



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie  
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt

**Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid-Mausmodelle:  
Entwicklung, Validierung und pharmakologische Beeinflussung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Sabrina Patzelt

aus Hamburg

Lübeck, 2020

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt

2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. Tamas Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.02.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 HAUT UND SCHEIMHAUT .....	1
1.1.1 <i>Aufbau der Haut</i> .....	1
1.1.2 <i>Aufbau der Schleimhaut</i> .....	1
1.1.3 <i>Aufbau der Augenschleimhäute</i> .....	2
1.1.4 <i>Basalmembranzzone</i> .....	3
1.2 DAS IMMUNSYSTEM .....	5
1.2.1 <i>Angeborenes und adaptives Immunsystem</i> .....	5
1.2.2 <i>T- und B-Lymphozyten</i> .....	5
1.2.3 <i>Immunglobuline und Fc-Rezeptoren</i> .....	7
1.2.4 <i>Komplement</i> .....	8
1.2.5 <i>Immunprivilegierte Bereiche</i> .....	9
1.2.6 <i>Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe</i> .....	10
1.3 AUTOIMMUNITÄT .....	11
1.3.1 <i>Bedeutung und Entstehung</i> .....	11
1.3.2 <i>Epitope spreading</i> .....	12
1.3.3 <i>Autoimmunerkrankungen</i> .....	13
1.3.4 <i>Bullöse Autoimmunerkrankungen</i> .....	14
1.4 ANTI-LAMININ 332 SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID.....	14
1.4.1 <i>Einteilung und Diagnostik</i> .....	14
1.4.2 <i>Laminin 332</i> .....	15
1.4.3 <i>Klinik</i> .....	16
1.4.4 <i>Pathogenese und Therapie</i> .....	17
1.4.5 <i>Epitope spreading beim Schleimhautpemphigoid</i> .....	17
1.5 MAUSMODELLE .....	18
1.5.1 <i>Allgemein</i> .....	18
1.5.2 <i>Mausmodelle von Pemphigoid-Erkrankungen</i> .....	18
1.5.3 <i>Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid-Mausmodelle</i> .....	19
1.6 ZIELSETZUNG.....	20
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1 MATERIALIEN .....	22
2.1.1 <i>Geräte</i> .....	22
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	23
2.1.3 <i>Chemikalien und Lösungen</i> .....	24
2.1.4 <i>Antikörper</i> .....	25
2.1.5 <i>Verwendete Kits</i> .....	25
2.2 SOFTWARE .....	26
2.3 METHODEN ZUR PROTEINHERSTELLUNG, -AUFREINIGUNG UND -QUANTIFIZIERUNG .....	26
2.3.1 <i>Proteinherstellung und -aufreinigung der c-term und mid mLAM<math>\alpha</math>3 Fragmente</i> .....	26
2.3.2 <i>Konzentrationsbestimmung rekombinanter Proteine</i> .....	27
2.3.3 <i>Western-Blot und Neutralisation</i> .....	28
2.3.4 <i>Herstellung von Kaninchen Anti-mLAM<math>\alpha</math>3 IgG</i> .....	29
2.3.5 <i>Antikörper-Aufreinigung</i> .....	29
2.3.6 <i>Affinitätsaufreinigung spezifischer Antikörper</i> .....	30
2.4 EXPERIMENTE MIT MÄUSEN .....	31
2.4.1 <i>Entwicklung eines quantitativen Bewertungsverfahrens für das Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid-Mausmodell</i> .....	31
2.4.2 <i>Verwendete Mausstämme</i> .....	32
2.4.3 <i>Antikörpertransfer Mausmodelle</i> .....	32

2.4.4 Pathogenese des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodelles .....	33
2.4.5 Untersuchung der Pathogenität von mid- und c-term Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG.....	33
2.4.6 Abgrenzung des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell .....	33
2.4.7 Therapieoptionen im Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell.....	34
2.4.8 Quantifizierung des intrazellulären cAMP Gehaltes in Haut und Mundschleimhaut .....	35
2.4.9 Entwicklung eines aktiven Mausmodelles für das Schleimhautpemphigoid .....	35
2.5 TRANSKRIPTOMANALYSE.....	36
2.6 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN .....	36
2.6.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung.....	36
2.6.2 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	37
2.7 ZELLKULTUREXPERIMENTE.....	37
2.7.1 Kultivierung von Zellen und Beschreibung der verwendeten Zelllinien.....	37
2.7.2 Fluoreszenznachweis der Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an kultivierte Keratinozyten und Fibroblasten.....	37
2.7.3 Scratch Assay.....	38
2.7.4 Quantifizierung von IL-6 und CXCL2 im Zellkulturüberstand .....	38
2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN .....	38
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1 ENTWICKLUNG EINES QUANTITATIVEN BEWERTUNGSVERFAHREN FÜR DAS ANTIKÖRPERTRANSFER MAUSMODELL DES SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID.....	40
3.1.1 Voraussetzungen und Ansprüche an das Bewertungsverfahren .....	40
3.1.2 Die betroffene Körperoberfläche .....	40
3.1.3 Die oralen Läsionen .....	41
3.1.4 Die konjunktivale Spaltbildung .....	42
3.1.5 Der Gewichtsverlust.....	43
3.1.6 Die Gesamtkrankheitsaktivität.....	44
3.1.7 Das entwickelte Bewertungsverfahren eignet sich zur Differenzierung der Hauptcharakteristika des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid Mausmodelles.....	44
3.2 CHARAKTERISTIKA DES ANTIKÖRPERTRANSFER SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID-MAUSMODELLES .....	45
3.2.1 Antikörper gegen Epitope der mittleren und der C-terminalen Region von mLAM $\alpha$ 3 sind gleichermaßen pathogen .....	45
3.2.2 Abgrenzung des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell .....	46
3.3 INITIALE REAKTIONEN IM ANTIKÖRPERTRANSFER SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID-MAUSMODELL.....	49
3.3.1 Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG bindet an Keratinozyten und Fibroblasten.....	49
3.3.2 Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG induziert die Sekretion von IL-6 und CXCL2 von Keratinozyten in vitro.....	50
3.3.3 Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG erhöht die Migration von Keratinozyten.....	51
3.4 VALIDIERUNG VON ANTI-ENTZÜNDLICHEN SUBSTANZEN IM ANTIKÖRPERTRANSFER SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID-MAUSMODELL .....	53
3.4.1 Prophylaktische Gabe von Dapson .....	53
3.4.2 Inhibierung der Aldehyddehydrogenase.....	54
3.4.3 Prophylaktische Gabe von Roflumilast .....	55
3.4.4 Quasi-therapeutischer Einsatz von Roflumilast.....	58
3.4.4 Erhöhter cAMP Gehalt in Haut und Schleimhaut durch Roflumilast in vivo .....	59
3.4.5 Roflumilast reduziert TNF $\alpha$ und IL-17F in vivo .....	60
3.4.6 Transkriptomanalyse der Haut und Schleimhaut von Roflumilast- und Vehikel-behandelten Schleimhautpemphigoid Mäusen .....	61
3.4.7 Roflumilast verringert die Sekretion von IL-6 und CXCL2 von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG behandelten Keratinozyten .....	66
3.5 ENTWICKLUNG, CHARAKTERISIERUNG UND VALIDIERUNG EINES AKTIVEN SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID-MAUSMODELLES .....	68
3.5.1 Die Injektion von c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 kann die Immuntoleranz in B6.S und SJL/J Mäusen brechen und eine Autoimmundermatose induzieren .....	68

3.5.2 Das aktive Laminin 332 Schleimhautpemphigoid-Mausmodell spiegelt wesentliche Merkmale der Patienten wider .....	68
a) Läsionen der Mundschleimhaut .....	68
b) Läsionen der Augen .....	72
c) Läsionen der Konjunktiva .....	75
d) Läsionen der Haut .....	76
3.5.3 Direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Haut, Mundschleimhaut und Konjunktiva .....	79
3.5.4 Periphere eosinophile Granulozyten .....	82
3.5.5 Anti-c-term mLAM $\alpha$ 3 und Anti-mid mLAM $\alpha$ 3 IgG im Serum .....	84
3.5.6 Immunglobulin Isotypen und IgG-Subklassen der Autoantikörper .....	86
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
4.1 BEWERTUNGSVERFAHREN FÜR DAS ANTIKÖRPERTRANSFER SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID-MAUSMODELL .....	88
4.2 THERAPIEOPTIONEN IM ANTIKÖRPERTRANSFER SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID-MAUSMODELL .....	90
4.3 AKTIVES SCHLEIMHAUTPEMPHIGOID-MAUSMODELL .....	95
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>116</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>119</b>
<b>8. Publikationsliste .....</b>	<b>120</b>
8.1 ORIGINALARBEITEN .....	120
8.2 KONGRESSBEITRÄGE .....	120
8.2.1 Abstracts .....	120
8.2.2 Vorträge .....	121
8.2.3 Auszeichnungen .....	122
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Haut und Schleimhaut

### 1.1.1 Aufbau der Haut

Die menschliche Haut ist in drei wesentliche Schichten aufgeteilt: die Epidermis, die darunter liegende Dermis und die subkutane Fettschicht, die Subkutis.

