste das gesamte Medium gewechselt werden, dafür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche gesaugt, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und 14 mL erwärmtes Medium hinzugefügt.

Sobald die Keratinozyten eine Konfluenz von 50-80% erreichten, wurden diese passagiert oder für weitere Experimente verwendet.



**Abbildung 10. Isolierte Keratinozyten.**  
A an Tag 1, B an Tag 3.

#### 4.1.2 Isolation der Fibroblasten

Aus gespendeten humanen Hautstücken, von Patient\*innen, die eine elektive plastische Operation erhielten, wurden Fibroblasten isoliert.

Zu Beginn wurde ein 5 x 10 cm großes Hautstück mit einer Gewebeschere von dem Hautstücken abgetrennt und in PBS gelegt, um ein Austrocknen der Haut zu vermeiden. Da die Subcutis nicht benötigt wurde, wurde sie großzügig abgeschnitten und das bearbeitete Hautstück wurde in die sterile Werkbank gebracht. Dort wurde es in 5 x 5 mm große Stücke geteilt und in ein 15 mL Falcon mit 5 mL Dispase II eingelegt. Dieses Röhrchen wurde über Nacht in einen 360 ° Rotator auf 4 °C gestellt.

Unter der sterilen Werkbank wurde das Falcon mit der Dispase II und der Haut geöffnet und in eine sterile Petrischale gefüllt. Die Epidermis wurde mithilfe von zwei sterilen Pinzetten von der Dermis gelöst, dazu wurde das Hautstück mit einer Pinzette fixiert und mit der Zweiten war es möglich die ganze Epidermis abzuziehen. Die abgelöste Epidermis konnte nun für weitere Experimente (**siehe 4.1.1.**) verwendet werden oder wurde entsorgt.

Anschließend wurde die Dermis in ein 15 mL Falcon platziert mithilfe einer Pinzette. 7,5 mL Kollagenase I wurde hinzugegeben, sodass alle Stücke mit Flüssigkeit bedeckt waren.

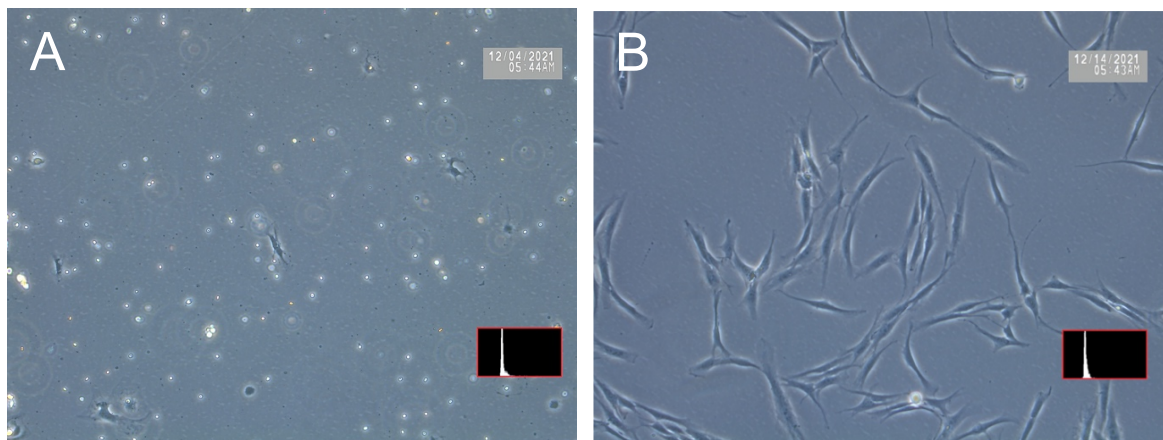
Das Gemisch wurde (37° C, 120 min) in dem 360° Rotator inkubiert (37 °C, 120 min). Als Kulturmedium der Fibroblasten wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (1X) verwendet, welchem 10% (50 mL) *Fetal bovine serum* (FBS) und 1% (5 mL) Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde (DMEM-Mix).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 7,5 mL DMEM-Mix hinzugefügt. Um ein Lösen der Zellen zu erleichtern, wurde das Falcon für 10 sec gevortext. Die Suspension wurde zuerst durch ein 100 µm Zellsieb filtriert, dann durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Das Filtrat wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde mit 5 mL PBS resuspendiert. Das Falcon wurde erneut zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden mit 5 mL erwärmten DMEM-Mix resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche gesät, die 9 mL erwärmten DMEM-Mix erhält. Zur optimalen Verteilung der Zellen, musste die Zellkulturflasche gleichmäßig geschwenkt werden. Die isolierten Fibroblasten mussten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator gelagert werden. Nach 24 h wechselte man das halbe Medium, indem der

Inhalt der Zellkulturflasche in ein Falcon gefüllt wurde, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen wurden und ihnen 7 mL erwärmter DMEM-Mix hinzugefügt wurde. Das Falcon wurde zentrifugiert und 7 mL des Überstandes wurden in die Zellkulturflasche zurück pipettiert.

Nach drei Tagen musste das gesamte Medium gewechselt werden, dafür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche gesaugt, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und 14 mL frisches erwärmtes Medium hinzugefügt.

Sobald die Fibroblasten eine Konfluenz von 80-100% erreichten, wurden diese passagiert oder für weitere Experimente verwendet.



**Abbildung 11. Isolierte Fibroblasten.**  
*A an Tag 1, B an Tag 3*

#### 4.1.3 Passagieren der Keratinozyten

Das Passagieren von Keratinozyten bedeutet, dass die Zelldichte verringert wird, indem die Zellen auf eine größere Fläche ausgesät werden. Ab einem 50-80% konfluenten Zellrasen, wurden die Keratinozyten von einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche auf drei 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät.

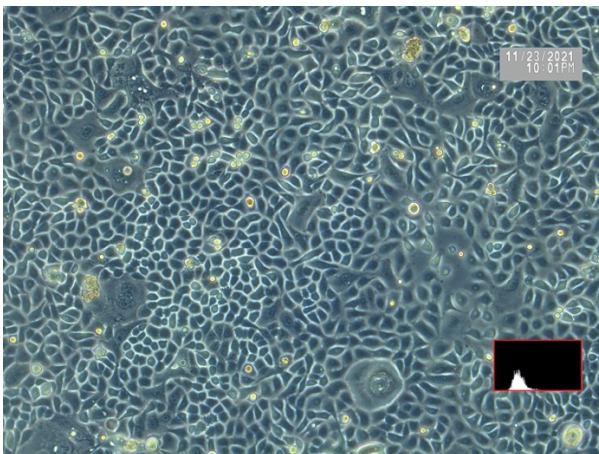
Zu Beginn wurde das Medium der Zellen verworfen und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 5 mL 0,025% Trypsin-EDTA wurden in die Zellkulturflasche gegeben. Die Lösung wurde inkubiert (8 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Um ein weiteres Lösen der Zellen zu induzieren, wurde die Flasche vorsichtig beklopft. Mithilfe des Mikroskops wurde überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben. Es wurden 5 mL Trypsin-Inhibitor zu den Keratinozyten hinzugefügt und die Zellsuspension wurde mehrmals mit einer Pipette über den Boden der Zellkulturflasche gespült, um dann in ein 15 mL Falcon gefüllt zu werden.

Dieses wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet der Keratinozyten mit 6 mL *DermaLife-Mix* in Lösung gebracht. Aufgeteilt wurden die 6 mL Keratinozyten zu gleichen Teilen auf 3 x 75 cm<sup>2</sup> Flaschen, welche jeweils 12 mL erwärmten *DermaLife-Mix* enthalten.

Die Keratinozyten mussten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator gelagert werden. Nach 24 h wechselte man das halbe Medium, indem der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Falcon gefüllt wurde, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen wurden und dann 7 mL *DermaLife-Mix* hinzugegeben wurde. Das Falcon wurde zentrifugiert und 7 mL des Überstandes wurden in die Zellkulturflasche zurück pipettiert.

Nach zwei Tagen musste das gesamte Medium gewechselt werden, dafür wurde die Flüssigkeit aus der Zellkulturflasche gesaugt, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und 14 mL erwärmtes Medium hinzugefügt.

Sobald die Keratinozyten eine Konfluenz von 50-80% erreichten, wurden diese wieder passagiert oder für weitere Experimente verwendet.



**Abbildung 12. Kultivierte Keratinozyten.**  
Mit einer Konfluenz von 100 %.

#### 4.1.4 Passagieren der Fibroblasten

Das Passagieren von Fibroblasten bedeutet, dass die Zelldichte verringert wird, indem die Zellen auf eine größere Fläche ausgesät werden. Ab einem 80-100% konfluenten Zellrasen, wurden die Fibroblasten einer 75 cm<sup>2</sup> in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät.

Zu Beginn wurde das Medium der Zellen verworfen und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 5 mL 0,025% Trypsin-EDTA wurden in

die Zellkulturflasche gegeben. Die Lösung wurde inkubiert (8 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

Um ein weiteres Lösen der Zellen zu induzieren, wurde die Flasche vorsichtig beklopft. Mithilfe des Mikroskops wurde überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben. Es wurden 5 mL PBS zu den Fibroblasten hinzugefügt und die Zellsuspension wurde mehrmals mit einer Pipette über den Boden der Zellkulturflasche gespült, um dann in einen 15 mL Falcon gefüllt zu werden.

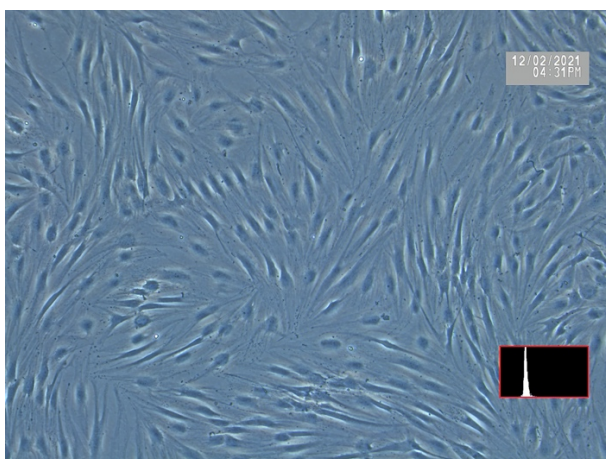
Dieser wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet der Fibroblasten wurde mit 5 mL DMEM-Mix gelöst.

Die Fibroblasten wurden in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gefüllt, welche 22 mL erwärmten DMEM-Mix enthält.

Die Fibroblasten mussten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator gelagert werden. Nach 24 h wechselte man das halbe Medium, indem der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Falcon gefüllt wurde, die Zellen in der Zellkulturflasche wurden mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend wurde 7 mL DMEM-Mix hinzugegeben. Das Falcon wurde zentrifugiert und 7 mL des Überstandes wurden in die Zellkulturflasche zurück pipettiert.

Nach drei Tagen musste das gesamte Medium gewechselt werden, dafür wurde die Flüssigkeit aus der Zellkulturflasche gesaugt, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und 14 mL erwärmtes Medium hinzugefügt.

Sobald die Fibroblasten eine Konfluenz von 80-100% erreichten, wurden diese passagiert oder für weitere Experimente verwendet.



**Abbildung 13. Kultivierte Fibroblasten.**  
Mit einer Konfluenz von 100%.

#### 4.1.5 Kryokonservierung der Keratinozyten

Um die Vitalität der isolierten Zellen zu erhalten, können diese in flüssigen Stickstoff auf  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Eine präzise Beschriftung, der eingefrorenen Zellen ist essenziell für nachfolgenden Projekte.

Keratinozyten aus einer  $75\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche werden in 4 Gefrierfläschchen (*Cryovials*) eingefroren.

Das Nährmedium der Zellen wurde verworfen und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 5 mL 0,025% Trypsin-EDTA wurden in die Zellkulturflasche gegeben. Die Lösung wurde inkubiert (8 min,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

Um ein weiteres Lösen der Zellen zu induzieren, wurde die Flasche vorsichtig beklopft. Mithilfe des Mikroskops wurde überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben.

Es wurden 5 mL Trypsin-Inhibitor zu den Keratinozyten hinzugefügt und die Zellsuspension wurde mehrmals mit einer Pipette über den Boden der Zellkulturflasche gespült, um dann in ein 15 mL Falcon gefüllt zu werden.

Dieser wurde zentrifugiert (2 min,  $500 \times g$ ), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet der Keratinozyten mit 3,7 mL *DermaLife-Mix* in Lösung gebracht.

Die Zellsuspension wurde mit je 900  $\mu\text{L}$  auf 4 Gefrierfläschchen aufgeteilt. Abschließend wurden jedem Gefäß 100  $\mu\text{L}$  steriles Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt und die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert, solange bis sie benötigt wurden.

#### 4.1.6 Kryokonservierung der Fibroblasten

Um die Vitalität der isolierten Zellen zu erhalten, können diese in flüssigen Stickstoff auf  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Eine präzise Beschriftung, der eingefrorenen Zellen ist essenziell für nachfolgenden Projekte.

Fibroblasten aus einer  $175\text{ cm}^2$  Flasche wurden in 7 *Cryovials* eingefroren.

Das Nährmedium der Zellen wurde verworfen und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 7,5 mL 0,025% Trypsin-EDTA wurden in die Zellkulturflasche gegeben. Die Lösung wurde inkubiert (8 min,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

Um ein weiteres Lösen der Zellen zu induzieren, wurde die Flasche vorsichtig beklopft. Mithilfe des Mikroskops wurde überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben.

Es wurden 9,5 mL PBS zu den Fibroblasten hinzugefügt und die Zellsuspension wurde mehrmals mit einer Pipette über den Boden der Zellkulturflasche gespült, um dann in ein 50 mL Falcon gefüllt zu werden.

Dieses wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet der Fibroblasten wurde mit 6,4 mL DMEM-Mix resuspendiert.

Die Zell-Medium-Suspension wurde auf 7 *Cryovials* je 900 µL aufgeteilt. Abschließend wurden jedem Gefäß 100 µL steriles DMSO hinzugefügt und die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert, solange bis sie benötigt wurden.

#### 4.1.7 Aussaat der kryokonservierten Keratinozyten

Wurden die kryokonservierten Zellen für weitere Experimente benötigt, konnten diese aufgetaut und ausgesät werden. Die Zellen in den *Cryovials* wurden vom flüssigen Stickstoff entfernt und im Wasserbad für 2-3 min erwärmt, sobald die Lösung im *Cryovial* flüssig war, wurde diese in ein Falcon in 9 mL DermaLife-Mix gegeben. Dieses Falcon wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet der Keratinozyten in 5 mL DermaLife-Mix resuspendiert. Der Zell-Medium-Mix wurde in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit erwärmten 9 mL DermaLife-Mix gegeben. Die Keratinozyten mussten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator gelagert werden. Nach 24 h wechselte man das halbe Medium, indem der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Falcon gefüllt wurde, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen wurden und dann 7 mL DermaLife Mix hinzugegeben wurde. Das Falcon wurde zentrifugiert und 7 mL des Überstandes wurden in die Zellkulturflasche zurück pipettiert.

Nach zwei Tagen musste das gesamte Medium gewechselt werden, dafür wurde die Flüssigkeit aus der Zellkulturflasche gesaugt, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und 14 mL erwärmtes Medium hinzugefügt.

Sobald die Keratinozyten eine Konfluenz von 50-80% erreichten, wurden diese wieder passagiert oder für weitere Experimente verwendet.

#### 4.1.8 Aussaat der kryokonservierten Fibroblasten

Wurden die kryokonservierten Zellen für weitere Experimente benötigt, konnten diese aufgetaut und ausgesät werden. Die Zellen in den *Cryovials* wurden vom flüssigen Stickstoff entfernt und im Wasserbad für 2-3 min erwärmt, sobald die Lösung im *Cryovial* flüssig war, wurde diese in ein Falcon in 9 mL DMEM-Mix gegeben. Dieses Falcon wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet der Fibroblasten in 5 mL DMEM-Mix und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit erwärmten 9 mL DMEM-Mix gegeben.

Die Fibroblasten mussten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator gelagert werden. Nach 24 h wechselte man das halbe Medium, indem der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Falcon gefüllt wurde, die Zellen in der Zellkulturflasche wurden mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend wurde 7 mL DMEM-Mix hinzugegeben. Das Falcon wurde zentrifugiert und 7 mL des Überstandes wurden in die Zellkulturflasche zurück pipettiert.

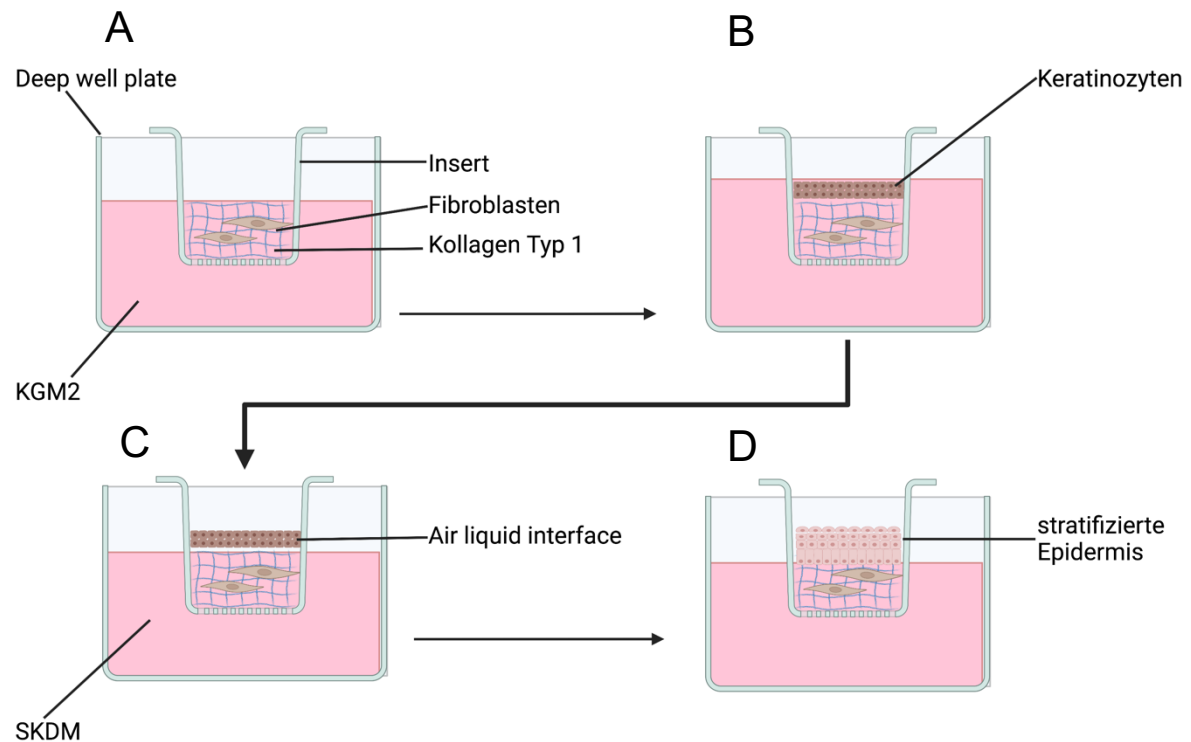
Nach drei Tagen musste das gesamte Medium gewechselt werden, dafür wurde die Flüssigkeit aus der Zellkulturflasche gesaugt, die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und 14 mL erwärmtes Medium hinzugefügt.

Sobald die Fibroblasten eine Konfluenz von 80-100% erreichten, wurden diese passagiert oder für weitere Experimente verwendet.

## 4.2 Humanes 3D Hautmodell

Mit den zuvor isolierten, kultivierten und passagierten Keratinozyten und Fibroblasten wurden in einem mehrtägigen Versuchsaufbau humane 3D Haut hergestellt.

### 4.2.1 Versuchsaufbau und Durchführung



**Abbildung 14. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des humanen 3D Hautmodells.**

Die humanen Keratinozyten und Fibroblasten werden von gespendeten Hautstücken isoliert. Darauf folgen die Kultivierung und Vermehrung der Zellen. **A** Sobald genug Zellen vorhanden sind, werden Fibroblasten mit Kollagen Typ I in ein Insert gegeben und die Deep well plate mit Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2) gefüllt. **B** Anschließend werden die Keratinozyten ausgesät. **C** Sobald sich die Keratinozyten abgesetzt haben, wird das Medium zu Supplemented keratinocyte defined medium (SKDM) geändert und das Air liquid interface geschaffen. **D** Die 3D Haut kann nach weiteren acht Tagen geerntet werden. Hergestellt mit BioRender.com

Das dermoepidermale 3D Hautmodell wurde von dem früheren medizinischen Doktoranden Paul W. Kunth im LIED eingeführt. Bevor das 3D Hautmodell gestartet werden konnte, musste man berechnen, wie viele konfluente Zellkulturflaschen von Keratinozyten und Fibroblasten benötigt wurden.

Es wurden stets die gleichen Zellen des Spenders HS22-016 genutzt, um eine optimale Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen 3D Häuten zu erlangen.

Für sechs 3D Häute wurden eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche vitaler Fibroblasten mit einer Konfluenz von 100% benötigt und drei 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Keratinozyten mit 80-100% dichtem Zellrasen.

Zu Beginn benötigte man 2 sterile Glasgefäße mit Schraubverschluss mit einem Fassungsvermögen von 50 mL und 500 mL. In das kleinere Gefäß wurden 16 mL Kollagen gefüllt und 2 mL *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) Tropfen für Tropfen dazu gegeben. Währenddessen musste das Gefäß langsam geschwenkt werden, sodass es zu einer gleichmäßigen Vermengung der Substanzen kam. Es wurden die Fibroblasten der 175 cm<sup>2</sup> Flasche gelöst. Das Nährmedium der Zellen wurde verworfen und die Zellen wurden mit 5 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 7,5 mL 0,025% Trypsin-EDTA wurden in die Zellkulturflasche gegeben. Die Lösung wurde inkubiert (8 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

Um ein weiteres Lösen der Zellen zu induzieren, wurde die Flasche vorsichtig beklopft. Mithilfe des Mikroskops wurde überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben. Es wurden 9,5 mL PBS zu den Fibroblasten hinzugefügt und die Zellsuspension wurde mehrmals mit einer Pipette über den Boden der Zellkulturflasche gespült, um dann in ein 50 mL Falcon gefüllt zu werden.

Dieses wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g). Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde anschließend das Zellpellet mit 2 mL FBS gelöst und tröpfchenweise zu dem Kollagen-HBSS-Mix hinzugefügt. In dem nächsten Schritt wurde Tropfen für Tropfen Natriumhydroxid zu dem Mix gegeben, bis ein Farbumschlag der Lösung von gelb zu rot stattgefunden hat.

In jedes der 6 Einsätze (*Inserts*), welche mit einer sterilen Pinzette in die *Deep well* gesetzt wurden, wurden 2,5 mL des zuvor angesetzten Mixes gefüllt.

Der *Keratinocyte Growth Mix 2 (KGM2)*, welcher aus dem *Keratinocyte Basal Medium 2*, dem *Keratinocyte Growth Medium 2 SupplementPack* und 5 mL Penicillin/Streptomycin besteht, wurde während der Inkubationszeit hergestellt.

Nach 2-3 h Inkubation bei 37 °C wurde der KGM2 erwärmt. Von diesem wurden 14 mL in jedes *Deep well* und 2 mL in jedes *Insert* gefüllt.

Der Kollagen-Mix wurde über Nacht inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>).

Am nächsten Tag wurden die Keratinozyten auf dem Kollagen-Fibroblasten-Mix ausgesät. Dazu wurden die Keratinozyten der drei 75 cm<sup>2</sup> Flaschen gelöst. Das Nährmedium der Zellen wurde verworfen und die Zellen wurden mit 5 mL PBS

gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 5 mL 0,025% Trypsin-EDTA wurden in die Zellkulturflasche gegeben. Die Lösung wurde inkubiert (8 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Um ein weiteres Lösen der Zellen zu induzieren, wurde die Flasche vorsichtig beklopft. Mithilfe des Mikroskops wurde überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben. Es wurden 5 mL Trypsin-Inhibitor zu den Keratinozyten hinzugefügt und die Zellsuspension wurde mehrmals mit einer Pipette über den Boden der Zellkulturflasche gespült, um dann in ein 15 mL Falcon gefüllt zu werden.

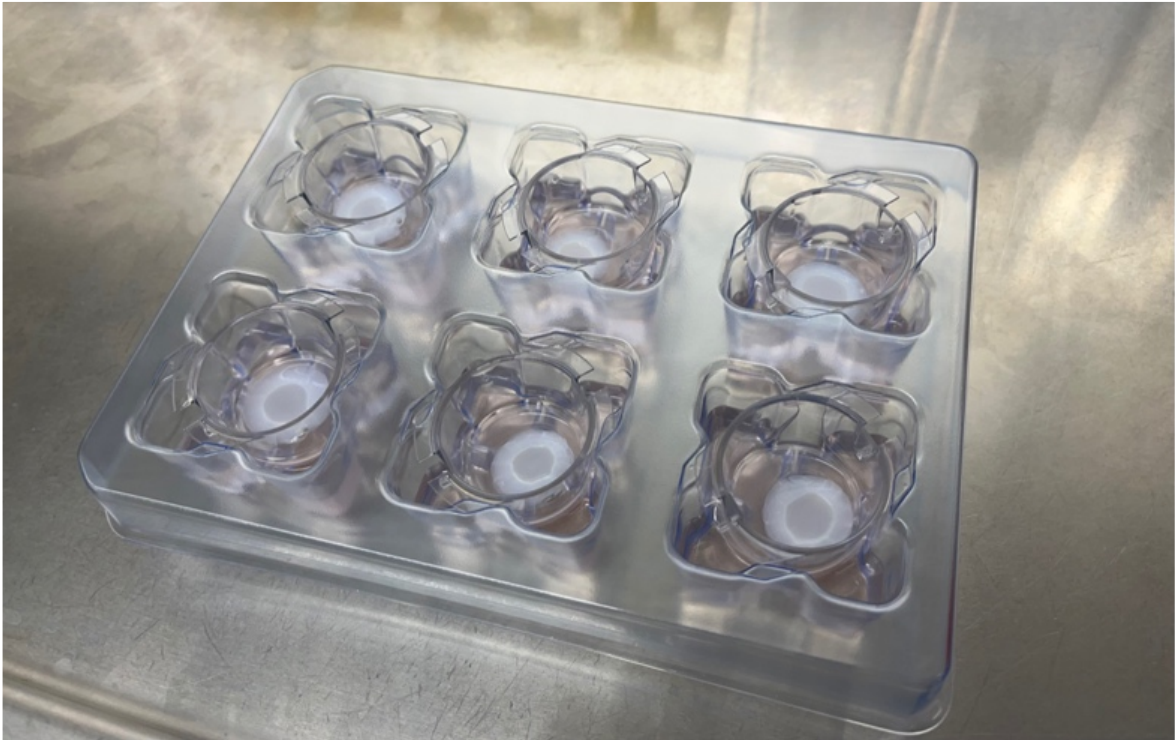
Dieser wurde zentrifugiert (2 min, 500 x g), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet der Keratinozyten einer Zellkulturflasche wurde mit 4 mL erwärmten KGM2 vermengt. Nachdem das Medium in den Inserts abgesaugt wurde, wurden 2 mL Keratinozyten-Suspension je Insert auf den Kollagen-Fibroblasten-Mix gegeben. Erneut wurde das Modell über Nacht inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)

Am nächsten Tag wurde die Kollagenschicht vom Boden des Inserts mit einer Pipettenspitze gelöst und 1–2 mal um 360° gedreht.

