

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

Charakterisierung der PDE4-Inhibition im immunisierungs-induzierten  
Mausmodell des Schleimhautpemphigoids und *in vitro*

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

Vorgelegt von

Leonard Diel aus Neuss, Deutschland

Lübeck 2025

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

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

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Charlotte Eitel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.09.2025

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

<b>1</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b>2</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>8</u></b>
2.1	ZUSAMMENFASSUNG	8
2.2	SUMMARY	8
<b>3</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>10</u></b>
3.1	AUFBAU DER HAUT UND SCHLEIMHAUT	10
3.2	IMMUNSYSTEM	11
3.2.1	ANGEBORENES UND ADAPTIVES IMMUNSYSTEM	11
3.2.2	T- UND B-LYMPHOZYTEN	11
3.2.3	IMMUNGLOBULINE UND Fc-REZEPTOREN	12
3.2.4	IMMUNPRIVILEGIERTE BEREICHE	12
3.3	AUTOIMMUNITÄT	13
3.3.1	BEDEUTUNG UND ENTSTEHUNG	13
3.3.2	BULLÖSE AUTOIMMUNDERMATOSEN	14
3.4	ANTI-LAMININ 332 SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID	14
3.4.1	BASALMEMBRANZONE	14
3.4.2	EXPRESSION VON LAMININ 332	15
3.4.3	DAS KOMPLEMENTSYSTEM	16
3.4.4	ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	17
3.4.5	KLINIK	17
3.4.6	DIAGNOSTIK	18
3.4.7	THERAPIE	20
3.5	MAUSMODELLE	20
3.5.1	ALLGEMEIN	20
3.5.2	MAUSMODELLE FÜR PEMPHIGOIDERKRANKUNGEN	20
3.5.3	ANTI-LAMININ 332 SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID MAUSMODELLE	21
3.6	FRAGESTELLUNG	21
<b>4</b>	<b><u>MATERIALIEN UND METHODEN</u></b>	<b><u>22</u></b>
4.1	MATERIALIEN	22
4.1.1	GERÄTE	22
4.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	22
4.1.3	LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN	24
4.1.4	ANTIKÖRPER	24
4.1.5	VERWENDETE KITS	25
4.2	SOFTWARE	25
4.3	ANTIKÖRPER AUFREINIGUNG	25
4.4	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	26
4.4.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG	26
4.4.2	QUANTIFIZIERUNG DES ENTZÜNDLICHEN INFILTRATS UND DER SPALTLÄNGE	27

4.4.3	DIREKTE UND INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ MIKROSKOPIE .....	27
4.5	KULTIVIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN ZELLINIE .....	27
4.5.1	FLUORESCENZNACHWEIS DER BINDUNG VON ANTI-MLAMA3 IGG UND ANTI-MCOL7c IGG AN KULTIVIERTEN KERATINOZYTEN .....	27
4.5.2	PROTEINEXPRESSIONEN NACH ANTI-MLAMA3-IGG BINDUNG AN KERATINOZYTEN SOWIE WIRKUNG DES PDE4-INHIBITORS .....	28
4.6	DOPPELFÄRBUNG.....	28
4.7	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER NACHWEIS VON TGF-IN MAUSSEREN .....	29
4.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	29
<b>5</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b>30</b>
5.1	VORARBEITEN .....	30
5.2	LINEARE ABLAGERUNGEN VON IGG, IGA UND C3 IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN IM AKTIVEN LAMININ 332 SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID MAUSMODELL.....	31
5.2.1	BUKCALE MUKOSA UND ZUNGENSCHLEIMHAUT.....	31
5.2.2	PALPEBRALE KONJUNKTIVA UND KORNEA .....	33
5.2.3	ÖSOPHAGUS UND GASTROINTESTINALTRAKT.....	35
5.2.4	HAUT UND GENITALE SCHLEIMHAUT .....	38
5.2.5	ATEMWEGE.....	40
5.2.6	HARNBLASE.....	42
5.2.7	IN DER IMMUNFLUORESCENZ NEGATIVE GEWEBE .....	42
5.2.8	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER DIREKTEN IMMUNFLUORESCENZ .....	43
5.3	ENTZÜNDLICHES INFILTRAT UND SPALTBILDUNG SOWIE DEREN QUANTIFIZIERUNG IN DIF-POSITIVEN GEWEBEN .....	44
5.3.1	BUKCALE MUKOSA.....	45
5.3.2	PALPEBRALE KONJUNKTIVA UND KORNEA .....	47
5.3.3	ÖSOPHAGUS.....	51
5.3.4	GEWEBE OHNE ODER MIT WENIG ENTZÜNDLICHEM INFILTRAT SOWIE BESONDERHEITEN .....	53
5.4	WIRKUNG DES PDE4-INHIBITORS AUF KERATINOZYTEN.....	54
5.4.1	PROTEINEXPRESSIONEN NACH INKUBATION MIT ANTI-MLAMA3 IGG UND PDE4-INHIBITOR .....	55
5.5	DOPPELFÄRBUNG.....	57
5.6	NACHWEIS VON TGF-B1 MITTELS LEGENDPLEX.....	59
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b> .....	<b>61</b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b> .....	<b>70</b>
<b>8</b>	<b><u>ANHÄNGE</u></b> .....	<b>81</b>
8.1	ORIGINALARBEITEN .....	81
8.2	VERÖFFENTLICHTE ABSTRACTS .....	81
<b>9</b>	<b><u>DANKSAGUNGEN</u></b> .....	<b>82</b>



## 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

BMZ = Basalmembranzone

BP = bullöses Pemphigoid

BSA = bovines Serum Albumin

cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat

CXCL2 = engl. *CXC motif chemokine ligand 2*

CX3CR1/CX3CL1 = engl. *C-X3-C motif chemokine receptor 1/ C-X3-C motif chemokine ligand 1*

DIF = direkte Immunfluoreszenz

DMEM = engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EBA = Epidermolysis bullosa acquisita

EDTA = engl. *ethylene diamine tetraacetic acid*

ELISA = engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

FcR = Fc-Rezeptoren

IF = Immunfluoreszenz

Ig = Immunglobulin

IL = Interleukin

IVIG = intravenöse Immunglobuline

HE-Färbung = Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HLA = engl. *human leukocyte antigen*

LIED = Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie

MAC = Membran-Angriffs-Komplex

mCOL7 = murines Kollagen VII

MHC = engl. *major histocompatibility complex*

mLAM $\alpha$ 3 = murines Laminin  $\alpha$ 3

MMP = engl. *mucoous membrane pemphigoid*

NR = engl. *normal rabbit*

PBS = engl. *phosphate buffered saline*

PDE4 = Phosphodiesterase 4

PEG = Polyethylenglykol

pH = negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

SEM = engl. *standard error of the mean*

SHP = Schleimhautpemphigoid

SLE = systemischer Lupus erythematodes

TGF- $\beta$ 1 = engl. *transforming growth factor  $\beta$ 1*

TH-Zellen = T-Helferzellen

UKSH = Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

## **2 Zusammenfassung**

### **2.1 Zusammenfassung**

Das Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid (SHP) ist eine seltene blasenbildende Autoimmunerkrankung, die zu Erosionen und Strikturen an oberflächennahen Schleimhäuten führt. Als Autoantikörper vermittelte Erkrankung zeigen Patienten klinisch einen dominanten Befall der Schleimhäute sowie lineare Ablagerungen von IgG und/oder IgA und/oder C3 entlang der Basalmembranzone (BMZ) in Biopsien, welche läsionsnah entnommen wurden. Histologisch sind eine subepidermale/-epitheliale Spaltbildung mit einem darunterliegenden entzündlichen Infiltrat charakteristisch. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist bisher nicht vollständig verstanden, was in einer erschwerten Diagnosefindung resultiert, und die Entwicklung zielgerichteter Therapien beeinträchtigt. Um ein besseres Verständnis des Anti-Laminin 332 SHP zu erlangen, wurden bereits passive und aktive Mausmodelle etabliert. Mithilfe von Biopsien, stammend aus einem Mausmodell des Anti-Laminin 332 SHP, wurde in dieser Arbeit zum einen untersucht, inwiefern dieses Modell die typischen Befunde hinsichtlich Antikörperablagerungen von IgG, IgA und C3, der Spaltbildung und des entzündlichen Infiltrats bei Patienten widerspiegelt. Zum anderen wurde hierbei die Standardtherapie für SHP-Patienten mit Dapson sowie eine mögliche neue Therapieoption mit einem PDE4-Inhibitor (Phosphodiesterase 4) untersucht. Bei Analyse der Antikörperablagerungen, des korrelierenden inflammatorischen Infiltrats und der damit verbundenen Spaltbildung in verschiedenen Geweben konnte gezeigt werden, dass dieses Mausmodell die immunpathologischen Charakteristika von SHP-Patienten in hohem Maße widerspiegelt. Außerdem gab es Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Gastrointestinaltrakts. Die Behandlung mit Dapson führte in vielen Geweben zu einer signifikanten Reduktion des entzündlichen Infiltrats und der Spaltbildung, jedoch fiel der bereits bekannte geringere Effekt von Dapson auf okuläre Läsionen auf. Auch der PDE4-Inhibitor konnte in verschiedenen Geweben zu einem signifikanten Rückgang der Entzündungsreaktion führen und war im Fall der untersuchten Konjunktiva-Proben Dapson überlegen. Diese Erkenntnisse unterstreichen, dass das verwendete Mausmodell zur Untersuchung der Pathogenese des SHP sowie zur Testung zukünftiger Therapieoptionen geeignet ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die medikamentöse Intervention mit einem PDE4-Inhibitor eine neue Strategie in der Behandlung des SHP darstellen könnte.

Zudem gelang es, Immunzellen, die an der Pathogenese des SHP beteiligt sein könnten, zu charakterisieren. Mittels *in vitro* Versuchen konnten Hinweise gewonnen werden, welche Zytokine beim SHP eine Rolle spielen könnten, um ein besseres Verständnis der Krankheitsentstehung zu erlangen und potenzielle therapeutische Angriffspunkte ins Blickfeld zu rücken.

Das in dieser Arbeit verwendete generische Maskulinum im Sinne einer besseren Lesbarkeit gilt stellvertretend für alle Geschlechter.

### **2.2 Summary**

Anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid (MMP) is a rare blistering autoimmune disease that leads to erosions and adhesions on nearby mucosal surfaces. As an autoantibody-mediated disease, patients clinically show dominant mucosal involvement and linear deposits of IgG, IgA and/or C3 along the basement membrane zone (BMZ) in biopsies taken close to the lesion. Histologically, a subepidermal/epithelial split formation with an underlying inflammatory infiltrate

is characteristic. The pathogenesis of this disease is not yet fully understood, resulting in difficult diagnosis and hampering the development of new targeted therapies. In order to gain a better understanding of anti-laminin 332 MMP, passive and active mouse models have already been established. With the help of biopsies from a mouse model this work investigated the extent to which this model reflects the typical findings with regard to autoantibody deposits of IgG, IgA and C3, the formation of subepidermal splitting and the inflammatory infiltrate in patients. In addition the standard therapy with dapsone as well as a new therapy option with a PDE4 inhibitor were investigated. Analysing the antibody deposition, the correlating inflammatory infiltrate and the associated split formation in different tissues, it was shown that this mouse model reflects major immunopathological characteristics of the human disease. In addition, there was evidence of possible involvement of the gastrointestinal tract. Treatment with dapsone significantly reduced the inflammatory infiltrate and split formation in many tissues, while the already known limited effect of dapsone on ocular lesions was noticeable. The PDE4 inhibitor lead to a significant decrease of the inflammatory reaction and was superior to dapsone in reducing the inflammatory infiltration of the conjunctiva samples. Collectively, these findings underline that this mouse model is suitable for investigating the pathogenesis of MMP as well as for testing future therapeutic options. The results indicate that drug intervention with a PDE4 inhibitor may represent a new strategy in the treatment of MMP.

It was also possible to characterise immune cells that could be involved in the pathogenesis of SHP. Using in vitro experiments, indications were obtained as to which cytokines could play a role in SHP in order to gain a better understanding of the development of the disease and to focus on potential therapeutic targets.

The generic masculine used in this work applies to all genders for the sake of better readability.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Aufbau der Haut und Schleimhaut

Die Haut des Menschen wird mikroskopisch von außen nach innen in die Kutis und die Subkutis eingeteilt. Die Kutis gliedert sich wiederum in die Epidermis und Dermis. Die Epidermis weist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel auf und besteht hauptsächlich aus vier histologischen Schichten: In der Tiefe befindet sich das *Stratum basale*, darüber liegen das *Stratum spinosum* sowie das *Stratum granulosum* an. Die oberflächlichste Schicht der Epidermis ist das *Stratum corneum*. Die Keratinozyten stellen den häufigsten Zelltyp in der Epidermis dar. Bei einem Lebenszyklus von ca. vier Wochen werden sie von Stammzellen des *Stratum basale* gebildet und durchqueren von dort die anderen Hautschichten in Richtung der Oberfläche. Auf diesem Weg differenzieren sich die Keratinozyten, ändern ihre Morphologie und werden schließlich als tote Zellen abgeschilfert (1). Die Aufgaben der Keratinozyten sind vielschichtig. Sie stellen bspw. einen wichtigen Teil der Barrierefunktion der Haut dar. Im *Stratum corneum* werden die nun kernlosen Keratinozyten als Korneozyten bezeichnet und bestehen u.a. aus dem Protein Keratin. Umgeben sind sie von einer verhornten Lipidhülle. Dieser Aufbau dient einerseits dem mechanischen Schutz, andererseits begrenzt er den Wasserverlust und verhindert eine daraus resultierende Austrocknung der Haut (2). Des Weiteren speichern die Keratinozyten das Pigment Melanin, dessen Anreicherung die Hautfarbe eines Menschen determiniert und vor durch UV-Strahlung ausgelösten DNA-Schäden schützt. Hierbei bilden die Keratinozyten eine funktionelle Einheit mit den Melanozyten. Letztere stellen den Produktionsort des Melanins dar, welches schließlich an umgebende Keratinozyten abgegeben wird (3). Zudem nehmen Keratinozyten auch an der angeborenen Immunreaktion und der Wundheilung teil, indem sie diverse Zyto- und Chemokine freisetzen (4). Zur spezifischen Immunantwort trägt eine weitere in der Epidermis vorkommende Zellart bei: die Langerhans-Zellen. Diese dendritischen Immunzellen durchziehen als dichtes Geflecht die Hautschichten, interagieren mit eingedrungenen Pathogenen, um sie in der Haut befindlichen T-Zellen zu präsentieren (5,6). Außerdem finden sich in der Epidermis Merkelzellen, die als Mechanorezeptoren Druck wahrnehmen (7). Die Dermis ist in das *Stratum reticulare* und das *Stratum papillare* strukturiert (8). Das Bindegewebe der Dermis setzt sich vor allem aus kollagenen und elastischen Fasern zusammen. Diese Beschaffenheit sorgt zum einen für mechanische Stabilität und zum anderen für eine gewisse Verformbarkeit der Haut (9). Neben Fibroblasten und Nervenzellen, wie den Meissner-Tastkörperchen und den Vater-Pacini-Körperchen, weist die Dermis u.a. auch Abwehrzellen wie dendritische Zellen, Mastzellen, Makrophagen oder Lymphozyten sowie Blut- und Lymphgefäße auf. Die Subkutis stellt die tiefste Schicht der Haut dar. Ihr Hauptbestandteil ist Fettgewebe, in dem sich Nervenzellen sowie zusätzlich Lymph- und Blutgefäße befinden (10).

Die Schleimhaut (*Tunica mucosa*) ist mehrschichtig aufgebaut, bildet die innere Hülle verschiedener Hohlorgane und findet sich zudem in Abschnitten des Auges, des Mundes, der Genitalien sowie der Harnblase. Als mechanische Barriere sowie durch ihr lymphatisches Gewebe („mucosa associated lymphatic tissue“, MALT) schützt die Schleimhaut das Körperinnere vor Umwelteinflüssen und dem Eindringen von Pathogenen (11). Ihre Resorptions- und Sekretionsfähigkeit als selektiv permeable Membran stellt einen wichtigen Faktor der Homöostase dar, was u.a. durch diverse Transportproteine im Zusammenspiel mit zahlreichen *tight junctions* ermöglicht wird (12). Der grundsätzliche Aufbau der Schleimhaut ist bei allen oben genannten Organen und Strukturen ähnlich, jedoch gibt es Unterschiede je nach Lokalisation. Die äußerste Schicht der Schleimhaut (*Lamina epithelialis mucosae*) kann sowohl einschichtig (z.B. im Darm) als auch mehrschichtig sein

(u.a. im Ösophagus) (13). Dieser Epithelschicht liegt neben einer Schleimschicht auch die sogenannte Glykokalix auf, die auf der extrazellulären Seite fest mit den äußeren Zellen verbunden ist (14). Die Schleimschicht besteht größtenteils aus Wasser und glykosylierten Proteinen, den Mucinen, welche u.a. von speziellen Becherzellen produziert werden (15). An diese Schicht schließen die *Lamina propria mucosae* und die aus Muskelgewebe bestehende *Lamina muscularis mucosae* an (16). Darunter liegt die *Tunica submucosa* sowie die *Tunica muscularis*. In beiden Schichten befinden sich Nervenplexus, welche nervale Funktionseinheiten der peristaltischen Bewegungen des Gastrointestinaltrakts darstellen (17,18).

## **3.2 Immunsystem**

### **3.2.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem**

Das Immunsystem des Menschen ist ein multidimensionales System, um den Organismus vor körperfremden Stoffen, pathogenen Erregern oder abnorm veränderten körpereigenen Zellen zu schützen. Es gliedert sich in ein angeborenes (unspezifisches) und ein erworbenes, adaptives (spezifisches) Immunsystem (19). Hierbei spielen neben mechanischen, chemischen und biologischen Abwehrmechanismen auch zelluläre und humorale Bestandteile eine essenzielle Rolle. Wichtige Zellen sind bspw. Makrophagen und Granulozyten, wohingegen das Komplementsystem einen essenziellen Teil des humoralen Verteidigungsapparats darstellt (20). Das erworbene Immunsystem basiert auf der Aktivierung von T- und B-Zellen. Es kommt zu einer spezifischen Immunantwort mit Bildung sogenannter „Gedächtniszellen“ und Plasmazellen, die charakteristische Antikörper produzieren (21,22).

### **3.2.2 T- und B-Lymphozyten**

Nach Bildung im Knochenmark wandern Vorläuferzellen der T-Lymphozyten in den Thymus. Dort entstehen nach mehrfachen T-Zell-Rezeptor-Umlagerungen naive T-Lymphozyten, die im Anschluss in Blut und Lymphe gelangen (23). Für die Erkennung eines Antigens durch die T-Zellen ist die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen notwendig. Letztere binden Antigene über die Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I und II (*major histocompatibility complex, MHC*), beim Menschen auch *human leukocyte antigen genes* (HLA) genannt, und präsentieren sie den T-Lymphozyten (24). Infolgedessen proliferieren die T-Lymphozyten und es folgt deren Differenzierung in Effektorzellen (25). Effektorzellen werden wiederum in T-Helferzellen (TH-Zellen) und zytotoxische T-Zellen unterteilt. Bei den TH-Zellen unterscheidet man sogenannte TH1- und TH2-Zellen gemäß der von ihnen ausgeschütteten Zytokininform, den Interleukinen (IL) (26). Zytotoxische T-Zellen sind dazu in der Lage über den zelleigenen CD8-Rezeptor an MHC I gebundene Antigene zu binden und die betroffene Zelle zu eliminieren. TH-Zellen hingegen weisen einen CD4-Rezeptor auf, der lediglich mit MHC II gebundenen Pathogenen kompatibel ist (27). Auch die B-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (28). Membrangebundene Antigene, die sogenannten B-Zell-Rezeptoren (BCRs, *b-cell receptors*), ermöglichen eine gezielte Bindung an unterschiedliche Pathogene. Im Laufe der Entwicklung der BCRs kommt es zu zufälligen Rekombinationen von Gensegmenten, die zu einer Diversifikation der Gesamtheit an Rezeptoren führt. Die naiven B-Zellen werden nach Selektionsprozessen aus dem Knochenmark in das Blut- und Lymphsystem freigesetzt (29). Treffen sie auf ein Antigen, werden die B-Lymphozyten aktiviert und können sich sowohl zu Plasmazellen als auch zu B-Gedächtniszellen entwickeln. Während die Plasmazellen Antikörper ausschütten, ermöglichen B-Gedächtniszellen eine schnellere, präzise Immunantwort im Fall eines erneuten Kontaktes mit diesem Antigen (21).

### 3.2.3 Immunglobuline und Fc-Rezeptoren

Als Immunglobuline (Ig) oder sogenannte Antikörper werden heterodimere Proteinkomplexe mit Y-ähnlicher Form bezeichnet. Ihre Grundstruktur bilden 2 schwere und 2 leichte Ketten. Die leichten und schweren Ketten weisen verschiedene Domänen auf, die sich im Hinblick auf ihre Funktion unterscheiden: die konstanten Domänen (C), die effektorisch die Bindung an Fc-Rezeptoren oder die Aktivierung von Komplementfaktoren ermöglichen, sowie variable, antigenbindende Domänen (V). Die 5 verschiedenen Klassen der C-Domäne der schweren Ketten definieren folgende Isotypen der Immunglobuline: IgG, IgA, IgM, IgE und IgD (30). Im Rahmen der adaptiven Immunantwort initiieren sie die Neutralisierung von Antigenen und sorgen u.a. durch Stimulation von Makrophagen und Aktivierung des Komplementsystems für die Eliminierung von Erregern (31). IgG ist mit 10-20 % aller Plasmaproteine der vorherrschende Antikörper im menschlichen Serum. Beim Menschen werden die IgG-Untergruppen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 differenziert, die sich hinsichtlich ihrer Immunantwort, der Komplementaktivierung sowie ihres Fc-Fragments unterscheiden (32). Für die Antigenbindung ist das Fab-Fragment zuständig. Es wird von einer C- und einer V-Domäne mit jeweils einer leichten und einer schweren Kette gebildet (33). Das Fc-Fragment ist für die Interaktion mit Immunzellen über die Bindung an deren Fc-Rezeptoren (FcR) wichtig (34). Es umfasst zwei konstante Domänen lediglich einer schweren Kette (31). Humane FcR werden hauptsächlich von Leukozyten membrangebunden exprimiert. Eingeteilt werden sie in die folgenden 5 Typen: Fc $\alpha$ Rs, Fc $\delta$ Rs, Fc $\gamma$ Rs, Fc $\epsilon$ Rs, Fc $\mu$ Rs. Der Fc $\gamma$ R gliedert sich in 6 Subtypen, den Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIc, Fc $\gamma$ RIIIa, und Fc $\gamma$ RIIIb. Die Diversität der FcRs ermöglicht vielfältige Antikörper-vermittelte Immunantworten. Während Fc $\alpha$ / $\mu$ R als duales Rezeptorprotein IgM und IgA binden kann, interagiert der Fc $\epsilon$ R mit freiem IgE und der Fc $\gamma$ R mit IgG (35). Der Vergleich menschlicher FcR mit denen von Mäusen zeigt große Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer Lokalisation, Funktion und Nomenklatur. Auch bei Mäusen werden FcR von Immunzellen wie Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten exprimiert. Fc $\gamma$ R können inhibitorische oder aktivierende Eigenschaften aufweisen. Sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen ist mit dem Fc $\gamma$ RIIB nur ein inhibitorischer Rezeptor vorhanden (36). Der humane Fc $\gamma$ RIIB zeigt eine schwächere Bindungsstärke zu IgG1, IgG2 und IgG3 im Vergleich zu anderen Fc $\gamma$ R, was bei Mäusen nicht der Fall ist. Unterschiede hinsichtlich der Bindungsaffinität werden auch bei Betrachtung der aktivierenden Fc $\gamma$ R deutlich. So können alle humanen aktivierenden Fc $\gamma$ R IgG1 binden, bei Mäusen ist dazu nur der Fc $\gamma$ RIII in der Lage. Außerdem ist die Mehrzahl der Maus-Fc $\gamma$ R (Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ RIV) dazu fähig, IgE zu binden. Bei Menschen kann dies keiner der Fc $\gamma$ R-Subtypen. Eine weitere Divergenz besteht darin, dass der Fc $\gamma$ R und der neonatale FcR der Maus humane IgG-Subtypen binden kann, während die Rezeptoren des Menschen keine oder nur eine geringe Affinität zum IgG der Maus besitzen (37). Zudem existiert bei Mäusen kein Fc $\alpha$ R (38).

### 3.2.4 Immunprivilegierte Bereiche

Unter dem Begriff der immunprivilegierten Bereiche werden Organe bzw. Gewebe zusammengefasst, in denen Bedingungen vorliegen, die die Antigenerkennung erschweren. Dies führt zu einem reduzierten Einfluss und einer eingeschränkten Kontrolle durch das Immunsystem u. a. in Bereichen wie dem Gehirn und den Haarfollikeln (39,40). Auch das Auge zählt dazu. Das Auge ist ständig exogenen, direkt oder indirekt schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Da Immunantworten sowie Reparationsmechanismen an Entzündungen und damit verbundene Folgeschäden gekoppelt sind, ist der Einfluss des Immunsystems hier eingeschränkt, um die Sehfähigkeit nicht durch diese Prozesse zu gefährden (41). Die Kornea spielt durch Fokussierung und Transparenz eine essenzielle Rolle beim Sehvorgang. Ein wichtiger Faktor, um diese

Gegebenheiten nicht zu beeinträchtigen, liegt in der Avaskularität der Kornea. Anti-angiogene Faktoren werden nach Verletzungen im Rahmen der Wundheilung ausgeschüttet und verhindern eine Gefäßneubildung, was als „Angiogeneseprivileg“ bezeichnet wird. Das Fehlen von Gefäßen schränkt auch die Einwanderung von Immunzellen ein (42). Diese gelangen erst über periphere (limbale) Blut- und Lymphgefäße in die Kornea. Letztere selbst besitzt nur wenige angeborene Abwehrzellen wie Langerhanszellen oder natürliche Killerzellen (43).

### **3.3 Autoimmunität**

#### **3.3.1 Bedeutung und Entstehung**

Unter dem Begriff der Autoimmunität versteht man den multifaktoriell bedingten Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen (44). Natürlicherweise entstehen jederzeit autoreaktive T- und B-Zellen. Die Basis der Unterbindung möglicher selbst-destruktiver Prozesse stellen bei gesunden Menschen die zentrale und periphere Toleranz dar. Die Entwicklung der zentralen Toleranz findet u. a. im Thymus statt. Dort werden im Rahmen der Negativselektion autoreaktive T-Zellen eliminiert (45). Trotzdem kommt es vor, dass sich autoreaktive T-Lymphozyten der Selektion im Thymus entziehen und ins Blut ausschwemmen. Hier agieren nun u. a. regulatorische Foxp3<sup>+</sup>- T-Zellen und unterdrücken im Sinne der peripheren Toleranz die Entwicklung von autoimmunen Prozessen (23). Die zentrale Regulation autoreaktiver B-Lymphozyten spielt sich sowohl im Knochenmark als auch in der fetalen Leber ab (45). Zentrale Mechanismen der B-Zell-Regulation stellen die Induktion der Apoptose und ein Rezeptor-Editing dar, die jeweils über verschiedene Gene und Proteinexpressionen reguliert werden (46). Im Fall einer Infektion erkennen die Zellen des Immunsystems über Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) normalerweise bakterielle und virale Erreger anhand deren Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), zu denen auch Nukleinsäuren gehören. Zeitweise werden aber auch körpereigene Nukleinsäuren freigesetzt und von Immunzellen gebunden, wodurch Autoimmunität induziert werden kann. Um dieser potenziellen Gefahr entgegenzuwirken, bestehen im Körper drei verschiedene Prinzipien, wie die Expression von PRRs innerhalb der Zelle, die Veränderung körpereigener Nukleinsäuren sowie deren Abbau nach dem Zelltod (47). Gerät dieses Gleichgewicht hinsichtlich der Infektionsabwehr und Vermeidung autodestruktiver Prozesse ins Wanken, kann eine Autoimmunerkrankung entstehen (48). Die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung ist ein multifaktorieller Prozess. Neben dem Verlust der Selbsttoleranz nehmen auch Umweltfaktoren und genetische Voraussetzungen einen Einfluss auf diese Entwicklung. Genvariationen, auch als *single nucleotide polymorphisms* (SNP) bekannt, resultieren in veränderten Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die zur Gruppe der PRRs gehören. Diese Veränderungen sind u.a. mit dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder dem Morbus Basedow assoziiert (49). Zudem gibt es Hinweise, dass Viren durch ein molekulares Mimikry oder die Induktion der Immortalisierung autoreaktiver Immunzellen Autoimmunerkrankungen initiieren können (50). Auch nimmt eine verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine Einfluss auf die Entwicklung von Immunintoleranz. Eine überschießende Freisetzung des Zytokins Il-6, freigesetzt von Makrophagen und Monozyten, inhibiert die Bildung jener Foxp3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, was über verstärkte effektorische Aktivität zu Entzündung und Gewebeschädigung führen kann (51). Außerdem können auch Medikamente Autoimmunität induzieren. So haben Fallberichte gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von DPP4-Inhibitoren und der Entstehung des bullösen Pemphigoids (BP) besteht (52).

### 3.3.2 Bullöse Autoimmundermatosen

Zur Gruppe der bullösen Autoimmundermatosen werden verschiedene antikörpervermittelte Hauterkrankungen gezählt, die durch das Auftreten von Blasen und Erosionen der Haut und Schleimhäute gekennzeichnet sind (53). Typisch sind Autoantikörper gegen strukturelle Bestandteile der Haut. In Abhängigkeit von der Position der Zielstrukturen und der daraus resultierenden Spaltbildung werden zwei Erkrankungen unterschieden: die Pemphigoid- und die Pemphiguserkrankungen (54). Für die Pemphigoid-Gruppe ist eine subepidermale/-epitheliale Spaltbildung typisch. Zu dieser Gruppe werden u.a. das BP, das SHP oder die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) gezählt (55). Die Zielmoleküle der Pemphigoiderkrankungen liegen in der dermo-epidermalen Junktionszone. Während die Antikörper beim BP gegen die Proteine BP180 und BP230 gerichtet sind, stellen beim SHP zusätzlich Laminin 332 und Kollagen VII die Zielantigene dar. Die EBA ist durch Autoantikörper gegen Kollagen VII charakterisiert (56). Die Dermatitis herpetiformis Duhring, die kutane Manifestation der Zölliakie, zeichnet sich durch die Bildung von IgA-Antikörpern aus, welche gegen die epidermale und Gewebstransglutaminase gerichtet sind (57). Die beiden häufigsten Vertreter der Pemphigus-Gruppe sind der Pemphigus vulgaris und der Pemphigus foliaceus. Hierbei entstehen Antikörper, die gegen die intraepidermalen/-epithelialen Proteine Desmoglein 1 und 3 gerichtet sind. Die Desmogleine sind entscheidend für Zell-Zell-Kontakte. Ein Verlust dieser strukturbildenden Proteine führt zu intraepidermalem Haftverlust mit sich anschließender intraepidermaler/-epithelialer Spaltbildung (58).

### 3.4 Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid

Das SHP ist eine chronisch und progredient verlaufende blasenbildende Autoimmunerkrankung. Definitionsgemäß finden sich Autoantikörper gegen Bestandteile der dermo-epidermalen Junktionszone bei überwiegendem Schleimhautbefall (59). Am häufigsten sind die Mundschleimhaut und die Konjunktiva von Läsionen betroffen, aber auch die Haut und weitere Körperregionen können involviert sein (53). In der Mundhöhle treten Läsionen vor allem an der bukkalen Schleimhaut, am Gaumen und an der Zunge auf. Angriffsziele der Autoantikörper sind Strukturproteine der dermo-epithelialen Junktionszone (60). Zu diesen zählen BP180, BP230, Laminin 332, Typ VII Kollagen und möglicherweise  $\alpha 6\beta 4$  Integrin (56). Etwa 10 – 25 % der Patienten leiden hierbei unter einem Anti-Laminin 332 SHP (61). Die Inzidenz des SHP liegt bei ca. 2 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Einwohnern. Damit ist das SHP nach dem BP die zweithäufigste bullöse Autoimmundermatose in Zentraleuropa. Während das BP vor allem bei Patienten im Alter zwischen 66 und 83 Jahren auftritt, zeigt das SHP einen Altersgipfel von 60-65 Jahren. Eine erhöhte Inzidenz bei einem bestimmten Geschlecht konnte in den meisten Studien nicht registriert werden. Es gibt jedoch Anhaltspunkte, dass Frauen etwas häufiger betroffen sind (62,63).