Die Epidermis setzt sich, von Innen nach Außen, aus den 5 Schichten Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum, zusammen. Hauptbestandteil der Epidermis sind die Keratinozyten, deren Proliferation im Stratum basale stattfindet. Innerhalb von ca. 30 Tagen gelangen die Keratinozyten über alle Schichten bis zum Stratum corneum, wo sie als Korneozyten bezeichnet und abgeschilfert werden (Ramos *et al.*, 2013). Dieser Prozess beinhaltet mehrere Transformationen und schließt mit dem Zelltod ab. Die verhornte Zellhülle der Korneozyten limitiert den Wasserverlust über die Haut (Mojumdar *et al.*, 2017). Weitere in der Epidermis vorkommende Zelltypen sind die Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen. Die Melanozyten bestimmen durch die Generierung und Verteilung von Melanin die Hautfarbe und bieten so Schutz vor DNA-Schäden durch ultraviolette Strahlung (Del Bino *et al.*, 2018). Langerhanszellen der Haut dienen der Antigenpräsentation in nahegelegenen Lymphknoten und sind damit ein zentraler Faktor in der adaptiven Immunantwort der Haut. Endogene antibiotische Stoffe, Defensine und Cathelicidine stellen essenzielle Faktoren der angeborenen Immunabwehr der Haut dar und werden von Keratinozyten produziert (Prasad *et al.*, 2019). Merkelzellen sind spezielle Sinneszellen, welche als Druckrezeptoren in der Epidermis fungieren (Bray, 2014).

Die Dermis ist unterteilt in das Stratum reticulare und das Stratum papillare. Sie besteht zum Großteil aus kollagenen und elastischen Fasern. In der Dermis vorkommende Zelltypen sind Fibroblasten und unterschiedliche Immunzellen wie Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen. Ein die gesamte Haut versorgendes Netzwerk aus Blutgefäßen befindet sich ebenfalls in der Dermis (Heath und Carbone, 2013; Nguyen und Soulika, 2019).

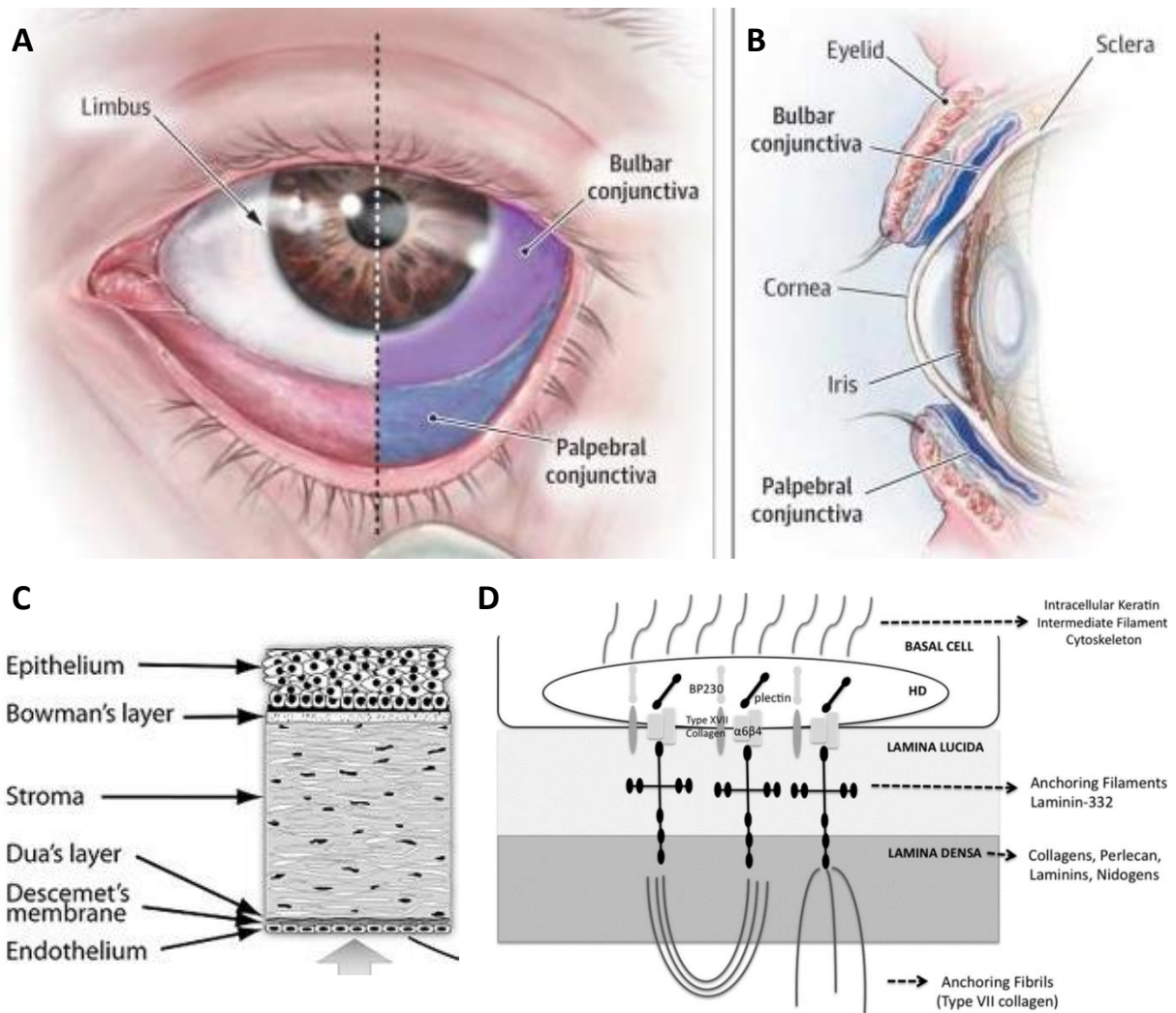
### 1.1.2 Aufbau der Schleimhaut

Die Schleimhaut (Tunica mucosa) hat einen ähnlichen Aufbau wie die Haut und bildet die Schutzschicht der inneren Hohlorgane sowie der Bindehaut und Teilen des äußeren Genitalbereiches. Im äußeren Bereich ist in aller Regel eine Schicht aus Schleimstoffen, den Mucinen zu finden. Mucine sind stark glykosylierte Proteine, die von Becherzellen und/oder Drüsen produziert und freigesetzt werden, die sich in ihrer Struktur, Funktion und Expressionsstelle unterscheiden (Gurcan und Ahmed, 2009). Ihre Funktion besteht im Schutz des Körperinneren vor Pathogenen und Umwelteinflüssen, sowie vor Dehydrierung. Neben der Sekretion gehört auch die Absorption zu den Aufgaben der

Schleimhaut. Unter der Schleimschicht präsentieren die Epithelzellen eine dichte Anordnung von unterschiedlichen Glykoproteinen und Glykolipiden, die die sogenannte Glykokalyx bilden (Schmidt *et al.*, 2001). Wohingegen Mucine von Zellen sekretiert und/oder adhärent bzw. membrandurchgängig sein können, ist die Glykokalyx fest mit den Zellen verbunden (Koppaka *et al.*, 2012). Ebenso wie bei der Haut ist die Schleimhaut aus einer äußeren Epithelschicht aus Keratinozyten, der Lamina epithelialis mucosae und einer darunterliegenden Bindegewebeschicht, der Lamina propria mucosa aufgebaut. Darunter befindet sich eine dünne Muskelschicht, die Lamina muscularis mucosae. Der genaue Aufbau der Schleimhaut ist individuell an das jeweilige Organ angepasst. Daher kann die Epithelschicht sowohl ein (u.a. Darm), als auch mehrschichtig (u.a. bukkale Mukosa) aufgebaut, und sowohl verhornend (u.a. harter Gaumen) als auch nicht-verhornend (u.a. bukkale Mukosa), sein (Jester *et al.*, 1999).