Für die 3D Haut wurde *Supplemented keratinocyte defined medium* (SKDM) hergestellt. Dafür wurden 25 mg L-Ascorbinsäure und 0,5 g bovines Serumalbumin in das *Keratinocyte Basal Medium* gefüllt und dieses geschüttelt. Dazu wurden 575 µL 1 M Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) gegeben und die Flüssigkeiten wurde erneut vermischt. Unter der sterilen Werkbank wurde die Lösung durch einen 0,45 µm sterilen Filter gegeben und 5 mL Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

Abschließend wurden die Zusätze des *Keratinocyte Growth Medium 2 SupplementPack* bis auf *Bovine pituitary extract* und Epinephrin hinzugefügt. Die beiden Genannten wurden verworfen. Das Medium der *Deep well* wurde abgesaugt und mit 10 mL erwärmten SKDM ersetzt. Das Medium in den *Inserts* wurde abgesaugt und somit wurde die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche geschaffen (*Air liquid interface*). Dieser Tag wurde als Tag 0 festgesetzt. Das Nährmedium in den *Deep well* wurde alle 48 h durch 10 mL erwärmtes SKDM ersetzt.

Die 3D Häute wurden bis Tag 8 weiter gezüchtet, anschließend wurden sie für mein weiteres Forschungsprojekt verwendet.



**Abbildung 15. Fotografie der 3D Häute in den Inserts unter der sterilen Werkbank.**

## 4.2.2 Applikation von PX43

**Positivkontrolle:**  
**PX43**  
**25 µg/ 20µL**



**Negativkontrolle:**  
**IVIG**  
**25 µg/ 20µL**



**Abbildung 16. Schematische Abbildung der Applikationswege in die 3D Häute in meiner Forschungsarbeit.**

Am 8. Tag nach Erschaffen des Air liquid Interface wurde als Positivkontrolle das Einzelkettenfragment PX43 auf drei unterschiedlichen Applikationswegen hinzugefügt. Es wurde ins Medium gegeben, auf die 3D Haut gegeben und in die 3D Haut injiziert. Analog dazu wurde mit der Negativkontrolle mit IVIG verfahren. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>.

IVIG – Intravenöses Immunglobulin, PX43 -Einzelkettenfragment PX43, Hergestellt mit BioRender.com

Die Vorgehensweise der Applikation von Positiv- und Negativkontrolle ist schematisch dargestellt.

An Tag 8 nach Erschaffen des *Air liquid Interface* wurden die oberen drei 3D Häute als Positivkontrolle genutzt und ihnen wurde das scFv PX43 zugefügt. Als Negativkontrolle nutzte ich intravenöse Immunglobuline (IVIG) für die unten dargestellten 3D Häute.

Zunächst wurden die Lösungen von PX43 (3,125 µL PX43 und 16,875 µL PBS) und IVIG (0,5 µL IVIG und 19,5 µL PBS) mit einer Konzentration von 25 µg/ 20 µL angesetzt, indem die entsprechende Menge der Substanz in PBS gelöst wurde.

Nachdem die Lösungen hergestellt wurden, war jeweils ein Applikationsweg für zwei 3D Häute als jeweils eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle vorgesehen.

Die erste Zuführungsweise war die Inkubation im Medium durch Zugabe von den 20 µL der PX43/- oder IVIG-Lösung in die *Deep well* und anschließende Verteilung der Substanz durch Resuspension.

Als zweiter Weg wurden 20 µL der jeweiligen Lösungen auf die 3D Häute pipettiert, sodass diese mit etwas Flüssigkeit bedeckt waren.

Als dritter Applikationsweg wurde, ähnlich zum HSOC für PV, in die 3D Häute die 20 µL Volumina zu injizieren. Dabei wurde das Volumen in eine 1 mL Spritze aufgezogen und möglichst luftfrei unter die Epidermis injiziert. Da die 3D Haut im *Insert* lag, war es nicht möglich seitlich zu injizieren und es wurde von oben durch die Epidermis hindurch gespritzt.

Nachdem die Applikation erfolgte, wurden die Häute für 24 h inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) und anschließend geerntet.

Für die Ernte der 3D Häute wurde die *Deep well plate* das erste Mal außerhalb der sterilen Werkbank geöffnet. Es wurde eine harte Unterfläche benötigt, die *Inserts* werden aus den *Deep well* gehoben und darauf platziert.

Um die Häute aus den *Inserts* zu lösen, wird mit großer Vorsicht einmal komplett um die 3D Haut mit einem Skalpell herumgeschnitten, sodass das *Insert* angehoben werden kann und die gelöste 3D Haut auf der Unterfläche bleibt.

Als nächstes werden die Häute mithilfe einer scharfen Klinge in der Mitte geteilt. Eine Hälfte wird in Formaldehyd eingelegt und die andere Hälfte wird in Cryomatrix in einem Cryomold eingebettet.

### 4.3 Histochemische Färbungen

Für die histopathologischen Erkenntnisse wurde die in Paraffin ausgegossene Probe mit dem Mikrotom auf 4,0 µm Dicke geschnitten, im Wasserbad wurden die Schnitte gestreckt und je Probe 10 Objektträger (OT) aufgenommen. Diese wurden über Nacht auf 37 °C ohne CO<sub>2</sub> getrocknet und schließlich am nächsten Tag im Histologielabor der Dermatologie mit der jeweiligen Methode gefärbt.

#### 4.3.1 Hämatoxylin- Eosin Färbung

**Tabelle 8. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE).**  
*Auflistung der benötigten Lösungen für die HE-Färbung.*

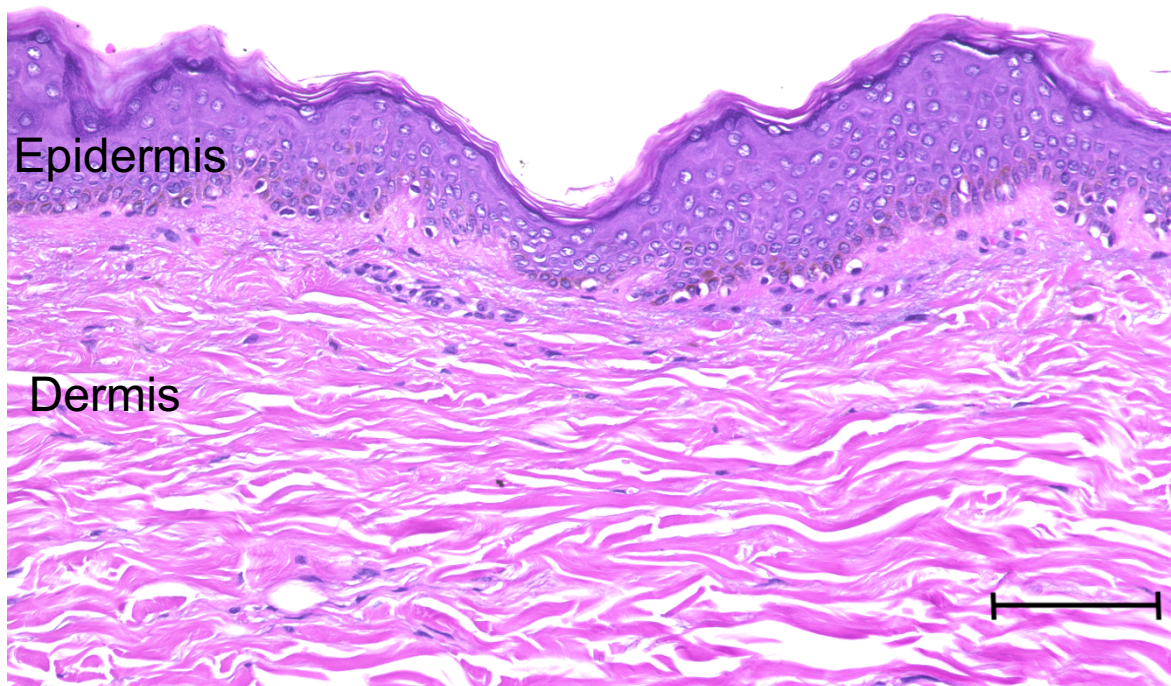
Eosin-Stammlösung 1%	1 g Eosin auf 100 mL Aqua dest.
Phloxin-Stammlösung 1%	1 g Phloxin B reinst auf 100 mL Aqua dest.
Eosingebrauchslösung	100 mL Eosinstammlösung 1% + 10 mL Phyloxinestammlösung 1% + 730 mL 96% Alkohol 3 mL Eisessig
Essigsäurealkohol	800 mL 96% Alkohol 40 mL Eisessig
Ammoniakwasser	800 mL Aqua dest. 33 Tropfen Ammoniak

Im ersten Schritt wurden die zu färbenden Schnitte im Xylolbad für 20 min entparaffiniert und in zwei weiteren Xylolbädern für je 1 min geschwenkt. Es folgte die absteigende Alkoholreihe, worin die OT für je 1 min geschwenkt wurden, um das Xylol zu entfernen und die Schnitte zu rehydrieren. Anschließend folgte die Hämatoxylin-Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Papanicolaou. Hierfür wurden die Schnitte für 5 min in die Eosingebrauchslösung gebracht. Zur Entfernung von nicht benötigtem Hämatoxylin wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser 1 min lang gespült.

Zur Ansäuerung wurden die Proben 2–3-mal in Essigsäurealkohol geschwenkt. Es folgte ein erneutes Spülen unter fließendem Leitungswasser, bis die Schaumbildung sistiert. Die Schnitte wurden 2–3 mal in Ammoniakwasser geschwenkt, zur Vorbereitung für das Bläuen der Präparate. Bevor die Eosin-Gegenfärbung stattfand, wurden die Schnitte erneut unter fließendem Leitungswasser für 1 min gespült. Die nicht zum Zellkern gehörenden Teile färbten sich bei der Eosinfärbung, hierfür wurden die OT 45 sec in die Eosin Gebrauchslösung eingetaucht und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 96% Ethanol vergällt [s.o.], 2x 100% Ethanol [s.o.]) dehydriert. Es folgte die Klärung der Schnitte durch Eintauchen der OT in 3 Xylolbäder (s.o.) für jeweils 1 min.

Als letzter Schritt folgte das Eindeckeln der Schnitte durch den Eindeckautomaten.

Die gefärbten Schnitte wurden am Mikroskop der Firma Keyence analysiert und fotografiert.

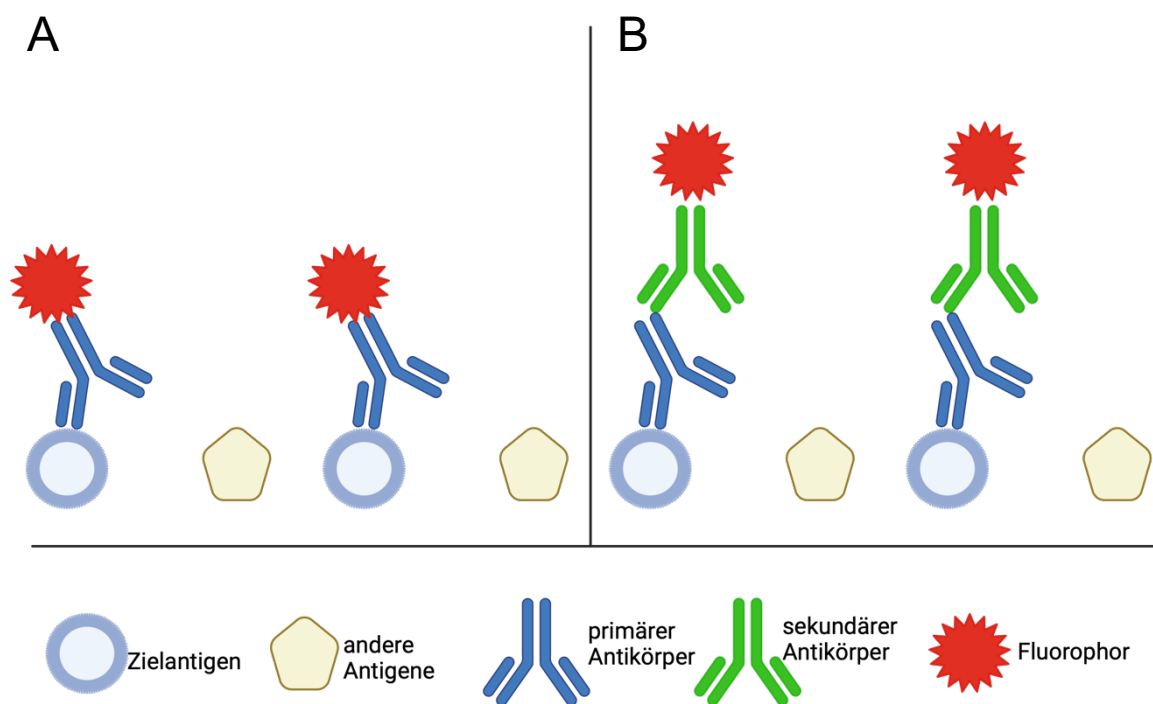


**Abbildung 17** Hämatoxylin-Eosin Färbung von normaler humaner Haut.  
Im oberen Teil des Bildes ist die Epidermis und im unteren die Dermis zu sehen.  
Maßstabsleiste 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Direkte Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenzfärbungen sind wichtige immunhistochemische Techniken, um Antigene in Geweben sichtbar zu machen. Sie finden einen breiten Einsatz in der experimentellen Dermatologie. Für die Färbungen werden primäre Antikörper verwendet, welche an das Zielantigen binden, im nächsten Schritt mit fluoreszierendem Farbstoff markiert werden und so unter dem Mikroskop gesehen werden können. (Im *et al.*, 2019)

Nachfolgend wird der Versuchsablauf von der DIF von PX43 beschrieben.



**Abbildung 18. Schematische Darstellung von A direkten und B indirekten Immunfluoreszenzfärbungen.**  
Hergestellt mit BioRender.com

#### 4.4.1 Direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43

**Tabelle 9. Herzustellende Lösungen für die direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43.**

Waschpuffer (1 Liter)	100 mL 10x <i>tris-buffered saline</i> (TBS)
	500 µL Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> 2M)
	900 mL NanoPure destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)
	Tween20
Blockpuffer	0,5 g Bovines Serumalbumin
	Verdünnen in <i>washing buffer</i> (WB) zu einem Volumen von 50 mL und steril filtrieren durch einen 0,2 µm Filtropur
Sekundärer Antikörper	Ratte anti-Hämagglutinin (HA)- Peroxidase-monoklonaler Antikörper <i>(rat anti-haemagglutinin (HA)- peroxidase-monoclonal antibody (mAb), high affinity, 0.1 µg /µL)</i> 1:100 Verdünnung mit Blockpuffer
Tertiärer Antikörper	Ziege anti-Ratte IgG leichte+ schwere Kette <i>(Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG heavy+light (H+L))</i> 1:200 Verdünnung mit Blockpuffer

Zur Visualisierung von in Gewebe gebundenem Antikörper, wurde die DIF durchgeführt. Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig

nur die benötigte Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 5 min an der Luft getrocknet werden. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

Die beiden Schnitte auf dem OT wurden mit dem Fettstift umkreist.

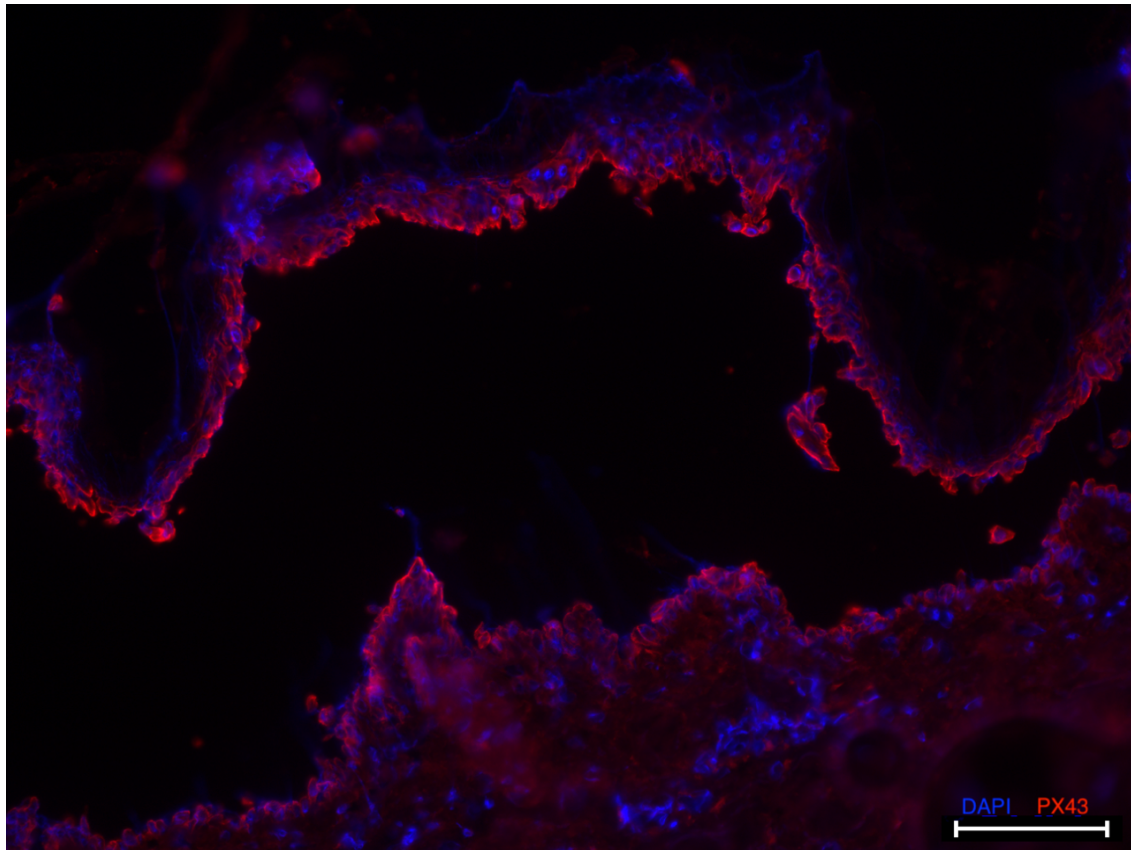
Mit 50  $\mu\text{L}$  *washing buffer* (WB) wurden die Schnitte gewaschen (2 x 3 min). Nachdem der Puffer verworfen wurde, wurde jeder Schnitt mit 50  $\mu\text{L}$  Blockpuffer für 30 min inkubiert.

Nach Abklopfen des Puffers, wurden 80  $\mu\text{L}$  des verdünnten sekundären Antikörpers auf die Positivkontrollen gegeben. Auf die Negativkontrollen wurden 80  $\mu\text{L}$  Blockpuffer gegeben. Für 60 min wurden die Schnitte inkubiert und anschließend mit WB gewaschen (3 x 3 min). Bevor der Sekundärantikörper auf alle Schnitte gegeben wurde, wurde dieser zentrifugiert (1 min, 500 x g).

Der zweite Antikörper wurde für 30 min auf den OT belassen und wurde vor Licht geschützt.

Abschließend wurden alle Schnitte mit 50  $\mu\text{L}$  WB (3 x 3 min) gewaschen und mit 4',6'-Diamindin-2-phenylindol (DAPI) eingebettet.

Diese mussten für 60 min bei Raumtemperatur trocknen. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 19. Direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43 eines Hautorgankulturmodells von Pemphigus vulgaris.**  
 Humane Haut eines Hautorgankulturmodells, in welches PX43 injiziert wurde.  
 Maßstabsbalken 100  $\mu$ m, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen

Nachfolgend werden die Versuchsabläufe der IIF-Färbung von BP180, BP230, DSG 1, DSG 3, Filaggrin, Ki-67/TUNEL, Loricrin, CK 6, CK 10 und CK 15 erläutert. Siehe **Abbildung 18** zur Veranschaulichung der Funktionsweise von indirekten Immunfluoreszenzfärbungen. Im Unterschied zu den DIF-Färbungen wird für die IIF-Färbung ein sekundärer Antikörper benötigt, welcher den primären Antikörper bindet und anschließend mit dem fluoreszierenden Farbstoff markiert wird.

#### 4.5.1 BP180

**Tabelle 10. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von BP 180.**  
 PBS – Phosphate buffered Saline, scFv - Einzelkettenfragment

Waschpuffer (1 Liter)	100 mL 10x <i>tris-buffered saline</i> (TBS)
	500 µL 2M Calciumchlorid
	900 mL NanoPure destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)
	Tween20
Blockpuffer (250 mL)	2,5 g Bovines Serum Albumin
	Verdünnen in <i>washing buffer</i> (WB) zu einem Volumen von 250 mL und steril filtrieren durch einen 0,22 µm Filtropur
Primärer Antikörper	scFv 4_8G auf 1 mg/ mL in PBS Verdünnung 1:100 Verdünnung mit Blockpuffer
Sekundärer Antikörper	Ratte anti-Hämagglutinin-Peroxidase ( <i>Anti-HA-peroxidase high affinity, rat monoclonal antibody</i> ) 1:100 Verdünnung mit Blockpuffer
Tertiärer Antikörper	Ziege anti-Ratte Immunglobulin G ( <i>Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG (H+L)</i> ) 1:200 Verdünnung mit Blockpuffer

Zur Visualisierung von in Gewebe gebundenem Antikörper, wurde die IIF durchgeführt. Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 5 min an der Luft getrocknet werden. In

dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet. Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (1 x WB x 5 min).

Beide Schnitte auf jedem OT wurden mit dem Fettstift umkreist.

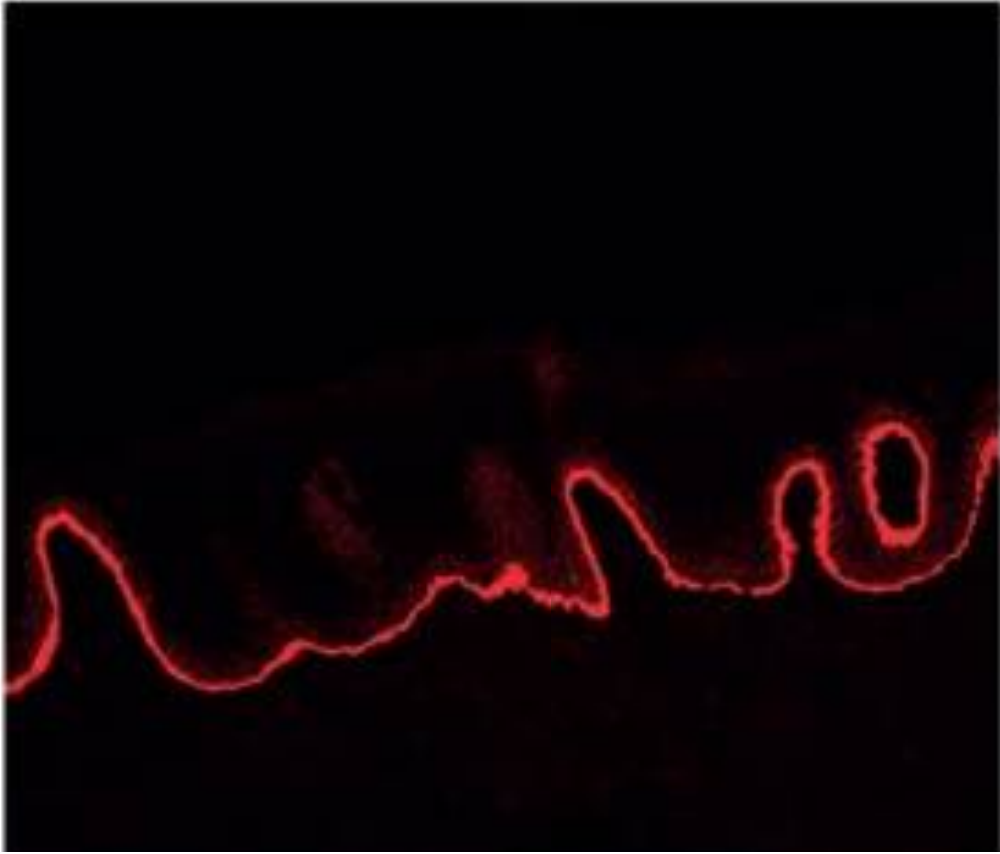
Nachdem der Puffer verworfen wurde, wurde jeder Schnitt mit 50 µL Blockpuffer für 30 min inkubiert.

Nachdem der Puffer verworfen wurde, wurden 80 µL des verdünnten primären Antikörpers auf die Positivkontrollen gegeben. Auf die Negativkontrollen wurden 80 µL Blockpuffer gegeben. Für 60 min wurden die Schnitte inkubiert und anschließend folgte der zweite Waschschrift (3 x WB x 5 min). Bevor der Sekundärantikörper auf alle Schnitte gegeben wurde, wurde dieser zentrifugiert (1 min x 500 x g).