#### 3.4.1 Basalmembranzone

Die BMZ der Haut wird auch als dermo-epidermale Junktionszone bezeichnet, und gewährleistet durch ihren speziellen Aufbau die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut (Abb. 1). Sie unterliegt einem ständigen *remodeling*, u.a. bedeutsam für proliferative Reparaturvorgänge. Außerdem beeinflusst sie die Differenzierung und Migration von Zellen. Die BMZ umfasst Hemidesmosomen sowie die *Lamina lucida*, die *Lamina densa* und die *Sublamina densa* der Basalmembran (64,65). Hemidesmosomen sind Strukturkomplexe, die aus verschiedenen Proteinen bestehen und basal liegende Keratinozyten mit tiefergelegenen Strukturen vernetzen. Desmosomen gewährleisten hingegen die Adhäsion der Keratinozyten untereinander (66,67). Es werden zwei Arten von Hemidesmosomen abgegrenzt. Typ I Hemidesmosomen finden sich in der

Epidermis und im Epithel. Ihre Stabilität basiert vor allem auf Verflechtungen verschiedener Transmembran- und Plaque-Proteine. Die 5 wichtigsten Strukturproteine stellen  $\alpha6\beta4$  Integrin, Plectin, Tetraspanin CD151 sowie BP180 und BP230 dar. Hemidesmosomen des Typ II sind im Gastrointestinaltrakt zu finden, ihnen fehlen BP180 und BP230 (68). Die hemidesmosomale Plaque setzt sich aus Plectin und BP230 zusammen. Intrazellulär gelegene Teile der Transmembranproteine  $\alpha6\beta4$  Integrin und BP180 bilden eine Brücke zur hemidesmosomalen Plaque, extrazelluläre Abschnitte sind in der *Lamina lucida* verankert (69). Die Verankerung der basalen Keratinozyten mit der Basalmembran der Haut und Schleimhaut wird zudem durch die Verbindung von  $\alpha6\beta4$  Integrin und Laminin 332 gefestigt (70). Laminin 332 wiederum stellt, über seinen Kontakt zu Kollagen VII, ein Bindeglied zu den inferior befindlichen Kollagenfibrillen dar (71). Basalmembranen sind mehrschichtige, aus extrazellulärer Matrix bestehende Einheiten, die verschiedene Gewebe vom unter ihnen befindlichen Parenchym abgrenzen. Wichtige Komponenten sind Kollagen IV, Laminine, Heparansulfat-Proteoglykane, Nidogene, Perlecan und Agrin. Neben dem Stabilitätserhalt der Haut übernehmen Basalmembranen auch weitere Funktionen. Sie sind dazu in der Lage, Wachstumsfaktoren und Zytokine zu speichern, und so beispielsweise Einfluss auf die Entwicklung von Tumoren zu nehmen (72).

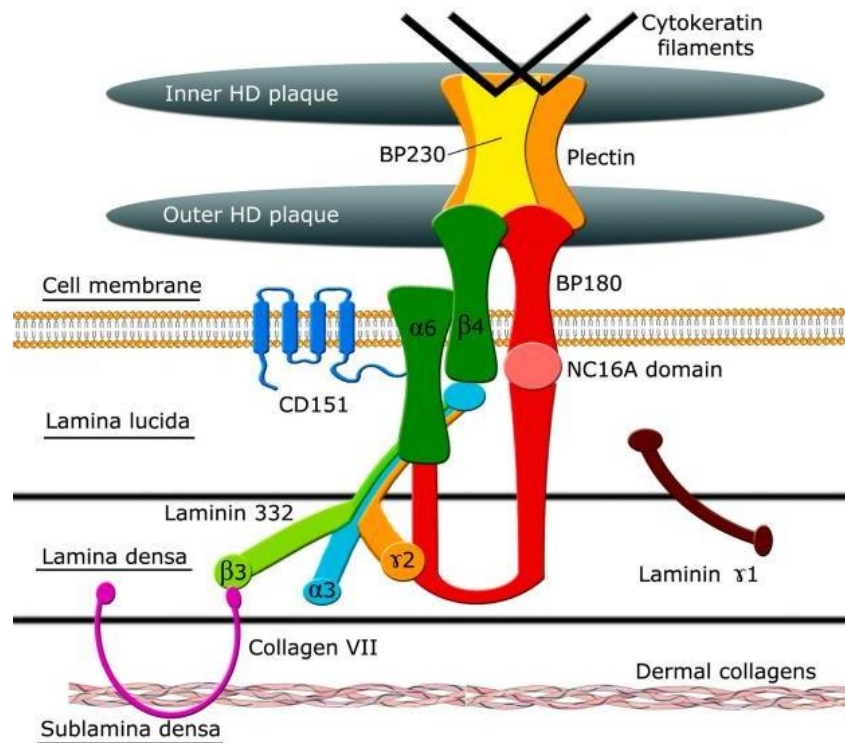


Abb. 1: Die BMZ von Haut und Epithelien mit Schwerpunkt auf der Darstellung des strukturellen Aufbaus der Zielantigene des Schleimhautpemphigoids (73).

### 3.4.2 Expression von Laminin 332

Laminin 332 (ehemals Laminin 5) stellt das Zielantigen des Anti-Laminin 332 SHP dar. Laminine sind Adhäsionsproteine, deren Aufbau auf einer Kombination aus einer großen  $\alpha$ -Kette sowie den kleineren  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten basiert. Angesichts unterschiedlicher genetischer Expressionen werden 11 Subtypen der Ketten differenziert, die zu 16 verschiedenen Subtypen der Laminine führen. Laminin 332 besteht demnach aus einer  $\alpha3$ -,  $\beta3$ - und  $\gamma2$ -Kette (74). Neben ihren strukturbildenden Eigenschaften interagieren Laminine mit Zellen und Mikroorganismen über mechanische und

biochemische Signalwege. So beeinflussen sie die Differenzierung, Organisation und Migration von Zellen (75). Laminin 332 wird von Keratinozyten und Fibroblasten produziert und findet sich in Haut und in von Plattenepithel bedeckter Schleimhaut (76). Neben dem SHP spielen Defekte im Laminin 332 auch in der Ätiologie der *Epidermolysis bullosa junctionalis*, einer genetisch determinierten blasenbildenden Hauterkrankung, eine Rolle (77). Außerdem konnte festgestellt werden, dass Laminin 332 vermehrt im Gewebe diverser Tumore detektierbar ist. Neben kutanen, kolorektalen oder lingualen Plattenepithelkarzinomen zeigten auch Harnblasen-, Brust-, Ösophagus- und Lungentumore eine vermehrte Expression von Laminin 332 (78). Zwar sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass u.a. eine fehlerhafte Prozessierung des Laminin 332, dessen zytoplasmatische Akkumulation sowie Interaktionen mit anderen Matrixmolekülen die Einwanderung von Krebszellen induzieren können (74,79). Die Akkumulation von Laminin 332 in den verschiedenen Krebsarten ist dabei mit einer schlechteren Krankheitsprognose und verstärkter Invasivität verknüpft (78).

### **3.4.3 Das Komplementsystem**

Das Komplementsystem setzt sich aus über 40 Serumproteinen zusammen (80). Diese werden als Vorläuferproteine größtenteils in der Leber synthetisiert und unter Einfluss bestimmter Stimuli in ihre aktive Form als Proteasen überführt. Diese setzen eine sich gegenseitig verstärkende Kaskade in Gang, die mit der Lyse der Zielzelle oder der Opsonierung von Pathogenen enden kann. Es existieren 3 Möglichkeiten, die in der Aktivierung der Komplementkaskade resultieren: der klassische, der alternative und der Lektin-Signalweg. Beim klassischen Weg führt die Bildung von Antigen-Antikörper (IgM, IgG) -Komplexen zur Exposition der Bindungsstelle des Komplementfaktors C1q, welcher ein Bestandteil des C1-Komplexes und der am Fc-Teil des Antikörpers lokalisiert ist. Dies mündet in einer Konformationsänderung des C1-Komplexes mit folgender Aktivierung von C1r und C1s. C1s spaltet anschließend C4 in C4a und C4b sowie C2 in C2a und C2b. Die beiden Komplementfaktoren C4b und C2a formieren im Anschluss die C3-Konvertase (C4b2aC3b). Diese spaltet C3 in C3a und C3b. Nach Spaltung von C5 in C5a und C5b bildet sich die C5-Konvertase (C4b2aC3b), die zusammen mit weiteren Komplementfaktoren die Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (C5bC6C7C8C9) ermöglicht (81). Wird der Membran-Angriffs-Komplex (MAC) in Zellmembranen integriert, kommt es zur Lyse oder Aktivierung der Zelle. Die verschiedenen Komplementfaktoren selbst haben immunmodulatorische Eigenschaften und können an spezifische Komplementrezeptoren binden. Diese Bindung resultiert bspw. in einer Zellaktivierung und -migration oder führt zur Regeneration von geschädigtem Gewebe sowie zur Phagozytose. Die Phagozytose kann z. B. über den Komplementrezeptor der Immunglobulin-Familie (CRIg-Rezeptor) nach Bindung von C3b erfolgen, der sich bspw. auf Makrophagen befindet (82). Der alternative Weg wird unabhängig von Antikörpern durch spontane Hydrolyse von C3 angetrieben und setzt sich in Folge wie der klassische Weg fort. Die Aktivierung des Lektin-Weges erfordert die Bindung von Lektin an Zuckerreste, die sich auf der Zelloberfläche von bestimmten Erregern befinden können (83). Lektine sind Transmembranproteine, die gehäuft auf Zellen des Immunsystems zu finden sind (84). Der Lektin-Weg mündet in der bereits zuvor beschriebenen Bildung des MAC (81). Eine überschießende Aktivierung des Komplementsystems oder eine fehlerhafte Regulation begünstigen das Auftreten von Autoimmunerkrankungen und generalisierten Entzündungen (83). Die vielschichtigen Wirkungsprofile der Komplementfaktoren nehmen in der Pathogenese von verschiedenen Krankheiten eine wichtige Rolle ein. Aus laborchemischer Sicht hat sich bspw. die Messung der Faktoren C3 und C4 im Blutplasma zur Diagnostik, zum Monitoring und zur Prognose des SLE etabliert (85).

### 3.4.4 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und die Pathogenese des SHP sind bisher noch nicht vollständig erklärt. Es gibt Hinweise, dass Patienten, die HLA-DR4 und HLA-DBQ1\*0301 exprimieren, genetisch prädisponiert für die Entwicklung der Erkrankung sein könnten (86,87). Autoreaktive CD4+-T-Lymphozyten sind in der Lage, verschiedene Epitope der Komponenten innerhalb der dermo-epidermalen Junctionszone zu binden, sodass es zum Verlust der Selbsttoleranz kommen kann. Nach Bindung der Antigene durch Autoantikörper entstehen Wechselwirkungen zwischen T- und B-Zellen über eine sogenannte „CD40/CD40-L-Interaktion“. Die B-Zellen produzieren IgG- und IgA-Autoantikörper, die spezifisch an die in Abschnitt 1.4.1 genannten Strukturen binden können. Dies führt zur Entzündung des betroffenen Gewebes durch infiltrative Migration von Lymphozyten, Mastzellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (88,89).

### 3.4.5 Klinik

Am häufigsten sind die Mundschleimhaut (ca. 80-95 %) und die Konjunktiva (ca. 40-60 %) betroffen, aber auch Haut, Nasenhöhle, Anogenitalregion, Pharynx, Speiseröhre, Larynx und Trachea können involviert sein (90). Die Symptomatik ist abhängig von Ausmaß und Lokalisation der Hautveränderungen. Im Mund zeigen sich schmerzhaft Erosionen und Blasen, die im Rahmen der chronischen Entzündung bis hin zum Zahnverlust führen können (Abb. 2).



**Abb. 2: bukkale erosive Schleimhautveränderungen eines Patienten mit SHP.**

Der Befall der Augen tritt häufig monookulär, aber auch bilateral auf. Frühsymptome sind Juckreiz, Brennen, verstärkter Tränenfluss und ein Fremdkörpergefühl als Zeichen einer rezidivierenden Konjunktivitis. Im Spätstadium und bei fehlender Behandlung kann es zur Bildung eines Symblepharons (Abb. 3) und schließlich durch Fibrose und Vernarbung zur Erblindung kommen.



**Abb. 3: okuläre Manifestation des SHP mit Zeichen einer Konjunktivitis und eines Symblepharons.**

Prädilektionsstellen der Hautläsionen stellen der Kopf, der Nackenbereich und der Oberkörper dar (Abb. 4) (91).



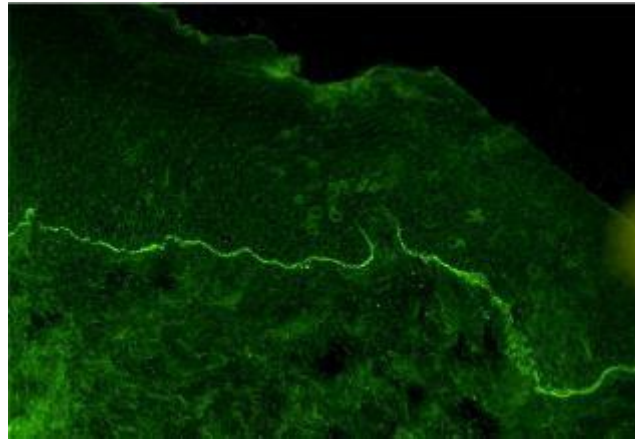
**Abb. 4: kutane Manifestation des Schleimhautpemphigoids am Rücken.** Es zeigen sich multiple erythematöse Erosionen, teilweise mit hämorrhagischen Krusten belegt, umgebend postinflammatorische Hyperpigmentierungen und Vernarbungen.

Ein genitaler Befall zeigt sich in Dysurie und Dyspareunie. Läsionen in der Speiseröhre können sich in durch Dysphagie erschwelter Nahrungsaufnahme und nachfolgendem Gewichtsverlust äußern. Ist der Kehlkopf betroffen, sind Heiserkeit bis hin zu Atemwegsobstruktionen möglich (92,93). Die verschiedenen Arten des SHP zeigen ein ähnliches klinisches Bild, wobei das des Anti-Laminin 332 SHP durch eine häufigere und schwerwiegendere Mundschleimhaut- und Augenbeteiligung gekennzeichnet ist. Eine große diagnostische Relevanz hat die Assoziation des Anti-Laminin 332 SHP als fakultativ paraneoplastische Erscheinung. Ca. ein Viertel der Patienten entwickeln nach Auftreten des Anti-Laminin 332 SHP eine maligne Erkrankung. Am häufigsten werden Lungen- und Magentumore diagnostiziert (94,95).

### **3.4.6 Diagnostik**

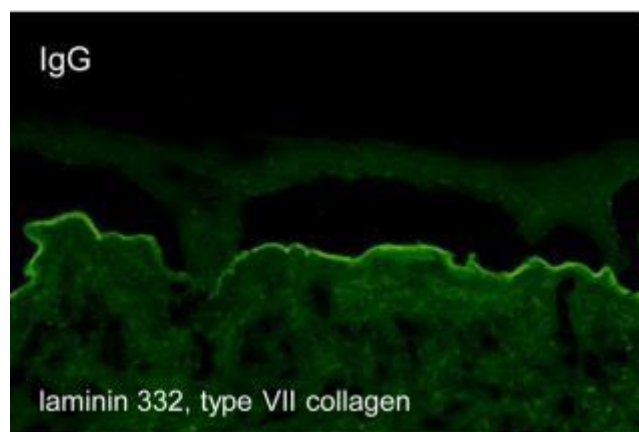
Die Diagnosestellung des Anti-Laminin 332 SHP erfordert ein Zusammenspiel klinischer und immunpathologischer Aspekte. Zum einen sind krankheitstypische Hautveränderungen mit einem dominierenden Schleimhautbefall zu berücksichtigen, wobei diese rein klinisch kaum von anderen

bullösen Hauterkrankungen zu unterscheiden sind (95,96). In der direkten Immunfluoreszenz (DIF) von Patientenbiopsien finden sich Ablagerungen von IgG und/oder IgA und/oder C3 (Abb. 5) (61).



**Abb. 5: direkte Immunfluoreszenz einer periläsionalen oralen Biopsie eines Patienten mit SHP.** Die vorliegende DIF zeigt lineare Ablagerungen von IgG in der Basalmembranzzone (73).

Als Entnahmestellen der Proben ist auch beim okulären SHP die Wangenschleimhaut aufgrund der erschwerten Probengewinnung aus der Konjunktiva zu favorisieren. Beim kutanen Befall haben sich perilesionale Biopsien etabliert (97). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die DIF, basierend auf der ersten Biopsie, nur eine Sensitivität von ca. 69 % zeigt. Wiederholte Biopsien bei den initial DIF-negativen Patienten führten schließlich zur Diagnose des SHP. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Durchführungen mindestens einer weiteren Biopsie nach initial negativer Probe (98). In 50 % der Fälle lassen sich Antikörper aus dem Serum der Patienten mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) detektieren. Hierfür wird mit 1 M NaCl-gespaltene menschliche Haut verwendet (Abb. 6). Sind Autoantikörper vorhanden, binden diese im Fall des Anti-Laminin 332 SHP an die dermale Seite des Hautspalts, dem sogenannten Blasenboden (97).



**Abb. 6: indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung von mit NaCl-gespaltener menschlicher Haut.** Es zeigen sich Ablagerungen von IgG-Autoantikörpern eines Patienten mit SHP am Boden des artifiziellen Spalts. Diese können gegen Laminin 332 oder Typ VII Kollagen gerichtet sein (73).

In der histologischen Untersuchung zeigt sich ein unspezifisches Bild in Form eines zumeist milden inflammatorischen Infiltrats mit verstärkter Einwanderung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten, zum Teil begleitet von einer Spaltbildung (99). Zur Feststellung des genauen Zielantigens kommen Verfahren wie die Immunpräzipitation oder Immunoblots

infrage (100). Ein vergleichsweise unkompliziertes Verfahren stellt der Immunoblot mit extrazellulären Komponenten kultivierter menschlicher Keratinozyten dar. Mithilfe von diesem sind die  $\alpha$ 3-,  $\beta$ 3- und  $\gamma$ 2-Ketten von Laminin 332 unabhängig voneinander nachweisbar (101). Die Durchführung dieser Methoden ist jedoch nur in spezialisierten Zentren möglich. Die Etablierung von kommerziellen ELISA-Tests zum Nachweis zirkulierender Anti-Laminin 332 Antikörper gestaltet sich als schwierig (97). 2018 wurde jedoch ein standardisiertes Verfahren veröffentlicht, das dem Nachweis von Anti-Laminin 332 IgG Antikörpern dient. Hierbei wurden HEK293 Zellen verwendet, an deren Zellmembranen rekombinantes Laminin 332 exprimiert wurde (94).

### **3.4.7 Therapie**

Eine spezifische Therapie für das Anti-Laminin 332 SHP ist bisher nicht etabliert. Die Behandlung richtet sich nach der Schwere der Symptome und Lokalisation der Läsionen. Klagen Patienten über leichte bis milde Symptome und weisen sie lediglich Veränderungen der Mundschleimhaut mit oder ohne Einbezug der Haut auf, kann man von „Low-Risk-Patienten“ sprechen. In diesem Fall kann die Behandlung mit topischen Glukokortikosteroiden begonnen werden und bei fehlendem Ansprechen bspw. auf eine zusätzliche orale Therapie mit Dapson, Tetrazyklinen oder oralen Glukokortikosteroiden eskaliert werden. Die Gruppe der „High-Risk-Patienten“ betrifft Patienten, bei denen ein konjunktivaler, laryngealer, ösophagealer und/oder genitaler Befall vorliegt. Neben einer typischen Kombination aus Dapson und oralen Glukokortikosteroiden kann auch eine immunsuppressive Therapie mit Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil und Cyclophosphamid sowie die Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIG) in Erwägung gezogen werden (61,102). Auch die off-label Therapie mit dem Anti-CD20 Antikörper Rituximab stellt eine Behandlungsoption dar. Hierbei scheint das Therapieansprechen beim SHP aber geringer als bei Erkrankungen der Pemphigus-Gruppe zu sein (86).

## **3.5 Mausmodelle**

### **3.5.1 Allgemein**

Tiermodelle, insbesondere unter Verwendung von Mäusen, stellen eine essenzielle Untersuchungsmöglichkeit der Kausalität von Autoimmunerkrankungen dar. Eine spezifische Diagnostik findet bei Patienten erst nach Auftreten klinischer Symptome statt. Zu diesem Zeitpunkt haben der Verlust der Selbsttoleranz sowie die primäre Aktivierung des Immunsystems bereits stattgefunden. Zudem erfordert die Symptomatik eine unverzügliche medikamentöse Therapie, sodass die folgende Effektorphase molekularbiologisch und klinisch nicht ohne externen Einfluss beurteilt werden kann. Dennoch ist zu betonen, dass die Immunsysteme von Maus und Mensch in Teilen voneinander abweichen. Gewonnene Daten aus Mausversuchen sind somit nicht direkt auf den Menschen übertragbar (103).

### **3.5.2 Mausmodelle für Pemphigoiderkrankungen**

In der Vergangenheit wurden verschiedene Mausmodelle zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen und Prozesse von Pemphigoiderkrankungen etabliert (104). Im Hinblick auf die EBA sind sowohl passive als auch aktive Mausmodelle beschrieben. Bei einem 2005 veröffentlichten sogenannten passiven Mausmodell konnte eine EBA durch Antikörperübertragung in Mäusen ausgelöst werden. Hierbei wurden zunächst Kaninchen mit verschiedenen Fragmenten des murinen Kollagen VII (mCOL7) immunisiert. Infolge wurden die von den Kaninchen produzierten Immunglobuline (IgG) verschiedenen Mausstämmen eingepflegt. Andere erhielten IgG von EBA-Patienten. Dies führte zur Ausprägung einer entsprechenden Klinik und Histologie mit

subepidermaler Spaltbildung. Zudem konnte im Rahmen eines aktiven Modells Mäuse mit verschiedenen Arten von murinem Kollagen VII immunisiert werden (105,106).

### **3.5.3 Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid Mausmodelle**

Auch für das SHP existieren Tiermodelle, bisher lediglich für das Anti-Laminin 332 SHP (105,107). Zum einen konnten Kaninchen mit aufgereinigtem Laminin 332, welches zuvor aus humanen Keratinozyten isoliert worden war, immunisiert werden. Das dadurch von den Kaninchen produzierte IgG konnte in neonatale Mäuse injiziert werden. Bei den Mäusen führte der Antikörpertransfer zu Blasenbildung innerhalb eines Tages. Korrelierend dazu wurden in der DIF Ablagerungen von IgG in der BMZ der Haut nachgewiesen. C3-Ablagerungen wurden hingegen nicht gefunden (108,109).

In einem 2017 veröffentlichten passiven Mausmodell des Anti-Laminin 332 SHP fielen bei adulten Mäusen neben IgG-Ablagerungen auch eine Anhäufung von C3 in der BMZ von Biopsien der periläsionalen Haut, der bukkalen Mukosa, der Konjunktiva, des Ösophagus und der Zunge auf. In diesem Modell wurden Kaninchen Antikörper gegen den C-terminalen (c-term, aa2756-3330) und den mittleren (mid, aa1656-1985) Teil des murinen Laminin  $\alpha$ 3 Proteins (mLAM $\alpha$ 3) verwendet. Nach Transfer der isolierten Antikörper in adulte Mäuse entwickelten diese nach 12 Tagen einen krankheitsspezifischen Phänotyp, der sich sowohl in der IF als auch in Histologie sowie in endoskopischen Untersuchungen spiegelte (110).

### **3.6 Fragestellung**

Die Ätiologie und Pathogenese des Anti-Laminin 332 SHP sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Das Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der folgenden wissenschaftlichen Fragestellungen. Inwieweit spiegelt das neue aktive Anti-Laminin 332 Mausmodell die Patientensituation mit Bezug zur diagnostisch relevanten IgG-, IgA- und C3-Ablagerung wider? Ist der klinische Phänotyp auch histologisch zu bestätigen? Welche Gewebe sind in dem Mausmodell betroffen? Korreliert dies mit der Patientensituation bzw. eröffnet das Mausmodell Anlass, bei Patienten auch andere Organe zu untersuchen, die bislang nur ungenügend bzw. keine Beachtung in der Diagnostik finden? Inwiefern beeinflusst die Standardtherapie mit Dapson die histologische und kutane Entzündungsreaktion der Mäuse? Ist das Mausmodell dadurch für die Testung neuer Therapieoptionen geeignet? Stellt die PDE4-Inhibierung eine mögliche neue Therapieoption dar? Die durchgeführten Versuche sollen Aufschluss darüber geben, welche Gewebe betroffen sein können unter Berücksichtigung möglicher medikamentöser Behandlungen.

Des Weiteren hat diese Arbeit den Zweck, das entzündliche Infiltrat jener betroffenen Gewebe zu charakterisieren, in dem die verschiedenen Entzündungszellen und die damit verbundene Ausschüttung von Zytokinen untersucht wurden.

Essenziell ist hierbei die Überprüfung, ob die in diesem Mausmodell erlangten Erkenntnisse auf die Patientensituation übertragbar sind. Die gewonnenen Ergebnisse könnten so zu einem besseren Verständnis hinsichtlich der Entstehung und des Verlaufs der Erkrankung führen, sowie als Basis für zukünftige Projekte und der Untersuchung medikamentöser Behandlungsmöglichkeiten dienen. Die zumeist schwerwiegende Klinik und der oftmals chronisch progrediente Verlauf unterstreichen die Wichtigkeit der Entwicklung neuer Strategien zur Diagnosefindung und Therapie des Anti-Laminin 332 SHP.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

Tabelle 1: verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
-80°C Gefrierschrank <i>Ultra Low Temperature Freezer C660 Premium</i>	New Brunswick Scientific, Stevenage, England
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Brutschrank	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Cryostat <i>Leica CM3050S</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar
Einbettungsstation <i>Tissue-Tek TEC 6 Embedding Console</i>	SakuraFinetek Europe B.V., Alphenaan den Rijn, Niederlande
ELISA-Reader <i>GloMax GM3000</i>	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Färbeautomat <i>Leica Autostainer XL</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar
Feinwaage <i>Analytical Plus</i>	Ohaus, Parsipanny, New Jersey, USA
Feuchtigkeitskammer	Werner Hassa, Lübeck
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop <i>BZ-9000</i>	Keyence, Neu-Isenburg
Geschlossener Gewebeeinfiltrationsautomat <i>Leica ASP300S</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar
Glaseindeckautomat <i>Leica CV5030</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar
Konfokalmikroskop	Olympus, Hamburg
Kühlplatte	Pfm medical, Köln
Lichtmikroskop	Helmut Hund, Wetzlar
Magnetrührer <i>Cole-Parmer™Stuart™</i>	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Waltham, USA
Microtom <i>Leica RM2255</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH Meter <i>pH 526</i>	WTW, Weilheim
Photometer <i>Biophotometer</i>	Eppendorf, Hamburg
Nanophotometer <i>NP80</i>	Implen GmbH, München
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe <i>Pipetus®</i>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Rüttler <i>KS250 basic</i>	IKA® -Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Sterilbank <i>Safe 2020</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Testplattenmischer <i>TPM 4</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex <i>Genie 2</i>	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Waage <i>Precision Standard</i>	Ohaus, Parsipanny, New Jersey, USA
Wasserbad	Medax GmbH & Co.KG, Neumünster
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: genutzte Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
1,5ml, 2ml Gefäße <i>Safe Seal Gefäß</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Biopsiebeutel <i>tissue specimen bags, smallsize</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Centricons <i>Amicon-Ultra 15</i>	Milipore, Pennsylvania, Bradford, USA
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Deckgläser 24x60mm	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen
Deckgläser 24x60mm	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Deckgläser rund, 10mm Durchmesser	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Dialysierschlauch <i>Membra Cell™, Cellu.</i>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Einbettkassetten	Medite GmbH, Burgdorf
Einbettmedium <i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i>	SakuraFinetek Europe B.V., Alphenaan den Rijn, Niederlande
Einbetttschälchen (Intermediate und Biopsy) <i>Tissue-Tek® Cryomold</i>	SakuraFinetek Europe B.V., Alphenaan den Rijn, Niederlande
Einmalküvetten <i>UV-Küvette micro</i>	Brand, Wertheim
Falcon	Sarstedt, Nürmbrecht
Färbeküvette	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Filterpapier (185mm Durchmesser)	Whatman™, Dassel
Klingen <i>Feather Microtome Blade R35/N35</i>	Pfm medical, Köln
Mikrotiterplatten <i>PS-Plate 96K non-binding</i>	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Objektträger <i>epredia Microscope Slides</i>	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Objektträger <i>Superfrost™ Plus Adhesion</i>	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitzen <i>Biosphere® Filter Tips</i> 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Platten für ELISA <i>F96 Cert. Maxisorp</i>	Nunc/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Protein-G-Resin	GenScript Corp., New Jersey, USA
Säulen	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Serologische Pipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nürmbrecht
Spritze 20ml <i>BD Discardit™ II</i>	Becton Dickinson, Bergen County, New Jersey, USA
Sterifilter <i>Minisart 0,22µm</i>	Sartorius stedim, Göttingen
Transferpipetten 1ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen T75cm <sup>2</sup> , T175cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nürmbrecht
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter, Krefeld

### 4.1.3 Lösungen und Chemikalien

Tabelle 3: verwendete Lösungen und Chemikalien

Chemikalien/Lösungen	Firma
1-Step™ Turbo TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA
4', 6-Diamidin-2-phenylindol <i>Fluoromount-G</i> ®	SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, USA
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniak 25%	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose, no Pyruvat	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Eindeckmedium <i>Surgipath Micromount</i>	Leica Biosystems, Richmond, Virginia, USA
Eosin	Waldeck GmbH & Co.KG, Münster
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 20% und ≥99,8%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 96% und Ethanol 70%	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Histofix® (4% Formaldehyd, phosphatgepuffert)	Carl Roth, Karlsruhe
Hydroxypropyl-methyl Zellulose (Methocel)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Normales Kaninchen Serum (NR IgG)	Eurogentec, Seraing, Belgien
orto-Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) 85%	Merck KGaA, Darmstadt
Papanicolaous Lösung 1 a Harris' Hämatoxylinlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin <i>Surgipath Paraplast Plus</i>	Leica Biosystems, Richmond, Virginia, USA
Phloxin B	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor <i>Halt</i> ™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Polyethylenglykol 20000	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Polyethylenglykol PEG 400	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail Set III, Animal Free	EMD Milipore Corporation, Darmstadt
Rinderserumalbumin, biotinfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Roflumilast	Sigma-Aldrich Chemie, München
Spüllösung <i>Ampuwa® Plastipur®</i>	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Tris-Base	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
<i>Tween</i> ® 20	Sigma-Aldrich Chemie, München
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen

### 4.1.4 Antikörper

Tabelle 4: verwendete Antikörper

Material	Verdünnung	Firma
Esel-Anti-Kaninchen IgG	1:500	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA

Esel Anti-Maus IgG FITC	1:1000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA
Ziege Anti-Maus C3 FITC	1:100	MP Biomedicals, Irvine, Kalifornien, USA)
Ziege Anti-Maus IgA FITC	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA

#### 4.1.5 Verwendete Kits

Tabelle 5: verwendete Kits

Bezeichnung	Firma
CXCL-2/MIP-2 DuoSet® ELISA	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
ProteomeProfiler Mouse XL Cytokine Array Kit	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Legendplex™ Multi-Analyte Flow Assay (Active/Total TGF-β1)	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Mykoplasmen-Detektions-Kit	Biontix, München

#### 4.2 Software

Tabelle 6: verwendete Software

Software	Version
BZ-Viewer und BZ-Analyser	Version 2.1
GraphPadPrism	Version 5.1
ImageJ Launcher	Freie Software
LegendPlex™ Data Analysis Software Suite (Qognit)	Abgerufen am 21.01.2022
Microsoft Word, Excel, PowerPoint	Microsoft Office 365
OLYMPUS Fluoview	Version 4.1

#### 4.3 Antikörper Aufreinigung

Tabelle 7: genutzte Puffer zur Antikörper Aufreinigung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Wasch-/Bindungspuffer	20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O, 0,15M NaCl, pH7
Glycinpuffer	0,1M Glycin pH 2,8
Neutralisationspuffer	1M Tris-Base, pH 9,0

Basis für die in diesem Abschnitt beschriebene Aufreinigung von IgG Antikörpern stellen drei unterschiedliche Kaninchenserum dar. So wurden zum einen Serum von Kaninchen verwendet, welche mit den Proteinen der mid (aa1656-1985) und c-term (aa2756-3330) mLAMα3 Kette immunisiert worden waren. Zum anderen wurden Serum von gesunden Kaninchen (Normal Rabbit IgG) sowie auch von mit mCOL7c (aa757-967) immunisierten Kaninchen genutzt. Die mCOL7c Serum wurden freundlicherweise von Dr. Katja Bieber und Prof. Dr. Ralf Ludwig zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigungen fanden gemäß den Angaben des Herstellers statt, wobei diese in geringem Ausmaß modifiziert wurden. Mithilfe von in Säulen befindlicher Protein G-Argarose erfolgte die Affinitätsaufreinigung der IgG Antikörper aus den Kaninchenserum. Zur Säuberung und Equilibrierung wurden die Säulen zunächst mit 0,1M Glycinpuffer, mit 1M NaCl und im Anschluss zweimalig mit Waschpuffer gewaschen. Die Kaninchenserum inkubierten folgend für mindestens 1

Stunde mit der Agarose auf einer Schwenkplatte bei 4°C. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Durchfluss verworfen und erneut mit Waschpuffer gewaschen bis eine Adsorption von unter 0,05 erreicht war, um anschließend, durch die Zugabe von 0,1M Glycin, die an die Matrix des Protein G gebundenen IgG Antikörper zu lösen. Hierbei ist zu beachten, dass der verwendete Glycinpuffer mit 2,8 einen niedrigen pH-Wert besitzt, um gebundene Antikörper von der Säule zu eluieren. Zur Verhinderung einer Denaturierung der Antikörper durch eine längere Expositionszeit gegenüber diesem sauren pH-Wert wurde im Auffanggefäß ein Neutralisationspuffer (pH 9,0) vorgelegt. Die Elution der Antikörper erfolgte bis zu einer Adsorption ( $A_{280}$ ) von 0,1. Der Neutralisationspuffer fand auch bei der folgenden Einstellung des pH-Werts des Eluats auf 7,0-7,2 Verwendung. Das Bestreben hinter den weiteren Schritten bestand zunächst in der Aufkonzentrierung des Eluats. So wurde dieses unter Zuhilfenahme von Dialyseschläuchen zunächst in Polyethylenglykol (PEG) gelegt, um das Volumen zu reduzieren, und anschließend dreimal in 5 Litern 1xPBS (*phosphate buffered saline*) für mind. 1 Stunde dialysiert. Bei 4000rpm und 4°C in Amicon Filtern wurde letztlich die benötigte Konzentration durch Zentrifugation eingestellt. Eine besondere Wichtigkeit lag auch in einem möglichst keimfreien Arbeiten, da das aufgereinigte IgG für Zellkulturexperimente eingesetzt werden sollte. Dazu wurde es mit einer Spritze und einem Spritzenfilter (0,22µm) steril filtriert. Mithilfe eines Nanophotometers (Wellenlänge von 280nm gegen PBS) und unter Berücksichtigung eines Korrektionskoeffizienten von 0,74 wurden die Konzentrationen der aufgereinigten Antikörper bestimmt.