### **1.1.3 Aufbau der Augenschleimhäute**

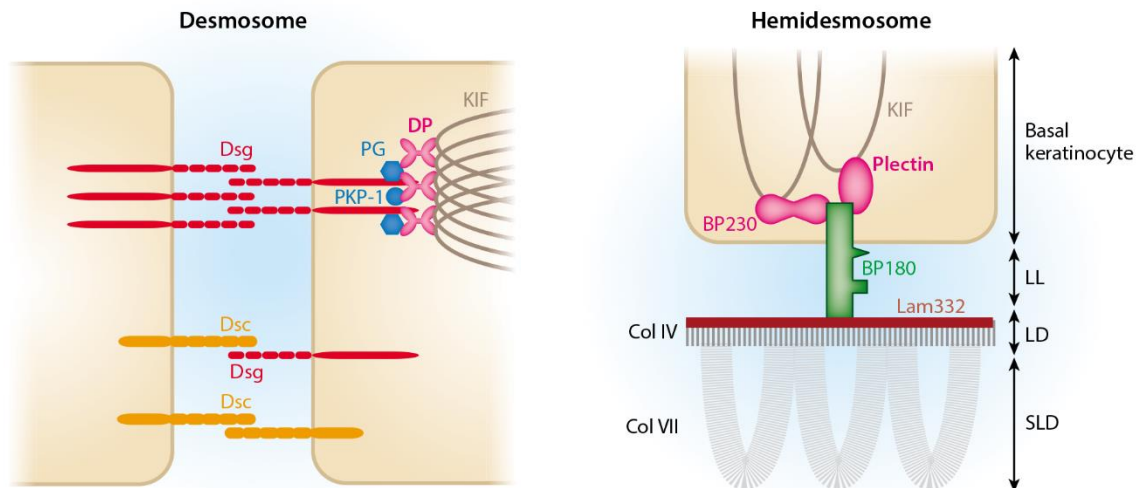
Die Bindehaut (Konjunktiva) ist eine dünne, durchscheinende Membran, die den vorderen Teil der Sklera (Lederhaut) bzw. das weiße der Augen und die Innenseite der Augenlider auskleidet. Sie besteht aus zwei Teilen, der bulbären und palpebralen Bindehaut (Abbildung 1A). Die bulbäre Bindehaut beginnt am Rand der Kornea (Hornhaut) und bedeckt den sichtbaren Teil der Sklera; der palpebrale Teil fasst die Innenseite der Augenlider ein. Die Bindehaut versorgt die unter ihr liegenden Gewebe mit Nährstoffen und ist darüberhinaus auch eines der Hornhaut am nächsten liegenden vaskularisierten Gewebe. Als solches ist sie eine Hauptquelle für die Versorgung der Hornhaut mit Immunkomponenten (Knop und Knop, 2005). Wie die Tränendrüsen produziert die Bindehaut IgA und enthält darüberhinaus auch Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten und andere Komponenten des allgemeinen mukosalen Immunsystems (Galletti *et al.*, 2017). Räumlich durch den Limbus getrennt, geht die Bindehaut in die Kornea über (Abbildung 1B) (Askgaard *et al.*, 2019b). Die Kornea, ebenso wie die Sklera, ist avaskulär und behält ihre Transparenz durch eine dichte, regelmäßige Anordnung von Proteinen in einer Proteoglykan-reichen Matrix bei, so dass Licht ungehindert hindurchtreten kann (Askgaard *et al.*, 2016a). Die kollagenreiche Schicht der Hornhaut wird als Stroma bezeichnet. Die menschliche Hornhaut besteht aus sechs Primärschichten - Epithel, Bowman-Schicht, Stroma, Dua's Schicht, Descemet's-Membran und Endothel (Abbildung 1C) (Askgaard *et al.*, 2016b). Stroma und Epithel sind über eine Basalmembranzzone (siehe Abschnitt 1.1.4) miteinander verbunden (Abbildung 1D) (Askgaard *et al.*, 2014; Torricelli *et al.*, 2013). Insgesamt gehört das Auge zu einem sogenannten immunprivilegierten Bereich (siehe Abschnitt 1.2.5).



**Abbildung 1: Aufbau der Augenschleimhäute** [A] Die Konjunktiva bedeckt als dünne Membran die Sklera und die Innenseite der Augenlider. Sie wird in die bulbäre (lila) und die palpebrale (blau) Konjunktiva unterteilt. [B] Die Konjunktiva geht räumlich durch den Limbus getrennt in die Hornhaut (Kornea) über. [C] Struktur der Kornea [D]. Aufbau der Basalmembran der Kornea, sowie der darüberliegenden Basalzelle und des darunter liegenden Stromas, die durch den Hemidesmosom-verankernden Filamentkomplex miteinander verbunden sind. HD, Hemidesmosom; BP230, bullöses Pemphigoid-Antigen 230. [A-B] adaptiert von (Azari und Barney, 2013) [C] adaptiert von (Navaratnam *et al.*, 2015) [D] adaptiert von (Toricelli *et al.*, 2013).

#### 1.1.4 Basalmembranzone

Die Keratinozyten in Haut und Schleimhaut sind durch verschiedene Verankerungsstrukturen unter anderem sogenannten Desmosomen miteinander verbunden (siehe Abbildung 2). Bei der Verbindung zwischen den basalen Keratinozyten mit der darunterliegenden Bindegewebschicht spielen wiederum Hemidesmosome eine wichtige Rolle (Borradori und Sonnenberg, 1999). Die Hemidesmosome bilden zusammen mit der Basalmembran, bestehend aus der Lamina lucida und Lamina densa, die Basalmembranzone. Die Basalmembranzone der Haut gehört wiederum zur sogenannten dermal-epidermalen Junctionszone, welche die Konnektivität der Epidermis mit der Dermis beschreibt (Woodley, 1987; Xiao *et al.*, 2015).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Desmosomen und Hemidesmosomen der Basalmembran.** Desmogleine (Dsg) und Desmogleine (Dsc) vermitteln den Zell-Zell-Kontakt von Keratinozyten untereinander. Die intrazellulären Proteine der Desmosomen PG, PKP-1, und DP, verbinden die Dsg und Dsc mit den KIF. Über die Hemidesmosomen werden basale Keratinozyten mit der epidermalen Basalmembranzzone verankert. BP180/230, bullous pemphigoid protein 180/230; Col, collagen; DP, desmoplakin; Dsc, desmocollin; Dsg, desmoglein; KIF, keratin intermediate filament; Lam332, laminin 332; LD, lamina densa; LL, lamina lucida; PG, plakoglobin; PKP-1, plakophilin 1; SLD, sublamina densa. Adaptiert von (Hammers and Stanley, 2016)

Hemidesmosomen sind Multiproteinkomplexe, welche den Zusammenhalt der basalen Keratinozyten mit der Basalmembran aufrechterhalten (Abbildung 2). Die mechanische Stabilität der Hemidesmosomen wird durch multiple Protein-Protein Interaktionen aus intrazellulären Plaque-Proteinen und Transmembranproteinen gewährleistet. Die Plaque-Proteine interagieren apikal mit Intermediärfilamenten und basal mit den Transmembranproteinen (Feng *et al.*, 2017). Die Transmembranproteine wiederum binden an extrazelluläre Ankerfilamente oder reichen zusätzlich direkt bis zur Lamina densa. Den inneren oder zytoplasmatischen Plaque bilden Plektin und BP230. Beide Proteine gehören zu den Plakinen und bilden Linker zwischen den zytoplasmatischen Keratinfilamenten und den Elementen des äußeren hemidesmosomalen Plaque,  $\alpha 6\beta 4$  Integrin und BP180 (Kawamatawong, 2017). Der zytoplasmatische Anteil der  $\beta 4$  Untereinheit kann mit Plektin und BP230 interagieren (Manso *et al.*, 2019). Des Weiteren kann die  $\beta 4$  Untereinheit mit BP180 verbunden sein. Bindungsstellen für Plektin und BP230 sind ebenso beim BP180 zu finden, sodass ein stabiler Proteinkomplex entsteht (Koster *et al.*, 2003). Extrazellulär reicht  $\alpha 6\beta 4$  Integrin bis in die Lamina lucida hinein und BP180 bis in die obere Lamina densa (Rieder *et al.*, 2013). Eine wichtige Verbindung der basalen Keratinozyten mit der Basalmembran der Haut bzw. Schleimhaut stellt die Verbindung zwischen der extrazellulären Domäne von  $\alpha 6\beta 4$  Integrin und Laminin 332 dar. Die  $\alpha 6$  Untereinheit kann zudem mit BP180 interagieren (Xiao *et al.*, 2015). Laminin 332 wiederum bildet die Verbindung zu darunterliegenden Kollagenfibrillen über Kollagen VII. Typ IV Kollagen, Entactin (Nidogen), Perlecan und Laminine bilden die Hauptbestandteile der Basalmembran (Christie, 2005). Basalmembranen sind dünne, dichte Schichten aus spezialisierter, selbstorganisierter extrazellulärer