Der zweite Antikörper wurde für 60 min auf den OT belassen und diese wurden lichtgeschützt gelagert. Es folgte der dritte Waschschrift (3 x WB x 5 min).

Bevor der Tertiärantikörper auf alle Schnitte gegeben wurde, wurde dieser zentrifugiert (1 min x 500 x g). Es folgte der vierte Waschschrift (3 x WB x 5 min). Abschließend wurde der WB verworfen und alle Schnitte wurden mit DAPI eingedeckelt.

Diese mussten für 60 min bei Raumtemperatur trocknen. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 20. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf humaner Haut von BP 180.**  
*Aus Emtenani et al., 2019 modifiziert.*

#### 4.5.2 BP230

**Tabelle 11. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von BP 230.**  
 PBS – Phosphate buffered saline

Waschpuffer (1 Liter)	100 mL 10x <i>tris-buffered saline</i>
	500 µL 2M Calciumchlorid
	900 mL NanoPure destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)
	500 µL Tween 20
Blockpuffer (250 mL)	2,5 g Bovines Serumalbumin
	Verdünnen in <i>washing buffer</i> (WB) zu einem Volumen von 250 mL und steril filtrieren durch einen 0,22 µm Filtropur
Primärer Antikörper	scFv 4_8G (Konzentration 1mg/mL in PBS) 1:100 Verdünnung mit Blockpuffer
Sekundärer Antikörper	Ratte anti-Hämagglutinin-Peroxidase ( <i>Anti-HA-peroxidase high affinity, rat monoclonal antibody</i> ) 1:100 Verdünnung mit Blockpuffer
Tertiärer Antikörper	Ziege anti-Ratte Immunglobulin G ( <i>Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG (H+L)</i> ) 1:200 Verdünnung mit Blockpuffer

Zur Visualisierung von in Gewebe gebundenem Antikörper, wurde die IIF durchgeführt. Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig

nur die benötigte Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 5 min an der Luft getrocknet werden. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet. Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (1 x WB x 5 min).

Beide Schnitte auf jedem OT wurden mit dem Fettstift umkreist.

Nachdem der Puffer verworfen wurde, wurde jeder Schnitt mit 50 µL Blockpuffer für 30 min inkubiert.

Nachdem der Puffer verworfen wurde, wurden 80 µL des verdünnten primären Antikörpers auf die Positivkontrollen gegeben. Auf die Negativkontrollen wurden 80 µL Blockpuffer gegeben. Für 60 min wurden die Schnitte inkubiert und anschließend folgte der zweite Waschschrift (3 x WB x 5 min). Bevor der Sekundärantikörper auf alle Schnitte gegeben wurde, wurde dieser zentrifugiert (1 min x 500 x g).

Der zweite Antikörper wurde für 60 min auf den OT belassen und diese wurden lichtgeschützt gelagert. Es folgte der dritte Waschschrift (3 x WB x 5 min).

Bevor der Tertiärantikörper auf alle Schnitte gegeben wurde, wurde dieser zentrifugiert (1 min x 500 x g). Es folgte der vierte Waschschrift (3 x WB x 5 min). Abschließend wurde der WB verworfen und alle Schnitte wurden mit DAPI eingedeckelt.

Die Schnitte mussten für 60 min bei Raumtemperatur trocknen. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 21. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf humaner Haut von BP 230.**

Aus Emtenani et al., 2019 modifiziert.

#### 4.5.3 Desmoglein 1

**Tabelle 12. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Desmoglein 1.**

PBS – Phosphate buffered saline

Primärer Antikörper	Maus anti-Mensch Desmoglein 1 ( <i>Mouse anti-human desmoglein 1</i> ) 1:100 Verdünnung mit PBS
Sekundärer Antikörper	Ziege anti-Maus IgG (leichte+ schwere Kette) ( <i>CyTm- conjugated Affinipure goat anti-mouse IgG (H+L)</i> ) 1:200 Verdünnung mit PBS

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 10 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist.

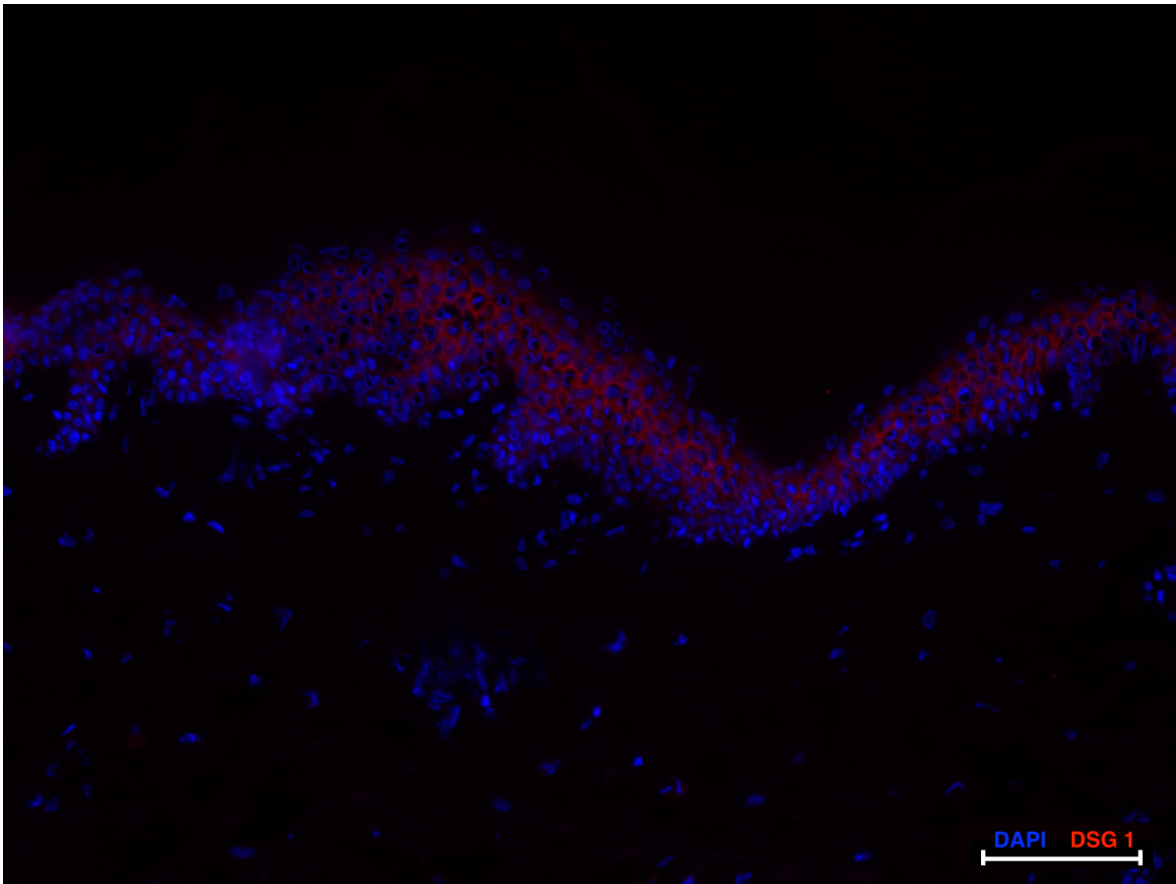
Durchgängig wurden 100 µL pro Schnitt bei allen Inkubationen pipettiert, sodass eine vollständige Benetzung stattgefunden hat.

Die Präinkubation aller Schnitte erfolgte mit 10% Ziegennormalserum (NGS) in PBS gelöst für 20 min bei Raumtemperatur.

Nachdem auf die Positivkontrollen der primäre Antikörper mit 2% NGS gegeben wurde und die Negativkontrollen PBS mit 2% NGS bedeckt wurden, stellte man die Schnitte über Nacht auf 4 °C zum Inkubieren.

Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde mit 2% NGS auf allen Schnitten verteilt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen (3 x PBS x 5 min) sowie die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt. Mit Deckgläschen wurden die gefärbten Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 22. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Desmoglein (DSG) 1.**

Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5.4 Desmoglein 3

**Tabelle 13. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Desmoglein 3.**

PBS – Phosphate buffered saline

Primärer Antikörper	Maus anti-Mensch Desmoglein 3 ( <i>Mouse anti-human desmoglein 3</i> ) 1:50 Verdünnung mit PBS
Sekundärer Antikörper	Ziege anti-Maus Immunglobulin G ( <i>Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488</i> ) 1:200 Verdünnung mit PBS

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0  $\mu\text{m}$  Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte

Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 10 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist.

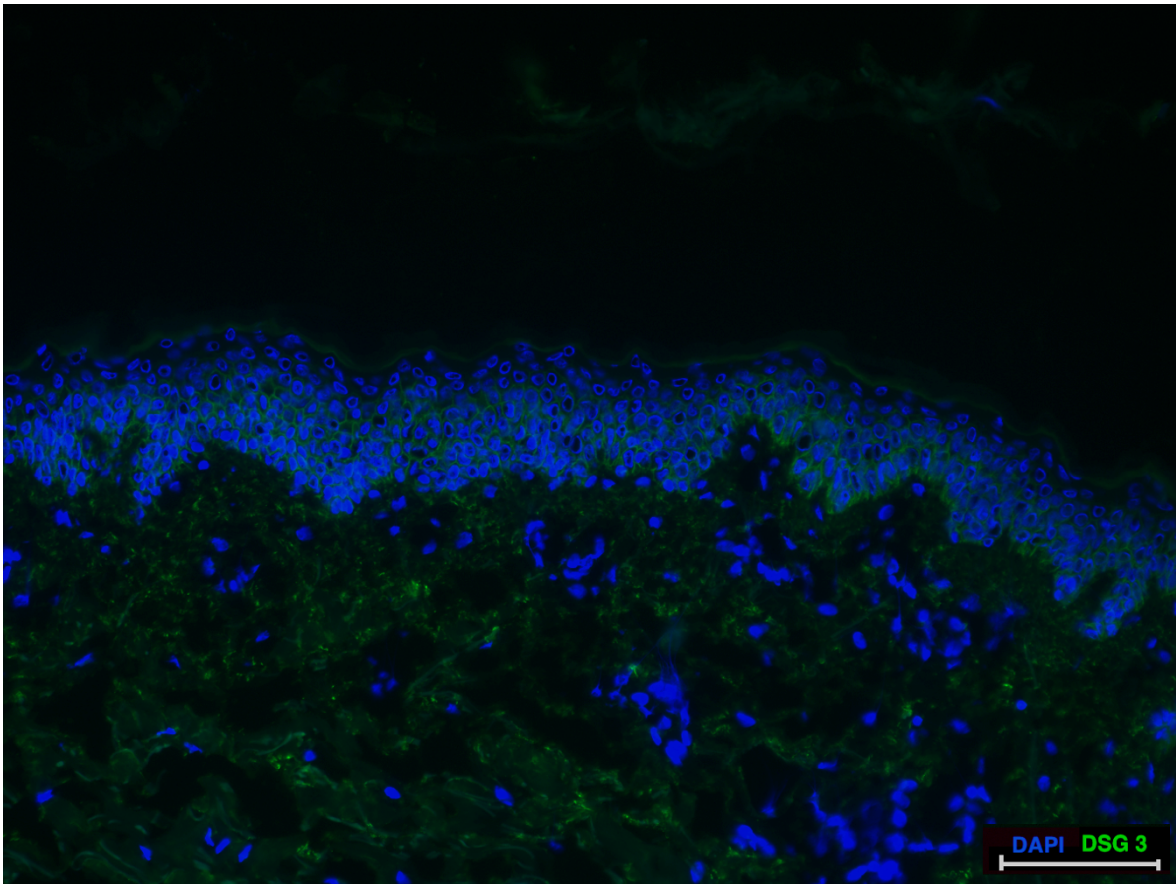
Durchgängig wurden 100 µL pro Schnitt bei allen Inkubationen pipettiert, sodass eine vollständige Benetzung stattgefunden hat.

Die Präinkubation aller Schnitte erfolgte mit 10% NGS in PBS gelöst für 20 min bei Raumtemperatur.

Nachdem auf die Positivkontrollen der primäre Antikörper mit 2% NGS gegeben wurde und die Negativkontrollen PBS mit 2% NGS bedeckt wurden, stellte man die Schnitte über Nacht auf 4 °C zum Inkubieren.

Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde mit 2% NGS auf allen Schnitten verteilt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen (3 x PBS x 5 min) sowie die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt. Mit Deckgläschen wurden die gefärbten Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 23. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Desmoglein (DSG)3.**

Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5.5 Filaggrin

**Tabelle 14. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Filaggrin.**

PBS – Phosphate buffered saline

Primärer Antikörper	Maus anti-Mensch Filaggrin ( <i>Mouse anti-human filaggrin</i> ) 1:100 Verdünnung mit PBS
Sekundärer Antikörper	Ziege anti-Maus Immunglobulin G ( <i>Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488</i> ) 1:100 Verdünnung mit PBS

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0  $\mu\text{m}$  Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte

Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 10 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

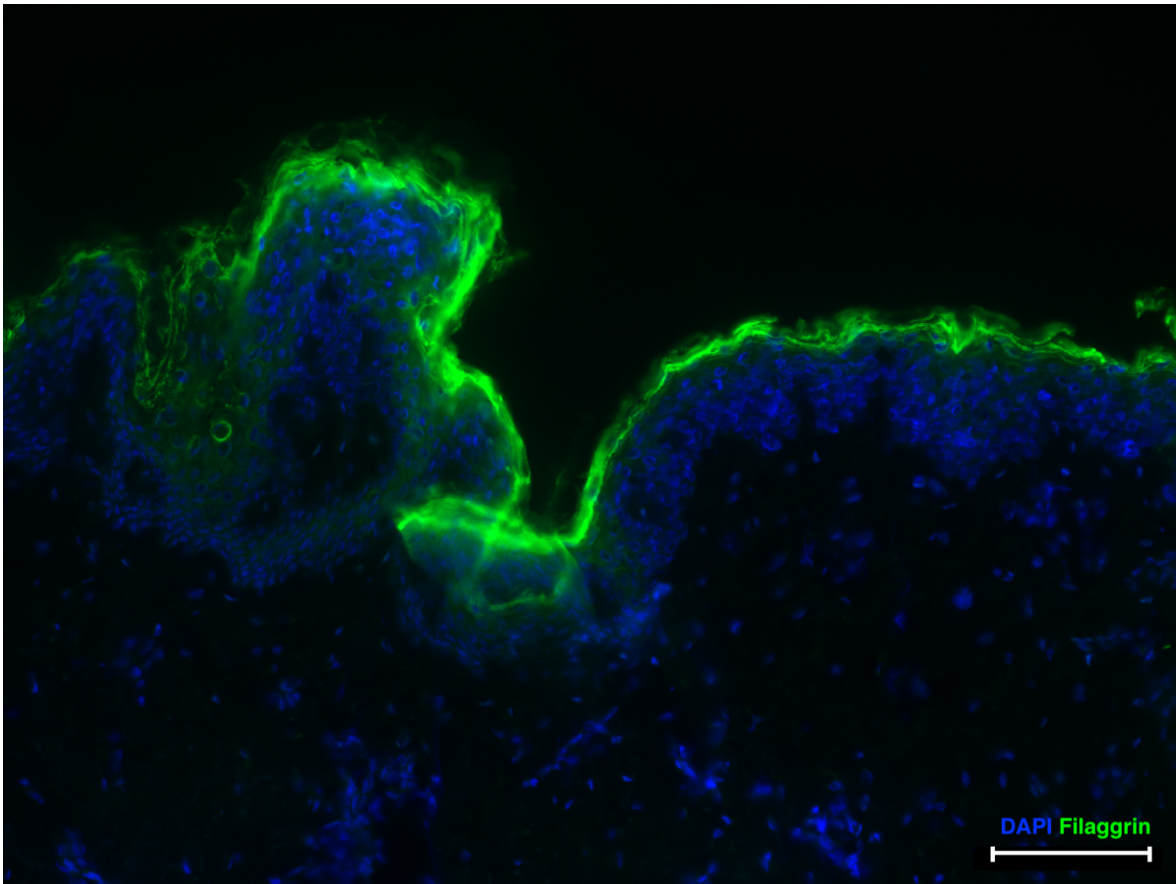
Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist.

Durchgängig wurden 100 µL pro Schnitt bei allen Inkubationen pipettiert, sodass eine vollständige Benetzung stattgefunden hat.

Die Präinkubation aller Schnitte erfolgte mit 10% NGS in PBS gelöst für 20 min bei Raumtemperatur.

Nachdem auf die Positivkontrollen der primäre Antikörper mit 2% NGS gegeben wurde und die Negativkontrollen PBS mit 2% NGS bedeckt wurden, stellte man die Schnitte über Nacht auf 4 °C zum Inkubieren.

Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde mit 2% NGS auf allen Schnitten verteilt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen (3 x PBS x 5 min) sowie die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt. Mit Deckgläschen wurden die gefärbten Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 24.** Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Filaggrin. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5.6 Ki-67/ TUNEL

**Tabelle 15. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Ki-67/TUNEL.**

Primärer Antikörper	Maus anti-Mensch Ki-67 ( <i>FLEX mouse-anti human Ki-67 antigen</i> )
Erster Sekundärer Antikörper	Anti-Digoxigenin Antikörper ( <i>fluorescein-labelled anti-digoxigenin antibody</i> ) (48,7% Blocklösung, 51,3% Antikörper Lösung)
Zweiter Sekundärer Antikörper	Ziege Anti-Maus IgG Rhodaminrot ( <i>Goat anti-mouse-IgG-Rhodamine Red</i> ) 1:200 in PBS
Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT)-Enzym-Lösung	70% Reaktionspuffer 30% (TdT-Enzyme)
Stopp-Puffer-Lösung 70 mL	68 mL destilliertes Wasser 2 mL Stopp-Puffer

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden das Ki/TUNEL-Kit auf Raumtemperatur gebracht, 1% Formaldehyd in PBS gelöst und ein Ethanol-Acetonsäure-Gemisch im Verhältnis von 2:1 auf -20 °C gekühlt. Alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 5 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

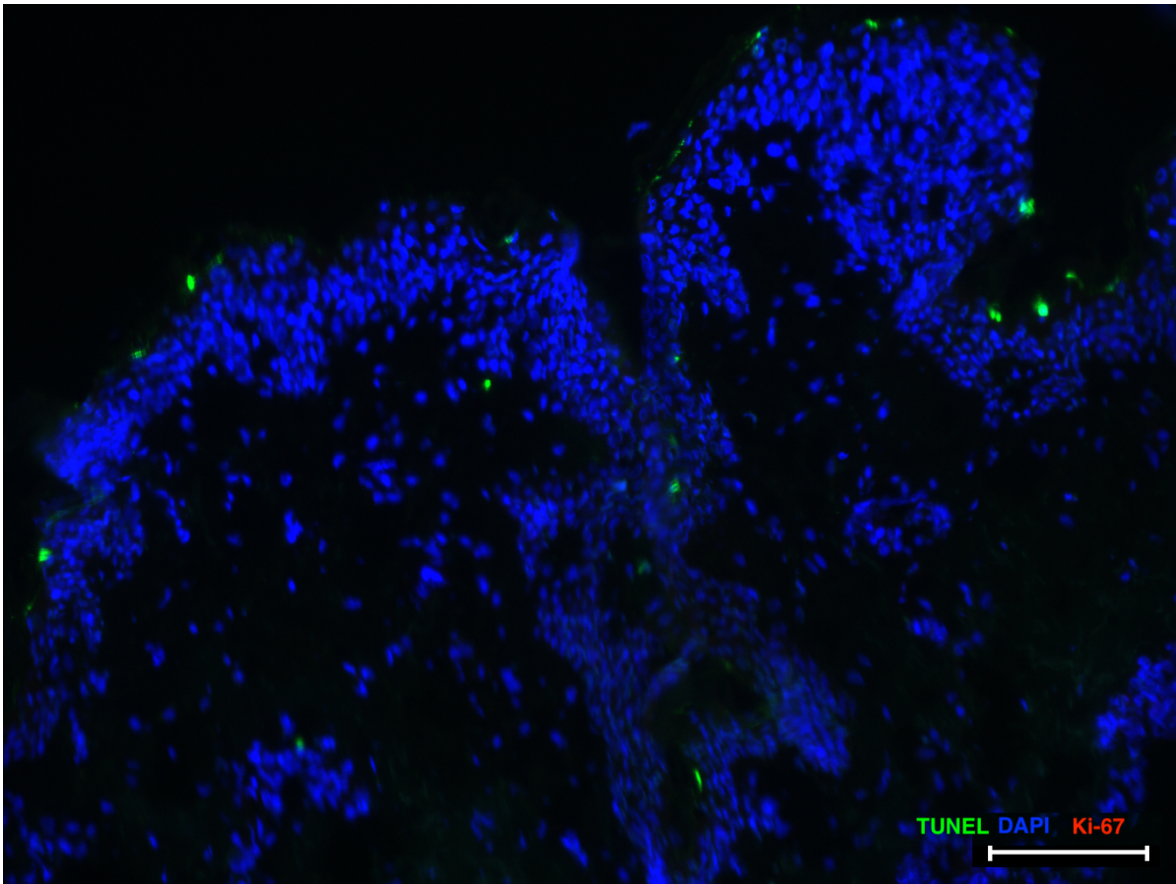
Danach wurden die Schnitte für 10 min bei RT in 1% Formaldehyd in PBS fixiert, anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Nachdem eine erneute Fixierung in Ethanol-Acetonsäure (2:1) stattgefunden hat, folgte der zweite Waschschrift (3 x PBS, 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist. Auf alle Schnitte wurden 20 µL Equilibrationspuffer pipettiert und inkubiert (5 min, Raumtemperatur).

Auf die Positivkontrolle wurde 20 µL terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT)-Enzym gegeben und auf die Negativkontrolle wurde Reaktionspuffer gegeben zur Inkubation (60 min, 37 °C).

Die Schnitte wurden in Stopp-Puffer-Lösung für 10 min auf 37 °C gegeben und anschließend folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Präinkubation folgte mit 10% NGS in PBS (20 min bei Raumtemperatur). 50 µL des primären Antikörpers wurde auf die Positivkontrollen pipettiert sowie 2% NGS in PBS auf die Negativkontrollen.

Die Schnitte wurden gewaschen (3 x PBS x 5 min). Es folgte der zweite Sekundärantikörper mit 50 µL auf alle Schnitte mit anteilig 2% NGS. Die Schnitte wurden gewaschen (3 x PBS x 5 min).

Abschließend wurden die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt, mit einem Deckgläschen versehen und lichtgeschützt getrocknet (60 min bei Raumtemperatur). Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 25. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Ki-67/TUNEL.**

Maßstabsbalken 100 µm, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5.7 Loricrin

**Tabelle 16. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Loricrin.**

PBS – Phosphate buffered saline

Primärer Antikörper	Hase polyklonal anti-Mensch Loricrin ( <i>rabbit polyclonal anti-human loricrin</i> ) 1:500 Verdünnung mit PBS
Sekundärer Antikörper	Ziege anti-Hase Immunglobulin G ( <i>fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L)</i> ) 1:200 Verdünnung mit PBS

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte

Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 10 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist.

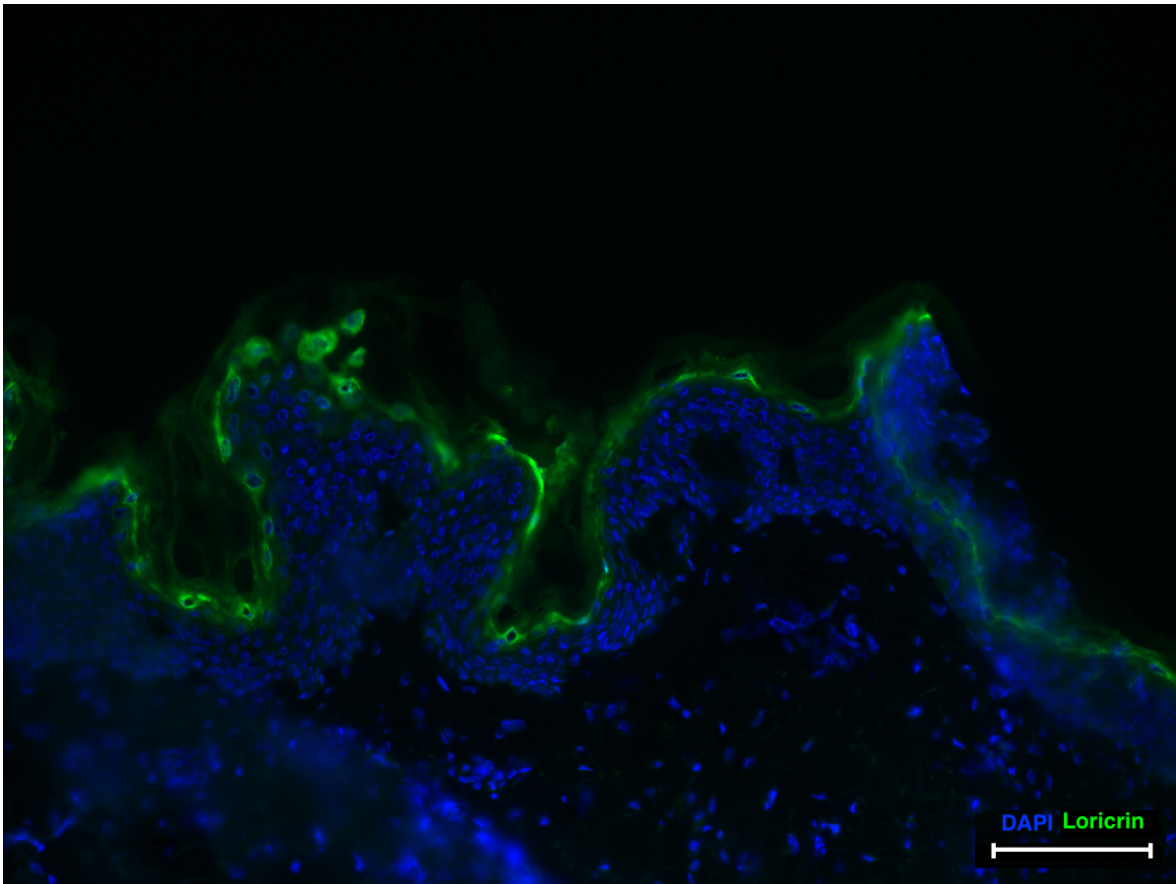
Durchgängig wurden 100 µL pro Schnitt bei allen Inkubationen pipettiert, sodass eine vollständige Benetzung stattgefunden hat.