#### **4.4 Histologische Färbungen**

Die Gewebeproben, welche für die Hämatoxylin-Eosin Färbung und die Immunfluoreszenz Mikroskopie verwendet wurden, stammen aus einem bisher unpublizierten aktiven Mausmodell für das SHP (siehe Abschnitt 5.1).

##### **4.4.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Das Einkapseln von in 4%igem Formaldehyd fixierten Gewebeproben ist eine Voraussetzung für deren darauffolgende Entwässerung. Dazu wurden mit der Probennummer sowie der Gewebeart beschriftete Einbettkassetten verwendet, welche mit Metalldeckeln verschlossen wurden. Es folgte eine Entwässerung über 14 Stunden im Gewebeeinfiltrationsautomaten *Leica ASP300S*. Die Entwässerung stellt eine wichtige Grundlage für das anschließende Einbetten der Proben in Paraffin mit Hilfe der *Tissue-Tek Embedding Console* dar. Die Ausrichtung der Proben im Paraffin erfolgte gemäß der erwünschten Schnittfläche. Um die entstandenen Paraffinblöcke am Microtom *Leica RM2255* schneiden zu können, wurden sie zunächst auf einer Kühlplatte (-10°C) abgekühlt. Von diesen wurden 4.5µm dicke Schnitte aus mind. 3 Ebenen und mit einem Abstand von knapp 100µm erstellt. Anschließend wurden die fertigen Schnitte im Brutschrank bei 78°C für mind. 20 Minuten inkubiert, um überschüssiges Paraffin zu entfernen. Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden zunächst verschiedene Färbelösungen hergestellt, welche sich wie folgt zusammensetzten: Eosinstammlösung 1% (5g Eosin auf 500ml Aqua dest.), Phloxinstammlösung 1% (5g Phloxine B auf 500ml Aqua dest.), Eosingebrauchslösung (100ml Eosinstammlösung 1% + 10ml Phloxinstammlösung + 730ml 96% Alkohol 3 ml Eisessig), Essigsäurealkohol (800ml 96% Alkohol + 40ml Eisessig) und Ammoniakwasser (800ml Aqua dest. + 33 Tropfen 25% Ammoniak). Die Färbung der Schnitte erfolgte nach Standardprotokoll im Färbeautomaten *Leica Autostainer XL*, das Auftragen der Deckgläser durch den Glaseindeckautomat *Leica CV5030*. Die Mikroskopie der Gewebe fand am Lichtmikroskop statt.

#### **4.4.2 Quantifizierung des entzündlichen Infiltrats und der Spaltlänge**

Um zu untersuchen, ob die Ablagerungen von IgG, IgA bzw. C3 in der BMZ zur Ablösung des Epithels (Spaltbildung) und/oder zu einer Entzündungsreaktion führten, wurde ein „semi-quantitatives Bewertungsverfahren“ (111) verwendet: 0=keine, 1=geringe, 2=mittlere, 3=sehr hohe Anzahl an Entzündungszellen, wobei feiner Abstufungen für Grenzbewertungen mit je +/- 0,5 möglich waren. Die Bewertung erfolgte verblindet. Zur Beurteilung der Spaltbildung wurde ein Scoring-System nach Heppe et al. verwendet. Hierbei werden für die palpebralen Konjunktiven je nach Länge der Spaltbildung Scores von 0-4 vergeben: 0=keine Spaltbildung, 1=Spaltbildung kleiner 100µm, 2=Spaltbildung kleiner 200µm, 3=Spaltbildung kleiner 300µm und 4=Spaltbildung größer als 300µm (110). Zudem mussten folgende Kriterien bestehen, damit der Spalt als solcher berücksichtigt werden konnte: Zum einen musste dieser krankheitstypisch zwischen der Epidermis und Dermis positioniert sein. Außerdem durfte sich der Spalt nicht an den beiden Enden des Schnittes befinden, da dieser sonst ein Artefakt des Schneidevorganges in Folge einer abgerissenen Konjunktiva darstellen könnte. Gemäß diesem Vorgehen wurde auch die Spaltbildung in anderen Geweben beurteilt.

#### **4.4.3 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz Mikroskopie**

Die Gewebeproben der verschiedenen Kohorten, welche im -80°C Gefrierschrank lagerten, wurden unter Berücksichtigung der benötigten Schnittfläche in *Tissue-Tek*® *Cryomold* Kryoeinbettenschälchen unter Verwendung von *Tissue-Tek*® *O.C.T. Compound* eingebettet und durch Lagerung auf Trockeneis gefroren. Aus den so gefertigten Gewebelöcke wurden am Cryostat *Leica CM3050S* Schnitte mit einer Dicke von 6µm hergestellt. Dabei wurden immer vier Schnitte auf die beschrifteten Objektträger *Superfrost*® *Plus* aufgetragen.

Die so gefertigten Kryoschnitte konnten nun für die hier beschriebene DIF verwendet werden. Diese wurden mit FITC-markierten polyklonalen Anti-Maus C3, Anti-Maus IgA und Anti-Maus IgG (Tabelle 2.4) Antikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS auf dem Rüttler *KS250 basic* für jeweils 15 Minuten. Die Zellkerne in den verschiedenen Geweben wurden mit DAPI-Fluoromount (Tabelle 2.3) angefärbt.

#### **4.5 Kultivierung und Charakterisierung der verwendeten Zelllinie**

Die verwendeten C5N immortalisierten murinen Keratinozyten wurden freundlicherweise von Dr. Allan Balmain (USA, verteilt von Dr. Christina Seebode, Universität Rostock) bereitgestellt. Die Keratinozyten wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) in T75 Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Wöchentlich erfolgte eine Passage der Zellen, wobei diese mit Trypsin-EDTA (*ethylen diamine tetraacetic acid*) für 10 Minuten abgelöst wurden und die mit 10% FCS gestoppt wurde, um die Zellen ernten zu können. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200rpm für 6 Minuten. Die als Pallets befindlichen Keratinozyten konnten schließlich im Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:40 zwecks zukünftiger Verwendung ausgesät werden. Ein Test auf Mykoplasmen vor und nach den Versuchen diente zur Erhöhung der Sauberkeit des Versuches.

##### **4.5.1 Fluoreszenznachweis der Bindung von Anti-mLAMA3 IgG und Anti-mCOL7c IgG an kultivierten Keratinozyten**

Zunächst wurden die Keratinozyten unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert und im Anschluss verdünnt, so dass 1x10<sup>5</sup> Zellen in jeweils ein Well einer 12-Well-Platte pipettiert werden konnten. Nachdem die Zellen bis zu 90% Konfluenz gezeigt hatten, folgten ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS und die Fixierung in Formalin. Die Inkubation über Nacht mit

biotinfreiem 3% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS hatte das Ziel, eine nachfolgende spezifischere Bindung zu ermöglichen, indem unspezifische Bindungsstellen geblockt wurden. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Keratinozyten inkubierten anschließend pro Well mit 6mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG, normalem Kaninchen IgG, 0,5mg Anti-mCOL7c IgG oder mit 6mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 + dem PDE4-Inhibitor Roflumilast (5mg/ml) für mind. 2 Stunden bei 37°C. Die Co-Inkubation mit Roflumilast sollte hierbei eine verminderte Bindungsfähigkeit des Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an die Keratinozyten durch den PDE4-Inhibitor ausschließen. Ein weiterer dreimaliger Waschschrift mit PBS wurde durchgeführt, dem eine Inkubation der Zellen mit dem Detektionsantikörper Esel Anti-Kaninchen IgG AlexaFluor594 in PBS für 1 Stunde bei 37°C folgte. Um überschüssige, ungebundene Zweitantikörper loszulösen, wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellkerne konnten im Anschluss mit DAPI-Fluoromount (Tabelle 2.3) angefärbt und die Objektträger mithilfe dessen eingedeckelt werden. Der Nachweis der Bindungen und deren fotografische Dokumentation geschah am Fluoreszenzmikroskop *Keyence BZ-9000* unter Benutzung des *BZ-Viewers* sowie am konfokalen Fluoreszenzmikroskop *Olympus IX81* mithilfe des Programms *Olympus Fluoview* (Tabelle 2.1 & 2.6).

#### 4.5.2 Proteinexpressionen nach Anti-mLAM $\alpha$ 3-IgG Bindung an Keratinozyten sowie Wirkung des PDE4-Inhibitors

Dieser Versuchsteil diente dem Nachweis vom *CXC motif chemokine ligand 2 (CXCL2)* sowie diverser, intrazellulär von Keratinozyten gebildeter Entzündungsmediatoren im Zellkulturüberstand behandelter Keratinozyten. Murine Keratinozyten wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  pro Well in eine 12-Well Platte ausgesät und für die Dauer von 24 Stunden wie unter 2.6.1 beschrieben behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden nach Inkubationszeit und dreimaligem Waschen mit DPBS abpipettiert und mögliche Zellreste im Überstand abzentrifugiert. Genutzt wurden die Zellkulturüberstände zur Quantifizierung von CXCL2 mittels ELISA und der Bestimmung verschiedener Entzündungsmediatoren unter Verwendung eines DotBlots. Diese Experimente fanden gemäß den Protokollen der Hersteller statt. Die behandelten Zellen wurden in 100 $\mu$ l/Well Lysispuffer mit 10 $\mu$ l Proteininhibitor Cocktail III und 10 $\mu$ l Kinaseinhibitor resuspendiert. Mittels BSA Assay wurde die Proteinkonzentration der Lysate colorimetrisch ermittelt. Je 100 $\mu$ g der Zelllysate wurden im DotBlot Assay nach Herstellerangaben eingesetzt, um verschiedenste intrazelluläre Entzündungsmediatoren der Keratinozyten zu quantifizieren. Die Auswertung des DotBlots erfolgte mittels ImageJ über die *integrated density* der jeweiligen Spots auf den Zellmembranen. Insgesamt konnten so 111 Mediatoren in Doppelbestimmung überprüft werden.

#### 4.6 Doppelfärbung

Tabelle 8: verwendete Antikörper

Material	Verdünnung	Firma
Hamster Anti-Maus-CD11 Alexa Fluor® 594	1:500	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ratte Anti-Maus-CD19 Alexa Fluor® 594	1:500	
Ratte Anti-Maus-CD3 Alexa Fluor® 594	1:500	
Ratte Anti-Maus-F4/80 Alexa Fluor® 594	1:500	
Ratte Anti-Maus-Ly-6G Alexa Fluor® 594	1:500	

Ratte-Anti-Maus-CD22 <i>Alexa Fluor</i> <sup>®</sup> 594	1:500	
Kaninchen Anti-Maus CX3CR1 <i>Alexa Fluor</i> <sup>®</sup> 594	1:500	
Ziege Anti-Kaninchen IgG FITC <i>Alexa Fluor</i> <sup>®</sup> 594	1:100	

Zu Beginn wurden die in Tabelle 2.7 gelisteten Antikörper separat auf die verschiedenen Gewebeproben aufgetragen, für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer inkubiert und im Anschluss dreimal für jeweils 5 Minuten mit DPBS gewaschen. In Folge wurden die Proben mit dem Kaninchen-Anti-Maus CX3CR1 Antikörper versehen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um danach erneut einen dreimaligen Waschschrift mit DPBS à 5 Minuten zu durchlaufen. Der sekundäre Ziege Anti-Kaninchen IgG FITC diente zur Fluoreszenzmarkierung des CX3CR1 Antikörpers und wurde analog zu den anderen Antikörpern auf die Schnitte aufgebracht. Erneut wurden die Proben mit DPBS gewaschen. Es folgte die Eindeckelung mit DAPI-Fluoromount (Tabelle 2.3) und die Lagerung über Nacht bei 4°C vor der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.

#### 4.7 Durchflusszytometrischer Nachweis von TGF-in Mausseren

Zum Nachweis des *transforming growth factor β1* (TGF-β1) sowie dessen aktiver Form (*active TGF-β1*) wurden Mausseren der Vehikel-, PDE4-Inhibitor- und Dapson-Behandlungs-, sowie der Adjuvanz-Kohorte verwendet, die mithilfe eines sogenannten LegendPlex analysiert wurden. Dieser wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, jedoch mit der Abweichung, dass von den Reagenzien lediglich die Hälfte genommen wurde (ausgenommen des Standards). Die Messung erfolgte am MacsQuant mit freundlicher Unterstützung von Dr. Anika Kasprick (Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck).

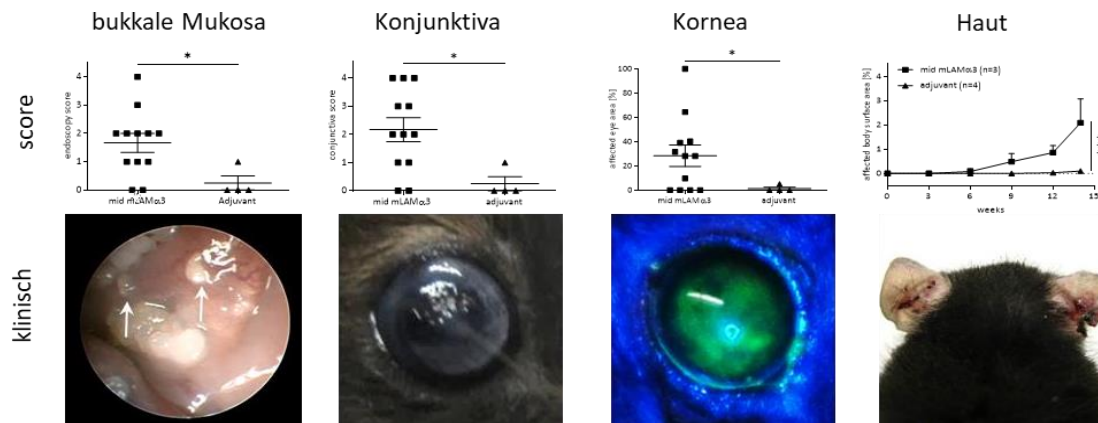
#### 4.8 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen wurde GraphPadPrism verwendet. Der Stichprobenumfang (n), die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) und das im Einzelfall verwendete statistische Analyseverfahren sind bei den jeweiligen Abbildungen aufgeführt. Für alle Datensätze erfolgte zunächst eine Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Eine statistische Analyse von metrischen Datensätzen mit bestätigter Normalverteilung wurde über einen t-Test bei zwei Gruppen und über einen One-way ANOVA bei mehreren Gruppen vorgenommen. Bei Vorliegen einer dritten Variablen, wie bspw. die Zeit, wurden statistische Unterschiede mittels Two-way ANOVA untersucht. Der Turkey's multiple comparison Test wurde bei der Analyse mehrerer Gruppen als Post-Hoc-Test verwendet. Ordinale, nicht-parametrische Datensätze, welche z.B. kategorisch und semi-quantitativ entzündliche Infiltrate bewerten sollten, wurden statisch über einen Kruskal-Wallis-Test durch einen One-way ANOVA on-ranks Test und beim Vorliegen mehrerer Gruppen mit anschließendem Student-Newman-Keuls Post-Hoc-Test ausgewertet. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert mit Standardabweichung, wobei ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant angesehen wird.

## 5 Ergebnisse

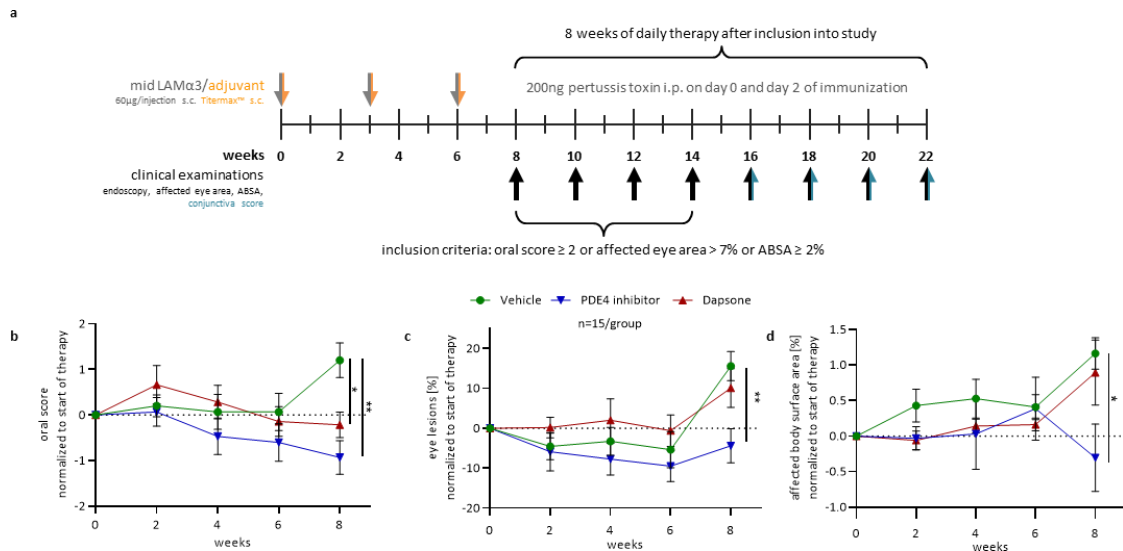
### 5.1 Vorarbeiten

Grundlage der vorliegenden Ergebnisse bildeten bislang unpublizierte Vordaten, welche von Dr. Sabrina Patzelt (LIED) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt erarbeitet wurden. Hierbei wurde ein aktives Mausmodell für das SHP in B6.S Mäusen durch Immunisierung entwickelt und validiert. Durch Immunisierung der Mäuse mit einem 1:1 Gemisch aus mid mLAMA3 Protein und dem Adjuvanz Titermax kann so ein klinischer Phänotyp in Mäusen nach etwa 8 Wochen erzeugt werden. Die Mäuse zeigten dabei Läsionen an der bukkalen Mukosa, der Konjunktiva und auch der Kornea/Bindehaut. Bei etwa 20% der Mäuse zeigten sich Hautläsionen (Abb.7).



**Abb. 7: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung gewebespezifischer Scores sowie jeweils repräsentative klinische Auffälligkeiten im aktiven Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid Mausmodell.** Obere Spalte von links nach rechts: Im Rahmen endoskopischer Untersuchungen der bukkalen Mukosa konnte eine signifikante Erhöhung des Scores bei den immunisierten und damit erkrankten Mäusen (Vehikel-Kohorte) im Vergleich zur gesunden Adjuvans-Kohorte festgestellt werden. Gleiches gilt sowohl für den Konjunktiva-Score als auch für die prozentual betroffene läSIONALE Fläche im Bereich des Auges. Bei Betrachtung der Haut wird deutlich, dass circa 6 Wochen nach Immunisierung die Mäuse mit zunehmender Zeit signifikant mehr Hautläsionen aufwiesen als die Adjuvanz-Mäuse. Die statistische Signifikanz zwischen der Vehikel- und der Adjuvanz-Kohorte wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem unkorrigierten Dunn-Post-hoc-Test berechnet. Die Graphen zeigen für die beiden Kohorten (X-Achse) die jeweiligen Scores. Die Linien stellen Mittelwerte  $\pm$  standard error of the mean (SEM) dar. Die untere Spalte stellt von links nach rechts die folgenden repräsentative Aufnahmen dar: Endoskopische Untersuchung der bukkalen Mukosa mit Blasenbildung einer erkrankten Maus. Okuläre Aufnahme mit beginnender Narbenbildung. Mit Fluoreszin angefärbte Hornhaut mit Darstellung des betroffenen Areal (grün) unter Blaulicht. Erosive, teilweise mit hämorrhagischen Krusten belegte Läsionen sind aurikulär zu sehen. In dem exemplarisch gewählten endoskopischen Bild verweisen Pfeile auf mukosale Läsionen.

In einem weiteren Schritt wurde dieses Mausmodell in der vorliegenden Arbeit angewandt, um zu überprüfen, ob es sich zur Erprobung neuer Therapieoptionen einsetzen lässt. Dafür wurden die Mäuse ab einem definierten Schweregrad in die folgenden Gruppen eingeteilt: Behandlung mit Dapson, als Referenztherapie, Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor Roflumilast, als mögliche neue Therapieoption, Behandlung mit dem Lösungsmittel, als Positivkontrolle. Mäuse, die nur mit dem Adjuvans und dem Lösungsmittel des Proteins immunisiert wurden, dienten als Negativkontrollen. Die Behandlung erfolgte für 8 Wochen und die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Abb. 8 dargestellt. Die Gewebeproben, welche im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, stammen von hier verwendeten Mäusen und wurden freundlicherweise von Frau Dr. Sabrina Patzelt zur Verfügung gestellt.



**Abb. 8: Das neu entwickelte Mausmodell als Möglichkeit zur Erprobung neuer Behandlungsstrategien.** **a**, Graphischer Überblick über verschiedene Therapiemethoden. Mäuse (n=15/Gruppe) wurden mit 5mg/kg/Tag PDE4-Inhibitor, 100mg/kg/Tag Dapsone, einer Kombination aus PDE4-Inhibitor und Dapsone in gleicher Dosierung, oder einem gleichen Volumen des Vehikels p.o. therapiert. Die Einteilung der einzelnen Mäuse erfolgte nach dem Zufallsprinzip jeweils in die Behandlungsgruppen, wenn sie zwischen Woche 8 und Woche 14 einen oralen Score von 2 oder Augenläsionen von über 7 % oder eine betroffene Körperoberfläche von 2 % aufwiesen. PDE4, Phosphodiesterase 4; p.o., per oral; NR IgG, normales Kaninchen-IgG; s.c., subkutan; ABSA, betroffene Körperoberfläche. **b**, Der orale Score wurde für jede Maus innerhalb der Versuchsgruppen auf den Beginn der Therapie normalisiert. Mäuse, die Dapsone ( $p=0,0112$ ), einen PDE4-Inhibitor ( $p=0,0012$ ) oder die Kombinationstherapie ( $p<0,0001$ ) erhielten, zeigten weniger orale Läsionen. Die Linien stellen Mittelwerte  $\pm$ sem dar. Die Bestimmung der statistischen Signifikanz zwischen den Vehikel- und Behandlungsgruppen erfolgte mit Hilfe der Two-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (Tag 8,  $p=0,0058$ ; Tag 12  $p=0,0002$ ). **c**, dargestellt ist der prozentuale läsionale Befall der Bindehaut über die Zeit. **d**, Der prozentuale Anteil am Körper der Maus, der Hautläsionen aufwies, wird als betroffene Körperoberfläche im Zeitverlauf dargestellt. Die Linien stellen Mittelwerte  $\pm$ s.d. dar. Die statistische Signifikanz zwischen der PDE4-Inhibitor- und der Vehikelgruppe wurde mit Hilfe einer Two-Way-ANOVA mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest ermittelt (Tag 8,  $p=0,0058$ ; Tag 12  $p=0,0002$ ).

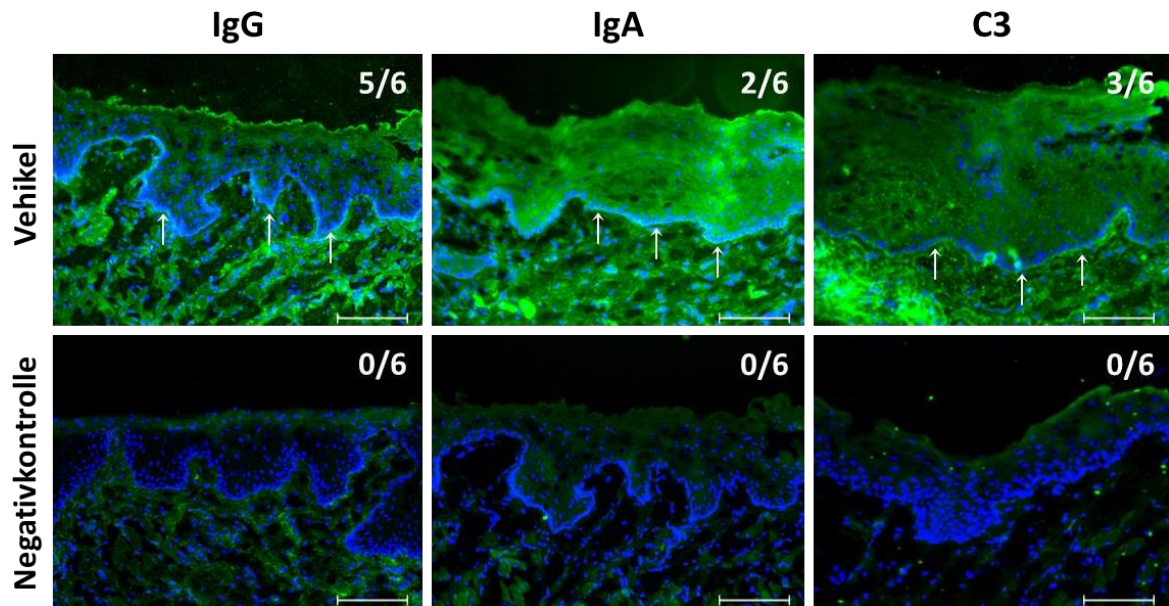
## 5.2 Lineare Ablagerungen von IgG, IgA und C3 in verschiedenen Geweben im aktiven Laminin 332 Schleimhautpemphigoid Mausmodell

Charakteristisch für das SHP sind lineare Ablagerungen von IgG, IgA und/oder C3 in der BMZ, nachweisbar durch eine DIF (59). Diesbezüglich wurden in dieser Arbeit DIFs anhand verschiedener Biopsien durchgeführt und gegenübergestellt, um potenziell betroffene Gewebe und Organe zu detektieren. Die Proben stammten sowohl von am Anti-Laminin 332 SHP erkrankten (Vehikel-Kohorte) als auch von gesunden Mäusen (Negativkontrolle). Gewebe, bei denen in den Vorarbeiten der klinische Score eine makroskopische Verbesserung durch eine der Behandlungen ergab (siehe Abb. 8), wurden ebenfalls auf lineare Ablagerungen überprüft. Dies diente der Untersuchung, ob ein vermeintlicher Heilungseffekt in einer verringerten Autoantikörper- und/oder Komplement-Ablagerung begründet sein könnte. Es wurden größtenteils Gewebeproben von 6 zufällig ausgewählten Versuchstieren pro Kohorte untersucht. Im Fall der Trachea waren es 4, bei der Lunge 4 in der Vehikelkohorte und 1 Probe in der Negativkontrolle. Im Hinblick auf die periläsionale Haut wurde 1 Probe in der Negativkontrolle berücksichtigt, für die Organe Milz, Herz, Niere und Leber standen jeweils 3 Proben zur Verfügung. In allen Fällen wurde 1 Gewebeprobe pro Tier untersucht.

### 5.2.1 Bukkale Mukosa und Zungenschleimhaut

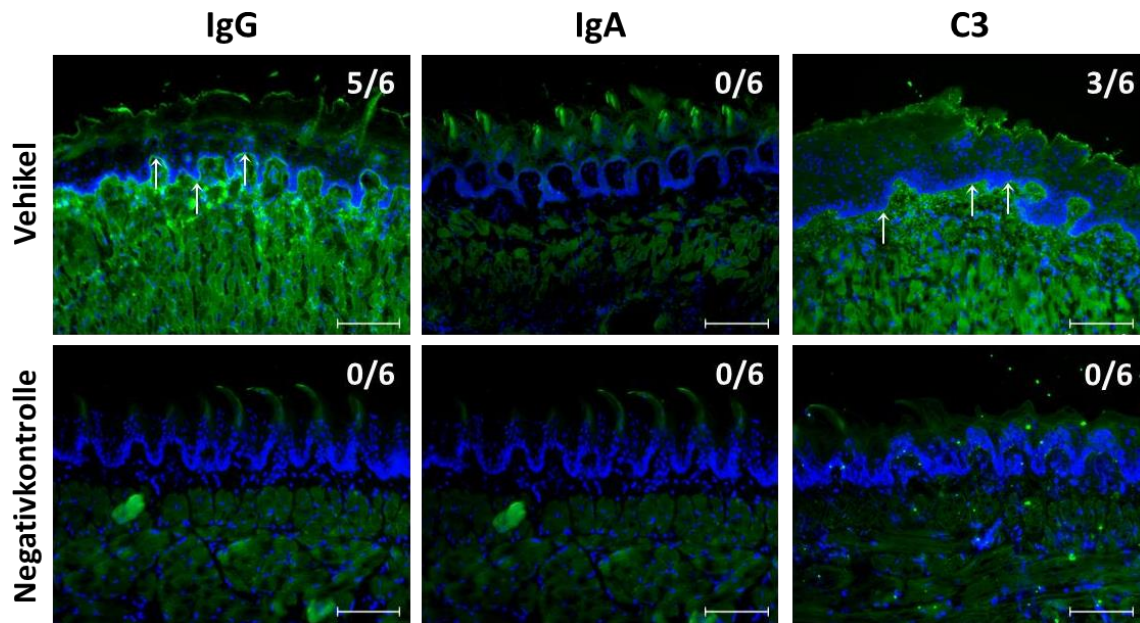
Die Mundschleimhaut stellt mit ca. 96% den häufigsten Manifestationsort des SHPs dar (90). Bei Betrachtung der bukkalen Mukosa konnte in der Vehikel-Gruppe in 5/6 Proben eine Deposition von IgG, in 2/6 von IgA und in 3/6 von C3 nachgewiesen werden. Hiervon zeigten sich 2 Proben dreifach

positiv, eine Probe doppelt positiv für IgG und C3 sowie eine Probe lediglich positiv für IgG. Die Negativkontrolle blieb, wie auch eine Gewebeprobe der Vehikel-Kohorte, unauffällig. Die Überprüfung der endoskopischen Aufnahmen dieser Vehikel Maus zeigte, dass jene erwartungsgemäß auch keine oralen Läsionen aufwies. Zu erwähnen ist zudem auch eine ausgeprägte Hintergrundfärbung (Abb. 9).



**Abb. 9: direkte Immunfluoreszenz der bukkalen Mukosa in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** Subepithelial konnten in der Vehikel-Kohorte (n=6) im Gegensatz zur Negativkontrolle (n=6) lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden werden. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

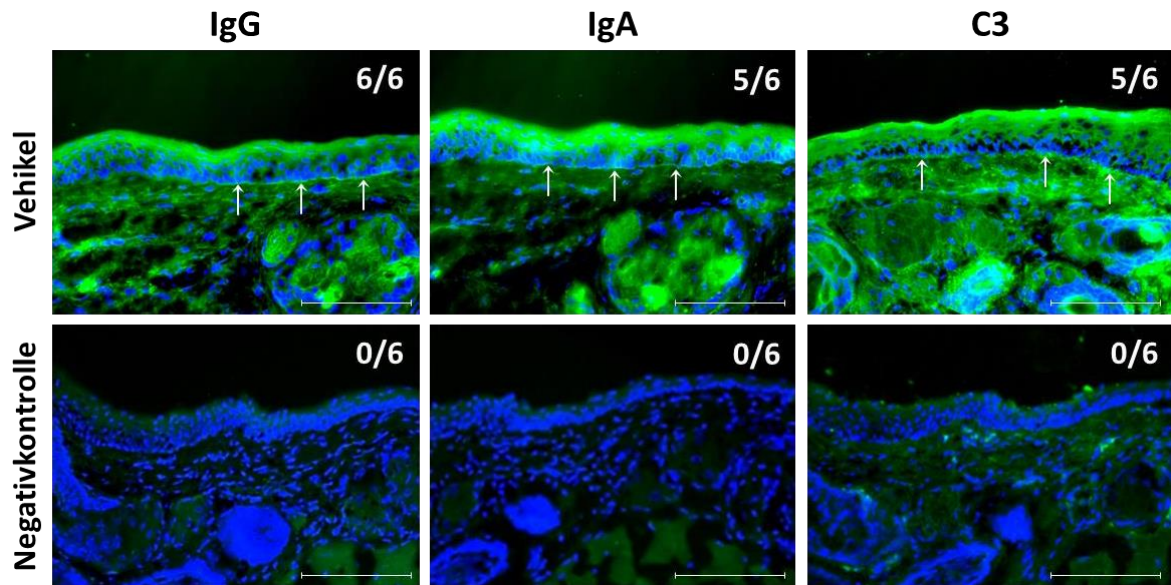
Hinsichtlich der Zungenschleimhaut fiel auf, dass in der Vehikel-Kohorte zwar die DIFs für IgG (5/6) und C3 (3/6) positiv ausfielen, hinsichtlich IgA in allen Proben jedoch negativ (0/6). In 3 Proben fanden sich Ablagerungen von IgG und C3, in 2 weiteren fiel nur IgG auf. Eine einzelne Probe zeigte keine Auffälligkeiten. Die Negativkontrollen zeigten keine Ablagerungen (Abb. 10).