Matrix, die die meisten Gewebe umgeben. Ihre geschichtete Struktur beruht auf zwei unabhängigen polymeren Netzwerken - einem aus Laminin und einem aus Typ IV Kollagen (Behrens *et al.*, 2012). Diese Netzwerke sind durch mehrere zusätzliche extrazelluläre Matrixproteine, einschließlich Nidogen und Perlecan, verbunden. Basalmembranen sind in aller Regel mit Zellen assoziiert und werden durch Wechselwirkungen mit Adhäsionsrezeptoren und sulfatierten Glykolipiden an Zelloberflächen verankert (Jayadev und Sherwood, 2017). Neben der Strukturgebung sind weitere Funktionen der Basalmembranzone die Regulation der Zelladhäsion, Proliferation, Differenzierung und Motilität (LeBleu *et al.*, 2007).

## **1.2 Das Immunsystem**

### **1.2.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem**

Das Immunsystem ist ein komplexes Verteidigungssystem zur Abwehr pathogener Organismen, körperfremder Stoffe oder entarteter Zellen des eigenen Organismus. Es setzt sich aus dem angeboren und dem erworbenen, oder adaptiven Immunsystem zusammen (Riera Romo *et al.*, 2016). Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen sowohl körperfremde Stoffe als auch eindringende Pathogene, wie Bakterien, Viren und Pilze dar (Berry *et al.*, 2020). Pathogene können durch generelle, meist hoch konservierte Struktur motive, z.B. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*), vom angeborenen Immunsystem erkannt werden. Wichtige Faktoren bei diesem Prozess sind zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten, Makrophagen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie auch humorale Bestandteile wie das Komplementsystem oder Interleukine (Jain und Pasare, 2017). Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem agiert das angeborene Immunsystem antigenunabhängig innerhalb von Minuten bis Stunden (Shih *et al.*, 2016). Das adaptive Immunsystem reagiert mit einer spezifischen Immunantwort und bildet ein sogenanntes „immunologisches Gedächtnis“ aus, wobei T- und B-Lymphozyten die wichtigsten zellulären und Antikörper die wichtigsten humoralen Faktoren darstellen (Turvey und Broide, 2010). Die hohe Spezifität mit welcher T- und B-Zellen Antigene erkennen basiert dabei vor allem auf dem Prozess der somatischen Rekombination während der Reifung der Zellen (siehe Abschnitt 1.2.2) (Murphy *et al.*, 2012).

### **1.2.2 T- und B-Lymphozyten**

T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und bewegen sich zur Reifung und Selektion in den Thymus. Naive T-Zellen sind im Blut und Lymphsystem zu finden. Nach dem sie ein Antigen detektiert haben, proliferieren sie und differenzieren zu Effektorzellen (Cheng und Anderson, 2018). Dabei ist die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Antigenen über den Hauptkompatibilitäts-Komplex (MHC, *major-histocompatibility complex*, in Menschen auch HLA,

*human leukocyte antigen*, in Mäusen auch H-2, *Histocompatibility system 2*, genannt) essenziell. Hierdurch kann zwischen intrazellulären Pathogenen (MHC I) und extrazellulären Pathogenen (MHC II) differenziert werden (Rock *et al.*, 2016). T-Zellen können nur Antigene, welche an ein MHC-Molekül gebunden sind, an der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC, *antigene presenting cell*) erkennen (Halenius *et al.*, 2015). Es gibt verschiedene Klassen von Effektor T-Zellen: zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen. Zytotoxische T-Zellen exprimieren den CD8-Rezeptor. Sie können in Kombination mit dem T-Zellrezeptor an MHC-Klasse-I-Moleküle gebundene Antigene einer, durch ein Pathogen, infizierten Zelle binden und diese Zelle eliminieren. T-Helferzellen (Th-Zellen) stimulieren andere Immunzellen über die Sekretion von Zytokinen oder die Expression membranständiger Moleküle. Durch die Expression des CD4-Rezeptors können sie Antigene über MHC II-Moleküle, welche von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen und B-Zellen präsentiert werden, erkennen und die Aktivität von Phagozyten, sowie auch die Bildung spezifischer Antikörper stimulieren (Turvey und Broide, 2010). Ihre Einteilung wurde über die von ihnen produzierten und freigesetzten Zytokine definiert: Th1-Zellen können IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$ , Th2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-13, Th9-Zellen IL-9, Th17-Zellen IL-17 und Th22-Zellen IL-22, sekretieren (Raphael *et al.*, 2015).

Das adaptive Immunsystem umfasst zellulär die T-Lymphozyten, welche im Thymus reifen, und Antikörper-produzierende Zellen, die B-Lymphozyten, die im Knochenmark entstehen. Nach der Entwicklung in den primären lymphoiden Organen (Thymus und Knochenmark) gelangen sie zu sekundären lymphoiden Organen, einschließlich Lymphknoten und Milz, die dazu dienen, zirkulierende Antigene aus Lymphe bzw. Blut zu filtern (Sprent, 2017). Die adaptiven Immunantworten entstehen in diesen Bereichen häufig unter dem Einfluss von Signalen des angeborenen Immunsystems, die entweder direkt von zirkulierenden Pathogenen oder indirekt von pathogenaktivierten kutanen oder mukosalen antigenpräsentierenden Zellen bereitgestellt werden, welche in die sekundären lymphoiden Organe wandern (Netea *et al.*, 2019). Lymphozyten, die aus Milz und Lymphknoten auswandern, können anschließend zu allen Geweben wandern, um Effektorfunktionen auszuüben. Diese Migration wird durch eine Reihe von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren reguliert. So gelangen beispielsweise CLA-11 CCR4-exprimierende Lymphozyten zur Haut, während Zellen, welche das  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin präsentieren, das an die Schleimhaut von zellulären Adhäsionsmolekül 1 (MadCAM-1) auf Darmendothelzellen bindet, vorzugsweise den Magen-Darm-Trakt infiltrieren (Ansari und Byrareddy, 2016).

B-Lymphozyten exprimieren Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche (BCRs, B-Zell-Rezeptoren), die spezifisch, fremde Antigene binden können. BCRs sind membrangebundene Immunglobuline. Die Vielfalt der BCRs, welche von den B-Zellen eines Individuums exprimiert werden, ist groß und

umfasst sowohl naive Rezeptoren, die während der Entwicklung zufällig aus der Keimbahn erzeugt werden, als auch Rezeptoren, die nach erfolgreicher Bindung eines Antigens während früherer Infektionen erhalten bleiben. Populationen von BCRs können die Antigenbindung während einer Infektion durch einen evolutionären Prozess der Mutation und Selektion, der als Affinitätsreifung bekannt ist, verbessern (Liu et al. 1991). T-Zell-Rezeptoren (TCRs) sind eine zweite Klasse von Immunrezeptoren, welche Antigene binden können. Obwohl verschiedene TCRs auch zufällig aus Keimbahngensequenzen erzeugt werden, erfahren TCRs während einer Infektion keine Affinitätsreifung. Die anfängliche Vielfalt des BCR-Repertoires ist das Ergebnis eines somatischen Rekombinationsprozesses, der als V(D)J-Rekombination bezeichnet wird. Während dieses Prozesses wird zusätzliche Sequenzdiversität durch zufällige Deletion oder Insertion von Nukleotiden an Segmentübergängen erzeugt. Dieser Prozess kombiniert hochvariable Sequenzregionen, die die Antigenbindung bestimmen, mit konservierteren Regionen, die strukturelle Unterstützung bieten. Somit hat jede naive B-Zelle ihre eigene BCR-Sequenz (Elhanati et al. 2015). Der Prozess kann jedoch auch unproduktive Codierungssequenzen erzeugen. In aller Regel unterliegt die Zelle hierbei der Apoptose. Die überlebenden, naiven B-Zellen werden nach Selbsttoleranz selektiert bevor sie in die Peripherie freigesetzt werden (Murphy et al. 2008). Ebenso wie T-Zellen zirkulieren sie in Blut und peripherem Lymphgewebe bis sie ein Antigen erkennen (Cooper, 2015). Anschließend können aktivierte B-Zellen entweder zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper sezernieren, welche ihrerseits im Blutplasma und in der extrazellulären Flüssigkeit Antigene binden können, oder sie differenzieren zu Gedächtniszellen, wodurch sie schneller auf dem Immunsystem bereits bekannte Antigene reagieren können.