Die Präinkubation aller Schnitte erfolgte mit 10% NGS in PBS gelöst für 20 min bei Raumtemperatur.

Nachdem auf die Positivkontrollen der primäre Antikörper mit 2% NGS gegeben wurde und die Negativkontrollen PBS mit 2% NGS bedeckt wurden, stellte man die Schnitte über Nacht auf 4 °C zum Inkubieren.

Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde mit 2% NGS auf allen Schnitten verteilt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen (3 x PBS x 5 min) sowie die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt. Mit Deckgläschen wurden die gefärbten Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 26. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Loricrin.**  
 Maßstabsbalken 100 µm, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5.8 Zytokeratin 6

**Tabelle 17. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin 6.**

PBS – Phosphate buffered saline

Primärer Antikörper	Maus anti-Mensch Zytokeratin 6 ( <i>mouse anti-human cytokeratin 6</i> ) 1:300 Verdünnung mit PBS
Sekundärer Antikörper	Ziege anti-Maus Immunglobulin G ( <i>goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488</i> ) 1:200 Verdünnung mit PBS

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte

Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 10 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist.

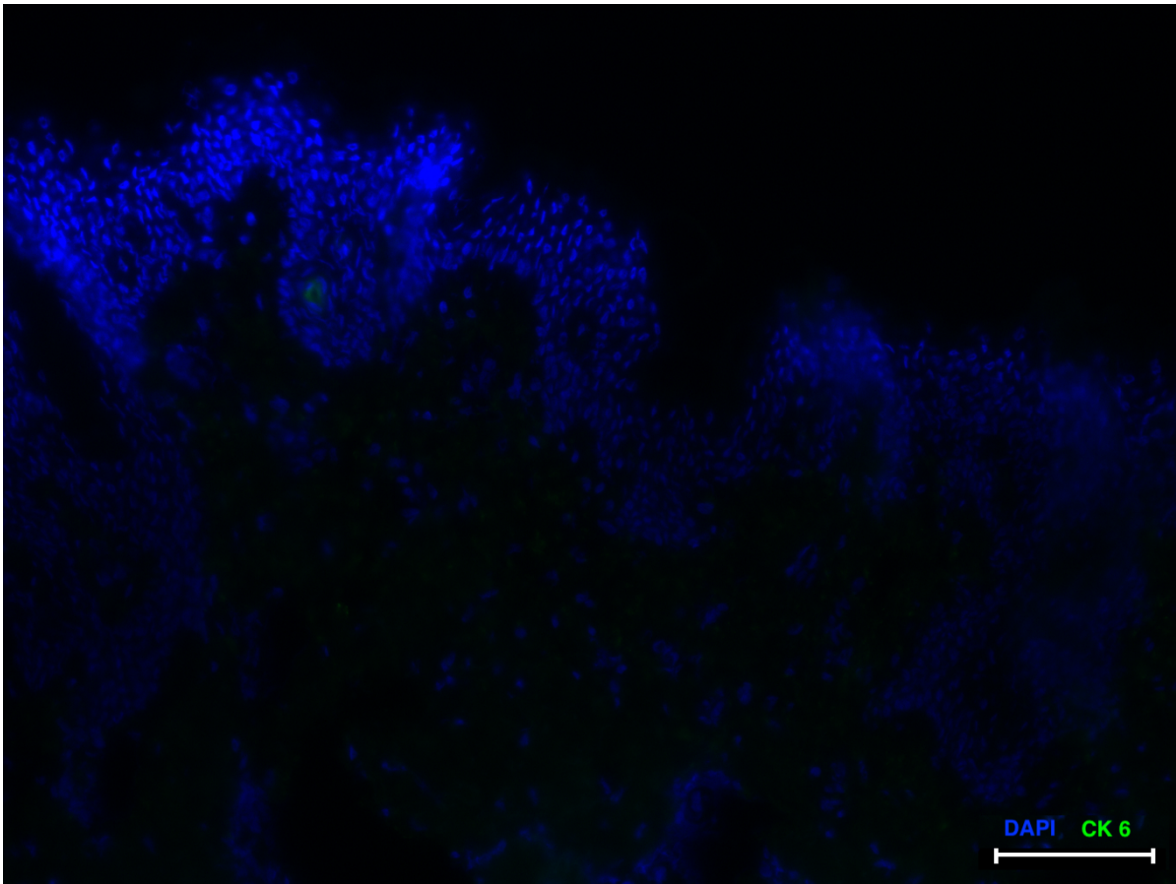
Durchgängig wurden 100 µL pro Schnitt bei allen Inkubationen pipettiert, sodass eine vollständige Benetzung stattgefunden hat.

Die Präinkubation aller Schnitte erfolgte mit 10% NGS in PBS gelöst für 20 min bei Raumtemperatur.

Nachdem auf die Positivkontrollen der primäre Antikörper mit 2% NGS gegeben wurde und die Negativkontrollen PBS mit 2% NGS bedeckt wurden, stellte man die Schnitte über Nacht auf 4 °C zum Inkubieren.

Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde mit 2% NGS auf allen Schnitten verteilt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen (3 x PBS x 5 min) sowie die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt. Mit Deckgläschen wurden die gefärbten Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 27. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Zytokeratin (CK) 6.**

Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5.9 Zytokeratin 10

**Tabelle 18. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin 10.**

PBS – Phosphate buffered saline

Primärer Antikörper	Maus anti-Mensch Zytokeratin 10 ( <i>mouse anti-human cytokeratin 10</i> ) 1:100 Verdünnung mit PBS
Sekundärer Antikörper	Ziege anti-Maus Immunglobulin G ( <i>goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488</i> ) 1:200 Verdünnung mit PBS

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0  $\mu\text{m}$  Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte

Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 10 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist.

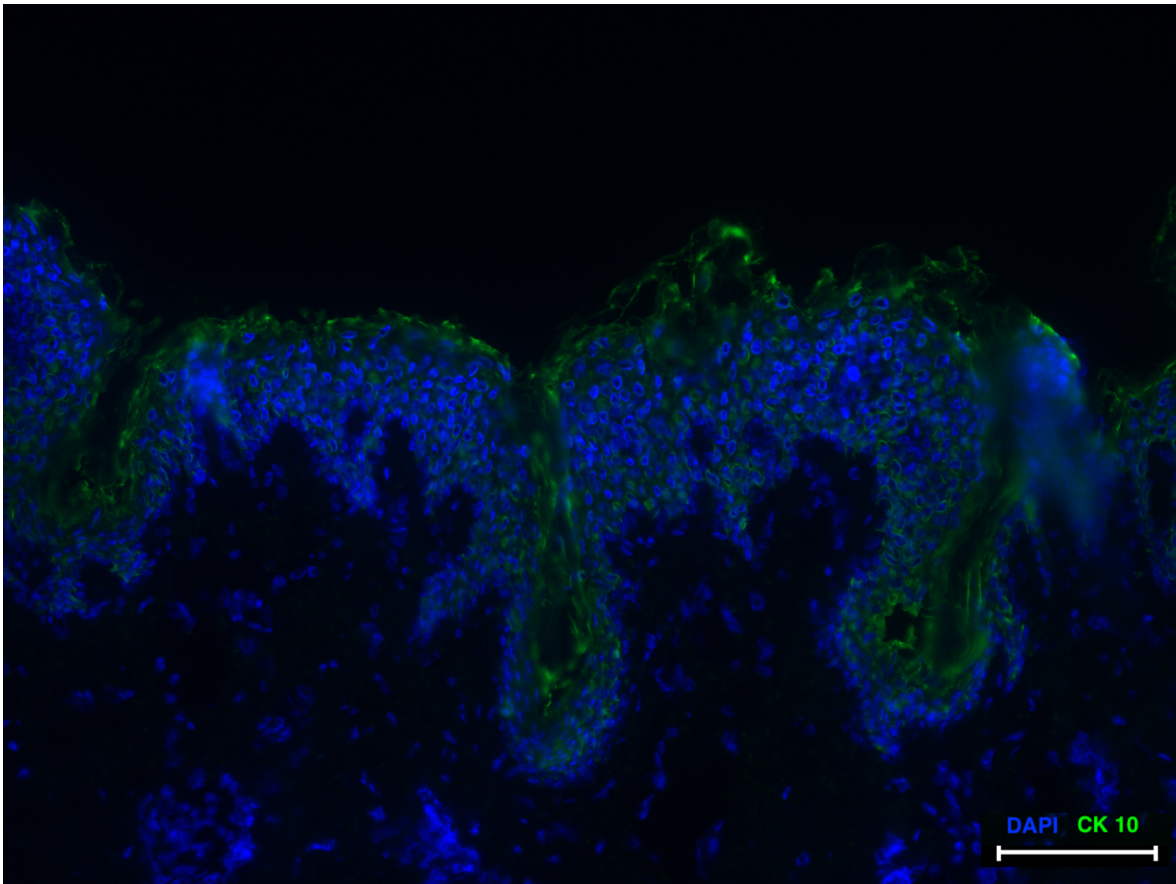
Durchgängig wurden 100 µL pro Schnitt bei allen Inkubationen pipettiert, sodass eine vollständige Benetzung stattgefunden hat.

Die Präinkubation aller Schnitte erfolgte mit 10% NGS in PBS gelöst für 20 min bei Raumtemperatur.

Nachdem auf die Positivkontrollen der primäre Antikörper mit 2% NGS gegeben wurde und die Negativkontrollen PBS mit 2% NGS bedeckt wurden, stellte man die Schnitte über Nacht auf 4 °C zum Inkubieren.

Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde mit 2% NGS auf allen Schnitten verteilt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen (3 x PBS x 5 min) sowie die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt. Mit Deckgläschen wurden die gefärbten Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 28. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Zytokeratin (CK) 10.**

Maßstabsbalken 100 µm, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

#### 4.5.10 Zytokeratin 15

**Tabelle 19. Herzustellende Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin 15.**

PBS – Phosphate buffered saline

Primärer Antikörper	Maus anti-Mensch Zytokeratin 15 ( <i>mouse anti-human cytokeratin 15</i> ) 1:100 Verdünnung mit PBS
Sekundärer Antikörper	Ziege anti-Maus IgG (Leichte + schwere Kette) ( <i>goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488</i> ) 1:200 Verdünnung mit PBS

Für diese Färbung benötigten wir in Kryomatrix eingebettete Proben, welche mit 6,0 µm Dicke im Kryostaten geschnitten und auf -80 °C aufbewahrt wurden. Um den Proben sowie den Materialien nicht zu schaden, wurde stets zügig nur die benötigte

Menge herausgeholt. Die Antikörper und die Puffer wurden auf Eis gelagert. Die fluoreszierenden Antikörper wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die Puffer vorbereitet, alle Materialien wurden zusammengesucht, die feuchte Dunkelkammer wurde vorbereitet und die zu färbenden Kryoschnitte auf OT wurden 10 min an der Luft getrocknet. In dieser Zeit sollte man alle OT beschriften, um welche Färbung es sich handelt und wo sich Negativ- bzw. Positivkontrolle befindet.

Danach wurden die Schnitte für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend folgte der erste Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umkreist.

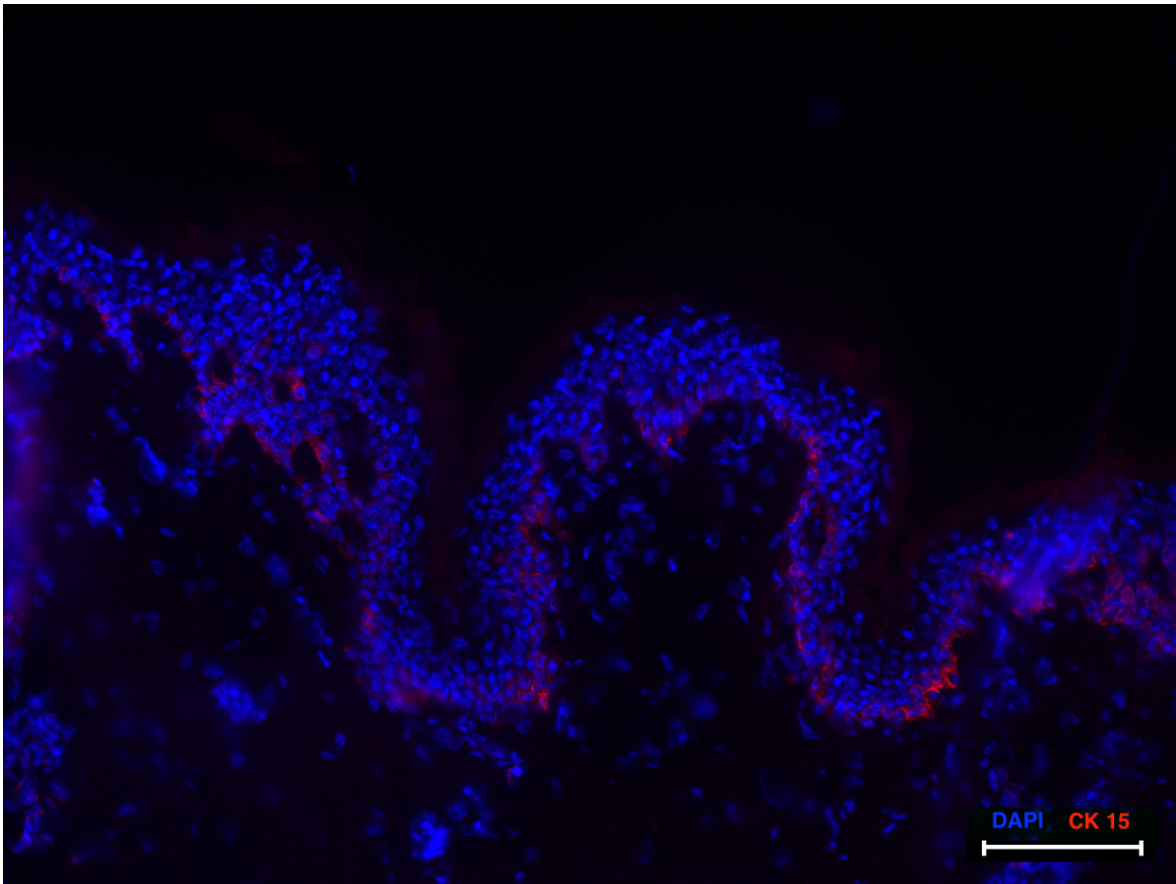
Durchgängig wurden 100 µL pro Schnitt bei allen Inkubationen pipettiert, sodass eine vollständige Benetzung stattgefunden hat.

Die Präinkubation aller Schnitte erfolgte mit 10% NGS in PBS gelöst für 20 min bei Raumtemperatur.

Nachdem auf die Positivkontrollen der primäre Antikörper mit 2% NGS gegeben wurde und die Negativkontrollen PBS mit 2% NGS bedeckt wurden, stellte man die Schnitte über Nacht auf 4 °C zum Inkubieren.

Am nächsten Morgen folgte ein Waschschrift (3 x PBS x 5 min). Der sekundäre Antikörper wurde mit 2% NGS auf allen Schnitten verteilt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen (3 x PBS x 5 min) sowie die Schnitte mit einem Tropfen DAPI bedeckt. Mit Deckgläschen wurden die gefärbten Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbten Schnitte sollten langfristig bei -80 °C gelagert werden und alle Fotos sollten für eine bessere Vergleichbarkeit im gleichen Abstand zur Färbung fotografiert werden, optimalerweise nach 24 h.



**Abbildung 29. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut von Zytokeratin (CK) 15.**

Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

## 5 Ergebnisse

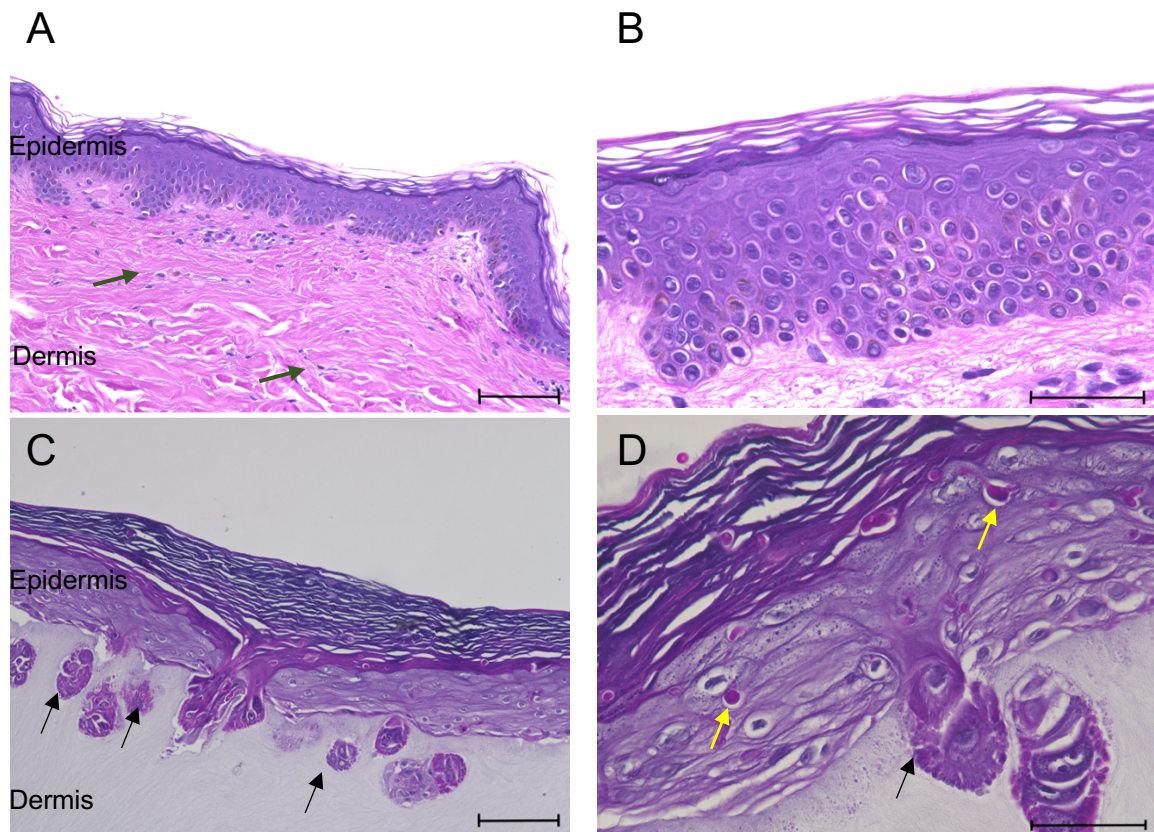
Nachfolgend sind die, während meiner Forschungsarbeit gewonnenen, Ergebnisse mithilfe von Bildern dargestellt.

### 5.1 Erfolgreiches Herstellen einer 3D Haut

Das Erschaffen der 3D Haut ist ein komplexer Prozess, welcher von verschiedenen Variablen abhängig ist. Zunächst war die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten notwendig. Wie in 4.1 beschrieben, waren drei von sechs Zellanzüchtungen erfolgreich. Die Vitalität und die Differenzierungsneigung der Keratinozyten trugen maßgeblich zum Erfolg des Herstellens der 3D Haut bei. Es wurden stets die Zellen der Hautspendernummer 22-16 (**siehe Tabelle 7**) genutzt, damit eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse nach Applikation von PX43 geschaffen werden konnte. Es wurden fünf 3D Häute hergestellt und viermal die PX43 Applikation (siehe 4.2.2) durchgeführt. Das Ziel der Herstellung einer 3D Haut ist es gewesen, der NHS in Aufbau, Struktur und Marker-Proteinen zu entsprechen. Im Folgenden wurde schrittweise analysiert, inwiefern die Vergleichbarkeit gegeben ist.

#### 5.1.1 Vergleichbarkeit von 3D Haut und normaler humaner Haut

Hierfür wurde zunächst mithilfe der HE-Färbung der Aufbau und die Struktur des dermoepidermalen Hautmodells mit der NHS verglichen. Der Dermatopathologe PD Dr. med. Christian Rose half freundlicherweise bei der Analyse meiner Ergebnisse und dem Vergleich der 3D Haut mit der NHS, sodass die Ergebnisse objektiver dargestellt werden konnten.



**Abbildung 30. Hämatoxylin-Eosin Färbung von normaler humaner Haut und 3D Haut.**  
 Normale humane Haut in **A/B**, 3D Haut in **C/D**. Pfeilmarkierung dunkelgrün auf Fibroblasten der Dermis, schwarz auf Formung einer Reteleiste, gelb auf avitale Zellen. Maßstabsbalken A/ B 100  $\mu$ m, C/ D 50  $\mu$ m

Die HE-Färbung war erfolgreich. Die Struktur der Epidermis der NHS (siehe 2.1.1) mit Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum ist zu erkennen (**Abbildung 30 B**). Die Keratinozyten sind dunkel angefärbt und das Stratum corneum ist schmal. Die Dermis der NHS ist pink angefärbt, locker geschichtet und enthält angeschnittene Fibroblasten (**Abbildung 30 A**).

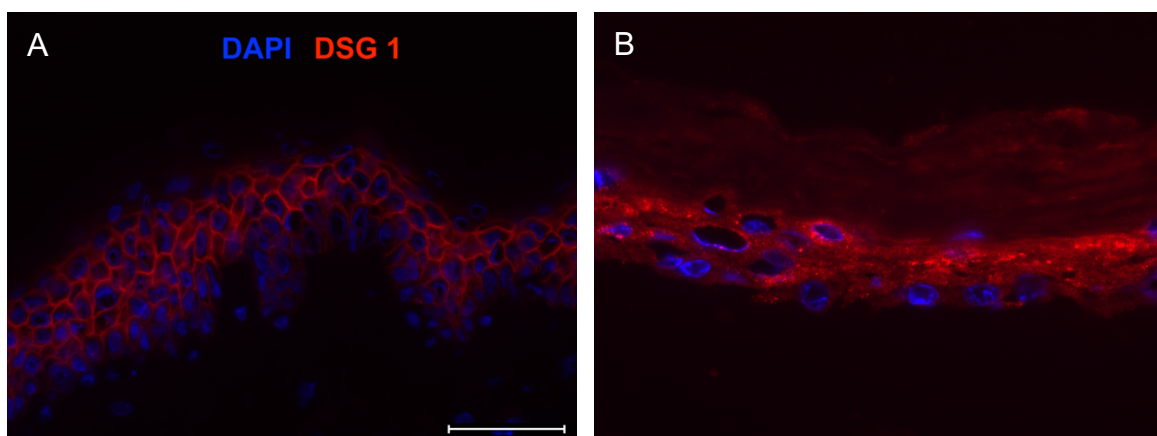
In der 3D Haut ist ebenfalls eine Schichtung mit Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum zu erkennen (**Abbildung 30 C**). Auffallend ist, dass die Epidermis schmäler ist, die Keratinozyten heller angefärbt sind, das Stratum corneum breiter ist und avitale Zellen innerhalb der Epidermis (**Abbildung 30 D**) zu sehen sind. Erstmals ist es in unserer Arbeitsgruppe gelungen, dass die Epidermis der 3D Haut eine Reteleiste ausgebildet hat (**Abbildung 30 C/D**).

Die Dermis der 3D Haut entspricht nicht der Dermis der NHS, denn die Struktur ist deutlich dichter, es sind keine Fibroblasten angeschnitten und die Anfärbung ist deutlich schwächer (**Abbildung 30 C**).

### 5.1.2 Nachweis epidermaler Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz

Im folgenden Abschnitt wurden Markerproteine der Epidermis, sowie der dermoepidermalen Übergangszone mithilfe von IIF-Färbungen visualisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse der IIF-Färbungen der 3D Häute bezüglich der Lokalisation und Ausprägung mit der NHS verglichen. Zur Funktion und zum Hintergrund der einzelnen Markerproteine siehe **2.1.1**.

Trotz mehrfacher Wiederholungen und der Unterstützung unserer Biologisch-Technischen Assistentin, Nadine Merck, waren die IIF-Färbungen von BP 180, BP 230 und KI-67/TUNEL nicht erfolgreich.

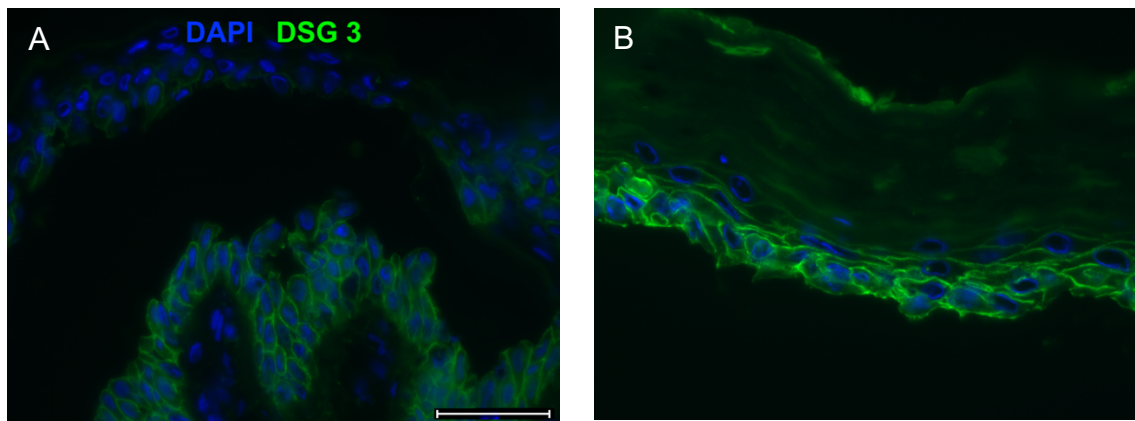


**Abbildung 31. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Desmoglein (DSG) 1.**

Die normale humane Haut **A** wurde wie die 3D Haut **B** mit einem Antikörper angefärbt, welcher gegen DSG 1 gerichtet ist. Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Mit der IIF-Färbung von DSG 1 wurde das Vorkommen und die Verteilung von DSG 1 in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 31**). Das rot-fluoreszierende Signal ist in der Epidermis der NHS vor allem im Stratum spinosum und Stratum granulosum ausgeprägt, in den basalen Schichten ist weniger Fluoreszenz zu sehen. Das klassische Honigwabenmuster, welches die Keratinozyten umrandet, ist gut zu erkennen (**Abbildung 31 A**).