**Abb. 10: direkte Immunfluoreszenz der Zungenschleimhaut in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** Basal des Epithels wurden in der Vehikel-Kohorte (n=6) zwar lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG und C3 gefunden, jedoch nicht von IgA. Die Negativkontrolle (n=6) zeigte keine Auffälligkeiten. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

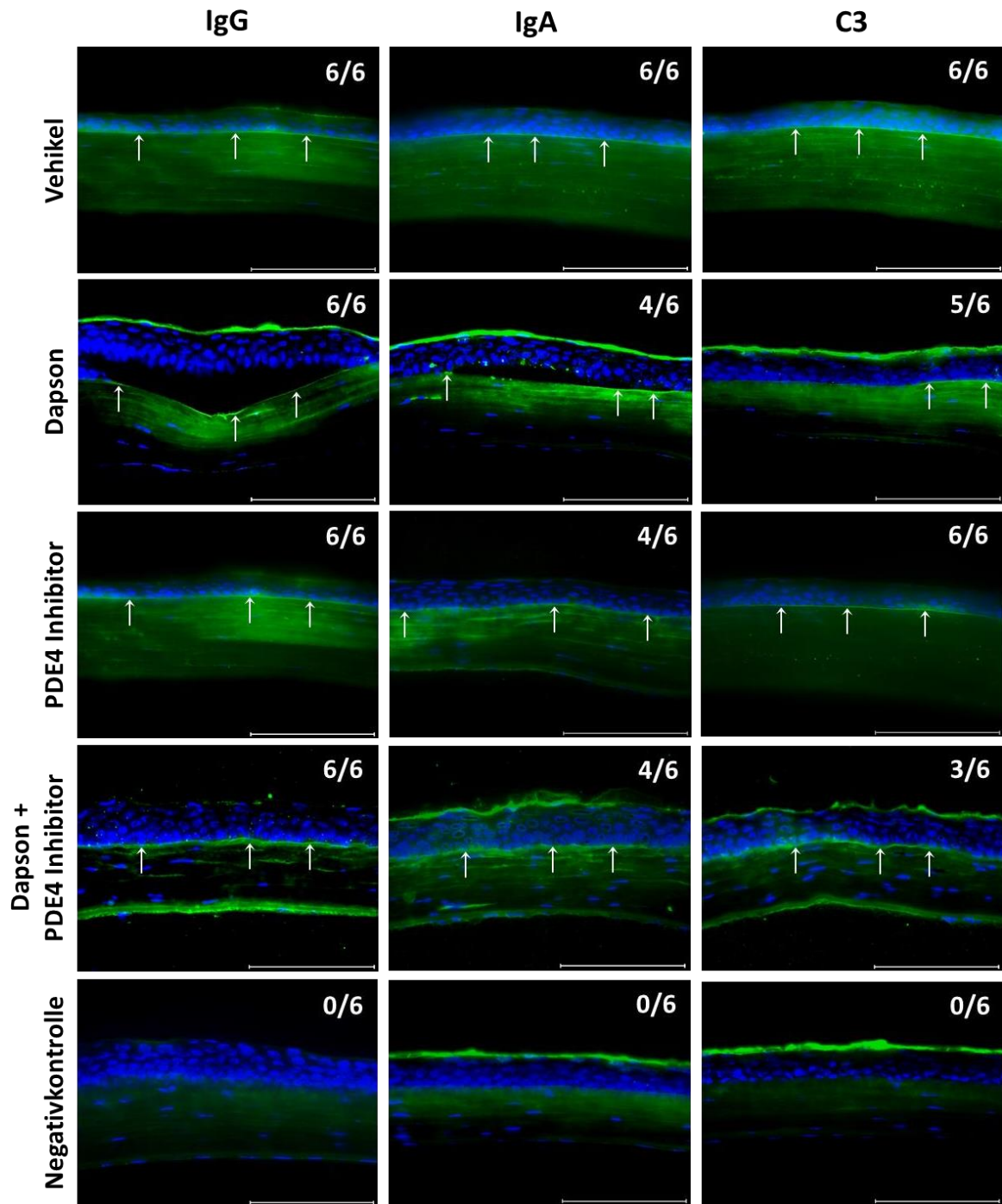
### 5.2.2 Palpebrale Konjunktiva und Kornea

Läsionen am Auge sind bei ca. 40% der Patienten mit Anti-Laminin 332 SHP zu finden (90). Die folgenden DIFs stammen von Biopsien der murinen palpebralen Konjunktiva und der Kornea. Abb. 11 zeigt DIFs der Vehikel-Kohorte und der Negativkontrolle. Hierbei wurden jeweils 6 Tiere pro Gruppe untersucht (n=6). In der Vehikel-Kohorte wurden bei 6/6 Mäusen lineare subepitheliale IgG-Ablagerungen gefunden, 5/6 zeigten ein entsprechendes Bild für IgA und C3. Von diesen Proben stellten sich 4 jeweils dreifach positiv dar, wohingegen bei einer Probe lediglich IgG und IgA gefunden wurden. Bei einer einzelnen Maus fehlte ausschließlich IgA. In der Negativkontrolle konnten erwartungsgemäß keine Auffälligkeiten gefunden werden (0/6).



**Abb. 11: direkte Immunfluoreszenz der Konjunktiva in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** Basal des Epithels konnten in der Vehikel-Kohorte (n=6) lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden werden. Die Negativkontrolle (n=6) blieb negativ. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

Im Hinblick auf die DIFs der Kornea wurden neben der Vehikel- und Negativkohorte auch 3 verschiedene Behandlungsgruppen erkrankter Mäuse untersucht, da sich in dem Mausversuch eine klinische Verbesserung der kornealen Läsionen gezeigt hatte (siehe Abb. 12). Die Mäuse wurden entweder mit Dapson, dem PDE4-Inhibitor Roflumilast oder einer Kombinationstherapie aus Dapson und PDE4-Inhibitor behandelt. Bei den unbehandelten erkrankten Mäusen fielen in 6/6 Fällen subepitheliale Ablagerungen jeweils für IgG, IgA und C3 auf. In den Behandlungsgruppen fielen geringfügig weniger positive DIFs auf. Die mit Dapson behandelten Mäuse wiesen für IgG in 6/6, für IgA 4/6 und C3 5/6 Proben ein positives Ergebnis auf. Hiervon zeigten 3 Proben Ablagerungen sowohl für IgG, IgA und C3. Bei 2 Mäusen fielen nur Ablagerungen von IgG und C3 auf, in einer konnte kein C3 gefunden werden. Zudem konnte in 2 Biopsien, jeweils für IgG und IgA, eine subepitheliale Spaltbildung festgestellt werden. In der PDE4-Inhibitor-Gruppe zeigten bezüglich IgG 6/6, IgA 4/6 und C3 6/6 Biopsien krankheitstypische Ablagerungen. Bei 4 Mäusen lagen beide Antikörper sowie C3 vor. Letzteres konnte in 2 Proben nicht gefunden werden. Unter der Kombinationstherapie zeigten 6/6 (IgG), 4/6 (IgA) und 3/6 (C3) Mäuse ein positives Ergebnis. 2 waren hierbei dreifach positiv, 2 weitere ausschließlich für IgA und IgG. Eine Probe zeigte nur Auffälligkeiten hinsichtlich IgG, eine andere nur für IgG und C3. Die Negativkontrolle blieb in allen Fällen negativ.

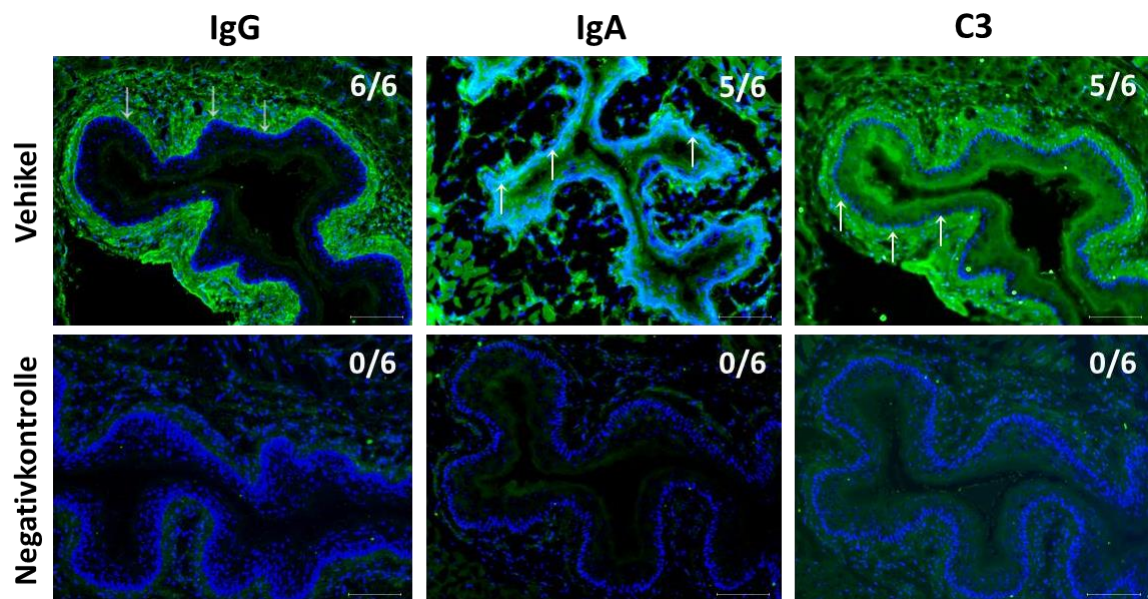


**Abb. 12: direkte Immunfluoreszenz der Cornea in Vehikel-Kohorte, Negativkontrolle und den 3 Behandlungsgruppen.** Basal des Epithels konnten mit Ausnahme der Negativkontrolle lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 in Proben aller Gruppen (n=6/Gruppe) gefunden werden. Bei den mit Dapson behandelten Mäusen konnte in zwei Proben eine subepitheliale Spaltbildung festgestellt werden (siehe Zeile 2). Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

### 5.2.3 Ösophagus und Gastrointestinaltrakt

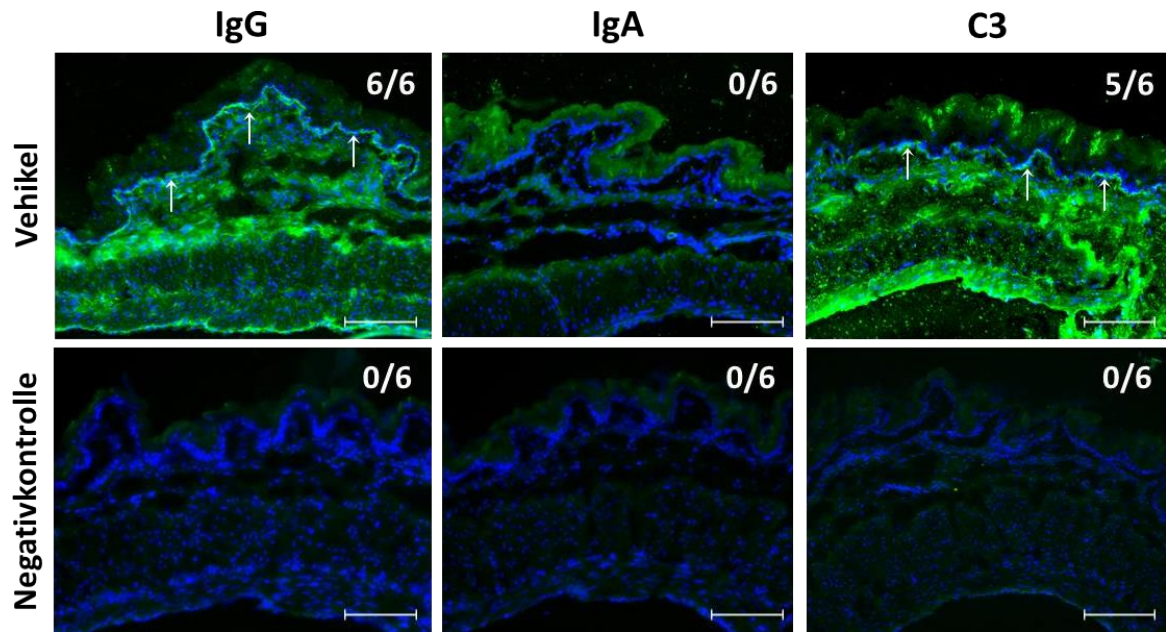
SHP-Patienten leiden zum Teil auch unter einer ausgeprägten Dysphagie, die sich unter anderem in einem Befall des Ösophagus begründet (90). Sowohl im Ösophagus als auch in verschiedenen Strukturen des Gastrointestinaltrakts konnten im Mausmodell lineare Ablagerungen von IgG, IgA und C3 gefunden werden. Abb. 13 verdeutlicht, dass in der Vehikel-Kohorte in jeder (6/6) der

untersuchten Proben eine Deposition von IgG vorlag, im Fall von IgA und C3 in jeweils 5/6 Fällen. 4 Ösophagus-Proben stellten sich dreifach positiv dar, in jeweils einer Probe konnten kein C3 beziehungsweise kein IgA gefunden werden. Die Negativkontrolle zeigte sich blande.



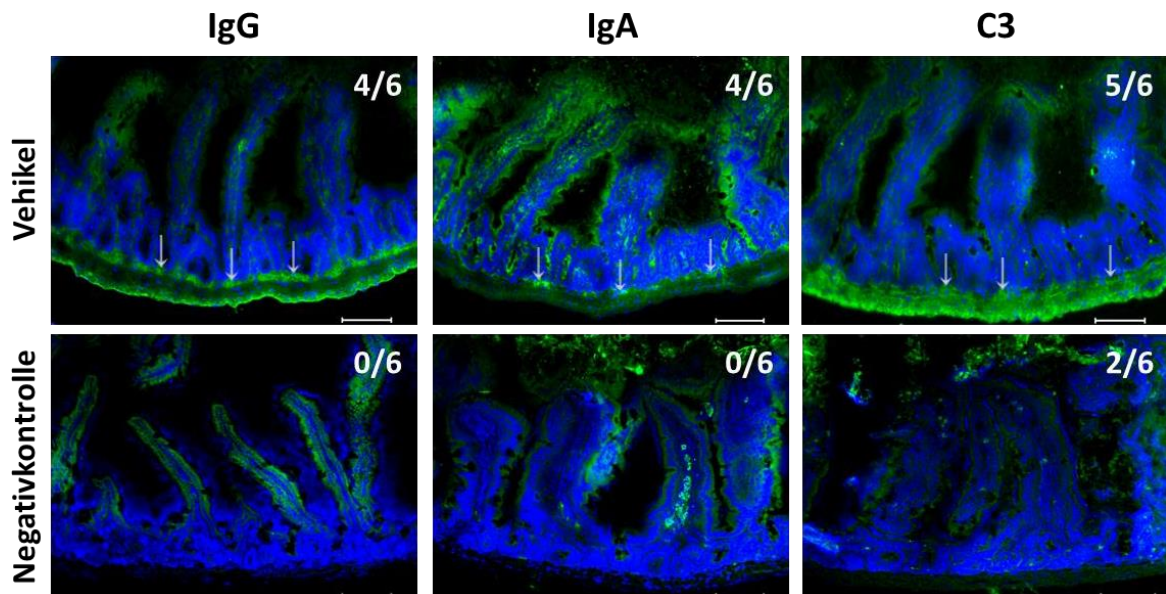
**Abb. 13: direkte Immunfluoreszenz des Ösophagus in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) wurden unterhalb des Epithels lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden. Die Negativkontrolle (n=6) zeigte sich unauffällig. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

Eine klinische Symptomatik, die auf den Magen zurückzuführen ist, ist für SHP-Patienten bisher nicht berichtet (112). Betrachtet man die Gewebebiopsien aus dem Magen, dann fiel in der Vehikel-Kohorte eine Positivität bezüglich IgG in 6/6 und für C3 in 5/6 Gewebeproben auf. IgA Ablagerungen hingegen waren nicht zu finden. Von den auffälligen Biopsien waren 5 Proben positiv für IgG und C3, in einer Probe konnte nur IgG nachgewiesen werden. Die DIF der Negativkontrolle zeigte keine Auffälligkeiten (Abb. 14).



**Abb. 14: direkte Immunfluoreszenz des Magens in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) zeigten sich subepitheliale Ablagerungen (Pfeile) von IgG und C3. Bei Betrachtung von IgA und der Negativkontrolle (n=6) zeigten sich keine Ablagerungen von Immunreaktantien. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

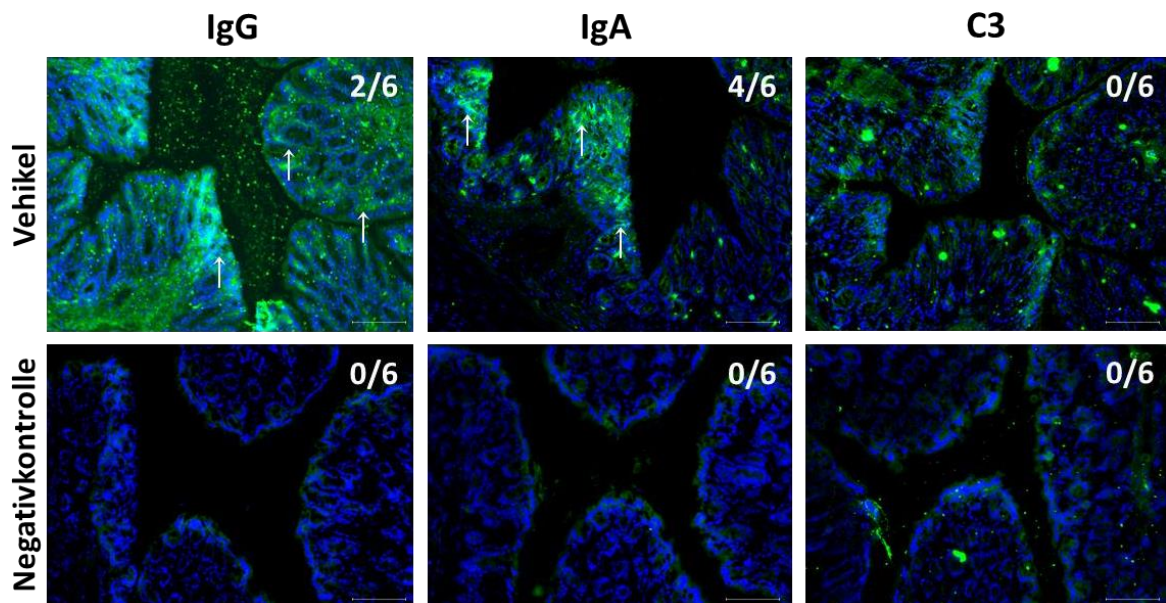
Auch in den zwei untersuchten Abschnitten des Darms fielen einige DIFs positiv aus. Hinsichtlich des Dünndarms waren 4/6 (IgG), 4/6 (IgA) und 5/6 (C3) Proben der Vehikel-Gruppe von linearen Ablagerungen gekennzeichnet. In 3 unterschiedlichen Proben waren die beiden Antikörper sowie C3 nachweisbar. Wiederum fand sich bei 2 Proben lediglich C3, in einer Probe waren nur IgG und IgA detektierbar. Zwar blieb die Negativkontrolle größtenteils negativ, jedoch waren in 2/6 Proben unspezifische Ablagerungen von C3 zu finden (Abb. 15).



**Abb. 15: direkte Immunfluoreszenz des Dünndarms in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) wurden unterhalb des Epithels lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden. Die Negativkontrolle (n=6) blieb bis auf 2 Proben für C3 unauffällig. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1

Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

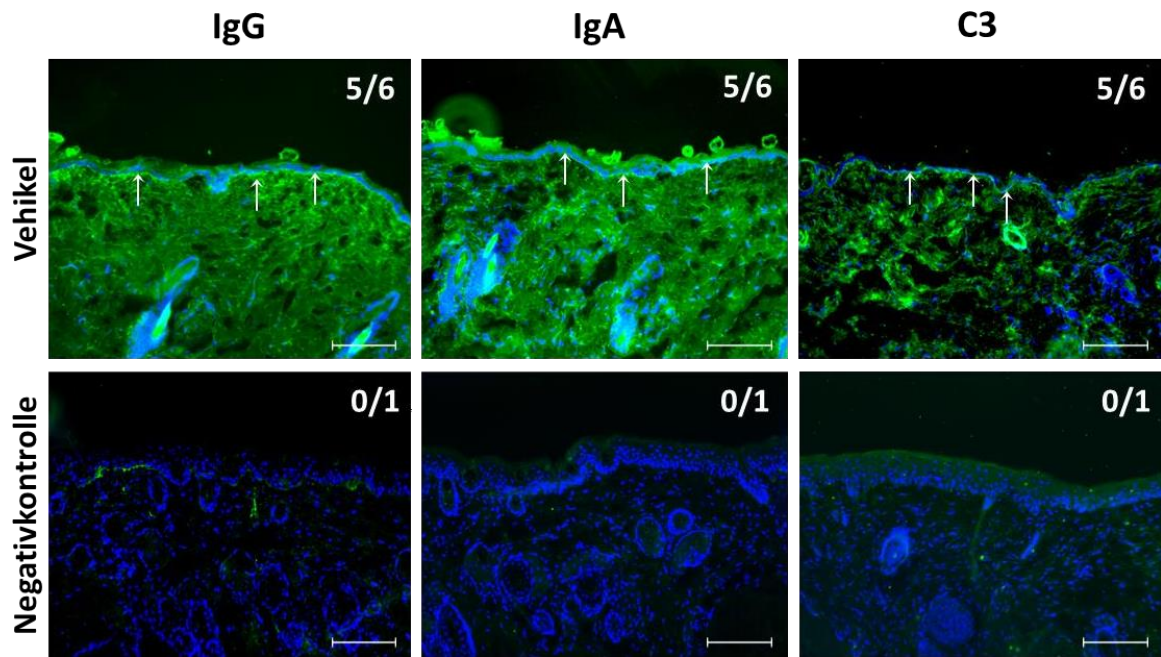
Im Dickdarm fielen einige DIFs aus der Vehikel-Kohorte im Gegensatz zur Negativkontrolle positiv aus. So waren 2/6 Gewebeproben für IgG positiv, 4/6 für IgA, wohingegen C3 nicht detektierbar war (0/6). Von den positiven Proben waren 2 Proben auffällig im Hinblick auf IgA und IgG, in 2 weiteren gelang lediglich der Nachweis von IgA. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Ablagerungen nur verschwommen, teils nicht durchgängig und ebenfalls nicht eindeutig linear an der BMZ zu detektieren sind (Abb. 16).



**Abb. 16: direkte Immunfluoreszenz des Dickdarms in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) fanden sich unspezifische Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3, die in der Negativkontrolle (n=6) nicht auffindbar waren. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

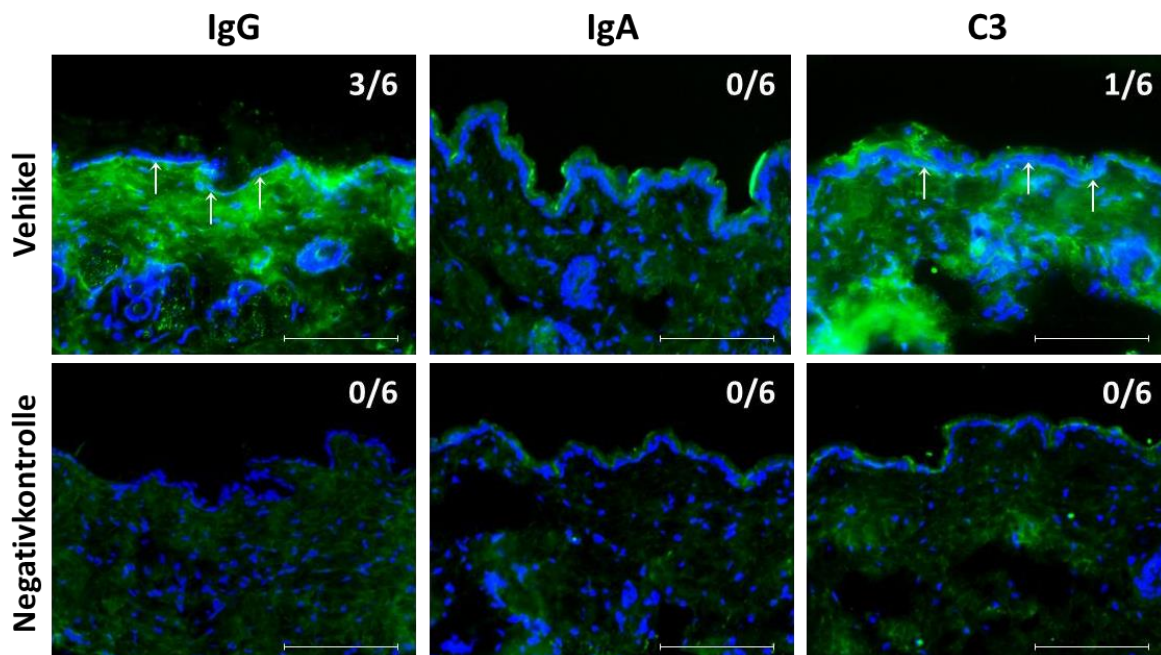
#### 5.2.4 Haut und genitale Schleimhaut

Bei Betrachtung periläsionaler Haut konnten in der Vehikel-Kohorte jeweils in 5/6 Fällen subepidermale Ablagerungen von IgG, IgA und C3 gefunden werden. Hierbei ist zu beachten, dass 4 Proben für alle 3 untersuchten Antikörper positiv waren. In einer Probe fand sich ausschließlich C3, wohingegen eine andere Probe nur IgG und IgA aufwies. Eine Negativkontrolle gab es dementsprechend nicht, da die gesunden Mäuse keine krankheitstypischen Läsionen ausbildeten. Die in dieser Gruppe untersuchte „Negativkontrolle“ stammte von einer Maus, die zwar eine Hautläsion aufwies, welche jedoch vermutlich auf Biss- oder Kratzspuren zurückzuführen war (Abb. 17).



**Abb. 17: direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Haut in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) wurden subepidermal lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden. Die Negativkontrolle (n=1) zeigte sich unauffällig. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren in der Vehikelkohorte und von einem Tier in der Negativkontrolle jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

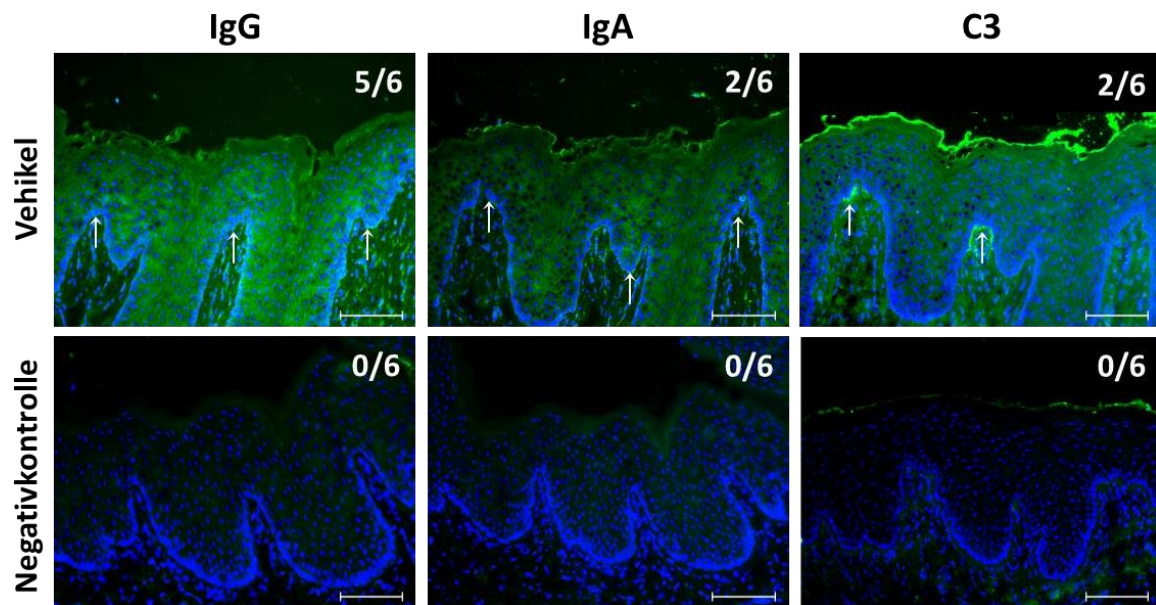
Abb. 18 repräsentiert die DIFs von Biopsien nicht-läsionaler Haut. Hier wurde in der Vehikel-Kohorte eine lineare Deposition von IgG (in 3/6 Proben) und C3 gefunden (1/6), wohingegen IgA nicht detektierbar war. Bei Betrachtung dieser Proben fiel auf, dass sich nur eine Probe sowohl für C3 und IgG positiv zeigte, 2 weitere isoliert für IgG. Die Negativkontrolle präsentierte sich unauffällig.



**Abb. 18: direkte Immunfluoreszenz des nicht-läsionaler Haut in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) wurden unterhalb der Epidermis lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG und C3 gefunden. Dies war für IgA

nicht der Fall. Die Negativkontrolle (n=6) blieb ohne Auffälligkeiten. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

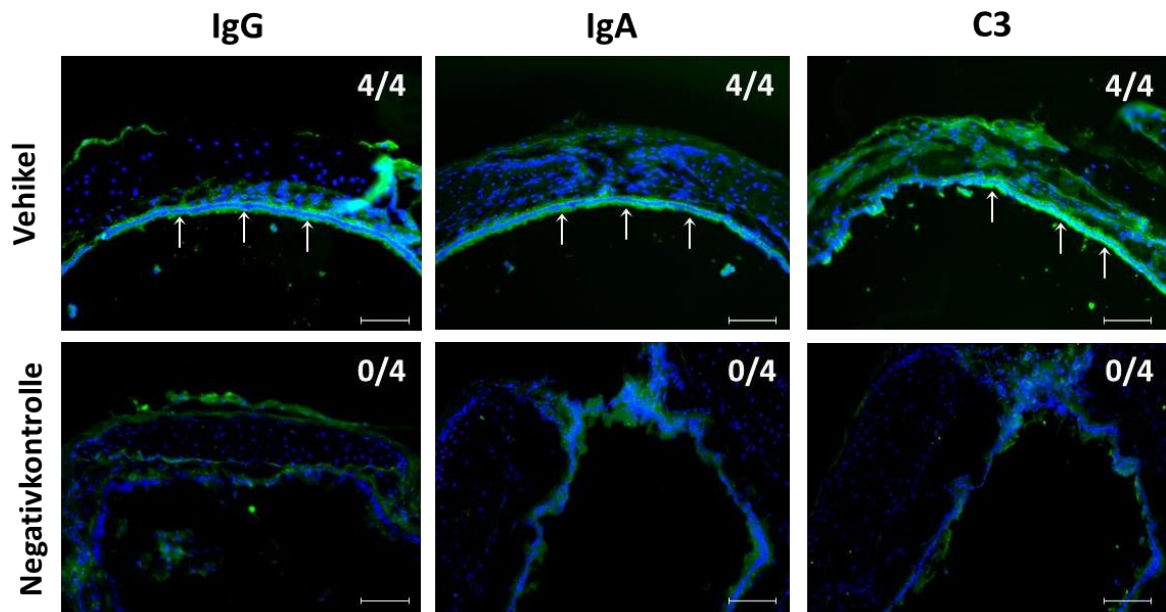
In der Genitalschleimhaut stachen bei den erkrankten Mäusen (Vehikel-Kohorte) positive Ergebnisse hervor. So gelang in 5/6 Fällen ein Nachweis von IgG, für IgA und C3 wiederum in 2/6. Von diesen stellte sich eine Mausprobe lediglich für IgG positiv dar, während dies für jeweils eine Probe hinsichtlich IgG und IgA bzw. für IgG und C3 der Fall war. Eine weitere Probe zeigte isoliert Ablagerungen von IgG, wohingegen eine weitere dreifach positiv war. Außerdem blieb eine Probe aus der Vehike-Kohorte ohne Auffälligkeiten. Erwartungsgemäß blieben die Negativkontrollen unauffällig (Abb. 19).



**Abb. 19: direkte Immunfluoreszenz von genitaler Schleimhaut in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) wurden unterhalb des Epithels lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden. Die Negativkontrolle (n=6) zeigte sich unauffällig. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

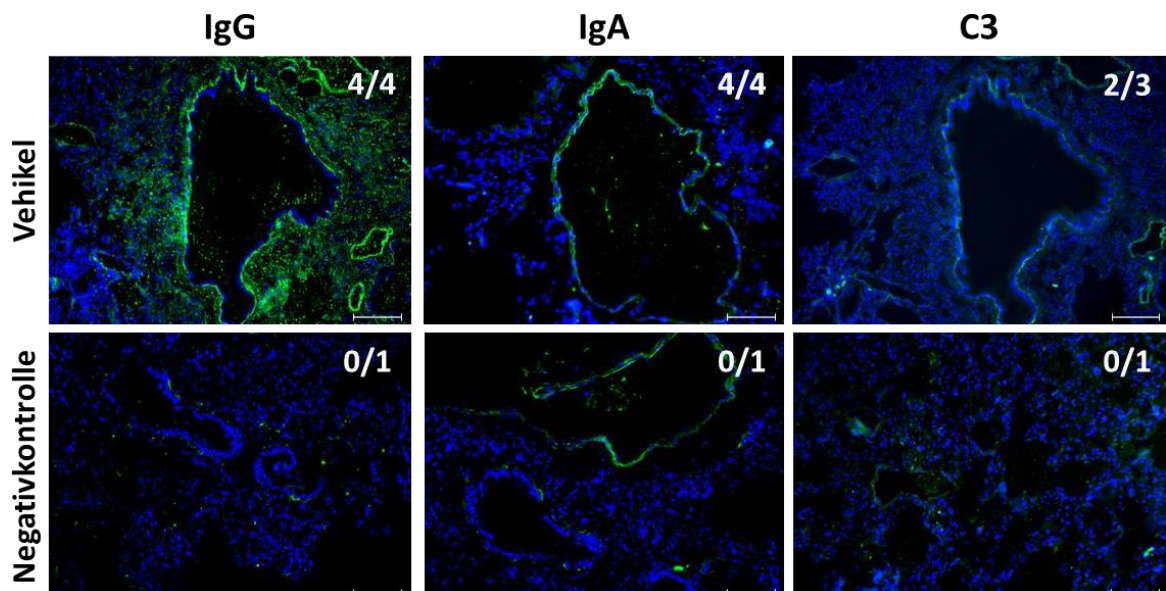
### 5.2.5 Atemwege

Das Vorkommen von Laminin 332 im Epithel der Atemwege und folglich in Trachea und Lunge ist bereits beschrieben (113,114). Im Folgenden wurden die Luftröhre und die Lunge auf Antikörper- und C3-Ablagerungen analysiert. Sowohl für IgG, IgA und C3 konnte in allen untersuchten Proben (4/4) der Vehikel-Gruppe positive Ergebnisse gefunden werden, was in der Negativkontrolle nicht der Fall war (Abb. 20).