### **1.2.3 Immunglobuline und Fc-Rezeptoren**

Immunglobuline (Ig) bzw. Antikörper sind Y-ähnlich geformte heterodimere Proteine. Sie bestehen aus 2 schweren (H) und 2 leichten (L) Polypeptidketten. Funktionell wird zwischen der variablen Domäne (V), die Antigene binden kann und der konstanten Domäne (C), die Effektorfunktionen wie beispielsweise die Aktivierung des Komplementsystems bestimmt, unterschieden. Es gibt fünf Klassen von C-Domänen der schweren Kette, wodurch die Isotypen der Ig bestimmt werden: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE (Schroeder und Cavacini, 2010). Jeder Ig-Isotyp erfüllt unterschiedliche Aufgaben und ist unterschiedlich im Organismus verteilt. Zu den Hauptfunktionen von Ig zählen die Neutralisierung und Agglutinierung von Pathogenen, sowie die Präzipitierung von im Serum gelösten Antigenen und die Aktivierung des Komplementsystemes (siehe Abschnitt 1.2.4). Prozentual am häufigsten liegt IgG im Serum vor. Beim Menschen wird IgG in vier Subklassen 1, 2, 3 und 4 unterteilt. In der Maus sind es die Subklassen 1, 2a/c, 2b und 3 (Vidarsson *et al.*, 2014). Das Antigen-bindende Fragment (Fab-Fragment) besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne von jeweils einer schweren und einer leichten Kette. Die schwere Kette beinhaltet zwei bis drei konstante

Domänen, abhängig vom Ig-Isotyp. Dieser Teil der Ig wird Fc-Fragment genannt und bindet an Zelloberflächenrezeptoren und Proteine des Komplementsystems. Die Verbindungen zwischen einer leichten und einer schweren Kette, sowie auch die Bindung zwischen den beiden schweren Ketten, werden durch Disulfidbrücken gewährleistet. Bedingt durch die Gelenkregion, welche zwischen Fab- und Fc-Teil des Ig liegt, erhalten die beiden Fab-Fragmente Beweglichkeit, um auch voneinander entfernte Epitope gleichzeitig binden zu können (Moritz und Stracke, 2017). Das Fc-Fragment fungiert in der Modulation der Aktivität von Immunzellen über die Bindung an Fc-Rezeptoren (Chiu *et al.*, 2019; Murphy *et al.*, 2012). Fc-Rezeptoren (FcR) sind glykolisierte, membrangebundene Rezeptoren, die hauptsächlich von myeloiden Zellen des Immunsystems präsentiert werden. Aufgrund ihrer Bindungsaffinität für die verschiedenen Isotypen der Ig können sie in fünf und bezüglich ihrer Proteinstruktur in zwei Unterklassen (Typ-I und Typ-II) eingeteilt werden (Pincetic *et al.*, 2014). Die Fc-Domäne von IgA wird von dem Fc $\alpha$ -Rezeptor und die des IgG von dem Fc $\gamma$ -Rezeptor gebunden. Aufgrund seiner Struktur und unterschiedlichen Bindungsaffinitäten wird der Fc $\gamma$ -Rezeptor nochmal in unterschiedliche Typen (beim Menschen Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA und Fc $\gamma$ RIIIB) unterteilt (Ahmed *et al.*, 2014). Für die Bindung der Fc-Domäne von freiem IgE ist der Fc $\epsilon$ -Rezeptor und für die Bindung von sowohl IgM als auch IgA ist der Fc $\mu$ -Rezeptor zuständig. Der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) gehört als einziger Fc-Rezeptor nicht zur Immunglobulin-Superfamilie, sondern zu der MHC-Superfamilie. Er bindet IgG mit schwacher Affinität und ist funktional für dessen Abbau verantwortlich (Pyzik *et al.*, 2019). Die Namensgebung der Fc-Rezeptoren ist sehr ähnlich zwischen Maus und Mensch. Jedoch gibt es essenzielle Unterschiede. In der Maus konnte bislang kein Fc $\alpha$ -Rezeptor nachgewiesen werden (Bakema und van Egmond, 2011). Bezüglich der Fc $\gamma$ -Rezeptoren existieren drei Hauptunterschiede zwischen den Bindungsaffinitäten. Alle aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren binden IgG1, wohingegen nur der aktivierende Fc $\gamma$ RIII das murine IgG1 binden kann. Der inhibitorische humane Fc $\gamma$ RIIB hat eine niedrigere Affinität für IgG1, IgG2 und IgG3 als andere humane Fc $\gamma$ R. Bei der Maus ist dies nicht der Fall für die Subklassen IgG1 und IgG2b. Zudem ist kein menschlicher Fc $\gamma$ R imstande IgE zu binden. Die murinen Rezeptoren Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII und Fc $\gamma$ IV hingegen binden IgE (Bruhns, 2012; Nimmerjahn und Ravetch, 2007). Somit wird die Immunantwort durch die Zusammensetzung der Fc-Rezeptoren essenziell beeinflusst und gesteuert.

#### **1.2.4 Komplement**

Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Plasmaproteinen, welche hauptsächlich von der Leber produziert werden (Hajishengallis *et al.*, 2017). Die Hauptfunktionen sind die Opsonisierung von Pathogenen und die Zellyse. Die Aktivierung des Komplementsystems kann über mindestens drei verschiedene Signalwege erfolgen: die klassische, alternative und die Lektin Kaskadenreaktion. Beim klassischen Weg wird durch die Bindung des C1q-Komplexes an das Fc-Fragment von IgG oder IgM, welche ein Antigen gebunden haben, eine Konformationsänderung ausgelöst, die zur

Aktivierung der C1r Serinprotease führt. Diese spaltet C1s. C1s wiederum spaltet C4 in C4a und C4b und C2 in C2a und C2b. Die Fragmente C4b und C2a bilden zusammen die C3-Konvertase, die ihrerseits C3 in C3a und C3b gespalten. C3b bindet die C3-Konvertase und spaltet C5 in C5a und C5b. C5a, C4a und C3a fungieren als Anaphylatoxine (Dunkelberger und Song, 2010). C5b bildet einen Proteinkomplex mit anderen Faktoren des Komplementsystems und kann so Zellmembranen angreifen und Zellen lysieren. Beim alternativen Weg wird C3 kontinuierlich gespalten. Bei einer niedrigen beziehungsweise fehlenden Inhibierung läuft die Kaskade weiter wie bei der klassischen Komplementkaskade. Bei der durch Lektin-initiierten Kaskade wird im ersten Schritt Lektin durch die Bindung an Zuckerreste auf einer Pathogenoberfläche aktiviert (Reis *et al.*, 2019). Die während der Kaskadenreaktion des Komplements gebildeten Anaphylatoxine dienen als Lockstoffe für eine Vielzahl von Immunzellen und können die Durchlässigkeit von Blutgefäßen erhöhen. Sie können jedoch auch an Rezeptoren binden. Es sind hierfür drei Rezeptoren im Menschen bekannt: C5aR1, C5aR2 und C3aR (Klos *et al.*, 2013). Komplementrezeptoren sind membrangebundene oder intrazelluläre Proteine, die eine Immunantwort initiieren oder regulieren können. So kann beispielsweise die Aktivierung des C5aR zu einer Veränderung des zellulären Zytoskeletts führen wodurch eine erhöhte Motilität und eine Liganden spezifische Zellmigration ausgelöst wird (Karsten *et al.*, 2014). Neben den erwähnten Komplementrezeptoren für Anaphylatoxine existieren vier weitere Rezeptoren CR1 bis CR4. Sie alle können die Fragmente der Komplementkomponenten 3 oder 4 binden, die an eine Pathogenoberfläche geheftet sind. CR1, CR3 und CR4 fungieren dabei als Opsonine und stimulieren so die Phagozytose, wohingegen CR2 nur von B-Zellen exprimiert wird und als Korezeptor dient. Auch die adaptive Immunantwort kann daher durch Komplementfaktoren beeinflusst werden. Die Opsonisierung von Pathogenen durch das Komplement bzw. die direkte Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern durch Dectin, erleichtert deren Aufnahme von phagozytischen antigenpräsentierenden Zellen mit Komplementrezeptoren. Dies wiederum erhöht die Antigenpräsentation für T-Zellen (Kemper und Kohl, 2018). Ebenso wird durch Komplement opsonisierte Antigene die Antwort von B-Zellen erhöht, welche Komplementrezeptoren exprimieren (Verschoor *et al.*, 2016). Einige der Komplementfaktoren beeinflussen die adaptive Immunantwort bezüglich der Zytokinproduktion antigenpräsentierender Zellen und damit auch das Ausmaß einer Immunantwort (Carroll und Isenman, 2012).