Auch in der 3D Haut ist ein rot-fluoreszierendes Signal (**Abbildung 31 B**) zu erkennen, die Lokalisation unterscheidet sich jedoch. Die basalen Schichten der Epidermis zeigen ein schwaches, weniger regelmäßiges Muster. In den oberen Schichten der Epidermis ist kaum Fluoreszenz zu sehen. Das Honigwabenmuster ist nicht gut zu erkennen, anstelle der Zellmembran ist das Zytoplasma teilweise angefärbt. Die 3D Haut ist hinsichtlich DSG 1 teilweise mit der NHS vergleichbar.

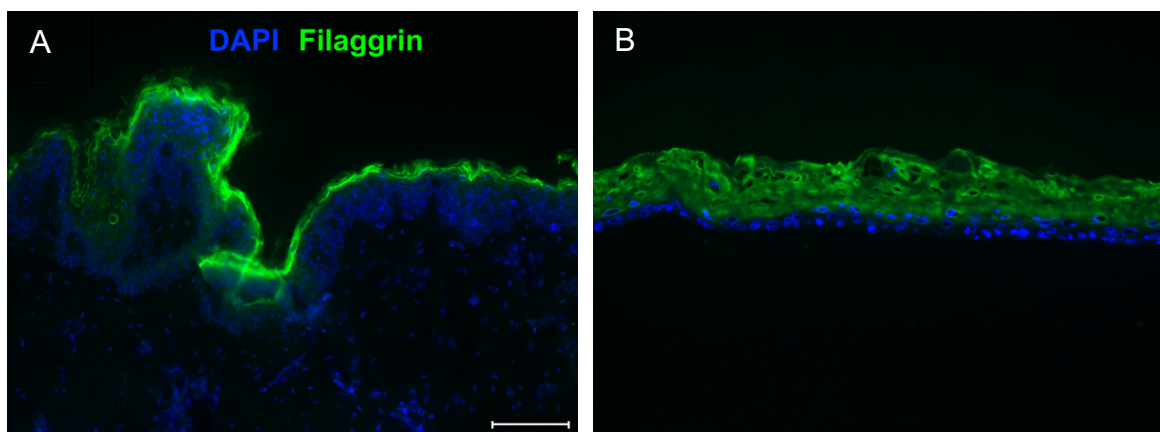


**Abbildung 32. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf humaner Haut und 3D Haut von Desmoglein (DSG) 3.**

Die normale Haut **A** wurde wie die 3D Haut **B** mit einem Antikörper angefärbt, welcher gegen DSG 3 gerichtet ist. Maßstabsbalken A 100  $\mu$ m, B 50  $\mu$ m, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Mit der IIF-Färbung von DSG 3 wurde das Vorkommen und die Verteilung von DSG 3 in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 32**). Das grün-fluoreszierende Signal ist in der Epidermis der NHS (**Abbildung 32 A**) vor allem im Stratum basale und im Stratum spinosum ausgeprägt. Das klassische Honigwabemuster, welches die Keratinozyten umrandet, ist gut zu erkennen (**Abbildung 32 A**).

Das grün-fluoreszierende Signal der 3D Haut (**Abbildung 32 B**) hat eine ähnlich starke Ausprägung wie in der NHS, auch hier bildet sich ein honigwabentartiges Muster um die Keratinozyten des Stratum basale. Die 3D Haut ist hinsichtlich DSG 3 mit der NHS vergleichbar.



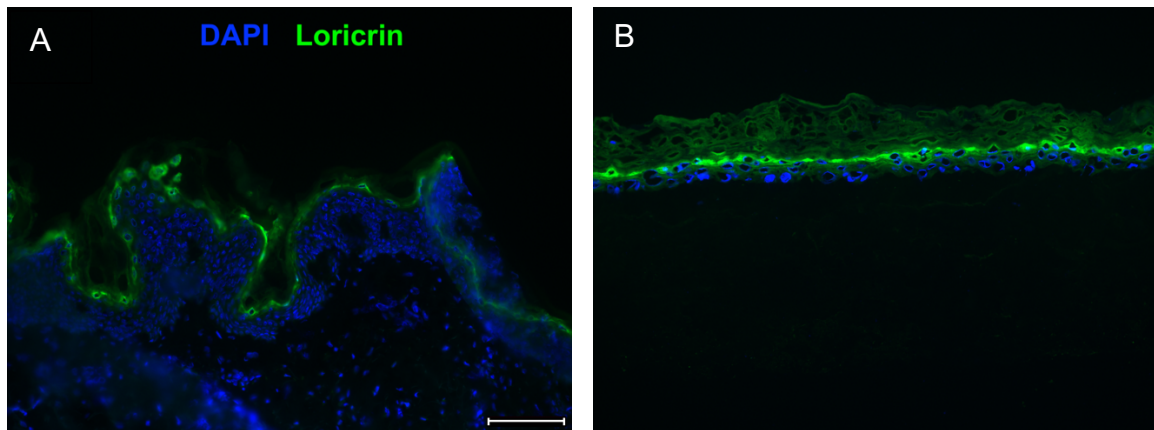
**Abbildung 33. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Filaggrin.**

Die normale Haut **A** wurde wie die 3D Haut **B** mit einem Antikörper angefärbt, welcher gegen Filaggrin gerichtet ist. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Mit der IIF-Färbung von Filaggrin wurde das Vorkommen und die Verteilung von Filaggrin in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 33**).

Das grün-fluoreszierende Signal der NHS ist im Stratum corneum der Epidermis stark ausgeprägt (**Abbildung 33 A**). Dieses umrahmt die Epidermis nach apikal.

Das grün-fluoreszierende Signal der 3D Haut ist in den suprabasalen Schichten der Epidermis ausgeprägt (**Abbildung 33 B**). Die Vergleichbarkeit von der 3D Haut mit NHS bezüglich Filaggrin ist teilweise gegeben, da die Ausprägung jedoch nicht die exakte Lokalisation übereinstimmen, da in der NHS das nur das Stratum corneum angefärbt ist und in der 3D Haut alle suprabasalen Zellschichten.



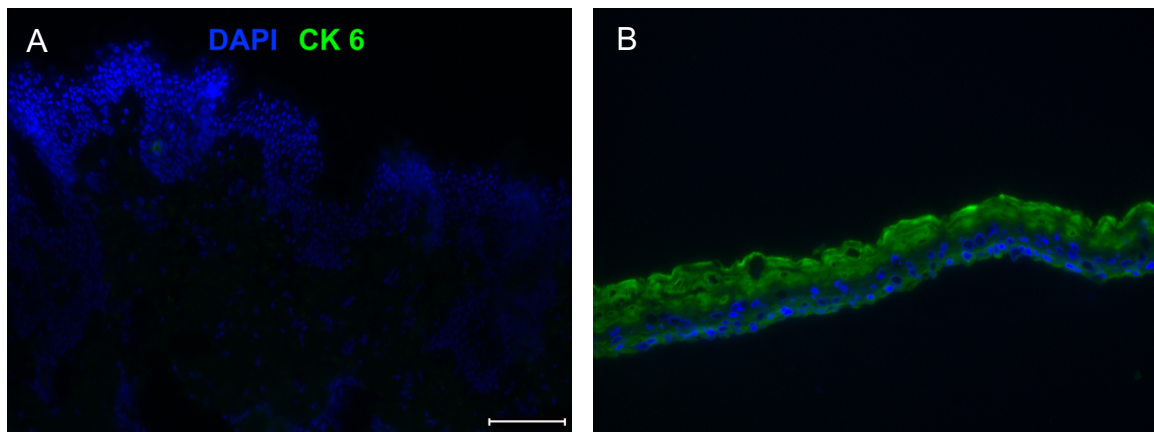
**Abbildung 34. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Loricrin.**

*Die normale humane Haut A wurde wie die 3D Haut B mit einem Antikörper angefärbt, welcher gegen Loricrin gerichtet ist. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.*

Mit der IIF-Färbung von Loricrin wurde das Vorkommen und die Verteilung von Loricrin in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 34**).

Das grün-fluoreszierende Signal der NHS ist im Stratum corneum der Epidermis zu erkennen (**Abbildung 34 A**).

In der 3D Haut ist ebenfalls eine linienartige Fluoreszenz oberhalb des Stratum basale der Epidermis zu sehen (**Abbildung 34 B**). Die Vergleichbarkeit von der 3D Haut mit NHS bezüglich Loricrin ist teilweise gegeben, da die Ausprägung jedoch nicht die Lokalisation des Stratum corneums übereinstimmen.

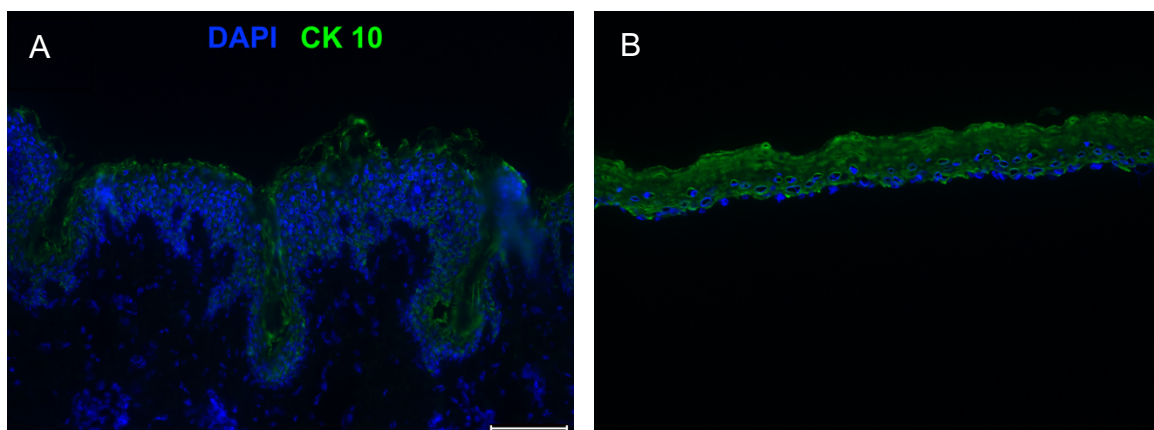


**Abbildung 35. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Zytokeratin (CK) 6.**

Die normale humane Haut **A** wurde wie die 3D Haut **B** mit einem Antikörper angefärbt, welcher gegen CK 6 gerichtet ist. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Mit der IIF-Färbung von CK 6 wurde das Vorkommen und die Verteilung von CK 6 in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 35**). In NHS ist kein CK 6 angefärbt (**Abbildung 35 A**), das entspricht unseren Erwartungen, da in intakter NHS kein CK 6 ausgeprägt ist, sondern während der Wundheilung exprimiert wird (**siehe 2.1.1.1**).

In der 3D Haut hingegen, ist ein deutliches grün-fluoreszierendes Signal im Stratum corneum und im Stratum granulosum der Epidermis zu sehen (**Abbildung 35 B**). Sodass die Vergleichbarkeit mit intakter NHS bezüglich CK 6 nicht gegeben ist.



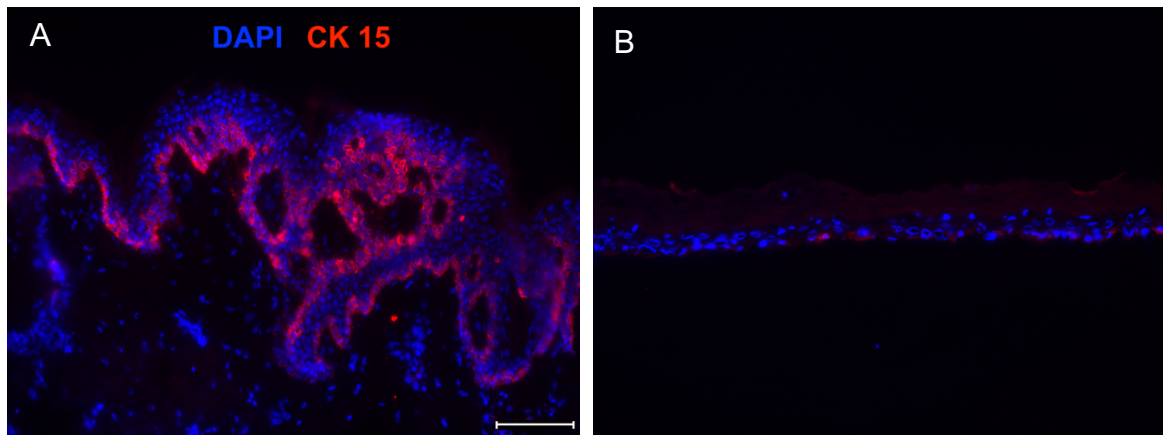
**Abbildung 36. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Zytokeratin (CK) 10.**

Die normale humane Haut **A** wurde wie die 3D Haut **B** mit einem Antikörper angefärbt, welcher gegen CK 10 gerichtet ist. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Mit der IIF-Färbung von CK 10 wurde das Vorkommen und die Verteilung von CK 10 in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 36**).

Das grün-fluoreszierende Signal ist in allen suprabasalen Schichten Epidermis der NHS (**Abbildung 36 A**) zu erkennen.

Auch in der 3D Haut ist eine deutliche grüne Fluoreszenz innerhalb der suprabasalen Schichten der Epidermis zu sehen (**Abbildung 36 B**). Die Vergleichbarkeit von der 3D Haut mit NHS bezüglich CK 10 ist gegeben, da sowohl Lokalisation als auch Ausprägung übereinstimmen.



**Abbildung 37. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf normaler humaner Haut und 3D Haut von Zytokeratin (CK) 15.**

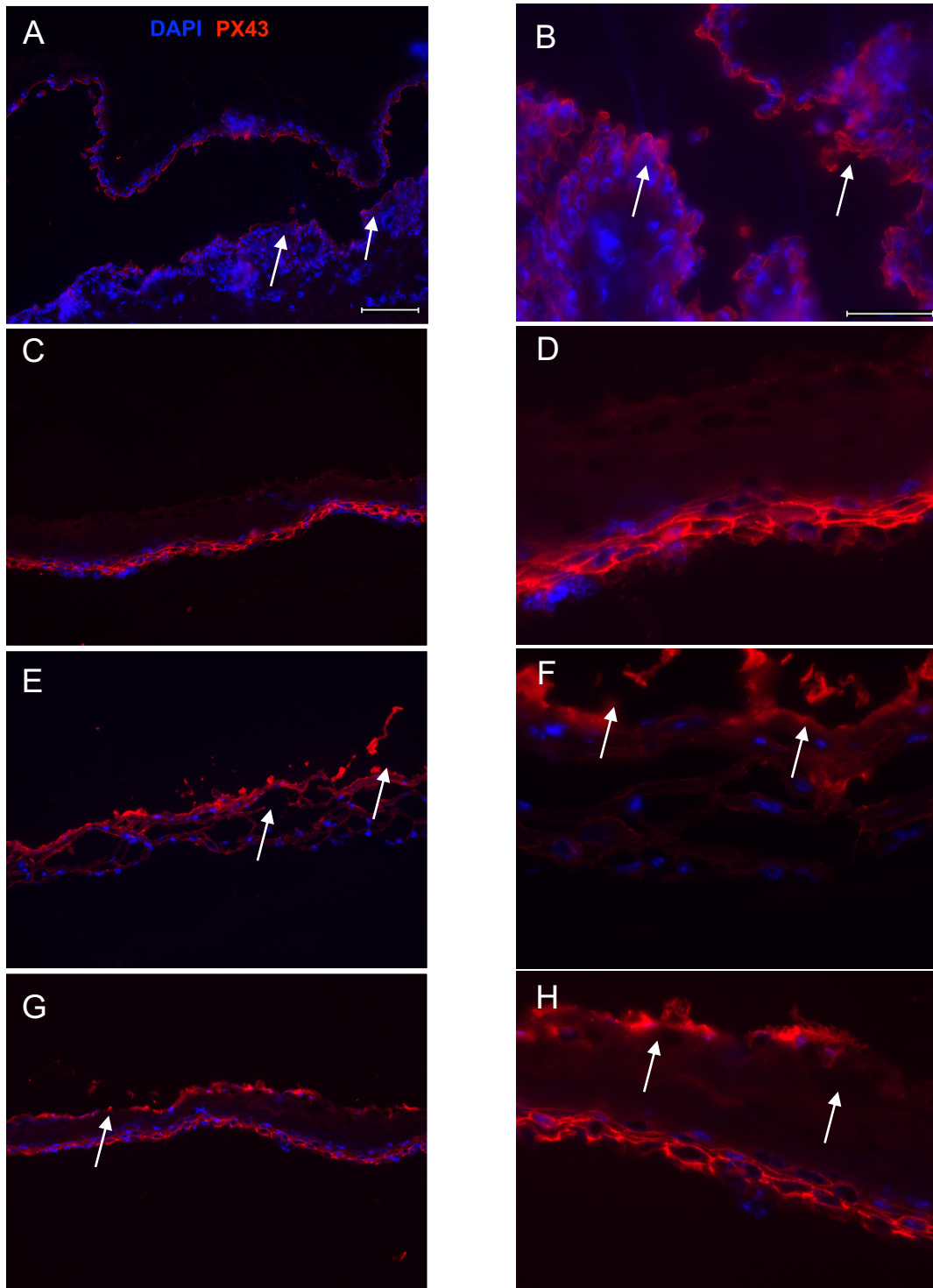
Die normale Haut **A** wurde wie die 3D Haut **B** mit einem Antikörper angefärbt, welcher gegen CK 15 gerichtet ist. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ , DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Mit der IIF-Färbung von CK 15 wurde das Vorkommen und die Verteilung von CK 15 in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 37**). Das rot-fluoreszierende Signal ist in der Epidermis der NHS ist durchgängig im Stratum basale ausgeprägt (**Abbildung 37 A**), sodass es eine leistenartige Erscheinung hat.

Das rot-fluoreszierende Signal der 3D Haut ist auch innerhalb des Stratum basale der Epidermis zu erkennen (**Abbildung 37 B**), die Fluoreszenz ist jedoch schwächer. Die Vergleichbarkeit von der 3D Haut mit NHS bezüglich CK 15 ist nur teilweise gegeben, da die Ausprägung deutlich schwächer ist, aber die Lokalisation übereinstimmt.

## 5.2 PX43 bindet in der Epidermis der 3D Haut

Um zu überprüfen, ob PX43 in der 3D Haut bindet, wurde die DIF-Färbung von PX43 durchgeführt. Da Unterschiede im Bindungsverhalten je nach Applikationsweg (**siehe 4.2.2**) entstanden sein könnten, wurde für jeden Applikationsweg die DIF-Färbung durchgeführt. Die DIF-Färbung des HSOC (**Abbildung 38 A/B**) dient als Vergleichsmodell für die 3D Häute, da das Bindungsmuster hier bereits gut bekannt ist und ein gutes, humanes *in vitro*-Modell für PV darstellt.



**Abbildung 38. Direkte Immunfluoreszenzfärbung von PX43.**  
*A/B* von humaner Haut, in die 20  $\mu$ L PX43-Lösung injiziert wurde, *C/D* 3D Haut, der 20  $\mu$ L PX43-Lösung über das Medium zugeführt wurde, *E/F* 3D Haut, der 20  $\mu$ L PX43-Lösung auf die Epidermis appliziert wurde, *G/H* 3D Haut, der 20  $\mu$ L PX43-Lösung injiziert wurde. Pfeilmarkierung auf *A/B* Spaltbildung *E-H* auf gelöster Zelladhäsion. Maßstabsbalken *A/C/E/G* 100  $\mu$ m, Maßstabsbalken *B/D/F/H* 50  $\mu$ m, DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Mit der DIF-Färbung von PX43 wurde das Vorkommen und die Verteilung von PX43 in der Haut visualisiert. Die Zellkerne der Keratinozyten sind mit DAPI blau gefärbt (**Abbildung 38**).

In der DIF-Färbung des HSOC (**Abbildung 38 A/B**) ist ein deutliches rot-fluoreszierendes Signal, um den entstandenen Spalt, zu erkennen. Die Fluoreszenz und die Spaltbildung beginnt über dem Stratum basale, sodass die basale Zellschicht persistiert. Da PX43 DSG 1/ DSG 3 bindet (**siehe 2.2.2**), ist dies das für die DIF des HSOC charakteristische Anfärbung und Spaltbildung.

Das Bindungsmuster von PX43 in den 3D Häuten unterscheidet sich abhängig von der Applikationsweise.

Durch die Applikation ins Medium (**Abbildung 38 C/D**) sieht man ein deutliches rot-fluoreszierendes Signal in der basalen Schicht der Epidermis. Es ist das klassische honigwabenartige Muster zu erkennen, welches die Umrandung der Keratinozyten beschreibt und mit der Ausprägung von DSG 1/ 3 übereinspricht (**Abbildung 31/32**). Es ist keine Spaltbildung zu sehen.

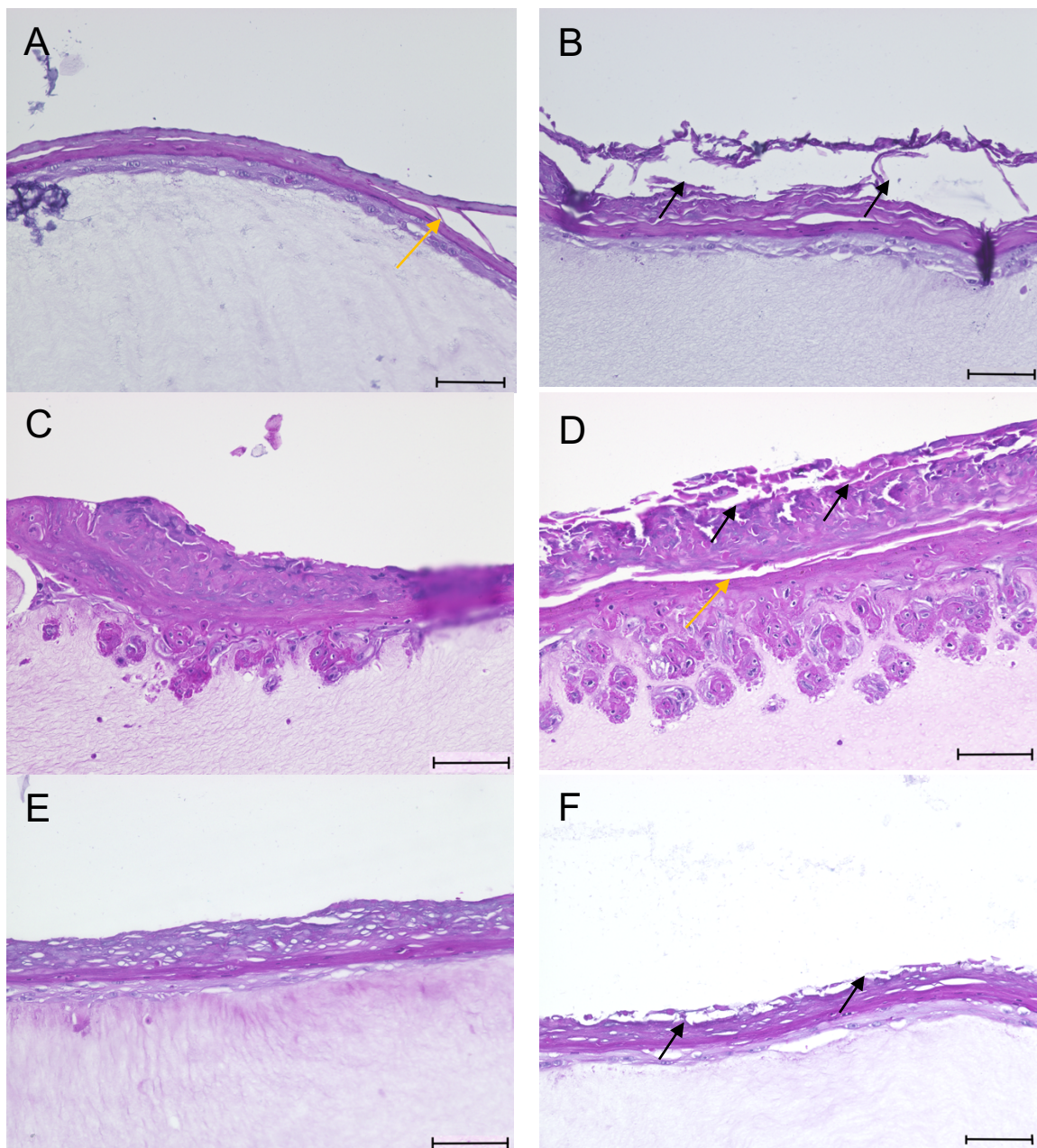
Durch die Applikation auf die 3D Haut (**Abbildung 38 E/F**) kam es zu einem deutlichen rot-fluoreszierenden Signal im Stratum corneum der Epidermis sowie den darunter liegenden Schichten. Zudem ist ein Zerreißen der Epidermis zu sehen, es kommt zu einem Adhäsionsverlust der Keratinozyten (**Abbildung 38 F**) und es sind Zellbestandteile apikal, außerhalb der Epidermis zu sehen. Auch dies entspricht nicht der charakteristischen Spaltbildung.

Durch die Applikation mittels Injektion von PX43 in die 3D Haut (**Abbildung 38 G/H**), ist ein rot-fluoreszierendes Signal im Stratum basale der Epidermis und vereinzelt, direkt darüber liegenden Zellen zu erkennen (**Abbildung 38 H**). Zusätzlich ist im Stratum corneum eine leichte Fluoreszenz zu erkennen (**Abbildung 38 G/H**) und es sind auch hier einzelne Zellbestandteile apikal der Epidermis zu sehen. Es kam nicht zu der charakteristischen Spaltbildung, wie es im HSOC zu sehen ist, aber zu einem leichten Adhäsionsverlust in der oberen Zellschicht.