**Abb. 20: direkte Immunfluoreszenz der Luftröhre in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=4) wurden unterhalb des Epithels lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden, bei negativer Negativkontrolle (n=4). Es wurde von 4 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

Auch in der Lunge fielen jeweils in 4/4 Proben der Vehikel-Kohorte lineare Ablagerungen von IgG und IgA auf, in 2/3 Fällen fiel die DIF positiv für C3 aus. Die C3-positiven Proben traten gemeinsam mit Ablagerungen von IgG und IgA auf. In der Negativkontrolle wurde lediglich eine Lunge untersucht, die sich unauffällig darstellte (Abb. 21).

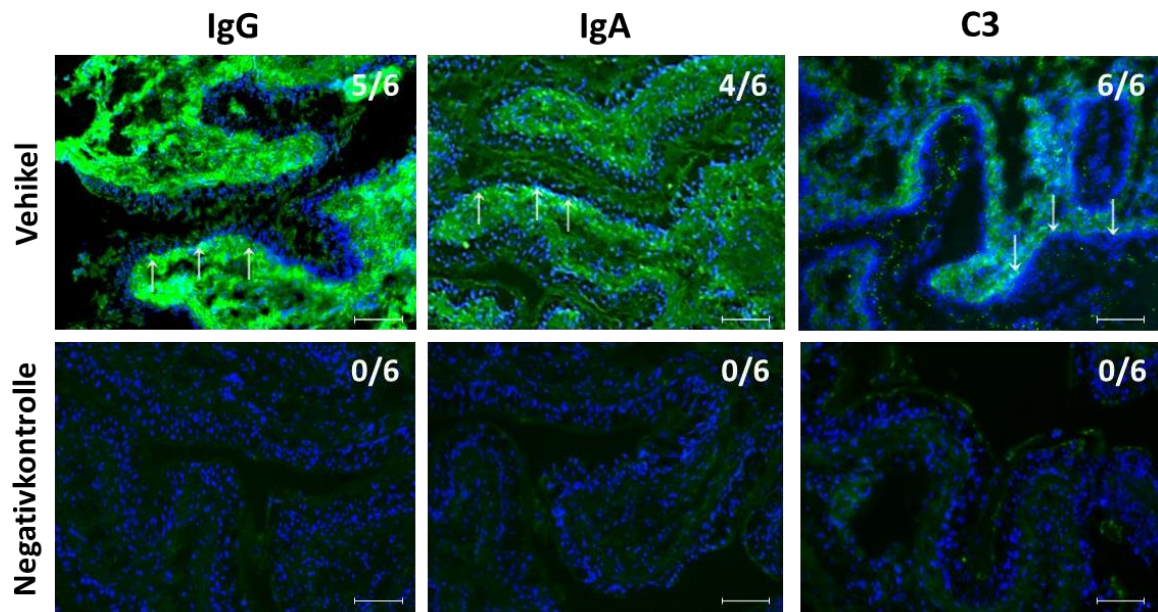


**Abb. 21: direkte Immunfluoreszenz der Lunge in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=4) wurden unterhalb des Epithels lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden. Die Negativkontrolle (n=1) zeigte sich unauffällig. Es wurde von 4 zufällig ausgewählten Tieren in der Vehikelgruppe und von 1 Tier in der Negativkontrolle jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der

untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

### 5.2.6 Harnblase

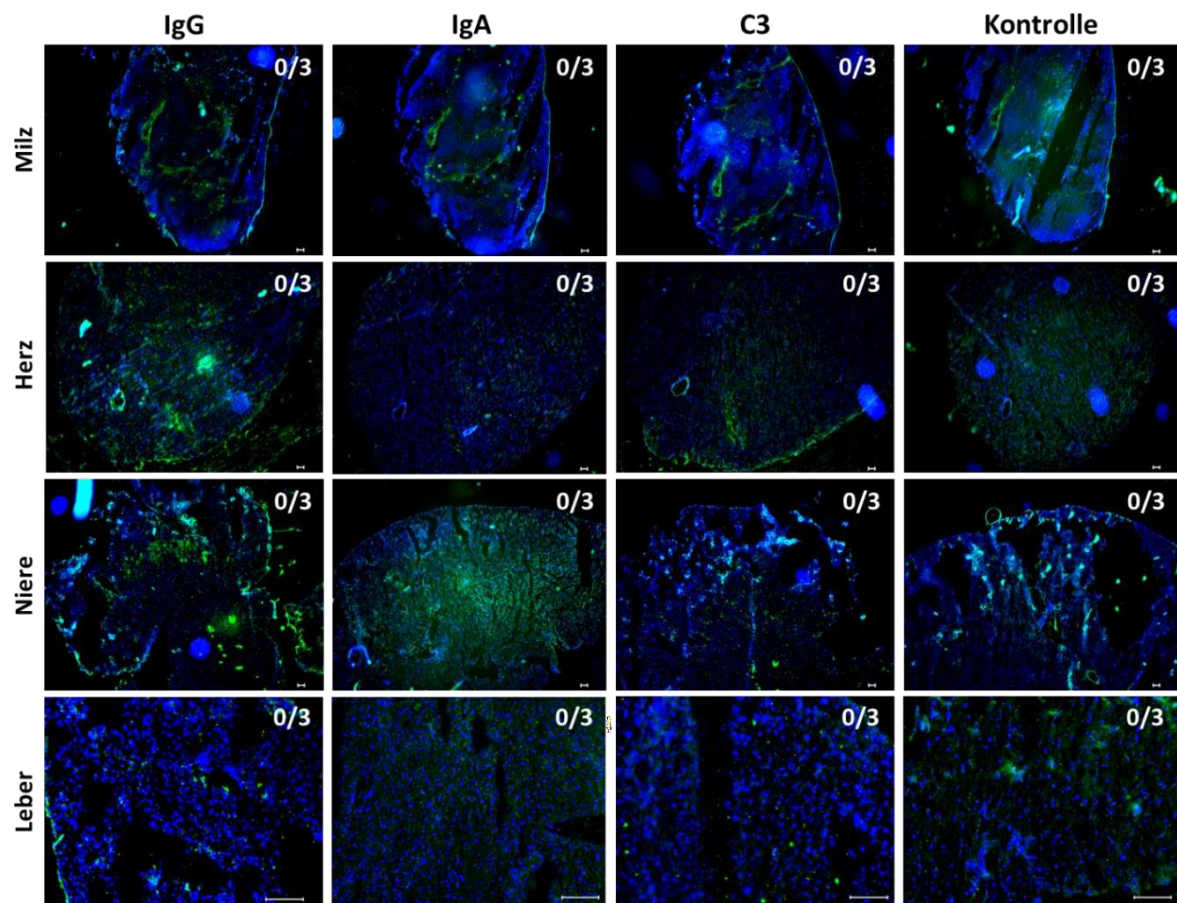
Auch in der Harnblase war in der Vehikel-Kohorte eine Deposition von IgG (5/6 Proben), IgA (4/6) und C3 (6/6) auffindbar. Dreifach positiv zeigten sich 3 Proben, 2 weitere fielen durch Ablagerungen von IgG und C3 auf. In einer Probe konnte kein IgG nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle blieb im Gegensatz dazu ohne Auffälligkeiten (Abb. 22).



**Abb. 22: direkte Immunfluoreszenz der Harnblase in Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** In der Vehikel-Kohorte (n=6) wurden unterhalb des Epithels lineare Ablagerungen (Pfeile) von IgG, IgA und C3 gefunden. Die Negativkontrolle (n=6) stellte sich unauffällig dar. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

### 5.2.7 In der Immunfluoreszenz negative Gewebe

Dieser Abschnitt fasst die Organe zusammen, die in der DIF sowohl in der Vehikel-Kohorte als auch in der Negativkontrolle unauffällige bzw. unspezifische Ergebnisse lieferten. Im Hinblick auf die DIFs von Milz, Herz, Niere und Leber fehlten in der Vehikel-Gruppe und Negativkontrolle für IgG, IgA und C3 in allen Proben subepitheliale Ablagerungen (0/3). In den Geweben fielen lediglich zum Teil unspezifisch fluoreszierende Abschnitte auf, welche jedoch unabhängig von den untersuchten Gruppen auftraten (Abb. 23).



**Abb. 23: direkte Immunfluoreszenz von Milz, Herz, Niere und Leber in der Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** Sowohl in Vehikel-Kohorte (n=3/Gewebe) als auch in Negativkontrolle (n=3/Gewebe) wurden unterhalb des Epithels keine linearen Ablagerungen von IgG, IgA und C3 gefunden. Es wurde von 3 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus IgG/IgA/C3 = grün, Maßstabsbalken = 100µm.

### 5.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenz

Die o.g. graphisch dargestellten Ergebnisse der DIF für die verschiedenen Gewebe sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der DIF unterschiedlicher Gewebe für die Vehikel- Kohorte und Negativkontrolle**

	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>C3</b>	<b>Negativkontrolle</b>
Bukkale Mukosa	5/6	2/6	3/6	0/6
Zungenschleimhaut	5/6	0/6	0/6	0/6
Konjunktiva	6/6	5/6	5/6	0/6
Kornea	6/6	6/6	6/6	0/6
Ösophagus	6/6	5/6	5/6	0/6
Magen	6/6	0/6	5/6	0/6
Dünndarm	4/6	4/6	5/6	2/6 positiv für C3
Dickdarm	2/6	4/6	0/6	0/6
Periläsionale Haut	5/6	5/6	5/6	0/1
Nicht-läsionale Haut	3/6	0/6	1/6	0/6
genitale Schleimhaut	5/6	2/6	2/6	0/6
Luftröhre	4/4	4/4	4/4	0/4
Lunge	4/4	4/4	2/3	0/1
Harnblase	5/6	4/6	6/6	0/6
Milz	0/3	0/3	0/3	0/3
Herz	0/3	0/3	0/3	0/3
Niere	0/3	0/3	0/3	0/3
Leber	0/3	0/3	0/3	0/3

**Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der DIF der Kornea in der Vehikel-Kohorte, den Behandlungsgruppe und der Negativkontrolle**

	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>C3</b>
Vehikel	6/6	6/6	6/6
Dapson	6/6	4/6	5/6
PDE4-Inhibitor	6/6	4/6	6/6
Dapson + PDE4-Inhibitor	6/6	4/6	3/6
Negativkontrolle	0/6	0/6	0/6

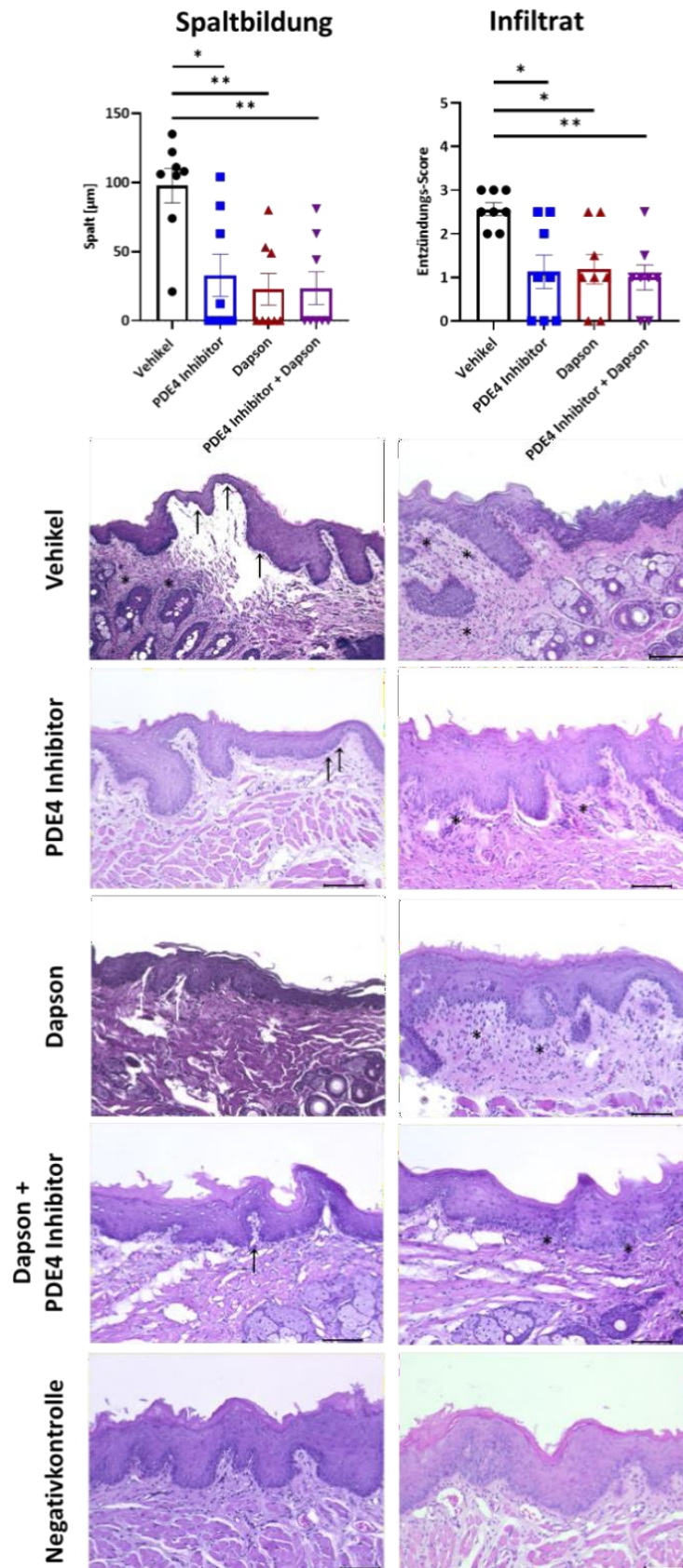
### **5.3 Entzündliches Infiltrat und Spaltbildung sowie deren Quantifizierung in DIF-positiven Geweben**

Gewebeproben, die in der DIF lineare subepitheliale Ablagerungen von IgG, IgA und/oder C3 aufwiesen, wurden im Folgenden mithilfe eines „semi-quantitativen Bewertungsverfahrens“ bezüglich ihres entzündlichen Infiltrats sowie unter Verwendung eines Scoring-Systems zur Beurteilung einer möglichen Spaltbildung untersucht (110,111). Die Quantifizierung erfolgte verblindet. Neben der Vehikel-Kohorte und der Negativkontrolle wurden im Fall von Auffälligkeiten

auch die Behandlungsgruppen mit einbezogen. Unterschieden wurden, je nach Behandlungsform, Mäuse, die entweder einen PDE4-Inhibitor, Dapson oder die Kombination aus PDE4-Inhibitor und Dapson erhalten hatten. Es wurde jeweils 1 Gewebeprobe pro Tier untersucht, die Anzahl der untersuchten Tiere unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Gewebe. Es folgte eine statistische Auswertung mittels GraphPadPrism mit entsprechender graphischer Darstellung.

### **5.3.1 Bukkale Mukosa**

Diverse Gewebeproben aus der bukkalen Mukosa der verschiedenen Kohorten wurden auf Spaltbildung und inflammatorischem Infiltrat untersucht. Während in der Vehikel-Kohorte die Spaltlänge durchschnittlich knapp 100 µm betrug, lag diese in allen drei Behandlungsgruppen unter 50 µm, was mit p-Werten unter 0,05 für eine signifikante Abnahme sprach. Unter den Behandlungsgruppen war die Spaltbildung im Durchschnitt am geringsten in der Dapson-Kohorte und am ausgeprägtesten in der PDE4-Inhibitor-Gruppe, wobei die Unterschiede nur geringfügig ausfielen. Hinsichtlich des entzündlichen Infiltrats waren die Ergebnisse in der Behandlungsgruppe signifikant niedriger als in der Vehikel-Kohorte. Hier waren jedoch keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen feststellbar. Die histologischen Aufnahmen zeigen beispielhaft Spaltbildungen sowie das Ausmaß der Entzündungszellen für die verschiedenen Gruppen (Abb. 24).



**Abb. 24:** Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der Spaltbildung und der Entzündungsreaktion in der bukkalen Mukosa sowie jeweils entsprechende Auffälligkeiten in der HE-Färbung von Vehikel-Kohorte, Behandlungsgruppen und Negativkontrolle. Semi-Quantifizierung der Histologien von Biopsien (n=8/Gruppe) der bukkalen Mukosa. Es wurde jeweils 1 Gewebeprobe pro Tier untersucht. Alle drei medikamentösen Interventionen führten zu einer signifikanten Abnahme der Spaltbildung. Die geringste Spaltbildung lag durchschnittlich in der Dapson-

Kohorte ( $p=0,0032$ ), gefolgt von den Mäusen, die eine Kombinationstherapie mit Dapson und PDE4-Inhibitor erhielten ( $0,0037$ ) und schließlich der PDE4-Inhibitor-Behandlungsgruppe ( $p=0,0183$ ). Sowohl PDE4-Inhibitor ( $p=0,0153$ ), als auch Dapson ( $p=0,0241$ ) und die Kombinationstherapie ( $p=0,0076$ ) führten zu einer signifikant reduzierten Entzündung der bukkalen Mukosa. Keine Auffälligkeiten fanden sich in der Negativkontrolle. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz zwischen Vehikel- und Behandlungsgruppen fand mittels Kruskal-Wallis-Test und unkorrigiertem Dunn-Post-hoc-Test statt. Die Graphen veranschaulichen für die verschiedenen Kohorten (X-Achse) das Ausmaß der Spaltbildung bzw. der Entzündungsreaktion hinsichtlich der Anzahl an Entzündungszellen (Y-Achse). Die Linien stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. In den beispielhaft gewählten histologischen Bildern verweisen Pfeile auf den dargestellten Spalt, Sterne kennzeichnen das Entzündungsinfiltrat. Maßstabsbalken =  $100\mu\text{m}$ .

### **5.3.2 Palpebrale Konjunktiva und Kornea**

Bei Betrachtung der Daten wird ersichtlich, dass deutlich mehr Proben in der Vehikel-Kohorte als in den Behandlungsgruppen eine ausgeprägte Spaltbildung aufwiesen. So zeigte jede Probe in der Vehikel-Kohorte mindestens einen Konjunktiva-Score von 1, bei den Behandlungsgruppen waren hingegen zum Teil keine Spaltbildungen zu sehen und ihr Score lag somit bei 0. Zwar waren auch in den Behandlungsgruppen vereinzelt Proben mit einem Score von über 1 zu finden, jedoch war dieser signifikant niedriger bei den mit PDE4-Inhibitor sowie mit Dapson und PDE4-Inhibitor behandelten Mäusen. In der Dapson-Kohorte nahm die Spaltbildung zwar auch ab, jedoch war diese Verringerung statistisch nicht signifikant. Unter Berücksichtigung des inflammatorischen Infiltrats wird deutlich, dass für alle 3 Behandlungsgruppen das Ausmaß der Entzündung signifikant verringert wurde. Für die verschiedenen Kohorten wurden jeweils repräsentative Fotos ausgewählt, die den durchschnittlichen Score der Spaltbildung bzw. des Entzündungsinfiltrates widerspiegeln. In der Negativkontrolle konnten keine Auffälligkeiten gefunden werden (Abb. 25).



**Behandlungsgruppen und Negativkontrolle.** Der Konjunktiva-Score wurde histologisch anhand von Biopsien palpebraler Konjunktiva bestimmt. Es wurde jeweils 1 Gewebeprobe pro Tier untersucht. Die Behandlung mit einem PDE4-Hemmer (n=14) sowie in Kombination mit Dapson (n=14) verringerte die Spaltbildung in der Konjunktiva signifikant ( $p=0,0427$  bzw.  $p=0,0310$ ). Die Monotherapie mit Dapson verringerte den Konjunktiva-Score nicht signifikant ( $p=0,0657$ ). Hinsichtlich des entzündlichen Infiltrats reduzierte sowohl die Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor ( $p=0,0044$ ), mit Dapson ( $p=0,0092$ ) und die Kombinationstherapie ( $p=0,0021$ ) dieses signifikant. Die Negativkontrolle zeigte sich unauffällig. Die statistische Signifikanz zwischen der Vehikel- (n=15) und den Behandlungsgruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem unkorrigierten Dunn-Post-hoc-Test berechnet. Die Graphen zeigen für die verschiedenen Kohorten (X-Achse) das Ausmaß der Spaltbildung bzw. der Entzündungsreaktion hinsichtlich der Anzahl an Entzündungszellen (Y-Achse). Die Linien stellen Mittelwerte  $\pm$  *standard error of the mean* (SEM) dar. In den exemplarisch gewählten histologischen Bildern verweisen Pfeile auf den dargestellten Spalt, Sterne kennzeichnen das Entzündungsinfiltrat. Maßstabsbalken = 100 $\mu$ m.

Neben der palpebralen Konjunktiva wurde auch die Kornea in der HE-Färbung auf Spaltbildung und entzündliches Infiltrat untersucht. Zusätzlich wurden Veränderungen des Epithels beobachtet und folglich auch in Abb. 26 berücksichtigt. Die Spaltbildung war sowohl in der Vehikel-Kohorte als auch in den Behandlungsgruppen „Dapson“ sowie „Dapson und Roflumilast“ gering ausgeprägt, lediglich in jeweils 1/6 Proben konnte diese nachgewiesen werden. Mäuse, die ausschließlich mit Roflumilast behandelt wurden, wiesen keinen Spalt auf. Entzündliches Infiltrat fiel hingegen in allen der o.g. Kohorten auf. Hinsichtlich der Vehikel-Kohorte in 5/6, in der PDE4-Inhibitor- sowie in der Dapson + PDE4-Inhibitor-Gruppe in 3/6 und in der Dapson-Kohorte in 2/6 Proben. Auffallend war zudem, dass sowohl in der Vehikel-Kohorte als auch in allen Behandlungsgruppen dieselbe Anzahl (4/6) an Mäusen Epithelveränderungen der Kornea aufwiesen. Das korneale Epithel fiel durch Auflockerungen und Vakuolenbildung auf. Die Negativkontrolle zeigte keine Spaltbildung, kein entzündliches Infiltrat und keine Epithelveränderungen.

Wie Abb. 27 verdeutlicht, wurden die zuvor genannten Ergebnisse bezüglich des inflammatorischen Infiltrats mithilfe des bereits bekannten Entzündungs-Scores beurteilt. In der Vehikel-Kohorte lag zwar durchschnittlich ein stärker ausgeprägtes inflammatorisches Infiltrat vor, jedoch kam es nicht zu einer signifikanten Verbesserung im Vergleich zu den Behandlungsgruppen. Mäuse, die mit Dapson behandelt wurden, zeigten das geringste Ausmaß an inflammatorischem Infiltrat, gefolgt von jenen, die die Kombinationstherapie erhielten. Die Monotherapie mit einem PDE4-Inhibitor hatte den geringsten Effekt auf die Anzahl an Entzündungszellen. Eine Signifikanz innerhalb der Behandlungsgruppen konnte nicht beobachtet werden.

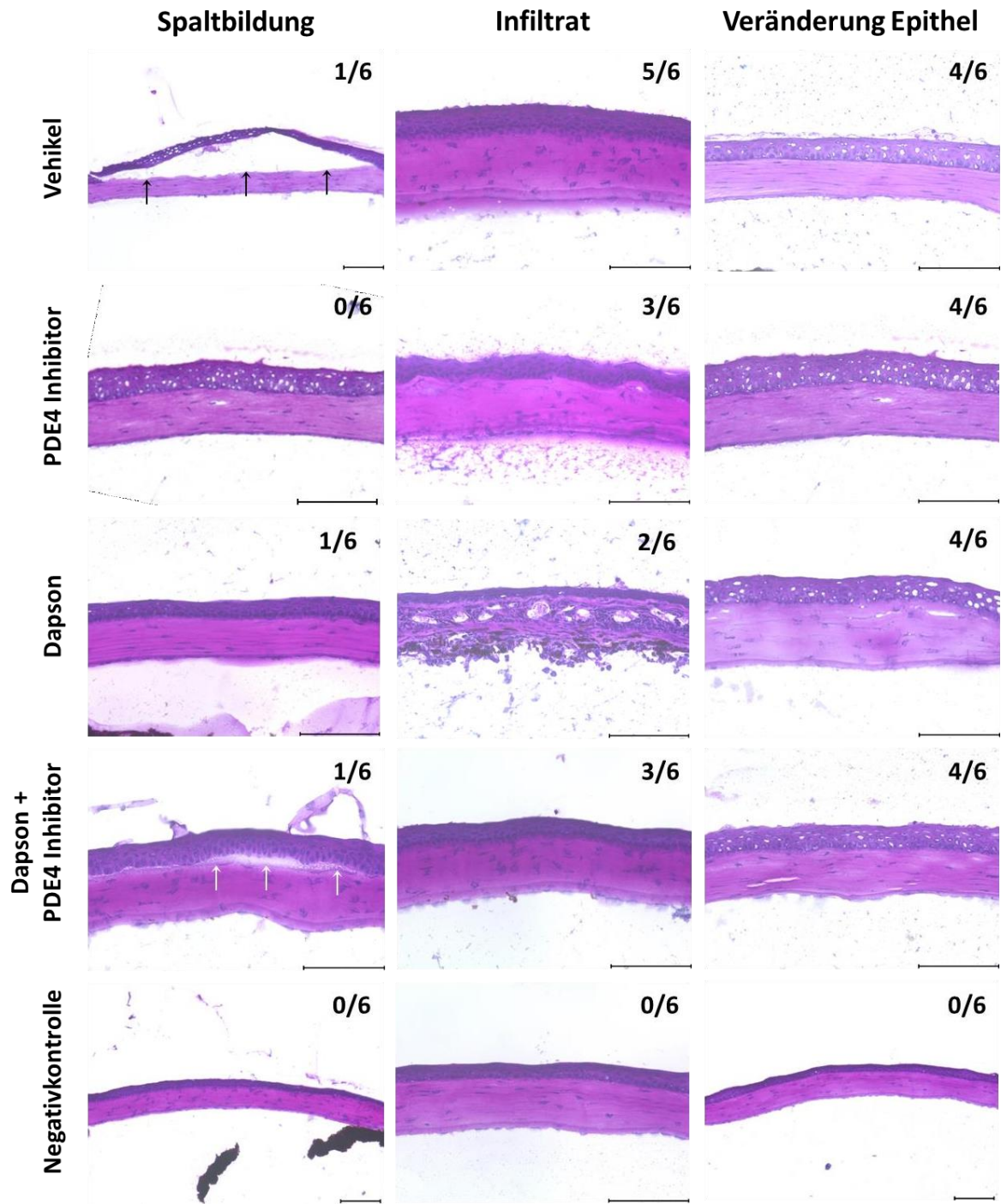


Abb. 26: HE-Färbung der Kornea der verschiedenen Kohorten (n=6/Kohorte) mit Fokus auf Spaltbildung, Entzündungsinfiltrat und Veränderungen des Epithels. Eine Spaltbildung fiel vereinzelt in der Vehikel-Kohorte sowie in den Behandlungsgruppen mit Ausnahme der PDE4-Inhibitor-Kohorte und der Negativkontrolle auf. Ein Entzündliches Infiltrat sowie Epithelveränderungen konnte jedoch in allen Kohorten außer der Negativkontrolle gefunden werden. Es wurde von 6 zufällig ausgewählten Tieren pro Kohorte jeweils 1 Gewebeprobe untersucht. Die Zahlen in der oberen rechten Ecke indizieren, wie viele der untersuchten Proben als positiv bewertet wurden. Kennzeichnung der Spaltbildung durch Pfeile. Maßstabsbalken = 100µm.



**Abb. 27: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung des Entzündungsscore der Kornea der unterschiedlichen Kohorten.** Semi-Quantifizierung der Histologien von okulären Biopsien. In keiner der Behandlungsgruppen (n=8) kam es zu einer signifikanten Verbesserung des Infiltrations-Scores, verglichen mit der Vehikel-Kohorte (n=11). Auf der X-Achse sind Vehikel-Kohorte sowie die drei verschiedenen Behandlungsgruppen dargestellt. Die Y-Achse repräsentiert den jeweiligen Entzündungsscore. Die Linien stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar. Der Kruskal-Wallis-Test sowie der unkorrigierte Dunn-Post-hoc-Test dienten der Ermittlung der statistischen Signifikanz zwischen Vehikel- und Behandlungsgruppen.

### 5.3.3 Ösophagus

Der folgende Abschnitt umfasst die Ergebnisse der HE-Färbung von Biopsien des Ösophagus und deren Analyse im Hinblick auf die Spaltlänge und das entzündliche Infiltrat. In diesem Fall war die durchschnittliche Spaltlänge in allen Kohorten der Behandlungsgruppe geringer im Vergleich zu den Vehikel-Mäusen. So konnte eine Behandlung mit Dapson die Spaltbildung fast auf einen Score von 0 und damit signifikant reduzieren, der PDE4-Inhibitor sorgte für eine ca. 50-prozentige Abnahme der Spaltbildung. Ein synergistischer Effekt der Kombinationstherapie aus Dapson und dem PDE4-Inhibitor ließ sich nicht beobachten. Diese Ergebnisse spiegelten sich zum Teil im Entzündungsscore, bei dem sowohl in der Dapson- als auch in der PDE4-Inhibitor- Behandlungsgruppe eine signifikante Reduktion des Entzündungsscores zu verzeichnen war. Wie auch bei der Spaltbildung zeigte die Kombinationstherapie keine synergistische Wirkung auf die Abnahme des Scores. Die dargestellten Bilder veranschaulichen exemplarisch aufgefallene Spaltbildungen und Entzündungszellen. Die Negativkontrolle blieb unauffällig (Abb. 28).

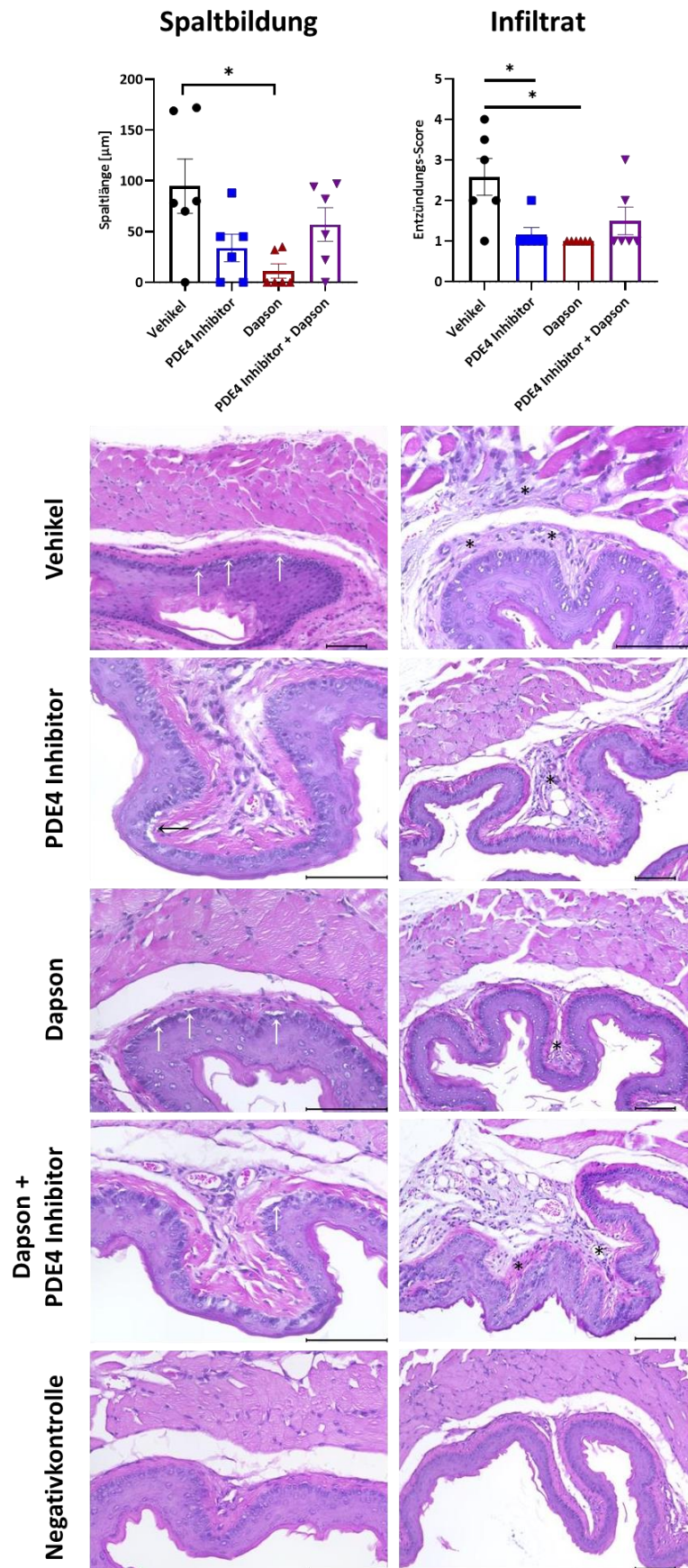
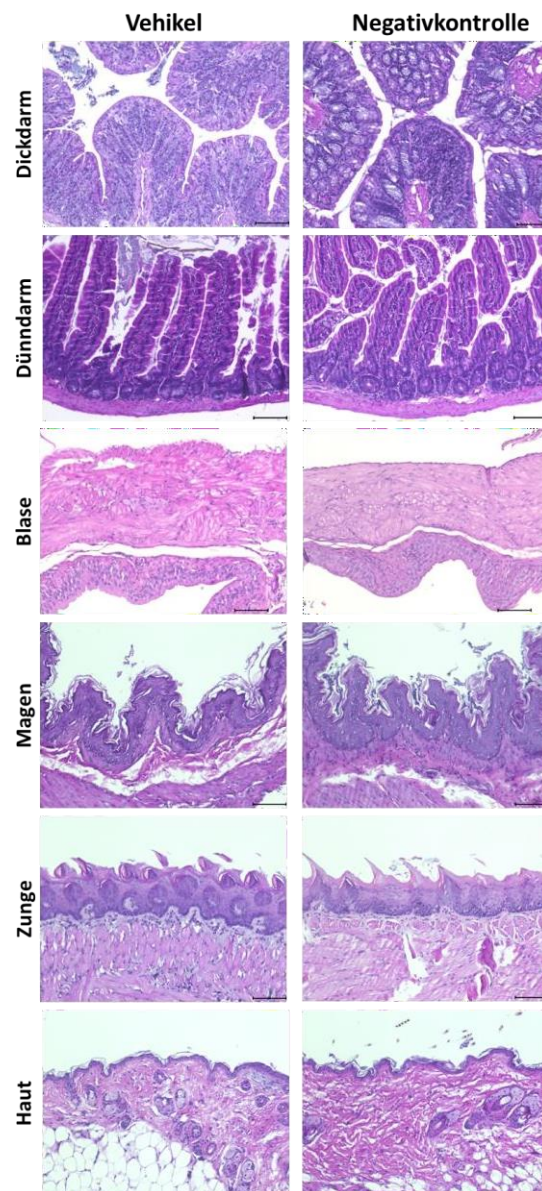


Abb. 28: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung der Spaltbildung und der Entzündungsreaktion in der Speiseröhre sowie jeweils entsprechende Auffälligkeiten in der HE-Färbung von Vehikel-Kohorte, Behandlungsgruppen und Negativkontrolle. Semi-Quantifizierung der Histologien von Biopsien (n=6/Gruppe) des Ösophagus. Es wurde jeweils

1 Gewebeprobe pro Tier untersucht. Betrachtet man die Spaltbildung in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Vehikel-Kohorte, ist festzustellen, dass nur in der Dapson-Kohorte ( $p=0,0315$ ) eine signifikante Abnahme nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu lagen die  $p$ -Werte in der PDE4-Inhibitor-Gruppe bei 0,3867 und in der Dapson + PDE4-Inhibitor-Kohorte bei  $>0,9999$ . Im Hinblick auf den Entzündungsscore wiesen sowohl die Dapson-Kohorte ( $p=0,0063$ ) als auch die PDE4-Inhibitor-Gruppe ( $p=0,0290$ ) eine signifikante Reduktion auf. Die mit der Kombinationstherapie behandelten Mäuse ( $p=0,1527$ ) zeigten keine Signifikanz hinsichtlich des Scores. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz zwischen Vehikel- und Behandlungsgruppen fand mittels Kruskal-Wallis-Test und unkorrigiertem Dunn-Post-hoc-Test statt. Die Graphen stellen für die verschiedenen Kohorten (X-Achse) das Ausmaß der Spaltbildung bzw. der Entzündungsreaktion hinsichtlich der Anzahl an Entzündungszellen (Y-Achse) dar. Die Linien zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM an. In den beispielhaft gewählten histologischen Bildern verweisen Pfeile auf den dargestellten Spalt, Sterne kennzeichnen das Entzündungsinfiltrat. Maßstabsbalken = 100 $\mu$ m.