### **1.2.5 Immunprivilegierte Bereiche**

Bestimmte Bereiche im menschlichen Körper enthalten sehr empfindliche, meist nicht erneuerbare Gewebe, die im besonderen Maße Mikroorganismen und Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. In diesen Bereichen ist das Immunsystem entweder räumlich ausgeschlossen, stark limitiert oder derart verändert, dass eine Immunreaktion das Gewebe nicht schädigt. Solche Organe bzw. Gewebe und auch bestimmte Zelltypen werden demnach als immunprivilegiert bezeichnet. Zu Bereichen, die als

immunprivilegiert gelten zählen u.a. Gebärmutter, Neuronen, Haarfollikel, Keratinozyten und die Augenschleimhäute. Die Schleimhäute der Augen, insbesondere die Kornea, gehören zu einem immunprivilegierten Bereich, da sie aufgrund ihrer feuchten Schleimhautoberfläche besonders anfällig für äußere Angriffe sind. Das Fehlen von Gefäßen und die relative Trennung des Immunsystems vom Rest des Körpers erschwert die Immunabwehr. Eine Aktivierung des Immunsystems verbunden mit einer folgenden Entzündungsreaktion kann irreparable Schäden am Auge anrichten kann (Askgaard *et al.*, 2016b; Streilein, 2003). Die Hornhaut liefert zudem einen großen Teil der Brechkraft des Auges, was bedeutet, dass eine definierte Transparenz gleichzeitig mit einer Barrierefunktion aufrechterhalten werden muss, um zu verhindern, dass Krankheitserreger den Rest des Auges erreichen. Da die Hornhaut avaskulär ist, erfolgt die Rekrutierung und Einwanderung von Entzündungszellen zur Stelle der Entzündung zunächst über periphere (limbale) Blutgefäße (Askgaard *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 1999). Immunreaktionen innerhalb der Hornhaut kommen daher von umgebenden vaskularisierten Geweben sowie von angeborenen immunreaktiven Zellen, die sich innerhalb der Hornhaut befinden (Askgaard *et al.*, 2019a).

### **1.2.6 Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe**

Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem sind Bestandteile des Netzwerkes von lymphoiden Zellen, die das Mukosa-assoziierte lymphoide Gewebe (MALT, *mucosa associated lymphoid tissue*) bilden. MALT ist ein Hauptbestandteil in allen Schleimhautorganen, einschließlich der Atemwege, des Verdauungstrakts, des oral-pharyngealen Traktes und des Auges. Zwischen diesen Schleimhautorganen können regulierte Wanderungen von Immunzellen auftreten. Die Rolle von MALT bei der menschlichen Immunabwehr, hier am Beispiel des Auges, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass die Tränendrüsen und die Bindehaut über die Sekretion von Immunglobulinen und lymphoiden Geweben zur Immunabwehr der Augen beitragen. Letzteres soll in Klustern von lymphoiden Follikeln sowie diffusen lymphoiden Geweben organisiert sein (Hein, 1999; Randall und Mebius, 2014). In der follikulären Form von MALT werden Antigene von den Follikeln aufgenommen und von antigenpräsentierenden Zellen den Lymphozyten präsentiert. Dies führt zur Aktivierung von B- und T-Zellen, welche die Immunreaktion ausführen. Diffuses lymphoides Gewebe besteht dagegen hauptsächlich aus eingestreuten Effektorzellen. Im Allgemeinen führen beide Wege zur Aktivierung und Migration von Immunzellen im Schleimhautgewebe, einschließlich der Bindehaut (Isung *et al.*, 2019; Knop und Knop, 2005). Die wichtigsten Faktoren der Immunabwehr durch die Schleimhaut sind neben den lymphoiden Strukturen vor allem die Produktion und Absonderung von Immunglobulinen, besonders von IgA (Cerutti *et al.*, 2011).

## 1.3 Autoimmunität

### 1.3.1 Bedeutung und Entstehung

Als Autoimmunität wird die Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) beschrieben, welche durch den Verlust der Selbsttoleranz ausgelöst wird (Ludwig *et al.*, 2017). Im natürlichen Immunrepertoire existieren immer autoreaktive Lymphozyten (Tukaj *et al.*, 2018). Allerdings werden Autoimmunreaktionen im gesunden Organismus durch eine Anzahl von Mechanismen unterbunden. Diese Mechanismen sind Grundlage der zentralen und peripheren Toleranz (Rosenblum *et al.*, 2015). Die zentrale Toleranz wird durch die Negativselektion von autoreaktiven T-Zellen im Thymus und autoreaktiven B-Zellen im Knochenmark erreicht. Im Fall einer Subpopulation von autoreaktiven CD4-positiven T-Zellen findet eine Positivselektion statt, wodurch natürliche regulatorische T-Zellen entstehen, die Immunreaktionen unterdrücken können (Cheng und Anderson, 2018). Mechanismen, welche die periphere Toleranz ermöglichen sind periphere Anergie (funktionelle Reaktionslosigkeit) und Deletion, sowie die Entwicklung von induzierten regulatorischen T-Zellen außerhalb des Thymus. Somit wird die Aktivität autoreaktiver Zellen in der Peripherie, ohne entsprechende Expression des Autoantigens, in Thymus oder Knochenmark unterdrückt (Mueller, 2010). Ein weiterer Faktor, der eine Autoimmunreaktion verhindert liegt im Unterschied in der Abundanz körpereigener und fremder Proteine (Gonzalez *et al.*, 2011). Während die Konzentration körpereigener Proteine relativ konstant ist und damit ein konstantes Signal liefert, verändert sich die Konzentration fremder Proteine, wie beim Eindringen von Pathogenen in den Organismus plötzlich und schnell. Ein konstantes Signal kann die Toleranz von Lymphozyten induzieren und aufrechterhalten, wobei eine rapide Veränderung des Signals zu einer Aktivierung von Lymphozyten führen kann (Poletaev *et al.*, 2012). Die Unterscheidung zwischen selbst und nicht-selbst wird zudem durch Signalgebung des angeborenen Immunsystems unterstützt (Zakka *et al.*, 2011). Bei einer Infektion generieren antigenpräsentierende Zellen proinflammatorische Zytokine und Co-stimulierende Moleküle. Bei nicht-Vorliegen dieser Signalmoleküle wird eher eine Inaktivierung von naiven Lymphozyten, oder die Entwicklung regulatorischer Lymphozyten ausgelöst. Dieser Mechanismus ist vor allem für Antigene, welche nur außerhalb des Knochenmarks und Thymus vorzufinden sind, von Bedeutung. Ebenso wichtig ist die natürliche Tendenz der Immunantwort selbst limitierend zu sein. Aktivierte Lymphozyten neigen durch intrinsische Programme gleichzeitig zur Apoptose (Akhtar und Bokhari, 2020; Ekert und Vaux, 1997).