### 5.3 PX43 verursacht ein Lösen der Zelladhäsion in der 3D Haut

Um die Reaktion nach Applikation von PX43 in der 3D Haut beurteilen zu können, wurde mithilfe der HE-Färbung die histologische Auswertung durchgeführt.

Bei jedem Durchgang wurde je Applikationsweg (**siehe 4.2.2**) eine HE-Färbung von der Positiv- (PX43) und Negativkontrolle (IVIG) gemacht. Alle entstandenen Bilder der 3D Häute wurden auf Abweichungen von der jeweiligen Negativkontrolle untersucht. Im Folgenden (**Abbildung 39**) wurden die jeweiligen Veränderungen dargestellt.



**Abbildung 39. Hämatoxylin-Eosin Färbung von 3D Haut.**

Nach Applikation von 20  $\mu$ l IVIG-Lösung **A** ins Medium, **C** auf die 3D Haut, **E** mittels Injektion in die 3D Haut und nach Applikation von 20  $\mu$ l PX43-Lösung **B** ins Medium, **D** auf die 3D Haut, **F** mittels Injektion in die 3D Haut. Pfeilmarkierung (schwarz) auf gelöster Zelladhäsion, (gelb) auf Artefakt. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m

Bei der Applikation von IVIG über das Medium (**Abbildung 39 A**) sieht man ein diskontinuierliches Zerreißen der oberen Schicht der Epidermis, dieses Bild ist gewählt worden, da es ein typisches Artefakt des Modells zeigt. Dieses ist am ehesten auf den Schneideprozess des Paraffinblocks zurückzuführen. Das Artefakt entsteht auch in NHS.

Bei der Applikation von PX43 über das Medium (**Abbildung 39 B**) sieht man ein Zerreißen der oberen Zellschicht der Epidermis. Die zerrissene Zellschicht ist nicht kontinuierlich. Die Epidermis ist in viele einzelne Fragmente geteilt worden.

Bei der Applikation von IVIG auf die 3D Haut (**Abbildung 39 C**) ist lediglich ein kleiner Einriss in der Epidermis zu erkennen.

Bei der Applikation von PX43 auf die 3D Haut (**Abbildung 39 D**) ist eine suprabasale Spaltbildung zu erkennen. Des Weiteren ist im Stratum granulosum, Stratum corneum der Epidermis ein Ablösen der obersten Zellschicht zu erkennen sowie einzelne Einrisse in die darunter liegenden Zellschichten. Auch hier ist das typische Artefakt zu sehen, welches häufig durch den Schneideprozess ausgelöst wird.

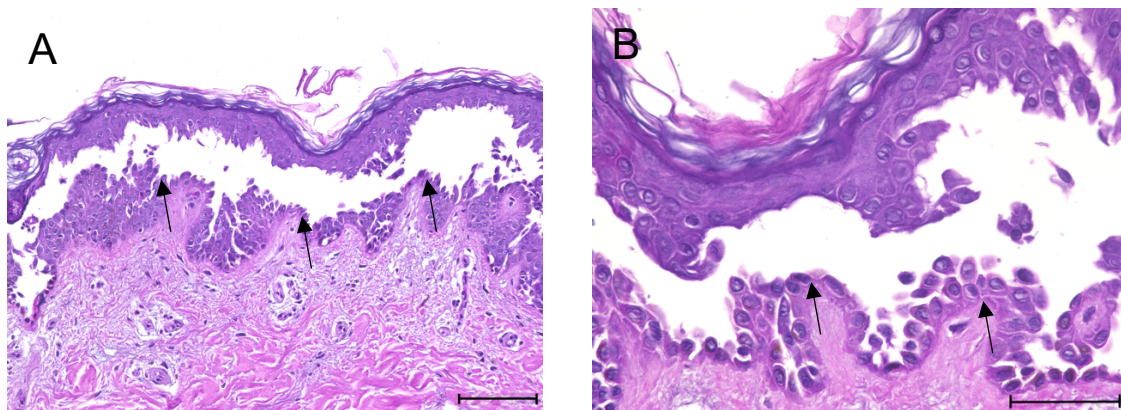
Bei der Applikation von IVIG mittels Injektion in die 3D Haut (**Abbildung 39 E**) ist eine leichte Auflockerung der Epidermis zu sehen. Es sind kleine weiße Areale innerhalb der Epidermis zu erkennen.

Bei der Applikation von PX43 mittels Injektion in die 3D Haut (**Abbildung 39 F**) sind weiße Einschlüsse in der 3D Haut zu erkennen. Zudem ist in der oberen Schicht der Epidermis ein Lösen einer Zellschicht, ohne kompletten Adhäsionsverlust der einzelnen Keratinozyten, zu sehen.

Als gemeinsames Resultat nach Applikation von PX43 in die 3D Haut ist zu nennen, dass es zu einem Adhäsionsverlust innerhalb der Epidermis kam, wobei eher die oberen Schichten der Epidermis betroffen waren. Zusätzlich kam es teilweise (**Abbildung 39 B/D**) zu einem kompletten Herauslösen der einzelnen Keratinozyten aus dem Zellverband der Epidermis.

#### 5.4 Unterschiede der Auswirkung von PX43 in 3D Haut zum humanen Hautorgankulturmodell für Pemphigus vulgaris

Zur Analyse der Unterschiede, der durch PX43 ausgelösten Spaltbildung im HSOC für PV und der Reaktion der 3D Haut, wurden die Resultate der HE-Färbung aus **Abbildung 40** mit denen aus **Abbildung 39** verglichen.



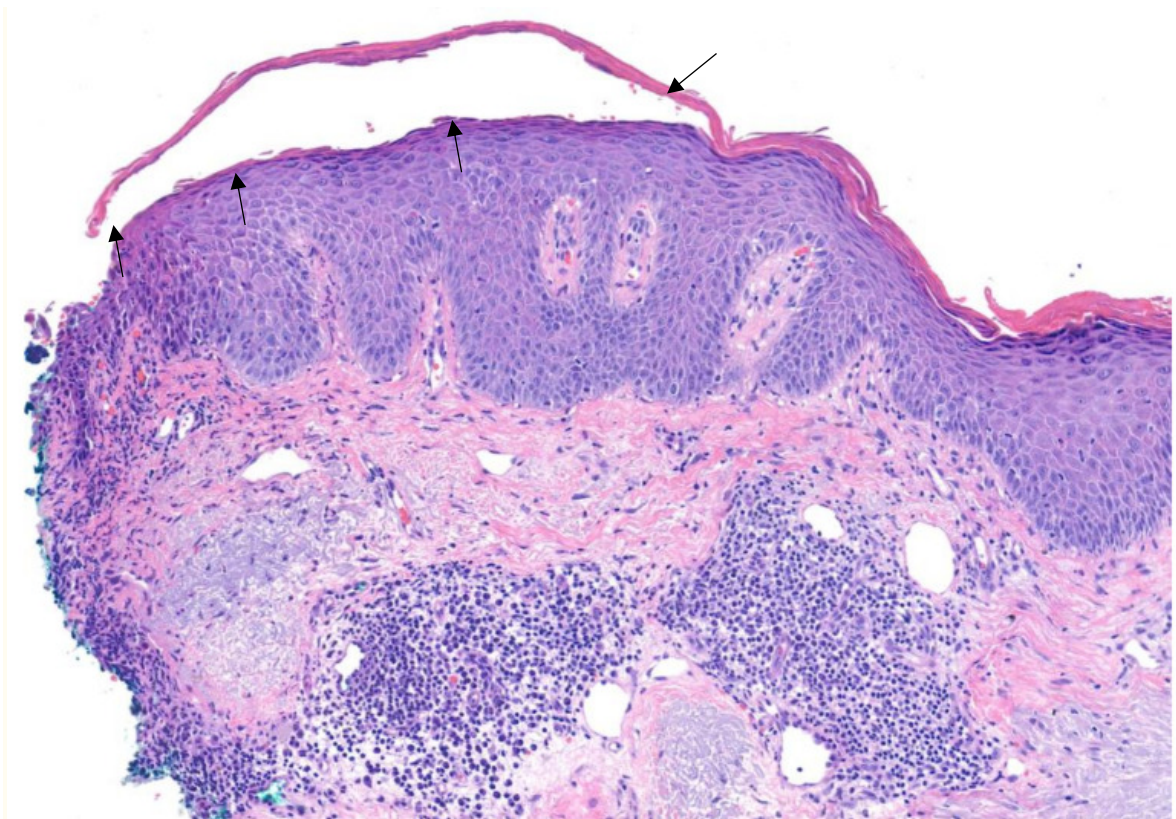
**Abbildung 40. Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Hautorgankulturmodells.**  
In welches 20  $\mu$ L PX43 injiziert wurde. Pfeilmarkierung auf Spaltbildung.  
Maßstabsbalken **A** 100  $\mu$ m, **B** 50  $\mu$ m

In der HE-Färbung des HSOC für PV ist eine deutliche intraepidermale Spaltbildung zu erkennen. Der entstandene Spalt erstreckt sich über die gesamte Breite des Bildes (**Abbildung 40 A**). Die basale Zellreihe persistiert, darüber ist die entstandene Blase als weißer Spalt zu sehen, dann folgt das Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum als kontinuierliches Blasendach (**Abbildung 40 B**).

Im Vergleich dazu sind die Resultate der 3D Haut nach Applikation von PX43 nicht so eindeutig (**Abbildung 39 B/D/F**). Es kommt nicht zur klassischen intraepidermalen Spaltbildung.

## 5.5 Unterschiede der Auswirkung von PX43 in 3D Haut zum Pemphigus foliaceus

Nachfolgend werden die Ergebnisse der HE-Färbung der 3D Haut nach Applikation von PX43 (**Abbildung 39**) mit einer HE-Färbung einer Hautprobe eines Patienten mit PF (Malik *et al.*, 2021) verglichen.



**Abbildung 41. Hämatoxylin-Eosin Färbung eines Patienten mit Pemphigus foliaceus.**

Akantholyse in der oberen Epidermis, angrenzend an das Stratum granulosum, was zu einer Spaltbildung unter dem Stratum corneum führt. Aus Malik *et. al.* (2021) modifiziert. Pfeilmarkierung auf Spaltbildung.

Beim PF kommt es durch Autoantikörper gegen DSG 1 (siehe 2.4.2) zu einer Spaltbildung in den oberen Schichten der Epidermis (**Abbildung 41**). Zu sehen ist dies als Blase unter dem Stratum corneum, welches sich als zusammenhängende Schicht von der Epidermis abhebt (**Abbildung 41 Pfeilmarkierung**).

In der 3D Haut, in welche PX43 appliziert wurde, haben wir Ähnlichkeit in Lokalisation der Spaltbildung und auch in der Dicke der Zellschicht über dem Spalt sehen können (**Abbildung 39**). Dennoch besteht ein Unterschied darin, dass die einzelnen Keratinozyten des Stratum corneum (**Abbildung 41**) weiterhin zusammenhängen. Es kommt nicht zum Herauslösen von einzelnen Zellen, wie wir es bei der 3D Haut gesehen haben.

## 6 Diskussion

Im Folgenden werden der Vergleich von 3D Haut und NHS, das humane 3D Hautmodell für Pemphigus, Vorzüge und Nachteile des 3D Hautmodells für Pemphigus, mögliche Fehler des Versuchsaufbaus/ -ablaufs sowie der Ausblick diskutiert. Abschließend ist das Fazit aufgeführt.

### 6.1 Der Vergleich von 3D Haut und normaler humaner Haut

Um eine endgültige Aussage über die Vergleichbarkeit zu machen, müssen die einzelnen Ergebnisse der Forschungsarbeit und ihre Bedeutung diskutiert werden. Wie in **5.1.1** schon ausgeführt ist die Vergleichbarkeit von 3D Haut und NHS gegeben, dennoch gibt es relevante Unterschiede.

Für die strukturelle Analyse und die Charakterisierung werden die HE-Färbung und die IIF-Färbungen genutzt, so wie es auch bereits in anderen Forschungsgruppen durchgeführt wurde (Bataillon *et al.*, 2019; Chau *et al.*, 2013)

Die HE-Färbung dient als histologische Übersichtsfärbung, anhand dieser wird die strukturelle Analyse durchgeführt. (Chan, 2014).

Wie in **5.1.1** beschrieben ähneln sich die Struktur der Epidermis der 3D Haut und der NHS stark. Es ist die gleiche Schichtung mit Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum zu erkennen (**Abbildung 30**). Ursächlich für eine schmalere Epidermis der 3D Haut, könnte sein, dass zu wenig vitale Keratinozyten auf die Dermis gesät wurden. Zusätzlich kann die deutlich hellere Farbe der Epidermis beobachtet werden (**Abbildung 30 C/D**). Um daraus Rückschlüsse zu ziehen, bedarf es der Zusammenschau mit den Ergebnissen der IIF-Färbungen. In den sich ausbildenden Reteleisten, ist hingegen eine dunklere, der NHS ähnelnde Farbe zu erkennen. Die Ausbildung des deutlich dickeren Stratum corneums spricht für bereits viele in die Apoptose übergegangene Keratinozyten (Murphrey *et al.*, 2024). Dies ist potenziell durch zu stark differenzierte Keratinozyten bei der Aussaat zu erklären.

Die dermoepidermale Übergangszone lässt sich aufgrund der gescheiterten Färbungen von BP 180 und BP 230 leider nur bedingt beurteilen. Es ist ein Zusammenhalt der Epidermis und der Dermis in den HE-Färbungen zu beobachten. Dies spricht für eine Ausprägung der Hemidesmosomen des Stratum basale und

für eine vorhandene Basalmembran, welche beispielsweise dem mechanischen Stress des Schneidens getrotzt haben (Rousselle *et al.*, 2022).

Auch die Dermis der 3D Haut kann anhand der HE-Färbung mit der Dermis der NHS verglichen werden (**Abbildung 30**). Wie in **5.1.1** beschrieben, entspricht die Dermis der 3D Haut nicht der Dermis der NHS. Dies stellt eine Limitation des Modells dar, weil Erkenntnisse aus der 3D Haut nicht auf die humane Dermis übertragen werden können. Die strukturelle Komplexität der humanen Dermis ist nicht gegeben (Haydont *et al.*, 2019). Es ist keine Einteilung in papilläre und retikuläre Dermis möglich und es fehlen wichtige Strukturen wie Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern und Drüsen (Goebeler & Hamm, 2017). Es sind keine dermalen Fibroblasten angeschnitten worden (**Abbildung 30**), was sich damit erklären ließe, dass zu wenig vitale Fibroblasten in der künstlichen Dermis verwendet worden sind. Auch in den IIF-Färbungen sind keine DAPI-Signale in der Dermis zu sehen, was gegen ausreichend vitale DNA von Fibroblasten in der Dermis der 3D Haut spricht (Kapuscinski, 1995). Daraus lässt sich ableiten, dass wichtige physiologische Interaktionen zwischen Fibroblasten und Keratinozyten, welche die Integrität der NHS beeinflussen, in der 3D Haut fehlen (Werner *et al.*, 2007).

Für die Erforschung der Dermis sind andere Modelle geeigneter, welche eine strukturelle Ähnlichkeit der Dermis erzielen (Bataillon *et al.*, 2019; Pourchet *et al.*, 2017).

Bezüglich der Dermis unseres 3D Hautmodells ist an dieser Stelle einzubringen, dass das genutzte 3D Hautmodell für unsere Forschungszwecke einen epidermalen Fokus hat und somit weiter genutzt werden kann. Nichtsdestotrotz ist die Modifikation an der Dermis dieses 3D Hautmodells notwendig und geplant (**siehe 6.5**).

Zur weiteren Charakterisierung der Epidermis wurden die IIF-Färbungen durchgeführt und evaluiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus **5.1.2** diskutiert.

Die 3D Haut unterscheidet sich im Verteilungsmuster der DSG von NHS. In NHS kann man eine Verteilung von DSG 1 in den oberen Schichten der Epidermis und damit in den weiter differenzierten Keratinozyten nachweisen. In den weniger differenzierten Keratinozyten der basalen Zellschichten der Epidermis zeigt sich DSG 3 (Alshami *et al.*, 2022).

In der 3D Haut können wir (**Abbildung 31/32**) ein Expressionsmuster von DSG 1 und DSG 3 in den basalen Schichten der Epidermis sehen. Die Expression der 3D Haut von DSG 3 stimmt mit der Expression der NHS überein (Amagai, 1999; Schmidt *et al.*, 2019). Die Ausprägung von DSG 1 ist insgesamt deutlich schwächer als in NHS. Dies könnte die zuvor genannte Hypothese unterstreichen, dass zu wenig vitale Keratinozyten intraepidermal vorhanden sind, welche DSG 1 ausbilden können, dennoch wird DSG 1 physiologischerweise nicht in den basalen Schichten exprimiert, was für eine fortgeschrittene Differenzierung spricht. DSG 1 dient nicht nur der Zelladhäsion, sondern auch als Zeichen der epidermalen Differenzierung (Getsios *et al.*, 2009).

Weitere Anzeichen für eine deutliche Differenzierung der suprabasalen Keratinozyten der 3D Haut konnten wir durch eine Expression von Filaggrin feststellen. Dieses epidermale Markerprotein markiert die verhornte Zellhülle und kommt physiologischerweise in stark ausdifferenzierten Keratinozyten vor (Brown & Irwin McLean, 2012; Hooper & Eggink, 2022). Die 3D Haut exprimiert Filaggrin in allen suprabasalen Schichten der Epidermis (**Abbildung 33**).

Loricrin ist wie Filaggrin ein Markerprotein für weit fortgeschritten differenzierte Keratinozyten. In der NHS wird dies im Stratum corneum exprimiert (Hohl *et al.*, 1991; Ishitsuka & Roop, 2020), wohingegen Loricrin in der 3D Haut als streifenartige Fluoreszenz oberhalb des Stratum basale exprimiert wird (**Abbildung 34**). Auch dies bestärkt die Hypothese, der bereits zu weit fortgeschritten Differenzierung Keratinozyten in den suprabasalen Schichten der Epidermis der 3D Haut.

CK 6 markiert in NHS ein Alarmin, welches eine Proliferations-, Zelladhäsions- und Migrationssteigerung in Wunden verursacht (Zhang *et al.*, 2019).

In intakter NHS wird CK 6 nicht exprimiert, in der 3D Haut hingegen schon (**Abbildung 35**). Dies spricht für eine starke epidermale Proliferation (Janson *et al.*, 2013), was durch den gesetzten Proliferations-, Zelladhäsions- und Migrationsreiz durch die Aussaat der Keratinozyten erklärbar ist. Dieses Verteilungsmuster von CK 6 wird auch in anderen Forschungsarbeiten zu Hautäquivalenzmodellen beschrieben (Van Gele *et al.*, 2011).

CK 10 ist ein wichtiges Markerprotein der suprabasalen Schichten. Es markiert die terminale Differenzierung der Keratinozyten der NHS. Die Expressionsmuster der 3D Haut und der NHS stimmen überein, welches die Keratinisierung der Keratinozyten zeigt (**Abbildung 36**). In der Literatur zeigen sich ähnliche Ergebnisse für Forschungsarbeiten (Bataillon *et al.*, 2019; Muhsen *et al.*, 2019)

Das Markerprotein CK 15 kann im Stratum basale der NHS nachgewiesen werden und markiert proliferierende Stammzellen (Bose *et al.*, 2013). Die Ausprägung in der 3D Haut ist an der gleichen Lokalisation, jedoch ist die Intensität der Expression deutlich geringer (**Abbildung 37**). Dies lässt den Rückschluss auf zu wenige nicht differenzierte, proliferative Keratinozyten zu.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse der Charakterisierung durch HE- und IIF-Färbungen der 3D Haut, kann diese die NHS imitieren. Jedoch scheint die Epidermis aus zu stark differenzierten Keratinozyten und die Dermis aus einer zu geringen Zellzahl von Fibroblasten zu bestehen.

Da für ein humanes 3D Hautmodell humane, *ex vivo* Zellen genutzt werden, ist der Einfluss der Spender\*in nicht außer Acht zu lassen. Optimalerweise sollten für ein 3D Hautmodell gesunde, Zellen genutzt werden, wobei jüngere Spender\*innen proliferativ-aktivere Keratinozyten besitzen (Czyz *et al.*, 2023). Da wir immer Zellen derselben Spenderperson genutzt haben, kann dazu keine Aussage getroffen werden.

## 6.2 Das humane 3D Hautmodell für Pemphigus

Damit das humane, *in vitro* 3D Hautmodell für Pemphigus die Dermatose imitieren kann, ist es wichtig die grundlegenden pathophysiologischen Zustände der Erkrankung in dem Modell zu etablieren (Hu *et al.*, 1978; Jeffes *et al.*, 1984). Dazu müssen Zielantigene, die Autoantikörper bzw. das imitierende scFv und die Bindung beider innerhalb des Modells nachgewiesen werden. Zudem sollte ein vergleichbares histologisches Ergebnis erzielt werden. Es gibt eine Auswahl an Modelltypen, welche zur Erforschung des Pemphigus dienen, dazu zählen das HSOC, die *monolayer*-Keratinocyten-Kultur und die *in vivo* Mausversuche (Lotti *et al.*, 2022). Das HSOC für PV wurde, aufgrund seiner Dreidimensionalität, der Verwendung humaner Zellen und der guten, reproduzierbaren Reaktion des Modells auf PX43 (Burmester *et al.*, 2019; Hartmann *et al.*, 2023; Lotti *et al.*, 2022), als Referenz zum humanen 3D Hautmodell für Pemphigus genutzt. Anhand von Zwischenschritten wird das humane 3D Hautmodell für Pemphigus im Folgenden diskutiert.

Die wichtigsten Zielantigene von Pemphigus-Erkrankungen sind DSG 1 und DSG 3 (Schmidt *et al.*, 2019). Diese werden in der 3D Haut in der basalen Schicht der Epidermis überlappend exprimiert, wobei DSG 3 zusätzlich schwach in der apikalen Zellschicht (**Abbildung 31/32**) nachgewiesen werden kann. Der zweite Schritt ist, dass die Zielantigene durch die Antikörper oder das imitierende scFv PX43 gebunden werden (Burmester *et al.*, 2019). Das Binden von PX43 nach Applikation in der 3D Haut konnten wir durch die DIF von PX43 beweisen (**Abbildung 38**). Das fluoreszierende Muster von PX43 in der 3D Haut ist am stärksten in den basalen Schichten der Epidermis zu sehen. Dies stimmt mit der Lokalisation der exprimierten DSG 1 und DSG 3 der 3D Haut überein (**Abbildung 31/32**).

Im Gegensatz zur NHS wird in den basalen Schichten der 3D Haut, dort wo PX43 im HSOC für PV die Spaltbildung induziert (Burmester *et al.*, 2019), auch DSG 1 exprimiert. Dies bewirkt, dass PX43 in der Epidermis der 3D Haut keine klassische suprabasale Akantholyse induzieren kann, da die Zelladhäsion über DSG 1 und DSG 3 funktioniert. Anhand der Desmoglein Kompensations-Theorie nach Stanley und Amagai von 1999 kann das Ausbleiben der Akantholyse in den basalen Schichten der Epidermis erklärt werden. Sofern in einer Zelle DSG 1 und DSG 3 exprimiert werden, wird keine Spaltbildung durch bindende Antikörper induziert (Amagai, 1999; Hammers & Stanley, 2016; Mahoney *et al.*, 1999). Dass dies der

Grund für das Ausbleiben der suprabasalen Spaltbildung ist, ist unsere Arbeitshypothese und sollte zukünftig anhand weiterer Modelle mit weniger differenzierten Keratinozyten reevaluiert werden. Der Adhäsionsverlust zwischen den Keratinozyten insbesondere im Stratum corneum (**Abbildung 39**), als unser Korrelat zur intraepidermalen Akantholyse, kann auf die schwache alleinige Expression von DSG 3 (**Abbildung 32**) zurückgeführt werden (Mahoney *et al.*, 1999). Dort ist PX43 in der Lage die Zelladhäsion zu zerstören, wodurch es zum apikalen intraepidermalen Kontaktverlust der Keratinozyten kommt.

Davon abzugrenzen ist das Bindeverhalten von PX43 bei Applikation auf die 3D Haut, dort bindet es in allen suprabasalen Schichten der Epidermis (**Abbildung 38 E/F**). Erklärbar wäre, dass eine Bindung an das DSG 3 in den apikalen Zellschichten stattfindet. Dort wo ausschließlich DSG 3 (**Abbildung 32**) exprimiert wird, wird die Spaltbildung induziert, und es kommt zum Adhäsionsverlust innerhalb der Epidermis (**Abbildung 38/39**). Grund dafür, dass die suprabasalen Zellschichten gebunden werden, könnte sein, dass die Diffusionsbarriere, welche unter anderem durch das Stratum corneum und *Tight junctions* gebildet wird, nicht intakt ist (Bäsler *et al.*, 2016; G. K. Menon *et al.*, 2012). Nur so kann PX43 intraepidermal binden.

Neben dem Binden der Zielstruktur ist es wichtig für das Modell, dass die Auswirkung des Antikörpers bzw. des scFv die histologischen Besonderheiten der Dermatose in dem Modell imitieren kann. Dies ist nur geringfügig gegeben, denn der Adhäsionsverlust in der 3D Haut (**Abbildung 39 B/D/F**) stimmt vermutlich, aufgrund des anderen Verteilungsmusters der DSG, nur teilweise mit der Spaltbildung einer läsionalen Histologie einer Pemphigus-Patient\*in bzw. der Histologie des HSOC für PV überein (Burmester *et al.*, 2019; Malik *et al.*, 2021). Dennoch kann man einen intraepidermalen Adhäsionsverlust in den apikalen Schichten der Epidermis der 3D Haut sehen, welcher der Spaltbildung beim PF ähnelt (**Abbildung 41**).