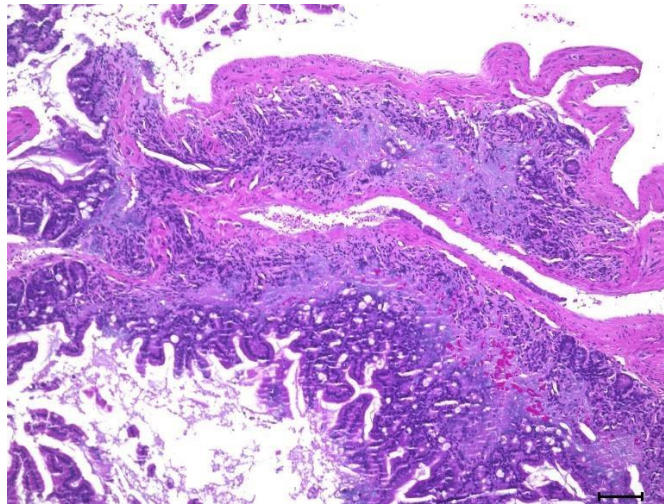
### 5.3.4 Gewebe ohne oder mit wenig entzündlichem Infiltrat sowie Besonderheiten

Abb. 29 führt die Gewebe auf, welche zwar in der DIF positiv ausfielen, aber kein oder nur ein partielles histologisches Korrelat in Form einer Spaltbildung oder eines inflammatorischen Infiltrats aufwiesen. Sowohl die Proben von Dick- und Dünndarm als auch von Blase, Magen, Zunge und Haut entsprachen in der Vehikel-Kohorte größtenteils dem histologischen Bild der Negativkontrolle.



**Abb. 29: Unauffällige HE-Färbung unterschiedlicher Gewebe der Vehikel-Kohorte und Negativkontrolle.** Die HE-Färbung der DIF-positiven Proben von Dick- und Dünndarm sowie von Blase, Magen, Zunge und Haut zeigte keine Auffälligkeiten. Eine Spaltbildung oder entzündliches Infiltrat lagen somit weder in der Vehikel-Kohorte als auch in der Negativkontrolle vor. Es wurde jeweils 1 Gewebeprobe pro Tier untersucht. Maßstabsbalken = 100µm.

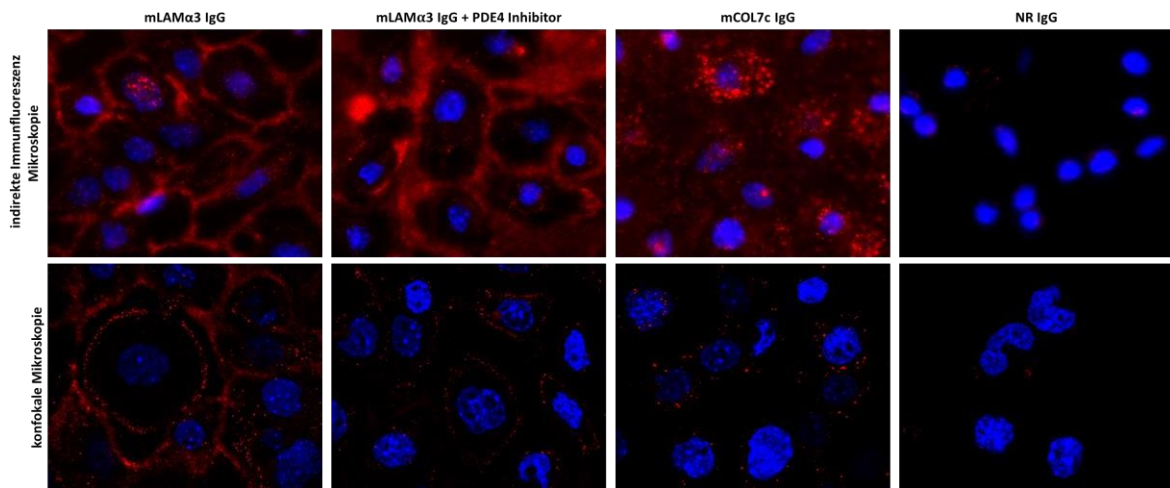
In einer Dünndarmprobe der Vehikel-Kohorte konnten jedoch verschiedene pathologische Veränderungen festgestellt werden. So zeigte sich zum einen eine verdickte Mukosa-Schicht bei Vakuolenbildung und vermehrter Eosinophilen Einwanderung. Des Weiteren fielen diffuse, adenomatöse Verwachsungen auf (Abb. 30).



**Abb. 30: Auffällige HE-Färbung einer Dünndarmbiopsie der Vehikel-Kohorte.** Die vorliegende Probe aus dem Dünndarm einer erkrankten und unbehandelten Maus wies verschiedene Pathologien, wie eine mukosale Verdickung, Vakuolenbildung sowie eine ausgeprägte eosinophilen Invasion auf. Außerdem zeigten sich diffuse, adenomatöse Verwachsungen im Gewebe.

#### 5.4 Wirkung des PDE4-Inhibitors auf Keratinozyten

In diesem Versuch sollte die Wirkung des PDE4-Inhibitors auf Keratinozyten nach der initialen Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG im Zellkulturmodell untersucht werden. Hierzu wurden Keratinozyten kultiviert und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Erstes Ziel des Versuches war der Nachweis der Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an kultivierte humane Keratinozyten. Diese Bindung konnte sowohl in der indirekten IF sowie in der konfokalen Mikroskopie in Form von zirkulären Antikörperablagerungen an die die Keratinozyten umgebende extrazelluläre Matrix gezeigt werden. Im Fall der Keratinozyten, welche mit Anti- mLAM $\alpha$ 3 IgG und dem PDE4-Inhibitor behandelt worden waren, konnten o.g. Ablagerungen in ähnlicher Ausprägung in der indirekten IF Mikroskopie gefunden werden. In der konfokalen Mikroskopie waren die emittierenden Intensitäten vermindert. Ähnliches gilt für den Nachweis der Bindung von Anti-mCOL7c IgG. So ist auch hier die Intensität der Desposition deutlich größer in der indirekten IF Mikroskopie als in der konfokalen. Dies war zu erwarten, da die Ebene der Zellen, welche mit dem Laser bei der konfokalen Mikroskopie angeregt wird, dünner ist, als beim Fluoreszenz Mikroskop und somit das emittierende Licht der Fluorophore geringer ausfällt. Die Keratinozyten, welche mit *normal rabbit* (NR) IgG versehen worden waren, dienten als Negativkontrolle. Es konnte in beiden Formen der Mikroskopie keine Ablagerungen von NR-Antikörpern gefunden werden (Abb. 31).



**Abb. 31: Nachweis der Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG sowie Anti-mCOL7c IgG an unbehandelten und behandelten Keratinozyten in der indirekten Immunfluoreszenz & konfokalen Mikroskopie.** In der indirekten Immunfluoreszenz Mikroskopie wurden deutlich zirkuläre Ablagerungen von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an den Keratinozyten, auch unter Therapie mit einem PDE4-Inhibitor, sowie von Anti-mCOL7c IgG nachgewiesen werden. Auch in der konfokalen Mikroskopie präsentierte sich ein ähnliches Bild für die genannten Gruppen bzw. Antikörper. Im Fall von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG+ PDE4-Inhibitor und Anti-mCOL7c IgG jedoch mit einer geringeren Ausprägung. NR IgG wurde in der Mikroskopie nicht nachgewiesen und diente als Negativkontrolle. Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG/Anti-mCOL7c IgG = rot, DAPI = blau (Zellkerne/Keratinozyten).

#### 5.4.1 Proteinexpressionen nach Inkubation mit Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG und PDE4-Inhibitor

Auf Basis der in Abschnitt 3.5 und 3.6 durchgeführten Zellkulturexperimente dienten die nachfolgenden Experimente dem Nachweis und der Charakterisierung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren im Zellkulturüberstand.

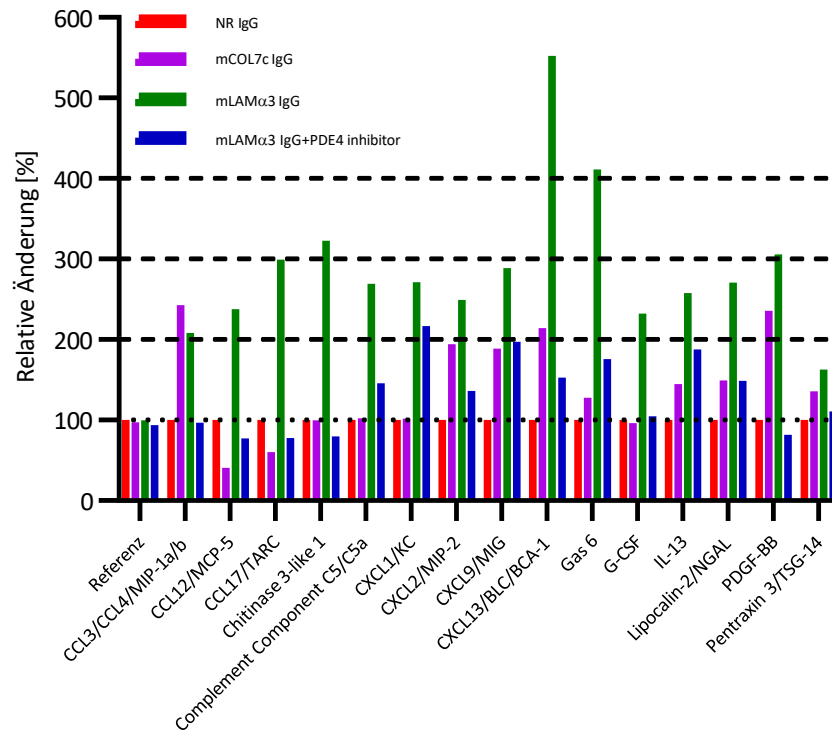
##### 5.4.1.1 Nachweis von CXCL2 im Zellkulturüberstand

Das Protein CXCL2 gehört zur Gruppe der chemotaktischen Zytokine. Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren ist es an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt und kann sowohl protektive Eigenschaften im Sinne der Immunantwort haben, als auch schädigend im Rahmen von Entzündungsreaktionen wirken (115). Dieser Versuch diente als Qualitätskontrolle. Es ist aus vorherigen, bislang unpublizierten Daten des Institutes bekannt, dass die Bindung des Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an Keratinozyten zur Freisetzung von CXCL2 in das Zellkulturmedium führt. Ebenfalls ist bekannt, dass eine Ko-Inkubation mit dem PDE4-Inhibitor zu einer verringerten CXCL2-Freisetzung führt. Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden. Das Zelllysat dieses Versuches konnte folglich für den Pilotversuch im DotBlot eingesetzt werden (Abb. 32).

##### 5.4.1.2 Nachweis diverser Entzündungsmediatoren im Zelllysat mittels DotBlot

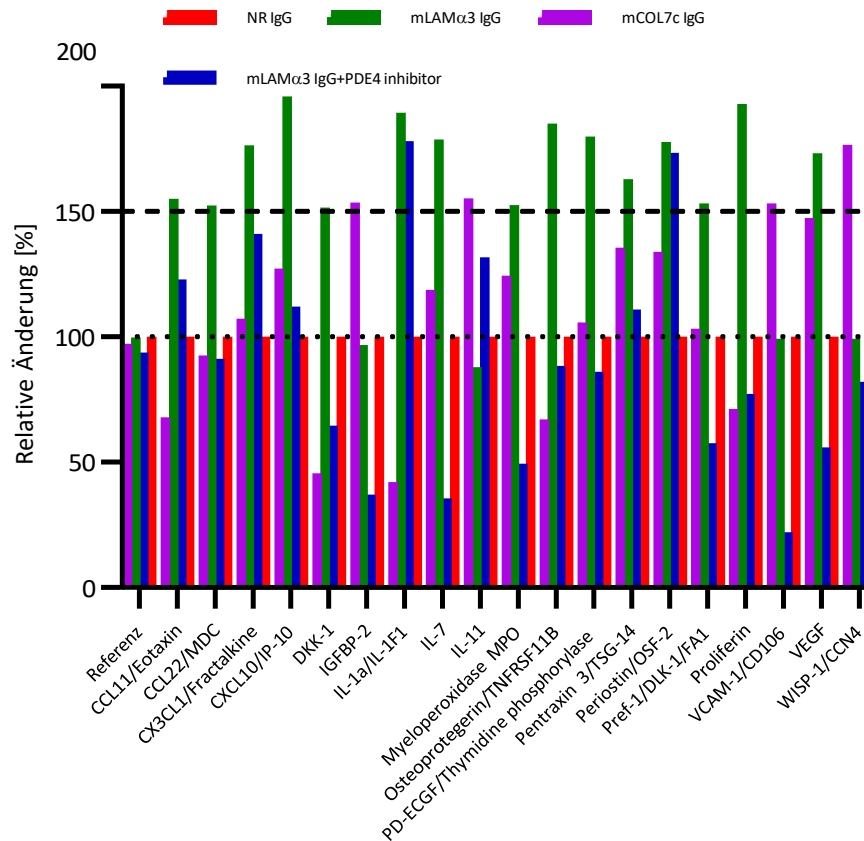
Nach dem erfolgreichen Nachweis von CXCL2 nach Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an die Keratinozyten mittels ELISA (vgl. Abschnitt 5.4.1.1) konnten die gewonnenen Zelllysate und somit jene Keratinozyten auch für den nachfolgenden DotBlot genutzt werden. Mittels Messung der relativen Änderung der *integrated density* unter Berücksichtigung des NR IgG als Referenzwert (100%) konnten nach Auswertung mithilfe von ImageJ über 111 verschiedene Entzündungsmediatoren in diesem Pilotversuch nachgewiesen werden. Exemplarisch werden einige von ihnen in diesem Abschnitt dargestellt. Wie Abb. 32 verdeutlicht, wurden hierbei Keratinozyten neben NR IgG sowohl mit Anti-mCOL7c, Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG als auch mit Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG und dem PDE4-Inhibitor versehen. Hierbei zeigten diverse Entzündungsmediatoren, wie

CXCL13/BL/BCA-1, CXCL2/MIP-2 oder die Komplementfaktoren C5/C5a, eine deutliche relative Änderung der jeweiligen *integrated density*, was somit mit einem vermehrten Vorkommen gleichzusetzen ist. In diesen Fällen zeigte die Ko-Inkubation mit dem PDE4-Inhibitor eine im Vergleich geringere relative Änderung.



**Abb. 32: Graphische Darstellung der relativen Änderungen der *integrated density* der verschiedener Entzündungsmediatoren im Vergleich zu den NR IgG Daten (100%) auf Basis des DotBlot-Versuches.** Betrachtet wurden Keratinozyten, welche zum einen mit NR IgG (rot), mCOL7c IgG (lila), mLAMAα3 IgG (grün) oder sowohl mit mLAMAα3 IgG und dem PDE4-Inhibitor (blau) versetzt wurden. Auf der X-Achse sind die untersuchten Entzündungsmediatoren dargestellt, auf der Y-Achse die jeweilige relative Änderung der *integrated density*, unter Berücksichtigung der verschiedenen Behandlungsstrategien. Als Referenz sind die NR IgG Daten (100%) zu sehen. Verschiedene Entzündungsmediatoren zeigten eine in Relation deutliche relative Erhöhung hinsichtlich der *integrated density* in der mLAMAα3 IgG Kohorte, wie beispielsweise CXCL13/BL/BCA-1, CXCL2/MIP-2 oder die Komplementfaktoren C5/C5a. In diesen Fällen zeigte auch die *integrated density* deutlich geringere Werte in der Kohorte, welche zusätzlich den PDE4-Inhibitor erhalten hatte. Die Auswertung des DotBlots erfolgte mittels ImageJ über die *integrated density* der jeweiligen Spots auf den Zellmembranen.

In Abb. 33 sind weitere Entzündungsmediatoren nach demselben Schema dargestellt. Exemplarisch fielen auch im Fall von CCL11/Eotaxin, CX3CL1/Fractalkine sowie IL-7 eine ausgeprägte Erhöhung der relativen Änderung im Hinblick auf die *integrated density* in der LAMα3 IgG-Kohorte bei geringerer Zunahme im Fall einer Behandlung mit dem PDE4-Inhibitor auf. Im Gegensatz dazu fiel in der Behandlungsgruppe ein erhöhtes Vorkommen von IL-11 im Vergleich zu den anderen Kohorten auf.



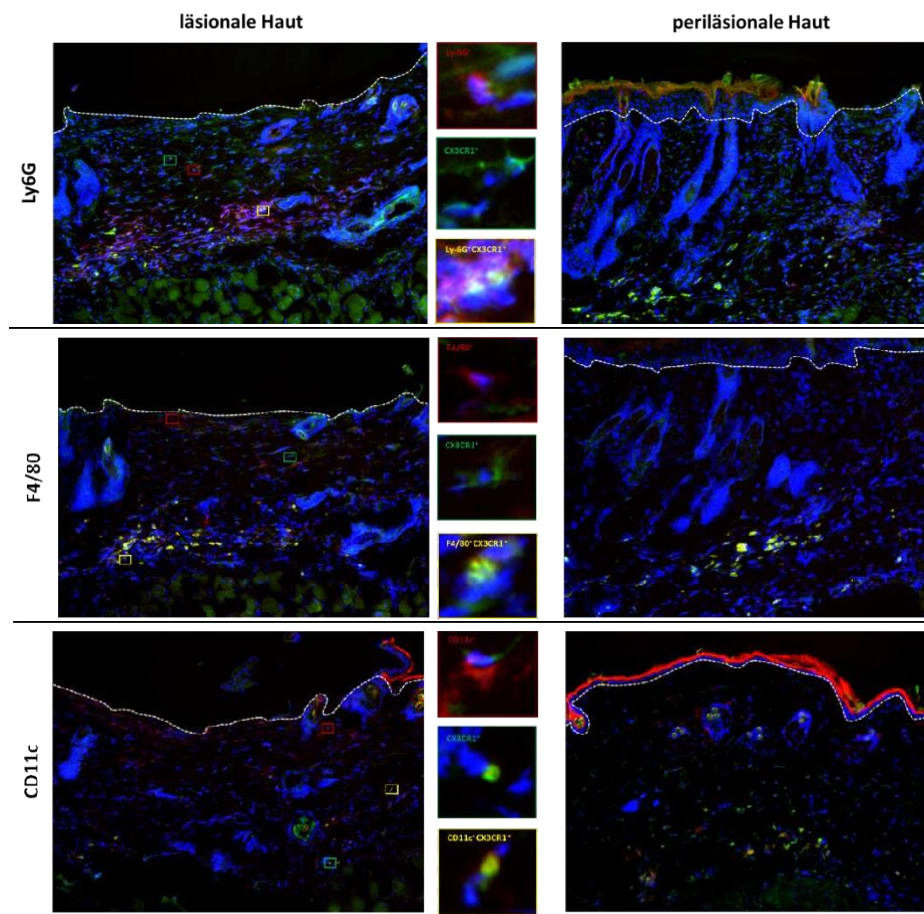
**Abb. 33: Graphische Darstellung der relativen Änderungen der *integrated density* der verschiedenen Entzündungsmediatoren im Vergleich zu den NR IgG Daten (100%) auf Basis des DotBlot-Versuches.** Die gewonnenen Keratinozyten wurden zum einen mit NR IgG (rot), Anti-mCOL7c IgG (lila), Anti-mLAMAα3 IgG (grün) oder sowohl mit Anti-mLAMAα3 IgG und dem PDE4-Inhibitor (blau) versetzt wurden. Auf der X-Achse sind die untersuchten Entzündungsmediatoren dargestellt, auf der Y-Achse die jeweilige relative Änderung der *integrated density*, unter Einbezug der verschiedenen Behandlungsstrategien. Als Referenz sind die NR IgG Daten (100%) zu werten. Diverse Entzündungsmediatoren fielen durch eine in Relation deutliche relative Erhöhung hinsichtlich der *integrated density* in der Anti-mLAMAα3 IgG Kohorte auf, wie zum Beispiel für CCL11/Eotaxin, CX3CL1/Fractalkine sowie IL-7. In diesen Fällen zeigte auch die *integrated density* deutlich geringere Werte in der Kohorte, welche zusätzlich den PDE4-Inhibitor erhalten hatte. Die Auswertung des DotBlots erfolgte mittels ImageJ über die *integrated density* der jeweiligen Spots auf den Zellmembranen.

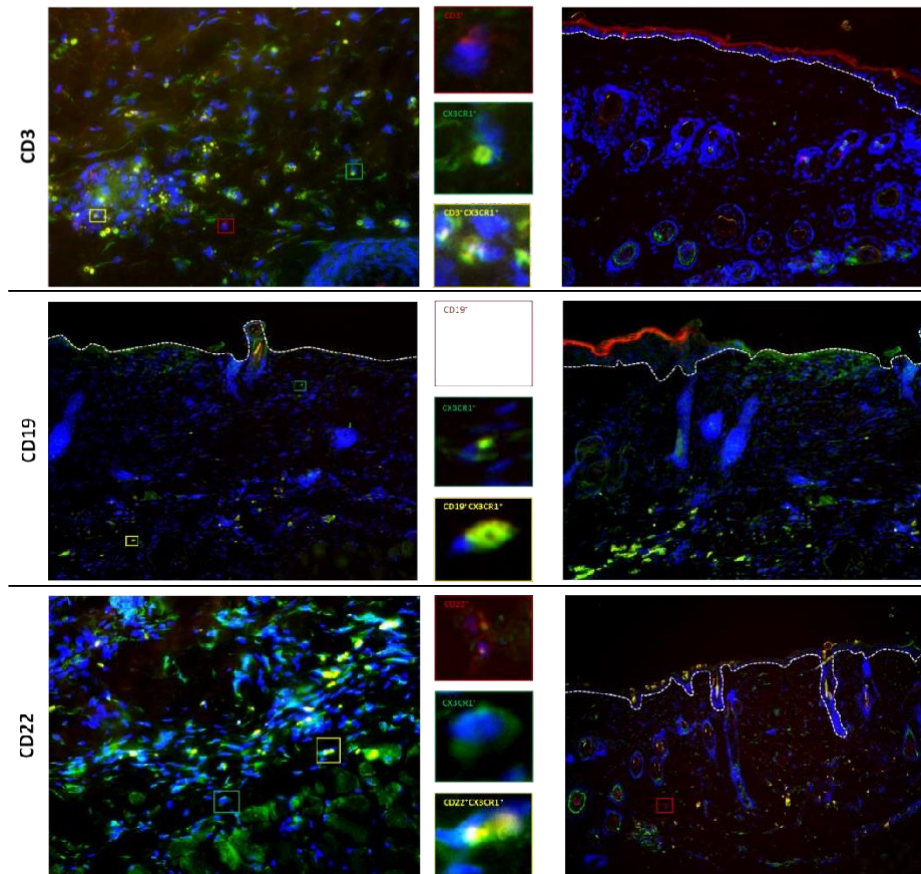
## 5.5 Doppelfärbung

Mithilfe der HE-Färbung konnten Entzündungszellen in den betroffenen Geweben sowie mittels DotBlot unterschiedliche Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden. Um die Entzündungszellen zu charakterisieren, wurde die Doppelfärbung anhand (peri-) läsionaler Haut durchgeführt. Zudem wurde für jede Probe der *Chemokine (C-X3-C Motif) receptor 1* (CX3CR1) mittels Antikörper detektiert, da dessen Ligand *Chemokine (C-X3-C Motif) ligand 1* (CX3CL1) in der DotBlot-Analyse hochreguliert war. Angesichts dessen wäre es naheliegend, wenn im Rahmen dieser Hochregulation verstärkt Zellen angelockt werden würden, die diesen Rezeptor exprimieren.

Die Abb. 34 veranschaulicht die Ergebnisse der Doppelfärbung von läsionaler und periläsionaler Haut der Vehikel-Kohorte. In der läsionalen Haut konnte die verschiedenen Oberflächenmarker gut mittels indirekter IF nachgewiesen werden. Alle Proben zeigten für Ly6G, F4/80, CD11c, CD3 sowie CD22 spezifisch positive Signale und für diese ebenfalls bei allen Färbungen doppelt-positive Zellen. Diese Proben waren also auch für CX3CR1 positiv. In den Biopsien, die dem Nachweis von CD19-positiven T-Zellen dienten, wurden keine einfach-positiven-Zellen gefunden werden, jedoch

doppelt-positive Zellen (CD19-CX3CR1). Vergleicht man die einfach-positiven Signale in der läSIONalen Haut untereinander wird deutlich, dass am meisten neutrophile Granulozyten (Ly6G) und Makrophagen (F4/80) auffindbar waren. Die häufigsten doppelt-positiven Zelltypen, die folglich auch CX3CR1 aufwiesen, stellten auch Makrophagen, T-Lymphozyten (CD3) und aktivierte B-Lymphozyten (CD22) dar. In den Biopsien periläsionaler Haut fanden sich insgesamt betrachtet weniger Immunzellen. Einfach-positiv Signale konnten wie auch im Fall der läSIONalen Haut einzig für CD19 nicht nachgewiesen werden. Doppelt-positive Immunzellen waren vor allem im Fall von F4/80-positive-Makrophagen sowie CD22-positive-B-Lymphozyten nachweisbar, zudem eine CD19-CX3CR1-positive Zelle. In der Adjuvanz-Kohorte waren keine Auffälligkeiten zu finden.



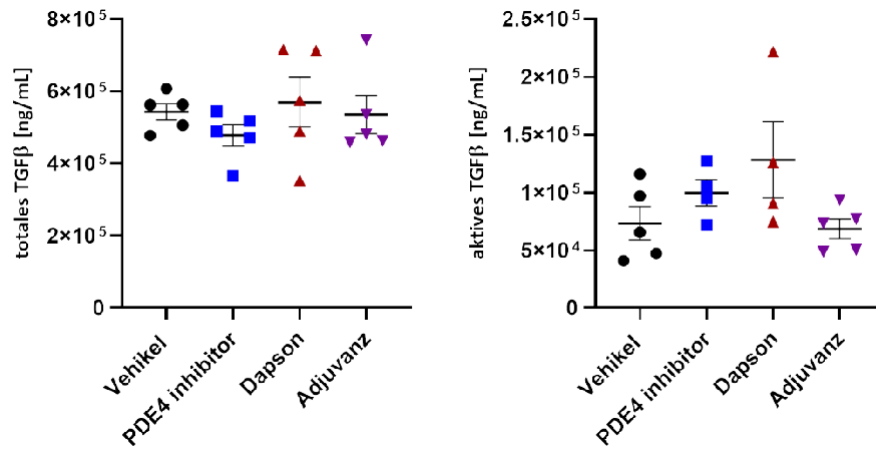


**Abb. 34: Doppelfärbung verschiedener Immunzellen in Kombination mit dem Rezeptor CX3CR1 in Proben von läSIONaler und perILäSIONaler Haut von aktiv immunisierten Mäusen der Vehikelgruppe zur Differenzierung des entzündlichen Infiltrats.** Bei Betrachtung der Proben läSIONaler Haut gelang der Nachweis von Ly6G-, F4/80, CD11c-, CD3- sowie CD22-positiven Zellen. Zudem fielen in diesen Biopsien auch doppelt-positive Zellen auf, die folglich neben dem jeweiligen Oberflächenmarker auch CX3CR1 aufwiesen. CD19-positive Immunzellen traten immer gemeinsam mit CX3CR1 auf. In der perILäSIONalen Haut ließen sich für alle Zelltypen mit Ausnahme von CD19 nachweisen. Doppelt-positive Zellen waren für F4/80 und CD22 detektierbar. Vehikel-Kohorte: n=3. DAPI = blau (Zellkerne), Anti-Maus Ly6G-, F4/80, CD11c-, CD3-, CD19-, CD22 = rot, Kaninchen Anti-Maus CX3CR1 = grün, doppelt positiv = gelb.

## 5.6 Nachweis von TGF- $\beta$ 1 mittels Legendplex

Im folgenden Versuchteil wurde die Ausschüttung des *transforming growth factor 1* (TGF- $\beta$ 1) in den verschiedenen Kohorten untersucht.

Betrachtet man die gemessene Menge an totalem TGF- $\beta$ 1 ist zu erkennen, dass diese sowohl in der Vehikel-Kohorte als auch in den beiden Behandlungsgruppen (PDE4-Inhibitor & Dapson) und der Adjuvanz-Kohorte bei Werten zwischen  $4 \times 10^5$  und  $6 \times 10^5$  liegt, bei nicht signifikanten Unterschieden untereinander. Größere Differenzen bestehen hingegen in Bezug auf das aktive TGF- $\beta$ 1. Im Durchschnitt wurden hier in aufsteigender Reihenfolge am wenigsten freies TGF- $\beta$ 1 in der Adjuvanz- und der Vehikel-Kohorte gemessen, wohingegen die Behandlungsgruppen, insbesondere die mit Dapson behandelten Mäuse mit einem Durchschnittswert zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1,5 \times 10^5$  ng/ml, höhere Werte aufwiesen. Auch hier waren die festgestellten Unterschiede jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (Abb. 35).



**Abb. 35: Graphische Darstellung der statistischen Auswertung des Legendplex zum Nachweis von totalem und aktivem TGF-β1 der verschiedenen Kohorten an unbehandelten und behandelten Keratinozyten.** Auf der X-Achse der beiden Graphen wurden die jeweiligen Kohorten aufgelistet, die Y-Achse gibt die Anzahl an totalem bzw. aktivem TGF-β1 in ng/ml an. Bei Betrachtung des totalen TGF-β1 wird deutlich, dass durchschnittlich sowohl in der Vehikel-, als auch in den Behandlungsgruppen (PDE4-Inhibitor sowie Dapson) eine ähnliche Menge gemessen wurde. Größere Unterschiede lassen sich im Hinblick auf das aktive TGF-β1 erkennen. Hier war die Menge an freiem TGF-β1 in der Vehikel- und der Adjuvanz-Kohorte am geringsten, am höchsten in der Dapson-Gruppe. Eine Signifikanz konnte bei vergleichender Betrachtung der verschiedenen Kohorten weder hinsichtlich des gesamten noch für das aktive TGF-β1 festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

## 6 Diskussion

Das SHP ist eine Erkrankung, die zu schwerwiegender Symptomatik seitens der Patienten führen kann (91). Zwar existieren bereits etablierte Therapieschemata, doch fehlt es bisher an spezifischen Therapiealternativen angesichts der größtenteils ungeklärten Pathogenese (61). Dieser Mangel an Kenntnissen in Bezug auf die immunologischen Vorgänge unterstreicht die Wichtigkeit der intensivierten Erforschung grundlegender Mechanismen in der Krankheitsentstehung und deren Verlauf sowie der damit verbundenen Etablierung neuer Behandlungsoptionen, um dem betroffenen Patientenkollektiv eine verbesserte Perspektive bieten zu können.