Eine Autoimmunerkrankung kann sich also nur entwickeln, wenn die zuvor beschriebenen Mechanismen in einem erheblichen Maß überwunden werden oder fehlen und eine andauernde Reaktion gegen körpereigenes Gewebe mit Hilfe von Effektorzellen und Molekülen, welche Gewebeschädigung hervorrufen, entsteht. Bislang sind die grundlegenden Mechanismen, welche zu

Autoimmunerkrankungen führen nicht komplett bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass eine genetische Suszeptibilität, eine Störung der natürlichen Toleranzmechanismen, Umweltfaktoren und Infektionen, beispielsweise über den Prozess der Molekularen-Mimikry, Auslöser für Autoimmunerkrankungen sein können (Ludwig *et al.*, 2017; Rosenblum *et al.*, 2015). Es wurden jedoch auch Zusammenhänge zwischen der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und der Einnahme bestimmter Medikamente publiziert (Chang und Gershwin, 2010; Hashimoto, 2017; Lammer *et al.*, 2019).

### **1.3.2 Epitope spreading**

Ein Epitop ist eine antigene Determinante oder eine Stelle auf der Oberfläche eines antigenen Moleküls an die ein einzelner Antikörper bindet. Das *epitope spreading* (Epitop-Ausweitung) bezieht sich auf die Entwicklung einer Immunantwort über die Zeit, auf Epitope, die sich vom krankheitsverursachenden Epitop unterscheiden und mit diesem nicht kreuzreaktiv sind. Diese Verbreiterung der Immunantwort kann auf Epitope entweder innerhalb desselben Antigens (intramolekulare Ausbreitung) oder eines anderen Antigens (intermolekulare Ausbreitung) abzielen. Bei einer Immunreaktion sind immundominante Epitope für Antigene ebenso charakteristisch, wie eine große Diversität von spezifischen B- und T-Zell Epitopen. Die Ausweitung einer Immunantwort wird bei Autoimmunerkrankungen durch Gewebeschädigungen, Antigenpräsentation und somatische Hypermutation induziert. Bei Autoimmunerkrankungen sind zwei Hauptmechanismen bekannt, welche zu einem *epitope spreading* führen könnten. Der eine ist unabhängig von physikalischen Assoziationen mit Antigenen, der andere Mechanismus ist hiervon abhängig. Bei dem „unabhängigen“ *epitope spreading* kommt es durch Gewebeschädigungen, Entzündungen und Zytokinen dazu, dass T-Zellen kryptische und/oder körpereigene Epitope erkennen und B-Zellen aktivieren. Ein Beispiel hierfür stellen virusvermittelte Autoimmunerkrankungen dar. Bei multipler Sklerose wird beispielsweise vermutet, dass ein Virus eine initiale Entzündungsreaktion des zentralen Nervensystems auslöst und diese der treibende Faktor ist, der zu einem *epitope spreading* und zur Bildung von Autoantikörpern führt (Sundqvist *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu basiert die „abhängige“ Antwort auf der Aktivierung von T- und B-Zellen durch die Prozessierung und Präsentation physikalisch assoziierter Antigene (Didona und Di Zenzo, 2018). Ein Beispiel für ein von physikalischen Assoziationen mit dem Antigen abhängiges *epitope spreading* ist beim systemischen Lupus erythematosus zu finden, bei dem Patienten Autoantikörper u.a. gegen unterschiedliche Komponenten des La/Ro Ribonukleinkomplexes und gegen das Spliceosome entwickeln. Durch die Immunisierung mit humanen Spliceosompeptiden oder humanem La-Protein können Lupus-ähnliche Symptome bei Mäusen induziert werden. Hierbei breiten sich die originale Antikörperreaktion gegen die zur Immunisierung eingesetzten Fragmente schnell auf die gesamten betroffenen Proteinkomplexe aus (Chan *et al.*, 1998). In Tiermodellen zu multipler Sklerose,

Autoimmunencephalomyelitis und *Theiler's murine encephalitogenic virus-induced demyelinating disease* (TMEV-IDD) konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass dem *epitope spreading* eine pathologische Rolle im Krankheitsverlauf zukommt. Die Inhibierung des *epitope spreading* beispielsweise durch eine Blockade der Kostimulation von T-Zellen kann den Krankheitsverlauf beim experimentellen Autoimmunencephalomyelitis bei Mäusen stoppen. Das Verständnis des Phänomens des *epitope spreading* ist daher wichtig, um die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu verstehen und bessere immuntherapeutische Ansätze für diese Erkrankungen zu entwickeln (Vanderlugt und Miller, 2002).

### **1.3.3 Autoimmunerkrankungen**

Die Prävalenz von Autoimmunerkrankungen weltweit wurde 2015 in einer Studie von Lerner *et al.* mit 12,5% und einem durchschnittlichen Zuwachs von 19,1% pro Jahr publiziert (Lerner *et al.*, 2015). Zudem ist es nicht unüblich, dass Patienten an mehr als einer Autoimmunerkrankung erkranken (Onuora, 2015). Obschon bislang mehr als 100 verschiedene Autoimmunerkrankungen beschrieben wurden (Hayter und Cook, 2012; Wang *et al.*, 2015), sind klinisch normalerweise die folgenden Übereinstimmungen bei Patienten zu finden: erhöhte Immunglobulinlevel, nachweisbare Autoantikörper, vermehrtes Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen, eine Verbesserung des Gesundheitszustandes durch Kortikosteroiden oder andere immunsuppressive Therapien und einem chronischen Verlauf über viele Jahre. Ebenfalls wird vermutet, dass alle Autoimmunerkrankungen nach einer Initiationsphase, eine Effektorphase, und schließlich eine Resolutionsphase durchlaufen. Letztere ist definiert über eine partielle und zumeist kurzzeitige Homöostase zwischen regulatorischen und entzündlichen Prozessen (Rosenblum *et al.*, 2015). Autoimmunerkrankungen können klinisch nach der betroffenen Körperpartie und nach der Art der Läsionen als lokal bzw. organspezifisch und systemisch bzw. nicht-organspezifisch klassifiziert werden (McGonagle und McDermott, 2006). Mit Bezug auf Ihren Ursprung können Autoimmunerkrankungen auch in Erkrankungen, welche eine generelle Veränderung der Selektion und Regulation von T- und B-Zellen, und in Erkrankungen mit einer anormalen Immunantwort auf ein bestimmtes, eigenes oder fremdes Antigen, unterteilt werden (Singh, 2016). Ob sich eine Autoimmunerkrankung manifestiert, hängt entscheidend von der Überwindung der körpereigenen Immuntoleranz ab (siehe Abschnitt 1.3.1). Eine übergeordnete Rolle konnte den Glykosylierungsmustern der antigenspezifischen Antikörper zugeordnet werden. Über diese können Immunantworten in Abhängigkeit von den Rezeptoren, die diese an Immunzellen binden, verstärkt oder unterdrückt werden (Kasperkiewicz *et al.*, 2017c; Tukaj *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2015).

### **1.3.4 Bullöse Autoimmunerkrankungen**

Bullöse Autoimmundermatosen umfassen eine heterogene Gruppe von seltenen Hauterkrankungen, die sich durch Blasen und Erosionen auf der Haut und an Schleimhäuten auszeichnen (Schmidt *et al.*, 2019; Schmidt und Zillikens, 2011, 2013). Allen bullösen Autoimmundermatosen gemein ist eine Autoantikörperbildung gegen strukturelle Komponenten der Haut bzw. Schleimhaut. Dabei binden die Autoantikörper Zielproteine, die für die Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten und für die Adhäsion der Epidermis auf der Dermis wichtig sind (Sitaru *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2015). Die Ätiologie der Autoantikörperbildung bei diesen Erkrankungen ist, wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, weitgehend unklar. Anhand der Lokalisation der Spaltbildung und der Zielantigene können blasenbildende Autoimmundermatosen in zwei Untergruppen unterteilt werden: die Pemphiguserkrankungen und die subepidermal bullösen Autoimmundermatosen. Innerhalb der subepidermal bullösen Autoimmundermatosen wird noch einmal zwischen den Pemphigoiderkrankungen und der Dermatitis herpetiformis Duhring unterschieden (Sundqvist *et al.*, 2012). Beim Pemphigus sind intraepidermale Spaltbildung und Akantholyse, d.h. Verlust des Zusammenhalts der Keratinozyten, charakteristisch (Kasperkiewicz *et al.*, 2017b; Schmidt *et al.*, 2019). Bei den subepidermalen bullösen Autoimmunerkrankungen ist hingegen eine Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis zu beobachten. Auch hinsichtlich der betroffenen Hautstrukturen unterscheiden sich Pemphigus- und Pemphigoiderkrankungen. Während beim Pemphigus Autoantikörper gegen desmosomale Strukturen, wie Desmoglein 1 und 3 gebildet werden, sind die Autoantikörper bei den subepidermal bullösen Autoimmundermatosen gegen Proteine der dermo-epidermalen Junctionszone, wie BP180, Laminin 332 oder Typ VII Kollagen gerichtet (Schmidt und Zillikens, 2011; Xiao *et al.*, 2015).