Um die optimale Applikationsweise in die 3D Haut zu finden, ist es hilfreich zu evaluieren, welche Methode praktikabel ist und konsistente Ergebnisse erzielt. Das zu erreichende Ergebnis, ist das Binden von PX43 in den basalen Zellschichten, da dort DSG 1 und DSG 3 exprimiert werden. Das war bei der Zugabe ins Medium und bei der Injektion gegeben (**Abbildung 38**). Aufgrund der besseren Durchführbarkeit

stellt aktuell die Zugabe ins Medium die optimale, uns bekannte Applikationsweise dar (**siehe 6.4**).

Die Auswirkungen von PX43 in der 3D Haut (**Abbildung 39**) unterscheiden sich von den Ergebnissen des HSOC für PV (**siehe 5.4**). Das HSOC für PV liefert verlässliche, reproduzierbare Ergebnisse, welche den histologischen Eigenschaften des PV entsprechen (Burmester *et al.*, 2019; Hartmann *et al.*, 2023). Aufgrund des simplen experimentellen Aufbaus und der Beständigkeit der Ergebnisse, sollte an dieser Stelle festgehalten werden, dass das HSOC für PV aktuell die bessere Alternative darstellt als das humane 3D Hautmodell für Pemphigus. In **6.3** werden die Vorzüge und Nachteile des 3D Hautmodells für Pemphigus diskutiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Etablierung eines humanen 3D Hautmodells für Pemphigus erfolgreich war. Zwar gibt es Abweichungen von der 3D Haut zur NHS und auch von dem 3D Hautmodell für Pemphigus zum HSOC für PV bzw. zur Pemphigus Histologie, dennoch können mit dem Modell bekannte Theorien bestärkt werden und ein tieferes Verständnis der Dermatose erlangt werden.

### 6.3 Vorzüge und Nachteile des 3D Hautmodells für Pemphigus

Das humane 3D Hautmodell ist ein interessantes Modell, um ein tieferes Verständnis für die humane Haut und Pemphigus-Erkrankungen zu erlangen. Dennoch hat das 3D Hautmodell für Pemphigus Vor- und Nachteile, welche im Folgenden erläutert werden.

Da es ein etabliertes Modell in unserer Arbeitsgruppe ist, war ich nach Anleitung eigenständig in der Lage die Herstellung durchzuführen. Sofern genug Zellen passagiert und kryokonserviert worden sind, war es jederzeit möglich neue Modelle zu beginnen und unabhängig von Hautspenden zu forschen. Die Vorteile dessen wurden insbesondere in der Sars-Corona-Virus-2 Pandemie deutlich, da in der Zeit viele der elektiven plastischen Operationen ausgefallen sind (Giunta *et al.*, 2020) und somit auch die davon abhängigen Versuche.

Nichtsdestotrotz war der zeitliche Aufwand dieses Modells enorm. Von der Isolation der Zellen bis zur Fertigstellung der Haut dauerte es, aufgrund von Variationen der Dauer der Kultivierung, durchschnittlich 21 Tage (**siehe 4**). Im Vergleich dazu, dauert der Versuchsaufbau des HSOC für PV ca. 26 h. Im Anschluss folgten das Schneiden, Färben und Auswerten der Ergebnisse. Die Methodik ist anspruchsvoll und ein äußerst sorgfältiges Vorgehen war bei jedem Arbeitsschritt unabdingbar.

Positiv hervorzuheben ist, dass nicht mehr benötigte Hautstücke genutzt wurden, was zum einen ressourcenschonend, innovativ und zum anderen ethisch gut vertretbar (**siehe 9.2**) ist.

Aufgrund des Versuchsaufbaus fehlen viele residente Zellpopulationen, Immunzellen, Adipozyten und deren Einfluss auf die Physiologie im 3D Hautmodell (Pupovac *et al.*, 2018; Randall *et al.*, 2018). Dies stellt gleichzeitig einen Vorteil und einen Nachteil des Modells dar, da somit der Fokus auf den wichtigsten Komponenten der Pathophysiologie des Pemphigus liegen kann, aber weitere Einflüsse auf die Erkrankung nicht beachtet werden können (Hosseini *et al.*, 2022; Pourchet *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2019).

Nachteilig ist, dass die Mengen an benötigten Material, Medien und Lösungen (**siehe 3.4**) hingegen deutlich größer sind als beim Versuchsaufbau des HSOC für PV (Burmester *et al.*, 2019).

Sehr günstig ist, dass durch den Aufbau des 3D Hautmodells (**siehe 4.2.2**) es methodisch sehr einfach ist, Substanzen, insbesondere ins Medium, zuzuführen, so

können zukünftig weitere Modelle für andere Krankheitsbilder etabliert werden (Ahn *et al.*, 2023).

Eine weitere Problematik stellt die Filigranität der 3D Häute (**Abbildung 15**) dar, es ist möglich die Häute bei der Ernte zu beschädigen, weshalb es sehr viel „Fingerspitzengefühl“ bedarf.

Der größte Nachteil des Modells ist, dass die 3D Häute von Modell zu Modell stark variieren (**Abbildung 39**). Es kam zum Kontaktverlust von Epidermis und Dermis, es gab Unterschiede bezüglich der Differenzierung und Schichtung der Epidermis und nur teilweise wurden Reteleisten ausgebildet (**Abbildung 39**). Das bedeutet, dass das 3D Hautmodell inkonsistente Ergebnisse schafft. Dies war der Fall, obwohl immer die Zellen derselben Hautspenderperson benutzt wurden und es keine Abweichung im Versuchsablauf gab. Die Instabilität in der Struktur der 3D Häute erschwert die Analyse der entstandenen Ergebnisse des 3D Hautmodells für Pemphigus. Jedoch weist auch das HSOC für PV individuelle, starke Variationen vor allem zwischen den verschiedenen Spender\*innen auf.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das humane 3D Hautmodell für Pemphigus einen komplexen Herstellungsvorgang hat, aber man unabhängig arbeiten und so neue 3D Hautmodelle erschaffen kann.

## 6.4 Mögliche Fehler des Versuchsaufbaus/-ablaufs

Aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus sind viele Zwischenschritte bis zur Fertigstellung des humanen 3D Hautmodells für Pemphigus notwendig. Dies bietet zum einen die Möglichkeit differenzierte Ergebnisse zu generieren, erhöht jedoch auch die Anfälligkeit für mögliche Fehler. Diese sind im Folgenden erläutert.

Aufgrund der Charakterisierung der 3D Haut gehen wir davon aus, dass die Keratinozyten zu differenziert sind und deshalb nicht exakt das Expressionsmuster der Markerproteine imitieren können (**siehe 5.1.2; 6.1**). Dies hat einen großen Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse und sollte in Zukunft durch die Wahl von jüngeren Spenderpersonen oder die Nutzung von infantilen Vorhäuten vermieden werden (Czyz *et al.*, 2023; Mcheik *et al.*, 2015).

Ein möglicher Faktor für die zu weit fortgeschrittene Differenzierung der Keratinozyten könnte die festgelegte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im SKDM der 3D Häute sein, da  $\text{Ca}^{2+}$  maßgeblich an der Differenzierung der Keratinozyten beteiligt ist (Denning *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 2002). Dagegen spricht, dass bereits physiologisch differenzierte 3D Haut mithilfe desselben Protokolls hergestellt wurde (Czyz *et al.*, 2023).

Wir entschieden uns für die Nutzung von Zellen derselben Spenderperson. Dies sollte uns ermöglichen, die beste Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Unklar ist, wie die Zellen der anderen Spender\*innen innerhalb der des humanen 3D Hautmodells auf PX43 reagieren. Deshalb sollten die Applikationen von PX43 in die 3D Haut mit Zellen anderer Hautspender\*innen wiederholt werden.

In Bezug auf die Applikation von PX43 auf die 3D Haut, ist zu bedenken, dass durch die mechanische Barriere des Stratum corneums, welche durch *Tight junctions* ergänzt wird (Bäsler *et al.*, 2016), die Diffusion physiologischerweise nicht möglich ist. Deshalb sollte in Erwägung gezogen werden, dass die Wirkung von PX43 bei Applikation auf die 3D Haut eine zytotoxische Komponente haben könnte, da es viele Stoffe gibt, auf die NHS reagiert (Hashempour *et al.*, 2019).

Bei der Injektion der Lösungen in die 3D Haut ist es zu Artefakten gekommen, da die 3D Haut im *Insert* lag (**Abbildung 16**) und die Injektion nur von apikal möglich war. Zudem ist es herausfordernd exakt zwischen Epidermis und Dermis zu injizieren, so wie es beim HSOC für PV standardisiert worden ist. Ob die richtige Lokalisation getroffen wurde, konnte nur mithilfe der DIF (**Abbildung 38**) beurteilt werden.

Schneideartefakte sind häufige Fehler (**Abbildung 39A**), und könnten mit geringer Wahrscheinlichkeit das Lösen der intraepidermalen Zelladhäsion in der Positivkontrolle ausgelöst haben. Dass wir das Lösen des Zellverbandes in dieser Weise nicht in den IVIG-Negativkontrollen beobachten konnten, spricht eher dagegen (**Abbildung 39**).

Die Auswertung erfolgte durch die Analyse der Bilder, da dies zunächst eine Etablierungsarbeit darstellt. Das ist eine etablierte Methodik zur Charakterisierung der künstlichen Häutäquivalenzmodelle (Bataillon *et al.*, 2019), wobei immer bedacht werden sollte, dass Bias die erzielten Ergebnisse verzerren könnten (Mendoza *et al.*, 2021). Zur Analyse der gewonnenen Ergebnisse nutzten wir deshalb die Erfahrung und Expertise des Dermatopathologen PD Dr. Christian Rose.

Dass die Färbungen von BP 180 und BP 230 nicht funktioniert haben, kann mehrere Ursachen haben, denn die scFv die benutzt wurden, waren wahrscheinlich nicht mehr funktionsfähig, da die Färbung auch auf NHS wiederholt nicht möglich war. NHS exprimiert normalerweise BP 180 und BP 230 (Emtenani *et al.*, 2019).

Die Auswertung der Ki-67/ TUNEL-Färbung der 3D Haut war aufgrund von überdeckenden DAPI-Fäden mehrfach nicht möglich. In NHS war die Färbung erfolgreich. Aufgrund dessen bedarf weiterer Wiederholungen dieser Färbung und einer Überarbeitung des Versuchsablauf in nachfolgenden Projekten.

## 6.5 Ausblick

Das humane 3D Hautmodell für Pemphigus ist ein vielversprechendes Modell und sollte weiter im Fokus der zukünftigen Forschung stehen.

Vorab ist zu sagen, dass ein wachsender Bedarf an humanen Hautmodellen besteht, da aufgrund der ethischen Forderung Tierversuche zu reduzieren, zu ersetzen und das Tierleid zu minimieren (Díaz *et al.*, 2021), Alternativen benötigt werden (Neil *et al.*, 2020).

Nach optimierter Herstellung der 3D Häute durch den Gebrauch von weniger differenzierten Keratinozyten, kann die Testung von PX43 in Kombination mit pharmakologischen Substanzen, welche im HSOC für PV die Spaltbildung durch PX43 inhibieren, erfolgen. Dazu zählen Selumetinib, BIRB 796, GW441756 and A66 (Burmester *et al.*, 2020).

Das Lösen der Zelladhäsion innerhalb der oberen Schichten der Epidermis nach PX43 Applikation zur 3D Haut ähnelt teilweise dem PF (**siehe 5.5**) (James *et al.*, 2011), weshalb wir die Applikation eines scFv für PF, welches ausschließlich DSG 1 bindet, planen. Eine weitere Substanz, welche der 3D Haut zugefügt werden könnte, wäre das exfoliative Toxin der Staphylokokken, welches DSG 1 bindet und einen weiteren Forschungsbereich der bullösen infektiösen Erkrankungen abbildet (Amagai *et al.*, 2000).

Zudem könnte eine Variation der verwendeten Spenderzellen hilfreich sein. Aktuell wird geplant Vorhäute von Jungen zu nutzen, welche eine Zirkumzision erhalten haben. Vorhäute werden bereits für unterschiedliche epidermale 3D Rekonstruktionen verwendet und erzielen gute Forschungsergebnisse (Mcheik *et al.*, 2015). Wobei die abweichende Physiologie der Vorhaut bezüglich Umwelteinflüssen bedacht werden sollte und nicht 100% mit der Haut am gesamten verbleibenden Integument verglichen werden kann.

Auch ist denkbar größere Zellmengen zu verwenden, um mehr Keratinozyten und Fibroblasten einzusetzen, was für einen verbesserten Aufbau und optimalere Struktur der Epidermis und Dermis sorgen könnte (**6.1**).

Zukünftig sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen der Desmosomen in der 3D Haut erfolgen, sodass die Struktur und Anordnung reevaluiert werden kann (Egu *et al.*, 2022; Radine *et al.*, 2022).

Zusätzlich ist geplant die PAS-Färbung durchzuführen, mithilfe dieser können Glykosaminoglykane in der Basalmembran der 3D Haut visualisiert werden und somit kann die Ausprägung von BP180 und BP 230 geprüft werden (Kain, 2017).

Abschließend sollte die Pilotstudie von Paul W. Kunth mit der Serentestung von Patient\*innen mit PV fortgeführt werden und durch Seren von Patient\*innen mit PF ergänzt werden. Die hohe Sensitivität und die hohe Spezifität sind sehr erfolgsversprechend und könnten in Zukunft die Abhängigkeit von Affenösophagus reduzieren.

## 6.6 Fazit

Im Folgenden wird auf die in **2.7** aufgelisteten Ziele und Fragestellungen meines Projekts Bezug genommen.

### 1. Die Herstellung eines 3D Hautmodells war erfolgreich.

- Die 3D Haut ist teilweise bezüglich des Aufbaus, der Struktur und der Markerproteine mit der NHS vergleichbar.

### 2. Verbesserung und Nutzbarmachung des 3D Hautmodells

- Als Verbesserung ist die Ausbildung von Reteleisten zu nennen.
- Das Modell wurde nutzbar gemacht, indem auf unterschiedliche Weise PX43 appliziert wurde.
- Die Applikation in das Medium der 3D Haut, auf die 3D Haut und durch Injektion sind möglich.

### 3. Erschaffung eines 3D Hautmodells für Pemphigus

- PX43 bindet in der 3D Haut.
- PX43 induziert keine klassische Spaltbildung in der 3D Haut, aber es induziert einen Verlust der Zelladhäsion in den oberen Schichten der Epidermis.
- Die Ergebnisse ähneln nur in Bezug auf den intraepidermalen Adhäsionsverlust den Ergebnissen des HSOC für PV.
- Es ist gelungen ein humanes 3D Hautmodell für Pemphigus zu erschaffen, was zukünftig optimiert werden kann.

## 7 Zusammenfassung

Pemphigus-Erkrankungen sind seltene schwerwiegende Autoimmunerkrankungen der Haut und/ oder Schleimhäute. Es kommt zur Bildung von Autoantikörpern gegen Desmoglein (DSG) 1 und/ oder DSG 3. DSG ist ein wichtiger Bestandteil von Desmosomen, welche für die Zelladhäsion innerhalb der Epidermis sorgen. Der Verlust der intraepidermalen Zell-Zellkontakte der Keratinozyten, wird als Akantholyse bezeichnet. PX43 ist ein gut etabliertes Einzelkettenfragment, welches DSG 1 und DSG 3 im Hautorgankulturmodell (HSOC) für Pemphigus vulgaris (PV) bindet und somit eine Akantholyse verursacht. Das Ziel dieser Arbeit ist ein humanes dreidimensionales (3D) Hautmodell für Pemphigus zu etablieren.

Für die Herstellung der humanen 3D Haut wurden humane Keratinozyten und Fibroblasten aus gespendeten Hautstücken, welche von elektiven plastischen Operationen stammen, isoliert, kultiviert und vermehrt.

Zu Beginn der Herstellung der 3D Haut wurde eine künstliche Dermis aus Fibroblasten und Kollagen Typ 1 geschaffen, auf diese wurden die Keratinozyten gesät und es wurde ein *Air liquid interface* geschaffen. Nach weiteren acht Tagen wurde die Applikation von PX43 und von intravenösen Immunglobulin (IVIG) als Negativkontrolle durchgeführt. Wir wählten drei unterschiedliche Routen aus, um die beste Applikationsweise zu finden. Es wurden 20 µL PX43-Lösung bzw. IVIG-Lösung in das Medium der 3D Haut, auf die 3D Haut und in die 3D Haut via Injektion appliziert. Anhand der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung und der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen (IIF) wurden die 3D Häute charakterisiert und das Expressionsmuster von DSG 1 und DSG 3 sichtbar gemacht. Die Ausprägung beider DSG konnte überlappend in den basalen Schichten und DSG 3 zusätzlich im apikalen Bereich der Epidermis detektiert werden. Dass PX43 nach Applikation vor allem in den basalen Schichten der Epidermis bindet, konnte durch die direkte Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden. Als Resultat von PX43 in der 3D Haut sahen wir einen Adhäsionsverlust in der apikalen Epidermis. Anhand der Desmoglein-Kompensations-Theorie kann der Adhäsionsverlust apikal und das Ausbleiben der suprabasalen Spaltbildung aufgrund der überlappenden Expression beider DSG erklärt werden.

Es ergab sich durch die IIF-Färbungen Anhalt dafür, dass die 3D Häute aus zu weit ausdifferenzierten Keratinozyten bestehen. Dies wird zukünftig durch die Wahl jüngerer Spender\*innen modifiziert.

In Zukunft kann das humane 3D Hautmodell für Pemphigus in Kombination mit medikamentösen Therapien getestet werden.

Wir haben ein humanes 3D Hautmodell für Pemphigus etabliert, welches für ein verbessertes Verständnis der Pathogenese sorgt und viel Potential als alternatives Modell zum HSOC für PV birgt.

## 8 Literaturverzeichnis

Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). scFv antibody: Principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, 980250.

Ahn, M., Cho, W.-W., Park, W., Lee, J.-S., Choi, M.-J., Gao, Q., Gao, G., Cho, D.-W., & Kim, B. S. (2023). 3D biofabrication of diseased human skin models in vitro. *Biomaterials Research*, 27(1), 80.

Alshami, M. L., Aswad, F., & Abdullah, B. (2022). Desmogleins 1, 3, and E-cadherin immunohistochemical expression within mucocutaneous pemphigus vulgaris. *Pan African Medical Journal*, 42, 186

Amagai, M. (1999). Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. *Journal of Dermatological Science*, 20(2), 92–102.

Amagai, M., Matsuyoshi, N., Wang, Z. H., Andl, C., & Stanley, J. R. (2000). Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nature Medicine*, 6(11), 1275–1277.

Amagai, M., Tsunoda, K., Zillikens, D., Nagai, T., & Nishikawa, T. (1999). The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(2), 167–170.

Baima, B., & Sticherling, M. (2002). How specific is the TUNEL reaction?: An account of a histochemical study on human skin. *The American Journal of Dermatopathology*, 24(2), 130–134.

Bäsler, K., Bergmann, S., Heisig, M., Naegel, A., Zorn-Kruppa, M., & Brandner, J. M. (2016). The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *Journal of Controlled Release*, 242, 105–118.

Bäsler, K., & Brandner, J. M. (2017). Tight junctions in skin inflammation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 469(1), 3–14.

Bastuji-Garin, S., Souissi, R., Blum, L., Turki, H., Nouria, R., Jomaa, B., Zahaf, A., Osman, A. B., Mokhtar, I., Fazaa, B., Revuz, J., Roujeau, J.-C., & Kamoun, M. R. (1995). Comparative epidemiology of Pemphigus in Tunisia and France: Unusual incidence of Pemphigus foliaceus in young tunisian women. *Journal of Investigative Dermatology*, 104(2), 302–305.

Bataillon, M., Lelièvre, D., Chapuis, A., Thillou, F., Autourde, J. B., Durand, S., Boyera, N., Rigaudeau, A.-S., Besné, I., & Pellevoisin, C. (2019). Characterization of a new reconstructed full thickness skin model, T-Skin™, and its application for investigations of anti-aging compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2240.

- Bieber, K., Hundt, J. E., Yu, X., Ehlers, M., Petersen, F., Karsten, C. M., Köhl, J., Kridin, K., Kalies, K., Kasprick, A., Goletz, S., Humrich, J. Y., Manz, R. A., Künstner, A., Hammers, C. M., Akbarzadeh, R., Busch, H., Sadik, C. D., Lange, T., Grasshoff, H., Hackel, A. M., Erdmann, J., König, I., Raasch, W., Becker, M., Kerstein-Stähle, A., Lamprecht, P., Riemekasten, G., Schmidt, E., Ludwig, R. J. (2023). Autoimmune pre-disease. *Autoimmunity Reviews*, 22(2), 103236.
- Bikle, D. D. (2004). Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(3), 436–444.
- Bose, A., Teh, M.-T., Mackenzie, I., & Waseem, A. (2013). Keratin K15 as a biomarker of epidermal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19385–19398.
- Broussard, J. A., Jaiganesh, A., Zarkoob, H., Conway, D. E., Dunn, A. R., Espinosa, H. D., Janmey, P. A., & Green, K. J. (2020). Scaling up single-cell mechanics to multicellular tissues – the role of the intermediate filament–desmosome network. *Journal of Cell Science*, 133(6), jcs228031.
- Brown, S. J., & Irwin McLean, W. H. (2012). One remarkable molecule: Filaggrin. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 751–762.
- Burmester, I. A. K., Emtenani, S., Johns, J., Ludwig, R. J., Hammers, C. M., & Hundt, J. E. (2019). Translational use of a standardized full human skin organ culture model in autoimmune blistering diseases. *Current Protocols in Pharmacology*, 85(1), e56.
- Burmester, I. A. K., Flaswinkel, S., Thies, C., Kasprick, A., Kamaguchi, M., Bumiller-Bini, V., Emtenani, S., Feldmann, N., Kridin, K., Schmidt, E., Van Beek, N., Zillikens, D., Hammers, C. M., Hundt, J. E., & Ludwig, R. J. (2020). Identification of novel therapeutic targets for blocking acantholysis in pemphigus. *British Journal of Pharmacology*, 177(22), 5114–5130.
- Chan, J. K. C. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, 22(1), 12–32.
- Chau, D. Y. S., Johnson, C., MacNeil, S., Haycock, J. W., & Ghaemmaghami, A. M. (2013). The development of a 3D immunocompetent model of human skin. *Biofabrication*, 5(3), 035011.
- Cole, C., Borradori, L., & Amber, K. T. (2022). Deciphering the contribution of BP230 autoantibodies in Bullous Pemphigoid. *Antibodies*, 11(3), 44.
- Czyz, C. M., Kunth, P. W., Gruber, F., Kremslehner, C., Hammers, C. M., & Hundt, J. E. (2023). Requisite instruments for the establishment of three-dimensional epidermal human skin equivalents-A methods review. *Experimental Dermatology*, 32(11), 1870–1883.
- Denning, M. F., Guy, S. G., Ellerbroek, S. M., Norvell, S. M., Kowalczyk, A. P., & Green, K. J. (1998). The expression of desmoglein isoforms in cultured human keratinocytes is regulated by calcium, serum, and protein kinase c. *Experimental Cell Research*, 239(1), 50–59.

Díaz, L., Zambrano-González, E., Flores, M. E., Contreras, M., Crispín, J. C., Alemán, G., Bravo, C., Armenta-Espinosa, A., Valdés, V. J., Tovar, A., Gamba, G., Barrios-Payán, J., & Bobadilla, N. A. (2021). Ethical considerations in animal research: The principle of 3R's. *Revista de Investigación Clínica*, 73(4), 5189.

Egu, D. T., Schmitt, T., Sigmund, A. M., & Waschke, J. (2022). Electron microscopy reveals that phospholipase C and Ca<sup>2+</sup> signaling regulate keratin filament uncoupling from desmosomes in Pemphigus. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 241, 151904.

Elias, P. M., Ahn, S. K., Denda, M., Brown, B. E., Crumrine, D., Kimutai, L. K., Kömüves, L., Lee, S. H., & Feingold, K. R. (2002). Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(5), 1128–1136.

Emmert, H., Rademacher, F., Gläser, R., & Harder, J. (2020). Skin microbiota analysis in human 3D skin models-“Free your mice”. *Experimental Dermatology*, 29(11), 1133–1139.

Entenani, S., Yuan, H., Lin, C., Pan, M., Hundt, J. E., Schmidt, E., Komorowski, L., Stanley, J. R., & Hammers, C. M. (2019). Normal human skin is superior to monkey oesophagus substrate for detection of circulating BP 180- NC 16A-specific IgG antibodies in bullous pemphigoid. *British Journal of Dermatology*, 180(5), 1099–1106.

Ford, M. J. (1986). Filaggrin. *International Journal of Dermatology*, 25(9), 547–551.

Fuchs, E. (1993). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Journal of Cell Science*, 1993, Supplement 17, 197–208.

Gandarillas, A., Goldsmith, L. A., Gschmeissner, S., Leigh, I. M., & Watt, F. M. (1999). Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Experimental Dermatology*, 8(1), 71–79.

Garrod, D., & Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 572–587.

Getsios, S., Simpson, C. L., Kojima, S., Harmon, R., Sheu, L. J., Dusek, R. L., Cornwell, M., & Green, K. J. (2009). Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 185(7), 1243–1258.

Giunta, R. E., Frank, K., Costa, H., Demirdöver, C., Di Benedetto, G., Elander, A., Henley, M., Murray, D. J., Schaefer, D., Spindel, S., Vasar, O., & Zic, R. (2020). The COVID-19 pandemic and its Impact on plastic surgery in Europe – An ESPRAS survey. *Handchirurgie · Mikrochirurgie · Plastische Chirurgie*, 52(03), 221–232.

Goebeler, M., & Hamm, H. (Hrsg.). (2017). *Basiswissen Dermatologie*. 1. Aufl., 4-8, Springer Berlin, Heidelberg.

Goleva, E., Berdyshev, E., & Leung, D. Y. M. (2019). Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1463–1474.