Die DIF ist ein Grundpfeiler der Diagnostik des SHP. Hierbei hat sich die Untersuchung von Gewebebiopsien auf subepitheliale bzw. subepidermale Ablagerungen von IgG, IgA und C3 etabliert, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SHP einnehmen (61). IgG und C3 sind hierbei bei Patienten am häufigsten zu finden, IgA im Vergleich seltener (73,102). Die Mundschleimhaut und die Konjunktiva stellen die beiden häufigsten Manifestationsorte des Anti-Laminin 332 SHP dar (90). Vergleicht man die typischen Antikörper- und C3-Ablagerungen der Patienten mit den Ergebnissen der DIF der in dieser Arbeit untersuchten Mäuse zeigt sich hier eine gute Übereinstimmung. Zum einen ist jedoch darauf einzugehen, dass nicht alle erkrankten Mäuse der Vehikel-Kohorte auch die zuvor genannten Ablagerungen aufwiesen. Dies ist auch bei SHP-Patienten häufig der Fall. Die DIF stellt zwar die sensitivste Nachweismethode für das SHP da, dennoch gelingt bei Patienten nur durchschnittlich zu ca. 70% in der ersten, nicht-läsionalen Biopsie ein Nachweis von Autoantikörpern im untersuchten Gewebe (98). Hinsichtlich der Sensitivität der DIF von Schleimhautbiopsien variieren die Aussagen in der Literatur. So wird von einer Sensitivität zwischen 40% und 100% berichtet. Dies kann unter anderem auf die beim SHP im Vergleich zu anderen bullösen Autoimmundermatosen geringere Anzahl an gebundenen Antikörpern, als auch auf mögliche technische Schwierigkeiten bei Schleimhautbiopsien zurückgeführt werden (61). Aus diesem Grund wird die Durchführung mindestens einer weiteren Biopsie bei initial negativer DIF empfohlen, sollte der Verdacht auf ein SHP weiterhin bestehen (61,102).

Auch im Fall der initial in der DIF negativ imponierenden Befunde von erkrankten Mäusen hätte also eine weitere DIF neu gewonnener Biopsien zu positiven Nachweisen führen können. Bei Betrachtung der Ergebnisse der DIF der palpebralen Konjunktiva und der Kornea wird deutlich, dass sich in der Vehikel-Kohorte alle Proben positiv auf IgG, IgA und C3 zeigten. Hinsichtlich der Kornea wurden zudem die Mäuse untersucht, die mit Dapson, dem PDE4-Inhibitor Roflumilast sowie mit einer Kombination aus Dapson und PDE4-Inhibitor behandelt worden waren. Insgesamt konnte hier keine wesentliche Abnahme der Antikörper- und C3-Ablagerungen festgestellt werden. Angesichts der Wirkungsweise der Medikamente war eine reduzierte Ablagerung diesbezüglich auch nicht zu erwarten.

Dapson stellt eine bereits etablierte Therapie des SHP dar und hat eine bakteriostatische sowie eine antientzündliche Wirkung. Letztere beruht u.a. auf einer Hemmung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und der Adhäsion von Neutrophilen sowie in der Verminderung der Aktivität der Peroxidase eosinophiler Granulozyten (97,116). Roflumilast agiert als selektiver PDE4-Inhibitor (117). Durch diese Wirkweise erhöht sich intrazellulär die Konzentration von *cyclic adenosine monophosphate* (zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP), was anti-entzündliche Prozesse zur Folge hat. Diese bestehen beispielsweise in der verminderten Ausschüttung von entzündlichen Mediatoren seitens der Granulozyten sowie von Zytokinen und zudem in einer verringerten Expression von Oberflächenmarkern diverser Zellarten (118). Ein direkter Effekt auf die

Antikörperablagerungen, wie er bereits für die Therapie von Autoimmundermatosen mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) publiziert wurde, lässt sich daraus angesichts der Wirkmechanismen der beiden Medikamente nicht erschließen (119).

Außerdem ließen sich in einem großen Teil der Schleimhautbiopsien unterschiedlicher Lokalisationen spezifische Ablagerungen finden. So konnten die beiden Autoantikörperisotypen und C3 in bukkaler Mukosa, Ösophagus, Genitalschleimhaut und Dünndarm gefunden werden, wohingegen C3 im Dickdarm fehlte. In der Zusammenschau verdeutlichen diese Ergebnisse, dass auch bei den Mäusen dieses Mausmodells jene Antikörper der am SHP erkrankten Patienten an den typischen Lokalisationen gefunden werden konnten. Nur wenige Proben fielen trotz klinischer Erkrankung der Mäuse negativ aus. Dies unterstreicht die bereits zuvor genannte Wichtigkeit von wiederholten Biopsien bei negativer DIF trotz hohen klinischen Verdachts in der Patientendiagnostik (98). Interessanterweise konnten auch in Magen, Dünn- und Dickdarm Antikörperdepositionen festgestellt werden. Eine Beteiligung des Gastrointestinaltrakts in Form von krankheitstypischen Schleimhautveränderungen ist bisher nicht für das SHP beschrieben. Für Patienten mit BP, paraneoplastischem Pemphigus und Pemphigus vulgaris existieren jedoch einzelne Fallberichte, die einen Befall von Dünn- bzw. Dickdarm beschreiben (120). Der fehlende Nachweis von IgA in Proben der Zunge und Magen ist nicht untypisch, da IgA zwar den vorherrschenden Antikörperisotyp der Schleimhaut darstellt, dieser jedoch bei SHP Patienten seltener zu finden ist (61, 121). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sind allerdings eine größere Anzahl an Proben beziehungsweise weitere Experimente notwendig.

Auch in der Harnblase der Mäuse fanden sich lineare Ablagerungen von Autoantikörpern. Zwar ist bisher nicht beschrieben, dass Laminin 332 in der Harnblase exprimiert wird, doch sind Fälle bekannt, in denen das Strukturprotein in Harnblasentumoren nachgewiesen werden konnte (122). Eine Studie zeigte, dass, trotz fehlender Symptomatik, bei Patienten mit neu diagnostizierten blasenbildenden Autoimmunerkrankungen Veränderungen im unteren Harntrakt in der Zystoskopie gefunden werden konnte. Hierbei wurde jedoch nur eine Patientin mit einem SHP eingeschlossen (123). Bisher wurden Milz, Herz, Nieren und Leber nicht auf Autoantikörperablagerungen in Bezug auf das SHP untersucht. Die DIFs von Milz, Herz, Niere und Leber zeigten sich unauffällig. Dies war vor allem hinsichtlich Milz und Herz zu erwarten, da eine Expression von Laminin 332 in diesen Organen bisher nicht bekannt ist. Auch in den Basalmembranen der Niere kommt Laminin 332 bei gesunden Menschen nicht vor (124). Bei Patienten, die unter einer autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung litten, konnte hingegen renal verändertes Laminin 332 gefunden werden (125). In der Leber scheint bei Menschen und Mäusen Laminin 332 in den Gallengängen exprimiert zu werden, wobei dessen physiologische Rolle bisher nicht bekannt ist (126). Die gewonnenen Ergebnisse sind somit übereinstimmend mit der Literatur.

Die weiterführende Untersuchung der Gewebeproben von Mäusen, die ein positives Ergebnis in der DIF aufwiesen, bezüglich des entzündlichen Infiltrats und der Spaltbildung fand mithilfe der HE-Färbung und der im Methodenabschnitt beschriebenen Scoring-Systeme statt. Hierbei zeigten sowohl Proben der Konjunktiva, der Kornea, der bukkalen Mukosa als auch des Ösophagus korrespondierende entzündliche Infiltrate und Spaltbildungen. Vergleicht man die Vehikel-Kohorte mit den Behandlungsgruppen wird deutlich, dass bei all diesen Geweben im Hinblick auf das entzündliche Infiltrat eine Abnahme unter medikamentöser Therapie festgestellt werden konnte. Dies lässt sich anhand der pharmakologischen Wirkweise, wie bereits zuvor beschrieben,

nachvollziehen (116,118). Hierbei gibt es jedoch Unterschiede je nach Gewebetyp bezüglich des Ausmaßes der Reduktion von Entzündung und Spaltbildung. Betrachtet man die HE-Färbung der Kornea und der Konjunktiva, dann ist festzustellen, dass zwar die Entzündung und, im Fall der Konjunktiva, auch die Spaltbildung unter Behandlung verringert war, jedoch nicht mit einer Intensität wie in der bukkalen Mukosa und im Ösophagus. Im Fall des Konjunktiva-Scores konnte keine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Vehikel-Kohorte durch die Gabe von Dapson erreicht werden. Gleiches gilt für den Entzündungs-Score der Kornea. Auch dies lässt sich anhand der bisherigen Erfahrungen in der Patientenbehandlung mit Dapson nachvollziehen. So scheint Dapson in der Behandlung des okulären SHP einen weniger ausgeprägten antiinflammatorischen Effekt zu haben als zum Beispiel Mycophenolat-Mofetil (127). Zwar konnte der PDE4-Inhibitor als Monotherapie und in Kombination mit Dapson auch keine signifikante Verbesserung des Entzündungs-Scores der Kornea induzieren, doch fiel auf, dass die Spaltbildung im Gegensatz zur Monotherapie mit Dapson für die beiden anderen Therapieformen signifikant abnahm. Bei Betrachtung der bukkalen Mukosa und der ösophagealen Schleimhaut wird deutlich, dass sowohl unter der Behandlung mit Dapson und unter der bisher nicht etablierten Therapie mit einem PDE4-Inhibitor als auch unter der Kombinationstherapie mit beiden Medikamenten das entzündliche Infiltrat sowie die Spaltbildung stark abnahmen. Im Fall des entzündlichen Infiltrats der bukkalen Mukosa wies der PDE4-Inhibitor sogar einen noch niedrigeren Score als die Dapson-Behandlungsgruppe auf. Eine Verbesserung der Entzündung und der Spaltbildung unter der Kombinationstherapie ließ sich nicht nachweisen, sodass hier nicht von einem synergistischen Effekt auszugehen ist.

Zudem fiel auf, dass in Gewebeproben aus Haut, Zunge, Magen, Dün- und Dickdarm der DIF-positiven Mäuse wenig bzw. kein entzündliches Infiltrat nachgewiesen werden konnte. Dies kann mit der Beobachtung erklärt werden, dass nicht bei allen Patienten mit einem Anti-Laminin 332 SHP eine Invasion von Entzündungszellen nachweisbar und auch nicht erforderlich für die Diagnosestellung ist (128).

Eine Besonderheit stellte eine Dünndarmprobe der Vehikel-Kohorte dar, die sich durch pathologische Veränderungen auszeichnete. Die dort beschriebene Vakuolenbildung und die Verwachsungen in Verbindung mit einer verdickten Mukosa könnten auf ein Adenom hinweisen. Unter Adenomen versteht man Neoplasien verschiedener Gewebe, die z.B. im Dünndarm in ein Adenokarzinom übergehen können (129). Eine Assoziation des SHP mit der Bildung von Tumoren ist bisher nur für das Anti-Laminin 332 SHP bekannt (78). Diesbezüglich existieren zudem Fälle, in denen auch der Gastrointestinaltrakt, genauer gesagt Magen und Kolon, von einer Tumorbildung betroffen waren (130). Bezüglich des veränderten Gewebes in dieser Dünndarmprobe ist jedoch anzumerken, dass sich die Unterscheidung von Adenomen gegenüber hyperplastischem bzw. regenerativem Gewebe schwierig gestalten kann (131). Zur Bestätigung einer Korrelation zwischen der Erkrankung und Auffälligkeiten im Dünndarm wäre eine größere Anzahl an Proben notwendig. Zudem wird die bestehende Assoziation des Anti-Laminin 332 SHP mit soliden Tumoren bei ca. 25% der Patienten durch eine Triggerung der Autoimmunantwort durch eine aberante Expression von Laminin 332 erklärt. Diese Hypothese könnte in einem passiven Mausmodell somit nicht als Erklärung für das Auftreten von Malignomen herangezogen werden (132).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass angesichts der Ergebnisse der DIF und unter Berücksichtigung des korrespondierenden inflammatorischen Infiltrats und der Spaltbildung das neu etablierte aktive Mausmodell die bisher bekannten immunpathologischen Charakteristika der

SHP-Patienten widerspiegelt. Positive Ergebnisse in der DIF für die bis zu diesem Zeitpunkt nicht auf diese Weise untersuchten Gewebe könnten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Gastrointestinaltrakts geben, die bereits bei anderen bullösen Autoimmundermatosen beschrieben ist. Der Fakt, dass auch in diesem Mausmodell die Behandlung mit Dapson einen geringen okulären Effekt aufwies bei einer ausgeprägteren Wirkung auf die Wangenschleimhaut und den Ösophagus, unterstreicht dessen gute Übertragbarkeit auf die bisherigen Kenntnisse der Therapie bei Patienten. Zudem könnte das Mausmodell auch bei der Erforschung und Testung neuer, alternativer Therapieformen helfen, was angesichts des Mangels an qualitativ hochwertigen, randomisiert kontrollierten Studien zur medikamentösen Behandlung wertvoll ist. Die vorliegende Arbeit liefert zudem Hinweise, dass eine Behandlung mit einem PDE4-Inhibitor in Betracht gezogen werden könnte, da dieser vor allem hinsichtlich einer Verbesserung des Konjunktiva-Scores sowie einer Abnahme des inflammatorischen Infiltrats der Monotherapie mit Dapson überlegen war. PDE4-Inhibitoren sind bisher u.a. für die Behandlung der COPD, der Psoriasis sowie des Morbus Behçet zugelassen. Bei letzterer Erkrankung handelt es sich auch um eine Autoimmunerkrankung, die unter anderem durch orale Läsionen gekennzeichnet und somit klinisch zum Teil nur schwer von blasenbildenden Autoimmundermatosen zu unterscheiden ist. Eine Etablierung der PDE4-Inhibitor-Behandlung als eine für beide Krankheiten gleichermaßen geltende Behandlungsstrategie könnte so zu einer schnelleren und einfacheren Therapie führen (133,134). Zwar sind auch für PDE4-Inhibitoren z.B. gastrointestinale Nebenwirkungen und Gewichtsverlust unter der Therapie beschrieben, doch könnten diese verträglicher als bei Dapson sein (118). So haben Nebenwirkungen des Dapsons, wie die Entwicklung von hämolytischen Anämien oder Hautveränderungen, in der Vergangenheit zu Therapieabbrüchen geführt (61). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Versuchsteile können gewisse Limitationen festgestellt werden. Zum einen konnten aus zeitlichen Gründen nicht alle Gewebe bzw. alle Behandlungsgruppen untersucht werden. Außerdem erfolgte die Auswertung der Antikörper- bzw. C3 Ablagerungen nur deskriptiv. Dies stimmt jedoch auch mit dem Vorgehen in der Diagnostik überein.

Im vorherigen Versuchsteil konnte bereits gezeigt werden, dass sich essenzielle immunpathologische Charakteristika vom Menschen im aktiven Mausmodell spiegelten. Zur tiefergreifenden Beurteilung und zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bestand anschließend das Ziel, die Immunantwort *in vitro* zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden auf Basis von Zellkulturexperimenten und nach positivem „CXCL2-Screening“ verschiedene Entzündungsmediatoren im Sinne eines Pilotprojekts mit Hilfe einer DotBlot-Analyse auf Proteinebene analysiert. Auch hierbei wurde die Wirkung des PDE4-Inhibitors untersucht. Neben ihrer essenziellen strukturbildenden Funktion initiieren bereits die Keratinozyten eine komplexe Immunantwort über direkte und indirekte Interaktionen mit Immunzellen. Über Chemo- und Zytokine rekrutieren und aktivieren Keratinozyten diese und können beispielsweise über eine Antigenpräsentation via MHC-II Molekülen direkt mit T-Zellen agieren. Letzteres stellt u.a. einen wesentlichen Pathomechanismus in der Entstehung der Psoriasis dar. Neben einem initiierenden und intensivierenden Einfluss auf die Immunantwort können Keratinozyten über antimikrobielle Peptide eine direkt schädigende Wirkung entfalten (135,136). Wie bereits zuvor beschrieben war aus unpublizierten Daten des Instituts bekannt, dass die Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an Keratinozyten zum einen die Ausschüttung von CXCL2 in das Zellkulturmedium nach sich zieht als auch eine Ko-Inkubation mit dem PDE4-Inhibitor die Freisetzung verringert. Diese Erkenntnisse konnten im ELISA-Test bestätigt werden. Auch im DotBlot bestätigte sich die Tendenz, wodurch dessen Aussagekraft unterstrichen werden konnte.

Eine große Anzahl weiterer Entzündungsmediatoren konnte im Rahmen dieser Untersuchung nachgewiesen werden, von denen im Folgenden verschiedene aufgegriffen und in den Kontext des SHP eingeordnet werden sollen. Zum einen zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen des Komplementfaktors C5 und dessen aktivierter Form C5a. Diese Faktoren stellen einen grundlegenden Bestandteil der Komplementkaskade und der damit verbundenen Bildung des Membran-Angriff-Komplexes dar (82). Auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielt das Komplementsystem eine wichtige Rolle. So konnte am Beispiel des BP gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen C5- bzw. C5a-Rezeptoren fehlen, eine gewisse Resistenz gegenüber der Einwanderung von Granulozyten und somit gegenüber entzündlichen Prozessen zeigten (137,138). Das vermehrte Vorkommen von C5 bzw. C5a nach Anti-mLAMA $\alpha$ 3 IgG Bindung an die Keratinozyten impliziert, dass diese Faktoren auch in der Pathogenese des SHP eine Rolle spielen könnten. Dies ist besonders unter Berücksichtigung der Rolle von C5a in der Tumorprogression interessant, da das Anti-Laminin 332 SHP als fakultativ paraneoplastische Erkrankung mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist. So kann C5a die Motilität von Tumorzellen und damit das Potential zur Metastasierung fördern (128,139).

Auch als potenzielles Angriffsziel medikamentöser Therapien ist das Komplementsystem bereits in den Fokus gerückt. Der monoklonale Antikörper Eculizumab, gerichtet gegen C5, stellt zum Beispiel eine effektive Therapie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie dar (140). Auch für die Behandlung von bullösen Autoimmunerkrankungen könnten solche Strategien eine mögliche Option darstellen, wie bereits in einer nicht randomisiert-kontrollierten Studie für BP-Patienten getestet wurde. Hierbei wurden 9 am BP erkrankte Patienten mit Nomacopan, einem C5- und Leukotrien B4-Inhibitor, behandelt. Bei 7 Patienten führte dies zu einer signifikanten Reduktion der Krankheitsaktivität (141).

In histopathologischen Untersuchungen der Biopsien von SHP-Patienten wurde sowohl ein erhöhtes Vorkommen von neutrophilen als auch von eosinophilen Granulozyten beschrieben (99). In der DotBlot-Analyse gelang der Nachweis von Botenstoffen, welche korrelierend eine chemotaktische Wirkung auf die beiden Zelltypen aufweisen. Neben der bereits beschriebenen vermehrten Ausschüttung von C5a ist auch eine vermehrte Expression von CXCR2 mit der Migration von neutrophilen Granulozyten assoziiert (142). Auch das Chemokine Eotaxin, welches unter anderem eine anlockende Wirkung auf Eosinophile hat, fiel bei den mit Anti-mLAMA3 IgG inkubierten Keratinozyten durch eine erhöhte relative Änderung der *integrated density* auf (143). Bei Betrachtung der untersuchten Interleukine zeigten sich unterschiedliche Tendenzen. Einerseits zeigte sich bei den unbehandelten Keratinozyten ein verstärktes Vorkommen von IL-7. Neben dessen stimulierenden Effekts auf Vorläuferzellen der B-Zellen könnte eine vermehrte Ausschüttung von IL-7 mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen assoziiert sein. Zwar sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher nicht vollständig geklärt, doch fiel beispielsweise bei am Sjörgen-Syndrom erkrankten Personen in Analysen der Speicheldrüsen eine verstärkte Bildung von IL-7 und dessen Rezeptor auf (144,145). Der PDE4-Inhibitor führte in diesem Fall zu einer verminderten Ausschüttung. Im Hinblick auf IL-11 imponierte eine gegenteilige Wirkung. Unter der Therapie stieg das Vorkommen dieses Interleukins an. Betrachtet man die antiinflammatorische Wirkung von IL-11 könnte dies als positiver Effekt des PDE4-Inhibitors gewertet werden. IL-11 scheint über verschiedene Mechanismen antientzündliche Effekte aufzuweisen, indem es zum Beispiel blockierend auf Transkriptionsfaktoren von Makrophagen wirkt oder eine direkte antagonisierende Wirkung auf den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) entfalten kann. Diesbezüglich ist

zu erwähnen, dass die vollständige Wirkung von IL-11 bis heute nicht gänzlich verstanden ist und auch proinflammatorische Wirkweisen diskutiert werden (146). Des Weiteren fiel auch ein vermehrtes Vorkommen des *C-X3-C motif chemokine ligand 1* (CX3CL1, syn. *Fractalkine*) auf. CX3CL1 ist ein Transmembranprotein und Chemokin, welches über Bindung an dessen Rezeptor *C-X3-C motif chemokine receptor 1* an Adhäsions- und Migrationsprozessen verschiedener Zellen des Immunsystems beteiligt ist. Der hier vorliegende Nachweis unter Berücksichtigung der komplexen Funktionsweise der CX3CL1/CX3CR1-Achse, deren möglicher Einfluss auf Autoimmunerkrankungen und der Möglichkeit, therapeutisch in diese Kaskade eingreifen zu können, bot Anreiz, in der angestrebten Charakterisierung der Immunzellen auch den CX3CR1 zu berücksichtigen (147,148).

Insgesamt konnte mittels des DotBlots eine Vielzahl an Entzündungsmediatoren nach Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an die kultivierten Keratinozyten vermehrt nachgewiesen werden. Größtenteils konnte durch die Ko-Inkubation mit dem PDE4-Inhibitor eine Reduktion der Mediatoren bzw. eine mögliche anti-entzündliche Wirkung erfasst werden. Eine potenzielle Wirkung des Inhibitors wird durch den Fakt unterstrichen, dass auch die Isoform PDE4 in Keratinozyten nachgewiesen werden konnte (149). Der von PDE4-Inhibitoren gewirkte Effekt auf primärer Ebene der Keratinozyten war bereits Gegenstand von Studien und bietet weiterführendes Forschungspotential, untermauert durch die in diesem Versuchsteil angedeuteten Ergebnisse (150).

Trotz dieser vielversprechenden Erkenntnisse ist anzumerken, dass es sich hierbei um einen Pilot-Versuch handelte, bei der lediglich wenige Proben untersucht wurden. Zur Validierung und Objektivierung wäre eine größere Anzahl an untersuchten Materialien notwendig, um endgültige Aussagen hinsichtlich der beim SHP vorkommenden Entzündungsmediatoren und eines möglichen therapeutischen Nutzens des PDE4-Inhibitors treffen zu können.

Nach der DotBlot-vermittelten Veranschaulichung der verschiedenen Entzündungsmediatoren, welche bereits auf primärer Ebene durch die Keratinozyten ausgeschüttet werden, stellte sich anschließend die Frage, welche Immunzellen an der Pathogenese des SHP beteiligt sein könnten. Die Charakterisierung der Immunzellen für das SHP ist bisher nur wenig erforscht. Patienten weisen in histopathologischen Untersuchungen verschiedene Entzündungszellen, wie neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, teilweise auch eosinophile Granulozyten auf (86). Bei Patienten, die unter einem okulären SHP leiden, finden sich überwiegend Neutrophile und Th17-Zellen, aber auch dendritische Zellen (151,152). Betrachtet man erkrankte Mäuse, dann zeigt sich hier, dass Neutrophile mit 24% den größten Anteil am entzündlichen Infiltrat aufweisen. Häufig sind zudem Makrophagen (21%) und schließlich auch Lymphozyten (13%) zu finden (110).

Makrophagen scheinen in der Entstehung von Pemphigoid-Erkrankungen eine Rolle zu spielen, wie es beispielsweise für das BP bei noch weitestgehend unklaren zu Grunde liegenden Mechanismen beschrieben ist (153). Die in dieser Arbeit durchgeführte Doppelfärbung an (peri-) läsionalen Hautbiopsien von erkrankten Mäusen diente der weiteren Aufschlüsselung des entzündlichen Infiltrats unter Berücksichtigung des CX3CR1 auf den gefundenen Zellen. CX3CR1 wird u.a. von Zellen des Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, T- und B-Zellen sowie von natürlichen Killerzellen, ausgebildet. CX3CR1 und sein Ligand CX3CL1 können in Abhängigkeit vom Gewebe sowohl bei pro- als auch bei antiinflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen (154). In diesem Versuchsteil wurden zudem fluoreszierende Antikörper verwendet, die spezifisch Rezeptoren bzw. Proteine von unterschiedlichen Immunzellen binden. Das Protein Ly6G zählt zur Ly6-Protein Familie und dient als Oberflächenmarker zur Erkennung von neutrophilen

Granulozyten. Die genaue Funktion der Ly6-Proteine ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass deren verstärkte Expression z.B. bei der Migration von Neutrophilen eine wichtige Rolle spielt (155). Das Glykoprotein F4/80 hat sich zur Identifikation von Makrophagen, CD11c für dendritische Zellen etabliert (156,157). CD3 wird von T-Zellen exprimiert und formt mit dem *T cell receptor* (TCR) den TCR-CD3 Komplex. Dieser bildet einen wichtigen Bestandteil in der Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen. CD19 wird an der Oberfläche von B-Zellen ausgebildet (157). Auch CD22 findet sich auf B-Zellen und spielt eine Rolle in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort, u.a. in Form von Beeinflussung der Zellmigration und der Antigenantwort, sowie bei der Entwicklung von Autoimmunität (159).

Vor allem in der läsionalen Haut konnten die verschiedenen Immunzellen mithilfe ihrer Marker nachgewiesen werden. So fanden sich entsprechend der bisherigen Kenntnisse neben Ly6G-positiven Neutrophilen auch F4/80-positiv Makrophagen und CD3-positiv T-Zellen. Zudem fielen CD11c-markierte dendritische Zellen und aktivierte, CD22-positiv B-Zellen auf. Die so detektierten Zellen exprimierten zum Teil auch CX3CR1, dessen Ligand CX3CL1 sich besonders hoch reguliert im DotBlot zeigte. Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der Dermatomyositis, konnten CX3CR1-positiv T-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden (160). Interessanterweise wiesen im Gegensatz zu den anderen Entzündungszellen alle CD19-markierten B-Lymphozyten diesen Rezeptor auf. CX3CR1-positiv B-Zellen sind mit einer immunsuppressiven Wirkung assoziiert, indem sie CD4-positiv Effektor-T-Zellen hemmen (148). So wurde zum Beispiel in einer klinischen Studie in Blutproben von Patienten mit Nahrungsmittelallergien eine reduzierte Anzahl an CX3CR1-positiv B-Zellen gefunden (161). Der Fakt, dass in den Hautbiopsien ausschließlich jene positiven B-Zellen gefunden werden konnten, könnte auf die Einwanderung dieser zur Inhibierung autoreaktiver Effektor-T-Zellen hinweisen. Bei Betrachtung der CX3CR1-/CX3CL1-Achse fällt jedoch auf, dass deren Wirkprinzipien und die damit verbundenen Auswirkungen in der Literatur kontrovers diskutiert werden. So gibt es Hinweise, dass eine vermehrte Aktivität sowohl zu proinflammatorischen als auch kanzerogenen Effekten führt, andererseits auch antiinflammatorische und antitumorale Wirkweisen entfalten kann (154,162). Die Doppelfärbung hat gezeigt, dass vor allem in den Biopsien läsionaler Haut der erkrankten Mäuse auch die bisher beim Menschen vorgefundenen Immunzellen nachgewiesen werden konnten. Ein besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf die Expression des CX3CR1 gelegt, der von den untersuchten Immunzellen, insbesondere von allen detektierbaren B-Lymphozyten, in läsionalen Hautbiopsien exprimiert wurde.

Die verstärkte Aktivität von CX3CR1 und seinem Liganden scheint in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen. Neben den bereits zuvor genannten Auffälligkeiten in betroffenen Geweben von Dermatomyositis-Patienten wurden auch in Liquoruntersuchungen von Menschen, die unter einem Lupus erythematoses mit Befall des zentralen Nervensystems litten, erhöhte Spiegel von CX3CL1 detektiert (163). In Anbetracht der Ergebnisse dieses Versuchsteils könnte diese Achse auch eine Rolle beim Anti-Laminin 332 SHP spielen. Ob sie einen protektiven oder negativen Einfluss auf die Krankheitsentstehung und/oder -entwicklung hat, lässt sich anhand dieser Arbeit nicht feststellen. Auch als Angriffsziel in der Entwicklung von medikamentösen Therapien könnte CX3CR1/CX3CL1 potenziell dienen. Dies wird bereits in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis diskutiert. So konnte bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ein vermehrtes Vorkommen von CX3CL1 in betroffenen Gelenken registriert werden, was folglich zu einer Invasion von CX3CR1-positiv Immunzellen führte. Diesbezüglich gibt es

Anzeichen, dass Patienten von einem Eingreifen in diese Kaskade profitieren könnten (161,164). In Anbetracht der Komplexität der bisher nicht vollständig verstandenen Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und der damit verbundenen Zytokinantwort gestaltet sich eine pharmakologische Intervention schwierig. Für viele Autoimmunerkrankungen ist bekannt, dass eine Vielzahl an Zytokinen an der Krankheitsentstehung beteiligt ist, die oftmals wechselseitig miteinander agieren. Aus diesem Grund könnte es notwendig sein, nicht nur an einer Stelle in diese Kaskaden einzugreifen, sondern möglicherweise Kombinationstherapien zu erforschen, die mehrere Zytokine beeinflussen (165). Ein besonderer Aspekt ist jedoch der Fakt, dass für CX3CR1 lediglich ein Ligand bekannt ist und er somit ein interessantes Target darstellen könnte.

Limitierend ist zu erwähnen, dass es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang, eine Färbung für Biopsien der Schleimhäute zu etablieren. Zudem sind die zur Charakterisierung der Immunzellen verwendeten Antikörper nur eingeschränkt spezifisch. CD11c wird teilweise nicht nur von dendritischen Zellen, sondern auch von B-Lymphozyten ausgebildet. F4/80 wird hingegen von manchen Makrophagen in so geringen Mengen exprimiert, dass es nicht detektierbar ist. Trotz dieser nicht vollständigen Genauigkeit sind die verwendeten Marker, vor allem in Kombination, in der aktuellen Forschung etabliert und ausreichend, um Aussagen zur Charakterisierung der Immunzellen treffen zu können (156,166). Eine Absicherung der Ergebnisse könnte in zukünftigen Experimenten beispielsweise durch eine Durchflusszytometrie mit mehreren Oberflächenmarkern realisiert werden oder mittels single-cell RNA-Sequenzierungen von Biopsien der Mäuse. Auch müsste anhand von Patientenproben eine Übertragbarkeit auf den Menschen überprüft werden.

Das SHP wurde in der Vergangenheit aufgrund der oftmals imponierenden vernarbenden Prozesse auch als vernarbendes Pemphigoid bezeichnet (167). Aus diesem Grund diente dieser Versuchsteil der fokussierten Untersuchung eines möglicherweise an der mit dem SHP assoziierten Vernarbung beteiligten Zytokins, dem TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 weist verschiedene Funktionen im Organismus auf. So kann das Zytokin in Abhängigkeit der aktuellen Stoffwechsellage u.a. sowohl immunsuppressive als auch proinflammatorische Wirkungen entfalten und trägt zur Homöostase bei. Dennoch sind viele zu Grunde liegende Mechanismen nicht bekannt. Zum einen ist ein Mangel an TGF- $\beta$ 1 in Anbetracht seiner vielseitigen Wirkung auf T-Zellen mit dem Verlust der Selbsttoleranz und somit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen assoziiert (168). Andererseits konnte beispielsweise im Rahmen verschiedener Patientenstudien ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsschwere des SLE und dem gemessenen TGF- $\beta$ 1-Spiegel festgestellt werden. So korrelierte dieser invers mit der Krankheitsschwere der Autoimmundermatose (169,170). Außerdem spielt TGF- $\beta$ 1 bei Reparaturvorgängen und Wundheilung durch seine Wirkung auf Fibroblasten eine wichtige Rolle. Zwar sind die darauf beruhenden Prozesse teilweise noch ungeklärt, doch konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 auch in der Dysregulation von jenen Reparaturvorgängen in Form von überschießenden Narbenbildungen, hochreguliert war (171,172). Auch bei SHP-Patienten kann es zu vernarbenden Läsionen an Haut und Schleimhaut kommen, die vor allem am Auge schwerwiegende Folgen in Form von Sehbeeinträchtigung bis hin zur Erblindung nach sich ziehen können (128,173). Bei der Untersuchung der Mauseeren auf TGF- $\beta$ 1 konnten in Bezug auf das Gesamt-TGF- $\beta$ 1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten gefunden werden. Bei Betrachtung der aktiven Form fanden sich zwar keine signifikanten Unterschiede, jedoch war zumindest ein Anstieg von TGF- $\beta$ 1 in den Behandlungsgruppen festzustellen.

In zwei Studien wurde bereits die Wirkung von PDE4-Inhibitoren auf TGF- $\beta$ 1 untersucht. Neben den bereits zuvor genannten Funktionen zeigten diese Studien, dass TGF- $\beta$ 1 auch einen Einfluss auf die

Entwicklung von Organfibrosen, insbesondere der Lunge, hat. So konnte in Maus- und Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 als transformierender Wachstumsfaktor über eine vermehrte cAMP-PDE4-Aktivität jene Fibrosierung fördern könnte, weswegen der Einsatz von PDE4-Inhibitoren zur Behandlung fibrosierender Erkrankungen möglicherweise in Erwägung gezogen werden kann. In diesen Studien wurde der Gesamtspiegel von TGF- $\beta$ 1 bestimmt, der unter der Behandlung mit den PDE4-Inhibitoren 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Roflumilast und Piclamilast abnahm. Dies ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen. Im Gegensatz dazu konnte sogar ein Anstieg des aktiven TGF- $\beta$ 1 festgestellt werden, welches in jenen Studien jedoch nicht berücksichtigt wurde (174,175). Eine Interpretation dieser Tendenz könnte lediglich vermuten lassen, dass unter der medikamentösen Therapie gewisse Reparatureffekte eingesetzt haben und, ähnlich wie beim SLE, ein erhöhter TGF- $\beta$ 1 Spiegel mit einer Abnahme der Krankheitsschwere assoziiert sein könnte. In Anbetracht der noch nicht vollständig geklärten Wirkungsweise von TGF- $\beta$ 1, der fehlenden Abgrenzbarkeit zur Korrelation von dessen erhöhter Ausschüttung zu Narbenbildung und Fibrose sowie angesichts der fehlenden Signifikanz der Ergebnisse sind diese Aussagen eher spekulativen Charakters. Trotzdem könnten diese Ergebnisse Anreiz für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Funktionsweise des Zytokins in der Pathogenese des SHP und dessen Behandlung geben.

Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Arbeit, dass das etablierte aktive Mausmodell essenzielle immunpathologische Charakteristika von SHP-Patienten widerspiegelt und somit als Basis weiterer Forschung dienen kann. Die Ergebnisse deuten an, dass eine medikamentöse Intervention mit PDE4-Inhibitoren eine zukünftige Therapieoption darstellen könnte. Zudem liefern die durchgeführten in vitro Versuche mögliche Hinweise auf an der Pathogenese beteiligte Faktoren.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Matsui T. Epidermal Barrier Development via Corneoptosis: A unique form of cell death in stratum granulosum cells. *J Dev Biol.* 2023;11(4):43.
2. Mojumdar EH, Pham QD, Topgaard D, Sparr E. Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Sci Rep.* 2017;7(1):15712.
3. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(6):345–58.
4. Morizane S, Mukai T, Sunagawa K, Tachibana K, Kawakami Y, Ouchida M. “Input/output cytokines” in epidermal keratinocytes and the involvement in inflammatory skin diseases. *Front Immunol.* 2023;14:1239598.
5. Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(1):19–30.
6. Seneschal J, Clark RA, Gehad A, Baecher-Allan CM, Kupper TS. Human epidermal langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory t cells. *Immunity.* 2012;36(5):873–84.
7. Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, Firozi P, Woo SH, Ranade S, Patapoutian A, Lumpkin EA. Epidermal merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature.* 2014;509(7502):617–21.
8. Losquadro WD. Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plast Surg Clin N Am.* 2017;25(3):283–9.
9. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, Park KC. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2126.
10. Nguyen AV, Soulika AM. The dynamics of the skin’s immune system. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1811.
11. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* 2008;1(1):31–7.
12. Horowitz A, Chanez-Paredes SD, Haest X, Turner JR. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023;20(7):417–32.
13. Blevins CH, Iyer PG, Vela MF, Katzka DA. The esophageal epithelial barrier in health and disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018;16(5):608–17.
14. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(6):352–61.
15. Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):639–49.
16. Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol.* 2011;73(1):213–37.

17. Grundmann D, Loris E, Maas-Omlor S, Schäfer K. Enteric neurogenesis during life span under physiological and pathophysiological conditions. *Anat Rec.* 2019;302(8):1345–53.
18. Neuhuber WL, Wörl J. Enteric co-innervation of striated muscle in the esophagus: still enigmatic? *Histochem Cell Biol.* 2016;146(6):721–35.
19. Hillion S, Arleevskaya MI, Blanco P, Bordron A, Brooks WH, Cesbron JY, Kaveri S, Vivier E, Renaudineau Y. The innate part of the adaptive immune system. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(2):151–4.
20. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology.* 2016;148(2):125–39.
21. Cancro MP, Tomayko MM. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol Rev.* 2021;303(1):72–82.
22. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):375–88.
23. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human t cell development, localization, and function throughout life. *Immunity.* 2018;48(2):202–13.
24. Tsai S, Santamaria P. MHC class II polymorphisms, autoreactive t-cells, and autoimmunity. *Front Immunol.* 2013.
25. Brummelman J, Pilipow K, Lugli E. The single-cell phenotypic identity of human CD8+ and CD4+ t cells. In: *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier; 2018.
26. Zhu J. T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(10):a030338.
27. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S24–32.
28. Sun S, Wijanarko K, Liani O, Strumila K, Ng ES, Elefanty AG, Stanley EG. Lymphoid cell development from fetal hematopoietic progenitors and human pluripotent stem cells. *Immunol Rev.* 2023;315(1):154–70.
29. Rawlings DJ, Metzler G, Wray-Dutra M, Jackson SW. Altered b cell signalling in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(7):421–36.
30. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S41–52.
31. Cobb BA. The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology.* 2020;30(4):202–13.
32. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5.
33. Moritz B, Stracke JO. Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies: General. *ELECTROPHORESIS.* 2017;38(6):769–85.
34. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. *Antibodies.* Dezember 2019;8(4):55.

35. Kim J, Lee JY, Kim HG, Kwak MW, Kang TH. Fc receptor variants and disease: A crucial factor to consider in the antibody therapeutics in clinic. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9489.
36. Lewis BJB, Branch DR. Mouse models of rheumatoid arthritis for studies on immunopathogenesis and preclinical testing of Fc receptor-targeting biologics. *Pharmacology.* 2020;105(11–12):618–29.
37. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 2012;119(24):5640–9.
38. Bakema JE, van Egmond M. The human immunoglobulin A Fc receptor FcαRI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2011;4(6):612–24.
39. Azzawi S, Penzi LR, Senna MM. Immune privilege collapse and alopecia Development: Is stress a factor. *Skin Appendage Disord.* 2018;4(4):236–44.
40. Mölzer C, Heissigerova J, Wilson HM, Kuffova L, Forrester JV. Immune privilege: The microbiome and uveitis. *Front Immunol.* 2021;11:608377.
41. Stepp MA, Menko AS. Immune responses to injury and their links to eye disease. *Transl Res.* 2021;236:52–71.
42. Mobaraki M, Abbasi R, Omidian Vandchali S, Ghaffari M, Moztafzadeh F, Mozafari M. Corneal repair and regeneration: Current concepts and future directions. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:135.
43. Liu J, Li Z. Resident innate immune cells in the cornea. *Front Immunol.* 2021;12:620284.
44. Jiang Q, Yang G, Liu Q, Wang S, Cui D. Function and role of regulatory t cells in rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2021;12:626193.
45. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol.* 2017;18(7):716–24.
46. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for b cells. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(5):281–94.
47. Kawasaki T, Kawai T. Discrimination between self and non-self-nucleic acids by the innate immune system. In: *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier; 2019. S. 1–30.
48. Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *The Lancet.* 2013;382(9894):819–31.
49. Zhang Y, Liu J, Wang C, Liu J, Lu W. Toll-like receptors gene polymorphisms in autoimmune disease. *Front Immunol.* 2021;12:672346.
50. Smatti MK, Cyprian FS, Nasrallah GK, Al Thani AA, Almishal RO, Yassine HM. Viruses and autoimmunity: A review on the potential interaction and molecular mechanisms. *Viruses.* 2019;11(8):762.
51. Jones BE, Maerz MD, Buckner JH. IL-6: a cytokine at the crossroads of autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2018;55:9–14.

52. Tasanen K, Varpuluoma O, Nishie W. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-associated bullous pemphigoid. *Front Immunol.* 2019;10:1238.
53. Schmidt E, Zillikens D. Pemphigoid diseases. *The Lancet.* 2013;381(9863):320–32.
54. Egami S, Yamagami J, Amagai M. Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(4):1031–47.
55. Bieber K, Ludwig R. Drug development in pemphigoid diseases. *Acta Derm Venereol.* 2020;100(5):adv00055-114.
56. Van Beek N, Zillikens D, Schmidt E. Bullous autoimmune dermatoses. *Dtsch Ärztebl Int.* 2021.
57. Antiga E, Maglie R, Quintarelli L, Verdelli A, Bonciani D, Bonciolini V, Caproni M. Dermatitis herpetiformis: Novel perspectives. *Front Immunol.* 2019;10:1290.
58. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *The Lancet.* 2019;394(10201):882–94.
59. Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, Bernauer W, Cooper KD, Elder MJ, Fine JD, Foster CS, Ghohestani R, Hashimoto T, Hoang-Xuan T, Kirtschig G, Korman NJ, Lightman S, Lozada-Nur F, Marinkovich MP, Mondino BJ, Prost-Squarcioni C, Rogers RS 3rd, Setterfield JF, West DP, Wojnarowska F, Woodley DT, Yancey KB, Zillikens D, Zone JJ. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: Definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol.* 2002;138(3).
60. Rashid H, Lamberts A, Borradori L, Alberti-Violetti S, Barry RJ, Caproni M, et al. European guidelines (S3) on diagnosis and management of mucous membrane pemphigoid, initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology – Part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021;35(9):1750–64.
61. Schmidt E, Rashid H, Marzano AV, Lamberts A, Di Zenzo G, Diercks GFH, et al. European Guidelines (S3) on diagnosis and management of mucous membrane pemphigoid, initiated by the European Academy of Dermatology and Venereology – Part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021;35(10):1926–48.
62. Hübner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases in Germany. *J Invest Dermatol.* 2016;136(12):2495–8.
63. Kridin K. Subepidermal autoimmune bullous diseases: overview, epidemiology, and associations. *Immunol Res.* 2018;66(1):6–17.
64. Bruckner-Tuderman L, Has C. Disorders of the cutaneous basement membrane zone—The paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol.* 2014;33:29–34.
65. LeBleu VS, MacDonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med.* 2007;232(9):1121–9.
66. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(2):a002543–a002543.
67. Zhang H, Labouesse M. The making of hemidesmosome structures in vivo. *Dev Dyn.* 2010.
68. Walko G, Castañón MJ, Wiche G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res.* 2015;360(2):363–78.

69. Goletz S, Zillikens D, Schmidt E. Structural proteins of the dermal-epidermal junction targeted by autoantibodies in pemphigoid diseases. *Exp Dermatol*. 2017;26(12):1154–62.
70. Arimori T, Miyazaki N, Mihara E, Takizawa M, Taniguchi Y, Cabañas C, u. a. Structural mechanism of laminin recognition by integrin. *Nat Commun*. 2021;12(1):4012.
71. Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JCR, Kobayashi H. Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol*. 2008;17(6):473–80.
72. Pozzi A, Yurchenco PD, Iozzo RV. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol*. 2017;57–58:1–11.
73. Du G, Patzelt S, van Beek N, Schmidt E. Mucous membrane pemphigoid. *Autoimmun Rev*. 2022;21(4):103036.
74. Berndt A, Gaßler N, Franz M. Invasion-associated reorganization of laminin 332 in oral squamous cell carcinomas: The role of the laminin  $\gamma$ 2 chain in tumor biology, diagnosis, and therapy. *Cancers*. 2022;14(19):4903.
75. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adhes Migr*. 2013;7(1):48–55.
76. Rousselle P, Scoazec JY. Laminin 332 in cancer: When the extracellular matrix turns signals from cell anchorage to cell movement. *Semin Cancer Biol*. 2020;62:149–65.
77. Pânzaru MC, Caba L, Florea L, Braha EE, Gorduza EV. Epidermolysis bullosa—A different genetic approach in correlation with genetic heterogeneity. *Diagnostics*. 2022;12(6):1325.
78. Tsuruta D, Kobayashi H, Imanishi H, Sugawara K, Ishii M, Jones J. Laminin-332-integrin interaction: A target for cancer therapy? *Curr Med Chem*. 2008;15(20):1968–75.
79. Katayama H. Mechanism of anchorage-independency and tumor formation of cancer cells: possible involvement of cell membrane-bound laminin-332. *Cell Tissue Res*. 2020;379(2):255–9.
80. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: Role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6.
81. Vignesh P, Rawat A, Sharma M, Singh S. Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta*. 2017;465:123–30.
82. Reis ES, Mastellos DC, Hajishengallis G, Lambris JD. New insights into the immune functions of complement. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):503–16.
83. Barratt J, Weitz I. Complement factor D as a strategic target for regulating the alternative complement pathway. *Front Immunol*. 2021;12:712572.
84. Pace A, Scirocchi F, Napoletano C, Zizzari IG, D'Angelo L, Santoro A, Nuti M, Rahimi H, Rughetti A. Glycan-lectin interactions as novel immunosuppression drivers in glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):6312.
85. Weinstein A, Alexander RV, Zack DJ. A review of complement activation in SLE. *Curr Rheumatol Rep*. 2021;23(3):16.

86. Buonavoglia A, Leone P, Dammacco R, Di Lernia G, Petrucci M, Bonamonte D, Vacca A, Racanelli V, Dammacco F. Pemphigus and mucous membrane pemphigoid: An update from diagnosis to therapy. *Autoimmun Rev.* 2019;18(4):349–58.
87. Cizenski JD, Michel P, Watson IT, Frieder J, Wilder EG, Wright JM, Menter MA. Spectrum of orocutaneous disease associations. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(5):795–806.
88. Hiroyasu S, Turner CT, Richardson KC, Granville DJ. Proteases in pemphigoid diseases. *Front Immunol.* 2019;10:1454.
89. Olbrich M, Künstner A, Witte M, Busch H, Fähnrich A. Genetics and omics analysis of autoimmune skin blistering diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2327.
90. Amber KT, Bloom R, Hertl M. A systematic review with pooled analysis of clinical presentation and immunodiagnostic testing in mucous membrane pemphigoid: association of anti-laminin-332 IgG with oropharyngeal involvement and the usefulness of ELISA. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(1):72–7.
91. Kourosh AS, Yancey KB. Pathogenesis of mucous membrane pemphigoid. *Dermatol Clin.* 2011;29(3):479–84, x.
92. Dart JK. The 2016 Bowman lecture conjunctival curses: scarring conjunctivitis 30 years on. *Eye.* 2017;31(2):301–32.
93. Taurone S, Spoletini M, Ralli M, Gobbi P, Artico M, Imre L, Czakò C, Kovács I, Greco A, Micera A. Ocular mucous membrane pemphigoid: a review. *Immunol Res.* 2019;67(2–3):280–9.
94. Goletz S, Probst C, Komorowski L, Schlumberger W, Fechner K, van Beek N, u. a. A sensitive and specific assay for the serological diagnosis of antilaminin 332 mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol.* 2019;180(1):149–56.
95. Shi L, Li X, Qian H. Anti-laminin 332-type mucous membrane pemphigoid. *Biomolecules.* 2022;12(10):1461.
96. Carey B, Setterfield J. Mucous membrane pemphigoid and oral blistering diseases. *Clin Exp Dermatol.* 2019;44(7):732–9.
97. Holtsche MM, Zillikens D, Schmidt E. Schleimhautpemphigoid. *Hautarzt.* 2018;69(1):67–83.
98. Shimanovich I, Nitz JM, Zillikens D. Multiple and repeated sampling increases the sensitivity of direct immunofluorescence testing for the diagnosis of mucous membrane pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(4):700-705.e3.
99. Scully C, Lo Muzio L. Oral mucosal diseases: Mucous membrane pemphigoid. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008;46(5):358–66.
100. Xu HH, Werth VP, Parisi E, Sollecito TP. Mucous membrane pemphigoid. *Dent Clin North Am.* 2013;57(4):611–30.
101. Lazarova Z, Sitaru C, Zillikens D, Yancey KB. Comparative analysis of methods for detection of anti-laminin 5 autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(6):886–92.

102. Hofmann SC, Günther C, Böckle BC, Didona D, Ehrchen J, Gaskins M, Geerling G, Gläser R, Hadaschik E, Hampl M, Haßkamp P, Jackowski J, Kiritsi D, Nast A, Pleyer U, Reichel C, Roth M, Schumann M, Sticherling M, Worm M, Zillikens D, Goebeler M, Schmidt E. S2k Guideline for the diagnosis and treatment of mucous membrane pemphigoid. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 2022;20(11):1530–50.
103. Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3(1):17026.
104. Sadik CD, Schmidt E. Resolution in bullous pemphigoid. *Semin Immunopathol.* 2019;41(6):645–54.
105. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest.* 2005;115(4):870–8.
106. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Büning J, Gebert A, Ishiko A, Zillikens D. Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol.* 2006;177(5):3461–8.
107. Woodley DT, Chang C, Saadat P, Ram R, Liu Z, Chen M. Evidence that anti-Type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol.* 2005;124(5):958–64.
108. Lazarova Z, Yee C, Darling T, Briggaman RA, Yancey KB. Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *J Clin Invest.* 1996;98(7):1509–18.
109. Lazarova Z, Hsu R, Briggaman RA, Yancey KB. Fab fragments directed against laminin 5 induce subepidermal blisters in neonatal mice. *Clin Immunol.* 2000;95(1):26–32.
110. Heppe EN, Tofern S, Schulze FS, Ishiko A, Shimizu A, Sina C, Zillikens D, Köhl J, Goletz S, Schmidt E. Experimental laminin 332 mucous membrane pemphigoid critically involves C5aR1 and reflects clinical and immunopathological characteristics of the human disease. *J Invest Dermatol* 2017;137(8):1709–18.
111. Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, Johann PS, Pfeffer J, Radeke HH, Schön MP, Kaufmann R, Boehncke WH, Podda M. Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 2005;125(5):969–76.
112. Scialpi R, Arrè V, Giannelli G, Dituri F. Laminin-332  $\gamma$ 2 monomeric chain promotes adhesion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancers.* 2023;15(2):373.
113. Isakson BE, Olsen CE, Boitano S. Laminin-332 alters connexin profile, dye coupling and intercellular Ca<sup>2+</sup> waves in ciliated tracheal epithelial cells. *Respir Res.* 2006;7(1):105.
114. Nguyen NM, Pulkkinen L, Schlueter JA, Meneguzzi G, Uitto J, Senior RM. Lung development in laminin  $\gamma$ 2 deficiency: abnormal tracheal hemidesmosomes with normal branching morphogenesis and epithelial differentiation. *Respir Res.* 2006;7(1):28.
115. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018;285(16):2944–71.

116. Ghaoui N, Hanna E, Abbas O, Kibbi AG, Kurban M. Update on the use of dapsone in dermatology. *Int J Dermatol.* 2020;59(7):787–95.
117. Li H, Zuo J, Tang W. Phosphodiesterase-4 Inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9:1048.
118. Wedzicha J, Calverley P, Rabe K. Roflumilast: a review of its use in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;81.
119. Hoffmann JHO, Enk AH. High-dose intravenous immunoglobulin in skin autoimmune disease. *Front Immunol.* 2019;10:1090.
120. Lu C-Y., Hsieh M -S., Wei K -C., Ezmerli M, Kuo C -H., Chen W. Gastrointestinal involvement of primary skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* Dezember 2020;34(12):2766–74.
121. Pietrzak B, Tomela K, Olejnik-Schmidt A, Mackiewicz A, Schmidt M. Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9254.
122. Kang S, Ha Y, Ko Y, Kang S, Joo K, Cho H, Park HS, Kim CH, Kwon SY, Kim JJ, Cheon J, Lee JG. Effect of laminin 332 on motility and invasion in bladder cancer. *Kaohsiung J Med Sci.* 2013;29(8):422–9.
123. Tsiriopoulos I, Sofikitis N, Kiorpelidou D, Gaitanis G, Bassukas ID. Lower urinary tract involvement in patients with newly diagnosed autoimmune bullous dermatoses: An urethroscopical study. *Am J Med Sci.* 2010;340(2):109–13.
124. Jandl K, Mutgan AC, Eller K, Schaefer L, Kwapiszewska G. The basement membrane in the cross-roads between the lung and kidney. *Matrix Biol.* 2022;105:31–52.
125. Vijayakumar S, Dang S, Marinkovich MP, Lazarova Z, Yoder B, Torres VE, Wallace DP. Aberrant expression of laminin-332 promotes cell proliferation and cyst growth in ARPKD. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 2014;306(6):F640–54.
126. Yamada M, Okada H, Kikkawa Y, Miyajima A, Itoh T. Tissue substructure-specific deposition of the  $\beta$ 3-containing laminin-332 in the biliary epithelium of human and mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(2):465–71.
127. Sobolewska B, Deuter C, Zierhut M. Current medical treatment of ocular mucous membrane pemphigoid. *Ocul Surf.* 2013;11(4):259–66.
128. Shi L, Li X, Qian H. Anti-laminin 332-type mucous membrane pemphigoid. *Biomolecules.* 2022;12(10):1461.
129. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL, Vigneau FD. The epidemiology and pathogenesis of neoplasia in the small intestine. *Ann Epidemiol.* 2009;19(1):58–69.
130. La Placa M, Balestri R, Tartari F, Sechi A, Ferrara F, Loi C, Patrizi A, Bardazzi F. Mucous membrane pemphigoid-associated malignancies. Case series and a brief overview of the literature. *Dermatol Pract Concept.* 2019;119–25.
131. Kóvári B, Kim BH, Lauwers GY. The pathology of gastric and duodenal polyps: current concepts. *Histopathology.* 2021;78(1):106–24.

132. Patzelt S, Schmidt E. Autoimmunity against laminin 332. *Front Immunol.* 2023 10;14,
133. Saadoun D, Bodaghi B, Cacoub P. Behçet's Syndrome. *Ingelfinger JR, Herausgeber. N Engl J Med.* 2024;390(7):640–51.
134. Nast A, Smith C, Spuls PI, Avila Valle G, Bata-Csörgö Z, Boonen H, De Jong E, Garcia-Doval I, Gisondi P, Kaur-Knudsen D, Mahil S, Mälkönen T, Maul JT, Mburu S, Mrowietz U, Reich K, Remenyik E, Rønholt KM, Sator PG, Schmitt-Egenolf M, Sikora M, Strömer K, Sundnes O, Trigos D, Van Der Kraaij G, Yawalkar N, Dressler C. EuroGuiDerm Guideline on the systemic treatment of Psoriasis vulgaris – Part 1: treatment and monitoring recommendations. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34(11):2461–98.
135. Zhou X, Chen Y, Cui L, Shi Y, Guo C. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. *Cell Death Dis.* 2022;13(1):81.
136. Piipponen M, Li D, Landén NX. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8790.
137. Sadik CD, Miyabe Y, Sezin T, Luster AD. The critical role of C5a as an initiator of neutrophil-mediated autoimmune inflammation of the joint and skin. *Semin Immunol.* 2018;37:21–9.
138. Karsten CM, Beckmann T, Holtsche MM, Tillmann J, Tofern S, Schulze FS, Heppe EN, Ludwig RJ, Zillikens D, König IR, Köhl J, Schmidt E. Tissue destruction in bullous pemphigoid can be complement independent and may be mitigated by C5aR2. *Front Immunol.* 2018;9:488.
139. Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Pio R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;85:153–63.
140. Hill A, DeZern AE, Kinoshita T, Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3(1):17028.
141. Sadik CD, Rashid H, Hammers CM, Diercks GFH, Weidinger A, Beissert S, Schauer F, Fettiplace J, Thaçi D, Ngai Y, Nunn MA, Zillikens D, Horváth B. Evaluation of nomacopan for treatment of bullous pemphigoid: A phase 2a nonrandomized controlled trial. *JAMA Dermatol.* 2022;158(6):641.
142. Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(5):433–50.
143. Yu L, Li L. Potential biomarkers of atopic dermatitis. *Front Med.* 2022;9:1028694.
144. Chen D, Tang TX, Deng H, Yang XP, Tang ZH. Interleukin-7 biology and its effects on immune cells: mediator of generation, differentiation, survival, and homeostasis. *Front Immunol.* 2021;12:747324.
145. Marković I, Savvides SN. Modulation of signaling mediated by TSLP and IL-7 in inflammation, autoimmune diseases, and cancer. *Front Immunol.* 2020;11:1557.
146. Xu DH, Zhu Z, Wakefield MR, Xiao H, Bai Q, Fang Y. The role of IL-11 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 2016;373(2):156–63.
147. Muraoka S, Nishio J, Kuboi Y, Imai T, Nanki T. Rationale for and clinical development of anti-fractalkine antibody in rheumatic diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2020;20(11):1309–19.

148. Li N, Jiang P, Chen A, Luo X, Jing Y, Yang L, et al. CX3CR1 positively regulates BCR signaling coupled with cell metabolism via negatively controlling actin remodeling. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(21):4379–95.
149. Chujor CSN, Hammerschmid F, Lam C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 subtypes are differentially expressed by primary keratinocytes and human epidermoid cell lines. *J Invest Dermatol.* 1998;110(3):287–91.
150. Kataoka S, Takaishi M, Nakajima K, Sano S. Phosphodiesterase-4 inhibitors reduce the expression of proinflammatory mediators by human epidermal keratinocytes independent of intracellular cAMP elevation. *J Dermatol Sci.* 2020;100(3):230–3.
151. Bernauer W, Wright P, Dart JK, Leonard JN, Lightman S. The Conjunctiva in acute and chronic mucous membrane pemphigoid. *Ophthalmology.* 1993;100(3):339–46.
152. Bose T. Role of immune cells in the ocular manifestations of pemphigoid diseases. *Ther Adv Ophthalmol.* 2019;11:251584141986812.
153. Riani M, Muller C, Bour C, Bernard P, Antonicelli F, Le Jan S. Blister fluid induces MMP-9-associated M2-Type macrophages in bullous pemphigoid. *Front Immunol.* 2019;10:1858.
154. Lee M, Lee Y, Song J, Lee J, Chang SY. Tissue-specific role of CX<sub>3</sub>CR1 expressing immune cells and their relationships with human disease. *Immune Netw.* 2018;18(1):e5.
155. Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol.* 2013;94(4):585–94.
156. dos Anjos Cassado A. F4/80 as a major macrophage marker: The case of the peritoneum and spleen. In: Kloc M, Herausgeber. *Macrophages.* Cham: Springer International Publishing; 2017. S. 161–79. (Results and problems in cell Differentiation; Bd. 62).
157. Heger L, Hofer TP, Bigley V, de Vries IJM, Dalod M, Dudziak D, Ziegler-Heitbrock L. Subsets of CD1c+ DCs: dendritic cell versus monocyte lineage. *Front Immunol.* 2020;11:559166.
158. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic t cell engineering. *Nature.* 2017;545(7655):423–31.
159. Clark EA, Giltaiy NV. CD22: A regulator of innate and adaptive b cell responses and autoimmunity. *Front Immunol.* 2018;9:2235.
160. Suzuki F, Kubota T, Miyazaki Y, Ishikawa K, Ebisawa M, Hirohata S, Ogura T, Mizusawa H, Imai T, Miyasaka N, Nanki T. Serum level of soluble CX3CL1/fractalkine is elevated in patients with polymyositis and dermatomyositis, which is correlated with disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R48.
161. Wu Z. CX3CR1(+) b cells show immune suppressor properties. *J Biol Chem.* 2014;289(33):22630–5.
162. Ishida Y, Kuninaka Y, Yamamoto Y, Nosaka M, Kimura A, Furukawa F, Mukaida N, Kondo T. Pivotal involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis for the recruitment of M2 tumor-associated macrophages in skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2020;140(10):1951-1961.e6.

163. Guo L, Lu X, Wang Y, Bao C, Chen S. Elevated levels of soluble fractalkine and increased expression of CX3CR1 in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Exp Ther Med*. 2017;14(4):3153–8.
164. Tanaka Y, Hoshino-Negishi K, Kuboi Y, Tago F, Yasuda N, Imai T. Emerging role of fractalkine in the treatment of rheumatic diseases. *ImmunoTargets Ther*. 2020;Volume 9:241–53.
165. Richmond JM, Strassner JP, Essien KI, Harris JE. T-cell positioning by chemokines in autoimmune skin diseases. *Immunol Rev*. 2019;289(1):186–204.
166. Winslow GM, Papillion AM, Kenderes KJ, Levack RC. CD11c+ t-bet+ memory b cells: Immune maintenance during chronic infection and inflammation? *Cell Immunol*. 2017;321:8–17.
167. Fleming TE, Korman NJ. Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(4):571–94.
168. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune response by TGF- $\beta$ : from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(6):a022236.
169. Becker-Merok A, Eilertsen GØ, Nossent JC. Levels of transforming growth factor- $\beta$  are low in systemic lupus erythematosus patients with active disease. *J Rheumatol*. 2010;37(10):2039–45.
170. Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler MM, Horwitz DA. The relationship between defects in lymphocyte production of transforming growth factor- $\beta$ 1 in systemic lupus erythematosus and disease activity or severity. *Lupus*. 1999;8(2):90–4.
171. Lodyga M, Hinz B. TGF- $\beta$ 1 – A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;101:123–39.
172. Ponedal A, Zhu S, Sprangers AJ, Wang XQ, Yeo DC, Lio DCS, Zheng M, Capek M, Narayan SP, Meckes B, Paller AS, Xu C, Mirkin CA. Attenuation of abnormal scarring using spherical nucleic acids targeting transforming growth factor beta 1. *ACS Appl Bio Mater*. 2020;3(12):8603–10.
173. Branisteanu D, Stoleriu G, Branisteanu D, Boda D, Branisteanu C, Maranduca M, Moraru A, Stanca HT, Zemba M, Balta F. Ocular cicatricial pemphigoid (Review). *Exp Ther Med*. 2020.
174. Kolosionek E, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Guenther A, Grimminger F, Seeger W, Banat GA, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: The role of phosphodiesterase 4. *Mol Biol Cell*. 2022;33(9):cor2.
175. Sisson TH, Christensen PJ, Muraki Y, Dils AJ, Chibucos L, Subbotina N, Tohyama K, Horowitz JC, Matsuo T, Bailie M, Nikam S, Hazama M. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces lung fibrosis following targeted type II alveolar epithelial cell injury. *Physiol Rep*. 2018;6(12):e13753.

## **8 Anhänge**

### **8.1 Originalarbeiten**

- Patzelt S, Pigors M, Steenbock H, **Diel L**, Boch K, Chakievska L, Künzel S, Busch H, Fähnrich A, Brinckmann J, Schmidt E. Increased Fibrosis in a Mouse Model of Anti-Laminin 332 Mucous Membrane Pemphigoid Remains Unaltered by Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase. Front Immunol. 2022

### **8.2 Veröffentlichte Abstracts**

- Patzelt S, **Diel L**, Ranjbar M, Pigors M, Emtenani S, Bieber K, Holtsche MM, Goletz S, Chakievska L, Ludwig RJ, Zillikens D, Schmidt E. PDE4 inhibition improves clinical lesions in a novel immunization-induced mouse model of mucous membrane pemphigoid. 48. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 24.-26.02.2022, online, Exp Dermatol 2022; 31: e60. (ausgewählt als Vortrag)

## 9 Danksagungen

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt für die großartige Chance, in einem solch spannenden Themengebiet forschen und lernen zu können. Danke für die vielen fachlich-kritischen und unterstützenden Gespräche, die mir immer sehr viel weitergeholfen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Sabrina Patzelt. Ich danke dir von Herzen für deine immerwährende Geduld, für deine Motivation und für deine unheimlich hilfreiche, kompetente Unterstützung, die du mir bei den kleinen und großen Problemen jeden Tag entgegengebracht hast. Durch deine humorvolle, offene Art hat mir die Arbeit im Labor und am Schreibtisch viel Spaß bereitet. Danke.

Außerdem danke ich dem ganzen Team des LIED, insbesondere Sylvana Schult, Vanessa Krull und Izabela Tomczak. Ihr habt mich offenherzig aufgenommen und standet mir bei all meinen Fragen geduldig zur Seite. Es war großartig, Teil eures Teams sein zu dürfen.

Danke auch an Nathalie Groß und Dr. Anika Kasprick für die tolle Hilfe bei der Auswertung meiner LegendPlex-Untersuchung.

Danke an die Klinik für Dermatologie, Allergologie & Venerologie des UKSH, Campus Lübeck, für die Bereitstellung der drei verwendeten Patientenfotos.

Vielen Dank an Dr. Annika Sünderhauf vom Institut für Ernährungsmedizin für die Unterstützung bei der Beurteilung der auffälligen Dünndarmprobe.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Dr. Katja Bieber und Prof. Dr. Ralf Ludwig, die mir freundlicherweise die mCOL7c Kaninchenseren zur Verfügung gestellt haben.

Ohne die Unterstützung und Liebe meiner Familie wäre ich niemals an dieser Stelle. Ich danke meiner Mama, meinem Papa, meinem Bruder, meinem Opa, meiner Patentante und meinem Onkel – ihr wart und seid mein ganzes Leben an meiner Seite. Egal, was auch passiert – ich kann mich immer an euch wenden. Dafür bin ich dankbar, das macht mich sehr stolz und glücklich.

Auch danke an euch, Oma A., Tante K. und Oma M.. Ihr wart immer für mich da. Ich habe in dieser Zeit oft mit einem Lächeln in den Himmel geschaut und an euch gedacht.

Danke auch an dich, A.. Deine einzigartige, liebevolle Art gibt mir jeden Tag neue Kraft. Du bedeutest mir unendlich viel.

Nicht zuletzt auch ein Dankeschön an meine Freundinnen und Freunde. Ich bin froh, euch an meiner Seite zu wissen.

## 10 Lebenslauf

Name: Leonard Diel

---

Geburtsdatum-/ort: 18.12.1993 in Neuss

---

### BILDUNGSWEG & BERUFLICHER WERDEGANG

---

06/2023 – Assistenzarzt Innere Medizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Campus Lübeck)

10/2015 – 11/2022 Studium der Humanmedizin (Staatsexamen)  
Universität zu Lübeck

- 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 11/2022
- 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 04/2021
- 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 09/2017

01/2014 – 07/2015 Ausbildung zum Rettungsassistenten  
DRK-Bildungszentrum (Düsseldorf), Johanna-Etienne-Krankenhaus & Malteser Lehrrettungswache (Neuss)

09/2013 – 12/2013 Ausbildung zum Rettungssanitäter  
Akademie für Gesundheitsberufe (Mönchengladbach), Johanna-Etienne-Krankenhaus & Malteser Lehrrettungswache (Neuss)

2004 – 07/2013 Abitur  
Quirinus-Gymnasium (Neuss)

---

Lübeck, den 11.09.2025

Unterschrift