- Goulet, D. R., & Atkins, W. M. (2020). Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 74–103.
- Hafttek, M. (2015). Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. *Cell and Tissue Research*, 360(3), 483–490.
- Hammers, C. M., & Stanley, J. R. (2014). Antibody phage display: Technique and applications. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 1–5.
- Hammers, C. M., & Stanley, J. R. (2016). Mechanisms of disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), 175–197.
- Harding, C. R., Aho, S., & Bosko, C. A. (2013). Filaggrin – revisited. *International Journal of Cosmetic Science*, 35(5), 412–423.
- Hartmann, V., Hariton, W. V., Rahimi, S., Hammers, C. M., Ludwig, R. J., Müller, E. J., & Hundt, J. E. (2023). The human skin organ culture model as an optimal complementary tool for murine pemphigus models. *Laboratory Animals*, 57(4), 381–395.
- Hashempour, S., Ghanbarzadeh, S., Maibach, H. I., Ghorbani, M., & Hamishehkar, H. (2019). Skin toxicity of topically applied nanoparticles. *Therapeutic Delivery*, 10(6), 383–396.
- Haydont, V., Bernard, B. A., & Fortunel, N. O. (2019). Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 177, 150–156.
- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M. L., Roop, D. R., & Steinert, P. M. (1991). Characterization of human lorincrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(10), 6626–6636.
- Hooper, J. K., & Eggink, L. L. (2022). The discovery and function of filaggrin. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1455.
- Hosseini, M., Koehler, K. R., & Shafiee, A. (2022). Biofabrication of human skin with its appendages. *Advanced Healthcare Materials*, 11(22), 2201626.
- Hu, C. H., Michel, B., & Schiltz, J. R. (1978). Epidermal acantholysis induced in vitro by pemphigus autoantibody. An ultrastructural study. *The American Journal of Pathology*, 90(2), 345–362.
- Ilijas, J. D., Röhl, J., McGovern, J. A., Moromizato, K. H., Parker, T. J., & Cuttle, L. (2021). A human skin equivalent burn model to study the effect of a nanocrystalline silver dressing on wound healing. *Burns*, 47(2), 417–429.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1897, 299–311.

Ishitsuka, Y., & Roop, D. R. (2020). Loricrin: Past, present, and future. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2271.

James, K. A., Culton, D. A., & Diaz, L. A. (2011b). Diagnosis and clinical features of Pemphigus foliaceus. *Dermatologic Clinics*, 29(3), 405–412.

Janson, D., Rietveld, M., Willemze, R., & El Ghalbzouri, A. (2013). Effects of serially passaged fibroblasts on dermal and epidermal morphogenesis in human skin equivalents. *Biogerontology*, 14(2), 131–140.

Jeffes, E. W. B., Kaplan, R. P., & Ahmed, A. R. (1984). Acantholysis produced in vitro with pemphigus serum: Hydrocortisone inhibits acantholysis, while dapsone and 6-mercaptopurine do not inhibit acantholysis. *Journal of Clinical Immunology*, 4(5), 359–363.

Jensen, J. M., & Proksch, E. (2009). The skin's barrier. *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia: Organo Ufficiale, Societa Italiana Di Dermatologia E Sifilografia*, 144(6), 689–700.

Jeriha, J., Kolundzic, N., Khurana, P., Gordon, M., Celli, A., Mauro, T. M., & Ilic, D. (2020). Markers for Ca<sup>++</sup>-induced terminal differentiation of keratinocytes in vitro under defined conditions. *Experimental Dermatology*, 29(12), 1238–1242.

Joly, P., Horvath, B., Patsatsi, A., Uzun, S., Bech, R., Beissert, S., Bergman, R., Bernard, P., Borradori, L., Caproni, M., Caux, F., Cianchini, G., Daneshpazhooh, M., De, D., Dmochowski, M., Drenovska, K., Ehrchen, J., Feliciani, C., Goebeler, M., Groves, R., Guenther C., Hofmann, S., Ioannides D., Kowalewski C., Ludwig, R. Lim, Y. L., Marinovic, B., Marzano, A. V., Mascaró J. M., Mimouni, D., Murrell D. F., Pincelli, C., Squarcioni, C. P., Sárdy, M., Setterfield, J., Sprecher, E., Vassileva, S., Wozniak, K., Yayli, S., Zambruno, G., Zillikens, D., Hertl, M. & Schmidt, E. (2020). Updated S2K guidelines on the management of pemphigus vulgaris and foliaceus initiated by the european academy of dermatology and venereology (EADV). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(9), 1900–1913.

Joly, P., & Litrowski, N. (2011). Pemphigus group (vulgaris, vegetans, foliaceus, herpetiformis, brasiliensis). *Clinics in Dermatology*, 29(4), 432–436.

Kain, R. (2017). Histopathology. In T. Lion (Hrsg.), *Human Fungal Pathogen Identification*, 1508, 185–193.

Kapsogeorgou, E. K., & Tzioufas, A. G. (2016). Autoantibodies in autoimmune diseases: Clinical and critical evaluation. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ*, 18(9), 519–524.

Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220–233.

Kasperkiewicz, M., Ellebrecht, C. T., Takahashi, H., Yamagami, J., Zillikens, D., Payne, A. S., & Amagai, M. (2017). Pemphigus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17026.

- Khavkin, J., & Ellis, D. A. F. (2011). Aging skin: Histology, physiology, and pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 19(2), 229–234.
- Kitajima, Y. (2013). New insights into desmosome regulation and pemphigus blistering as a desmosome-remodeling disease. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29(1), 1–13.
- Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin: *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203–213.
- Kridin, K. (2018). Pemphigus group: Overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunologic Research*, 66(2), 255–270.
- Kridin, K., & Schmidt, E. (2021). Epidemiology of Pemphigus. *JID Innovations*, 1(1), 100004.
- Kridin, K., Zelber-Sagi, S., & Bergman, R. (2017b). Pemphigus vulgaris and Pemphigus foliaceus: Differences in epidemiology and mortality. *Acta Dermato Venereologica*, 97(9), 1095–1099.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. In C. Kioussi (Hrsg.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 887, 41–47.
- Lacz, N. L., Schwartz, R. A., & Kihiczak, G. (2005). Epidermolytic hyperkeratosis: A keratin 1 or 10 mutational event. *International Journal of Dermatology*, 44(1), 1–6.
- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283–289.
- Lotti, R., Atene, C. G., Zanfi, E. D., Bertesi, M., & Zanocco-Marani, T. (2022). In vitro, ex vivo, and in vivo models for the study of Pemphigus. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7044.
- Lou, H., & Cao, X. (2022). Antibody variable region engineering for improving cancer immunotherapy. *Cancer Communications*, 42(9), 804–827.
- Ludwig, R. J., Vanhoorelbeke, K., Leyboldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., McLachlan, S. M., Komorowski, L., Luo, J., Cabral-Marques, O., Hammers, C. M., Lindstrom, J. M., Lamprecht, P., Fischer, A., Riemekasten, G., Tersteeg, C., Sondermann, P., Rapoport, B., Wandinger, K.-P., Probst, C., El Beidaq, A., Schmidt, E., Verkman, A., Manz, R. A. & Nimmerjahn, F. (2017). Mechanisms of autoantibody-induced pathology. *Frontiers in Immunology*, 8, 603.
- Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Fibroblast heterogeneity: Implications for human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), 26–35.
- Mahoney, M. G., Wang, Z., Rothenberger, K., Koch, P. J., Amagai, M., & Stanley, J. R. (1999). Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *Journal of Clinical Investigation*, 103(4), 461–468.

- Mai, Y., Izumi, K., Mai, S., & Ujiie, H. (2022). The significance of preclinical anti-BP180 autoantibodies. *Frontiers in Immunology*, *13*, 963401.
- Malik, A. M., Tupchong, S., Huang, S., Are, A., Hsu, S., & Motaparathi, K. (2021). An updated review of Pemphigus diseases. *Medicina*, *57*(10), 1080.
- Mcheik, J. N., Barrault, C., Pedretti, N., Garnier, J., Juchaux, F., Levard, G., Morel, Frank., Bernard, F.-X., & Lecron, J.-C. (2015). Study of proliferation and 3D epidermal reconstruction from foreskin, auricular and trunk keratinocytes in children. *Burns*, *41*(2), 352–358.
- Medawar, P. B. (1948). The cultivation of adult mammalian skin epithelium in vitro. *The Quarterly Journal of Microscopical Science*, *89*(Pt 2), 187–196.
- Melchionda, V., & Harman, K. E. (2019). Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: An overview of the clinical presentation, investigations and management. *Clinical and Experimental Dermatology*, *44*(7), 740–746.
- Mendoza, J. L., Lee, S., & Fife, D. (2021). The problem of measurement bias in comparing selected subgroups. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, *74*(S1), 1–23.
- Menon, G. K., Cleary, G. W., & Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, *435*(1), 3–9.
- Menon, S. S., Guruvayoorappan, C., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2019). Ki-67 protein as a tumor proliferation marker. *Clinica Chimica Acta*, *491*, 39–45.
- Miguel, M. C. B., Julio, T. A., Vernal, S., De Paula, N. A., Lieber, A., & Roselino, A. M. (2022). Autoantibodies against desmoglein 2 are not pathogenic in pemphigus. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *97*(2), 145–156.
- Mirzayans, R., & Murray, D. (2020). Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 9090.
- Mohammed, F., & Chidgey, M. (2021). Desmosomal protein structure and function and the impact of disease-causing mutations. *Journal of Structural Biology*, *213*(3), 107749.
- Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins: Biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, *129*(6), 705.
- Moreno-Sosa, T., Sánchez, M. B., Pietrobon, E. O., Fernandez-Muñoz, J. M., Zoppino, F. C. M., Neira, F. J., Germanó, M. J., Cargnelutti, D. E., Innocenti, A. C., Jahn, G. A., Valdez, S. R., & Mackern-Oberti, J. P. (2021). Desmoglein-4 deficiency exacerbates psoriasiform dermatitis in rats while psoriasis patients displayed a decreased gene expression of DSG4. *Frontiers in Immunology*, *12*, 625617.

Muhsen, M., Protschka, M., Schneider, L. E., Müller, U., Köhler, G., Magin, T. M., Büttner, M., Alber, G., & Siegemund, S. (2019). Orf virus (ORFV) infection in a three-dimensional human skin model: Characteristic cellular alterations and interference with keratinocyte differentiation. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210504.

Murphrey, M. B., Miao, J. H., & Zito, P. M. (2024). Histology, Stratum Corneum. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. [zitiert 26. Februar 24] verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513299/>

Neil, J. E., Brown, M. B., & Williams, A. C. (2020). Human skin explant model for the investigation of topical therapeutics. *Scientific Reports*, *10*(1), 21192.

Nithya, S., Radhika, T., & Jeddy, N. (2015). Loricrin-an overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, *19*(1), 64.

Patiño, M. I., Restrepo, L. M., Becerra, N. Y., Van Der Mei, H. C., Van Kooten, T. G., & Sharma, P. K. (2021). Nonviral expression of LL-37 in a human skin equivalent to prevent infection in skin wounds. *Human Gene Therapy*, *32*(19–20), 1147–1157.

Payne, A. S., Ishii, K., Kacir, S., Lin, C., Li, H., Hanakawa, Y., Tsunoda, K., Amagai, M., Stanley, J. R., & Siegel, D. L. (2005). Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(4), 888–899.

Pisetsky, D. S. (2023). Pathogenesis of autoimmune disease. *Nature Reviews Nephrology*, *19*(8), 509–524.

Pollmann, R., Schmidt, T., Eming, R., & Hertl, M. (2018). Pemphigus: A comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic approaches. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *54*(1), 1–25.

Pondelj, N., Lugović-Mihic, L., Tomić, L., Parać, E., Pedić, L., & Lazić-Mosler, E. (2023). Key factors in the complex and coordinated network of skin keratinization: Their significance and involvement in common skin conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(1), 236.

Porro, A. M., Seque, C. A., Ferreira, M. C. C., & Enokihara, M. M. S. E. S. (2019b). Pemphigus vulgaris. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *94*(3), 264–278.

Pourchet, L. J., Thepot, A., Albouy, M., Courtial, E. J., Boher, A., Blum, L. J., & Marquette, C. A. (2017). Human skin 3D bioprinting using scaffold-free approach. *Advanced Healthcare Materials*, *6*(4), 1601101.

Pupovac, A., Senturk, B., Griffoni, C., Maniura-Weber, K., Rottmar, M., & McArthur, S. L. (2018). Toward Immunocompetent 3D skin models. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(12), 1701405.

Radine, U. K., Bumiller-Bini Hoch, V., Boldt, A. B. W., Zillikens, D., Ludwig, R. J., Hammers, C. M., Klinger, M., & Hundt, J. E. (2022). Electron microscopy of desmosomal structures in the pemphigus human skin organ culture model. *Frontiers in Medicine*, *9*, 997387.

- Randall, M. J., Jüngel, A., Rimann, M., & Wuertz-Kozak, K. (2018). Advances in the biofabrication of 3D skin in vitro: Healthy and pathological models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 154.
- Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P., & Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of dermis: Scarring and cells involved. *Cells*, 8(6), 607.
- 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. (2019). Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy*, 234(4), 438–455.
- Rousselle, P., Laigle, C., & Rousselet, G. (2022). The basement membrane in epidermal polarity, stemness, and regeneration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 323(6), C1807–C1822.
- Ruocco, V., & Pisani, M. (1982). Induced pemphigus. *Archives of Dermatological Research*, 274(1–2), 123–140.
- Sanchez, M. M., Tonmoy, T. I., Park, B. H., & Morgan, J. T. (2022). Development of a vascularized human skin equivalent with hypodermis for photoaging studies. *Biomolecules*, 12(12), 1828.
- Schmidt, E., Kasperkiewicz, M., & Joly, P. (2019). Pemphigus. *The Lancet*, 394(10201), 882–894.
- Schmidt, E., Sticherling, M., Sárdy, M., Eming, R., Goebeler, M., Hertl, M., Hofmann, S. C., Hunzelmann, N., Kern, J. S., Kramer, H., Nast, A., Orzechowski, H., Pfeiffer, C., Schuster, V., Sitaru, C., Zidane, M., Zillikens, D., & Worm, M. (2020). S2k-Leitlinie zur Therapie des Pemphigus vulgaris/foliaceus und des bullösen Pemphigoids: 2019 Update. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 18(5), 516–527.
- Schommer, N. N., & Gallo, R. L. (2013). Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology*, 21(12), 660–668.
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41–S52.
- Shen, Z., Sun, L., Liu, Z., Li, M., Cao, Y., Han, L., Wang, J., Wu, X., & Sang, S. (2023). Rete ridges: Morphogenesis, function, regulation, and reconstruction. *Acta Biomaterialia*, 155, 19–34.
- Shih, Y., Wang, B., Yuan, H., Zheng, J., & Pan, M. (2020). Role of BP230 autoantibodies in bullous pemphigoid. *The Journal of Dermatology*, 47(4), 317–326.
- Smack, D. P., Korge, B. P., & James, W. D. (1994). Keratin and keratinization. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 30(1), 85–102.
- Spindler, V., & Waschke, J. (2018). Pemphigus-A disease of desmosome dysfunction caused by multiple mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9, 136.

Stanley, J. R., & Amagai, M. (2006). Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *New England Journal of Medicine*, 355(17), 1800–1810.

Stefanovic, N., & Irvine, A. D. (2024). Filaggrin and beyond: New insights into the skin barrier in atopic dermatitis and allergic diseases, from genetics to therapeutic perspectives. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 132(2), 187–195.

Suhail, S., Sardashti, N., Jaiswal, D., Rudraiah, S., Misra, M., & Kumbar, S. G. (2019). Engineered skin tissue equivalents for product evaluation and therapeutic applications. *Biotechnology Journal*, 14(7), 1900022.

Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: More than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186.

Tuusa, J., Kokkonen, N., & Tasanen, K. (2021). BP180/Collagen XVII: A molecular view. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12233.

Uhlig, R., Abboud, M., Gorbokon, N., Lennartz, M., Dwertmann Rico, S., Kind, S., Reisch, V., Viehweger, F., Kluth, M., Hube-Magg, C., Bernreuther, C., Büscheck, F., Clauditz, T. S., Fraune, C., Hinsch, A., Jacobsen, F., Krech, T., Lebok, P., Steurer, S., Burandt, E., Minner, S., Marx, A., Simon, R., Sauter, G. & Menz, A. (2022). Cytokeratin 10 (CK10) expression in cancer: A tissue microarray study on 11,021 tumors. *Annals of Diagnostic Pathology*, 60, 152029.

Van Gele, M., Geusens, B., Speeckaert, R., Dynoodt, P., Vanhooche, B., Van Den Bossche, K., & Lambert, J. (2011). Development of a 3D pigmented skin model to evaluate RNAi-induced depigmentation. *Experimental Dermatology*, 20(9), 773–775.

Werner, S., Krieg, T., & Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), 998–1008.

Yang, L., Fan, X., Cui, T., Dang, E., & Wang, G. (2017). Nrf2 promotes keratinocyte proliferation in psoriasis through up-regulation of keratin 6, keratin 16, and keratin 17. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(10), 2168–2176.

Yang, S., Geng, Z., Ma, K., Sun, X., & Fu, X. (2016). Comparison of the histological morphology between normal skin and scar tissue. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 36(2), 265–269.


Yousef, H., Alhaji, M., & Sharma, S. (2022). Anatomy, skin (integument), epidermis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [zitiert 27. Februar 24], verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>

Zhang, X., Yin, M., & Zhang, L. (2019). Keratin 6, 16 and 17-critical barrier alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*, 8(8), 807.


# 9 Anhänge

Im Folgenden sind mein Poster, das Ethikvotum, meine Danksagung und mein Lebenslauf meiner Dissertation als Anhänge beigefügt.


## 9.1 Poster



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK



Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie



RTG 2633  
Defining and Targeting  
Autoimmune Pre-Disease

### Establishing a human 3D skin model for pemphigus

Edda L. V. Janusch<sup>1</sup>, Christoph M. Hammers<sup>1,2</sup>, Ralf J. Ludwig<sup>1,3,4</sup>, Antje Müller<sup>5</sup>, Jennifer E. Hundt<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Lübeck Institute of Experimental Dermatology, University of Lübeck, 23562 Lübeck, Germany; <sup>2</sup>Department of Dermatology, Venerology and Allergology, University of Regensburg, 93040 Regensburg, Germany; <sup>3</sup>Center for Research on Inflammation of the Skin, University of Lübeck, 23562 Lübeck, Germany; <sup>4</sup>Department of Dermatology, Allergy and Venerology, University of Lübeck, 23562, Lübeck, Germany; <sup>5</sup>Department of Rheumatology and Clinical Immunology, University of Lübeck, 23562, Lübeck, Germany

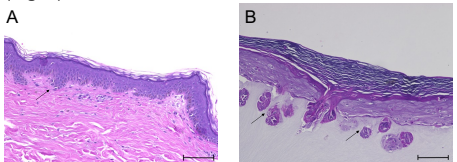
### Introduction

- Pemphigus diseases are rare but serious, IgG-mediated, autoimmune, skin blistering diseases<sup>1</sup>
- Pemphigus patients have autoantibodies against Desmoglein (DSG) 1 and/or DSG 3; these induce intraepidermal blistering by disrupting adhesion between keratinocytes, called acantholysis<sup>1</sup>
- The single-chain antibody variable fragment (scFv) PX43 is directed against DSG 1 and 3 and mimics pemphigus vulgaris (PV) in the human skin organ culture (HSOC) model and causes split formation<sup>2</sup>
- For the human 3D skin model we used skin donations from elective plastic surgery and isolated keratinocytes and fibroblasts, afterwards we created in an experimental set up with air liquid interface the 3D skin<sup>3</sup>
- **Our aim was to establish a human, *in vitro*, 3D skin model for pemphigus**

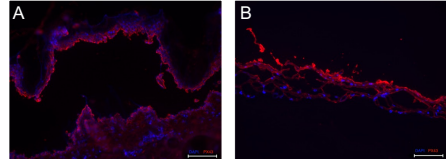
### Results

- The epidermal structure of the 3D skin imitates normal human skin (NHS), it even started to bild rete ridges (Fig. 1)
- Expression of DSG 1 and DSG 3 in the epidermis of the 3D skin is comparable to NHS (Fig. 2)
- PX43 binds in the epidermis of NHS and the 3D skin (Fig. 4)
- PX43 causes intraepidermal loss of adhesion (Fig. 5)

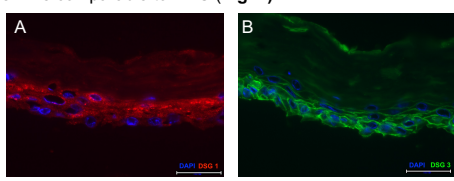
**Figure 1:** Hematoxylin/eosin staining of **A** normal human skin **B** 3D skin, arrow marker on rete ridges, scale bar 100 µm



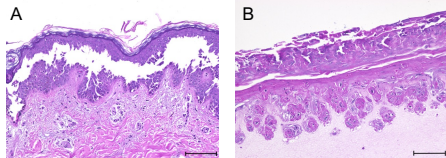
**Figure 4:** Direct immunofluorescence staining against PX43 of **A** HSOC model for **PV** **B** 3D skin on route (2), scale bar 100 µm



**Figure 2:** Indirect immunofluorescence staining of 3D skin against , **A** DSG1 and **B** DSG 3, scale bar 50 µm



**Figure 5:** Hematoxylin/eosin staining of **A** HSOC model for **PV** **B** 3D skin on route (2), scale bar 100 µm





### Conclusion

- 3D skin can be used as a model for pemphigus
- No classical split as in the HSOC model for PV, further improvement of application to reach the lower epidermis
- Potential model for pemphigus to test treatment options for pemphigus

**References:**

- 1) Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid, Hammers and Stanley, 2016
- 2) Translational Use of a Standardized Full Human Skin Organ Culture Model in Autoimmune Blistering Diseases, Bumester et al., 2019
- 3) Requisite instruments for the establishment of three-dimensional epidermal human skin equivalents—A methods review, Czyz et al. 2023
- 4) Biorender.com





IM FOCUS DAS LEBEN



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23562 Lübeck

Frau  
Prof. Dr. Hundt, Lübecker Institut für experimentelle  
Dermatologie (LIED)  
im Hause

jennifer.hundt@uni-luebeck.de.de  
Ralf.Ludwig@uksh.de

### Ethik-Kommission

**Vorsitzender:**  
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
**Stellv. Vorsitzender:**  
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

**Geschäftsstelle:**  
Dr. phil. Angelika Hüppe  
Dr. rer. nat. Inga Kauffhold  
Janine Kurzaj-Erdmann  
Doris Seuthe

**E-Mail:** ethikkommission@uni-luebeck.de

**Website:** www.uni-luebeck.de/forschung/  
kommissionen/ethikkommission

**Aktenzeichen: 21-191**  
Datum: 12. November 2021 DS/IK

**Sitzung der Ethik-Kommission am 03. Juni 2021, Nachreichung vom 30. September 2021  
und 08. November 2021**  
**Antragsteller: Frau Prof. Dr. Hundt**  
**Titel: In vitro Untersuchungen der Biologie von Haut und Schleimhaut samt Anhangsgebilden**

Sehr geehrte Frau Prof. Hundt,

vielen Dank für Ihre o.g. Schreiben, in denen Sie unserem Wunsch nach weiteren Informationen zum  
Studienvorhaben nachkommen.

Folgende Unterlagen lagen vor:

- Ihr Anschreiben vom 30. September 2021
- Ihre E-Mail vom 08. November 2021
- Ethikantrag (Basisformular) vom 22. April 2021
- Studienprotokoll Version 1 vom 30. September 2021
- Geänderte Patienteninformationen
- Geänderte Einwilligungserklärung
- Erklärung zur Körperspende

Die Kommission hat gegen die Durchführung der Studie **keine Bedenken**.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.  
Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend  
zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu  
registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter [www.drks.de](http://www.drks.de)).  
Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der  
Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.  
Datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben werden durch die Ethikkommission grundsätzlich nur kursorisch geprüft. Dieses Votum  
/ diese Bewertung ersetzt mithin nicht die Konsultation des zuständigen Datenschutzbeauftragten.

Mit freundlichem Gruß

  
Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Vorsitzender

## 10 Danksagung

Zuallererst gilt mein herzlichster Dank meiner wunderbaren, zuverlässigen und engagierten Doktormutter Prof. Dr. Jennifer Hundt. Ich durfte Teil deiner grandiosen Forschungsgruppe werden, viel lernen und einen Einblick in die Welt der Wissenschaft erlangen. Die Zeit und die Erlebnisse werde ich nie vergessen.

Meinem Ko-Betreuer, Prof. Dr. Dr. Christoph Hammers, welcher mir weiterhalf und gute Ideen beisteuerte, danke ich herzlich.

Auch PD Dr. Antje Müller möchte ich meinen Dank aussprechen, welche mir bei schweren Fragen geholfen hat, mir Zuspruch gegeben hat und die gehaltenen Vorträge/Poster mit mir besprochen hat.

Dem Leiter des Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED), Prof. Dr. Ralf Ludwig, danke ich ein Teil des hervorragenden Instituts sein zu dürfen und die Forschungsinfrastruktur nutzen zu dürfen.

Mein Dank richtet sich an das Graduiertenkolleg 2633. Von dem Stipendium, der Lehre, dem Austausch und der Struktur habe ich stark profitieren dürfen.

Danken möchte ich der Holstentor Privatlinik, der Klinik für Plastische Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein und den Patient\*innen, welche mir die Projektrealisierung ermöglichten.

Paul, ohne deine Anleitung wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen, danke für die Einweisung in die Methodik und das offene Ohr bei Fragen und Problemen.

Lilly, die ganzen langen, anstrengenden und schönen Tage, die wir zusammen durchgestanden haben, das gegenseitige Aufbauen und gemeinsame Ankommen in der experimentellen Dermatologie. Vielen Dank für alles.

Chiara, danke, dass du mir bei den Forschungsvorträgen, Fragen und der Organisation zur Seite standest.

Caren, Vero, Sarah, Johannes und dem gesamten Hundt Lab möchte ich danken für das zur Seite stehen bei Ratlosigkeit und die Einführung in das experimentelle Arbeiten.

Meiner Familie möchte ich für die seelische Unterstützung und das Auffangen in schweren Momenten und die bedingungslose Liebe danken.

Zu guter Letzt möchte ich meinem stetigen Lichtblick, David, danken. Du musstest so einiges ertragen und hast mich immer wieder aufgebaut und mir Kraft gegeben.