## **1.4 Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid**

### **1.4.1 Einteilung und Diagnostik**

Das Schleimhautpemphigoid (SHP) ist eine bullöse Autoimmunerkrankung die überwiegend die Schleimhäute trifft, einschließlich Mund, Pharynx, Larynx, Trachea, das obere Drittel des Ösophagus, Augenschleimhaut und Schleimhäute der Nase. Verschiedene Komponenten der Basalmembranzzone wurden als potenzielle Ziele von SHP Autoantikörpern beschrieben, darunter BP180, BP230, Laminin 332, Kollagen Typ VII und  $\alpha 6\beta 4$ -Integrin (Schmidt und Zillikens, 2013). Es ist mit einer Inzidenz von ca. 2 Neuerkrankungen auf 1 Mio. Einwohner/Jahr nach dem bullösen Pemphigoid die häufigste bullöse Autoimmundermatose (Bertram *et al.*, 2009). Etwa ein Drittel der SHP Patienten entwickeln Antikörper gegen Laminin 332 (Amber *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2015).

Das Anti-Laminin 332 SHP lässt sich nicht auf Grundlage des klinischen Phänotyps und Histologie diagnostizieren. Per Definition finden sich beim SHP IgG und/oder IgA und/oder C3 Ablagerungen an

der Basalmembranzone in der direkten Immunfluoreszenz von periläsionalen Schleimhaut- oder Hautbiopsien bei Patienten mit überwiegendem Schleimhautbefall (Chan *et al.*, 2002). Mit durch 1M NaCl-Lösung gespaltener humaner Haut können zirkulierende Autoantikörper nachgewiesen werden. Anti-Laminin 332 Antikörper, wie auch Anti-Laminin  $\gamma$ 1/p200 Antikörper und Anti-Kollagen VII Antikörper binden dabei am Boden des artifiziellen Spaltes (Kasperkiewicz *et al.*, 2017c; Lau *et al.*, 2019). Es können allerdings nur bei etwa 50% der Anti-Laminin 332 SHP Patienten Autoantikörper nachgewiesen werden (Sundqvist *et al.*, 2012). Um das Zielantigen zu identifizieren werden verschiedene Nachweismethoden wie beispielsweise Immunpräzipitation oder Western-Blot mit unterschiedlichen Extrakten aus humaner Haut oder kultivierten Zellen genutzt. Sensitivstes Substrat im Nachweis von Anti-Laminin 332 Antikörpern beim SHP ist die extrazelluläre Matrix kultivierter HaCaT Keratinozyten (Goletz *et al.*, 2019). Allerdings ist diese Methode schwer zu standardisieren, da die Ergebnisse von der Präparation der Zellen abhängig sind. Western-Blot und Immunpräzipitationsverfahren sind wie auch ELISA bisher nicht kommerziell erhältlich. Kürzlich wurde ein standardisiertes weithin verfügbares Verfahren zum Nachweis von Serum IgG Antikörpern gegen Laminin 332 unter Verwendung von HEK293 Zellen, die rekombinantes Laminin 332 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, entwickelt (Goletz *et al.*, 2018).

#### **1.4.2 Laminin 332**

Das Zielantigen des Anti-Laminin 332 SHP, Laminin 332 (früher auch Laminin 5, Kalinin, Epiligrin oder Nicein genannt) gehört zur Familie der Laminine. Laminine sind große nicht-kollagene Glykoproteine, bestehend aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette, welche sich im endoplasmatischen Retikulum über ihre C-terminale Dömane zu einem  $\alpha$ -helikalen Heterotrimer formen (Hohenester, 2019). Die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Ketten besitzen fünf, vier beziehungsweise drei genetische Varianten (Colognato and Yurchenco, 2000). Bisher sind 15 verschiedene Laminin-Formen bekannt. Nach der aktuellen Nomenklatur sind die Laminine nach den einzelnen Ketten benannt, aus denen das Protein besteht. Demnach besteht Laminin 332 aus der  $\alpha$ 3-,  $\beta$ 3- und  $\gamma$ 2- Kette (Aumailley *et al.*, 2005). Laminine sind wichtige Komponenten aller Basalmembranen und funktionell an der Zelldifferenzierung, Migration und Adhäsion beteiligt (Colognato and Yurchenco, 2000). Laminin 332 wird hauptsächlich von Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert (Chung *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). Seine Hauptaufgabe besteht in normalen Geweben in der Aufrechterhaltung des epithelial-mesenchymalen Zusammenhalts in Geweben, die externen Störkräften ausgesetzt sind, einschließlich der Haut, der geschichteten Plattenepithelschleimhaut und der Hornhaut (Kasperkiewicz *et al.*, 2017d). Defekte in einem der drei Gene von Laminin 332 haben daher weitreichende Konsequenzen. Die hereditäre Epidermolysis bullosa beispielsweise kann unter anderem durch Gendefekte in den *LAMA3*, *LAMB3* und *LAMC2* Genen auftreten, welche klinisch durch mechanisch induzierte Blasenbildung der Haut und Mundschleimhaut und chronischen Wunden charakterisiert ist. Dabei unterscheidet sich die

schwere, junctionale Epidermolysis bullosa durch eine extreme Fragilität der Haut und Mundschleimhaut und Letalität in den ersten Lebensjahren von der milderen Form der junctionalen Epidermolysis bullosa (Fine *et al.*, 2014).

Auch die gezielte Ausschaltung des Gens *Lama3* in Mäusen führt phänotypisch zu beträchtlicher Blasenbildung von Haut und Mundschleimhaut und Letalität 2-3 Tage nach der Geburt (Ryan *et al.*, 1999). Bezüglich Laminin 332 wird vor allem die Rolle bei der Wundheilung und bei der Invasion von Tumorzellen intensiv untersucht (Kang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011). Es wurde gezeigt, dass Laminin 332 in verschiedenen Arten von Plattenepithelkarzinomen und anderen epithelialen Tumoren, einschließlich Haut-, Mund-, Ösophagus-, Larynx-, Tracheal-, Zervix- und Kolonkarzinomen, stark exprimiert wird. Bei diesen Tumoren wird häufig festgestellt, dass sich Laminin 332 an der Grenzfläche des Tumors mit dem umgebenden Stroma ansammelt (Kim *et al.*, 2011). Die Expression von Laminin 332 korreliert hierbei mit der Invasivität des Tumors und der schlechten Prognose des Patienten in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen-Subtypen. Tumore zeigen ein erhöhtes Maß an Laminin 332-Expression, insofern sie aus Geweben stammen, die Laminin 332 exprimieren können (Kasperkiewicz *et al.*, 2017d; La Placa *et al.*, 2019).

### **1.4.3 Klinik**

Das klinische Bild des SHP ist heterogen. Dabei ist die Mundschleimhaut, gefolgt von den Konjunktiven am häufigsten betroffen (Amber *et al.*, 2018; Holtsche *et al.*, 2018). Die Schleimhäute von Nase, Nasopharynx, Vulva und Penis sowie Rektum, Larynx und Ösophagus können, hier in abfallender Häufigkeit gelistet auch betroffen sein und können auch jeweils die einzige betroffene Körperstelle eines Patienten darstellen. Bei etwa 25% der Patienten tritt zusätzlich eine Blasenbildung der Haut, vor allem an Kopf, Hals und oberem Körperrumpf auf (Schmidt und Zillikens, 2013). Die Mundschleimhaut kann Erytheme, Blasen und fibrinbelegte Erosionen aufweisen. Ein weiteres Merkmal ist die narbige Abheilung der Läsionen (Dart, 2017; Schmidt und Zillikens, 2013), wobei der Mundinnenraum ausgenommen ist. Die Augen sind meistens zunächst unilateral betroffen. Der anfänglichen Konjunktivitis folgt eine Verkürzung der konjunktivalen Umschlagfalten (Fornices), Vernarbungen der Konjunktiva und bei fehlender oder nicht wirksamer Therapie eine Erblindung infolge von Narbenbildung und Fibrose. Etwa 40% der Patienten mit narbenbildender Konjunktivitis haben als Ursache die Diagnose Schleimhautpemphigoid (Dart, 2017). Bei Vernarbung der Ösophagusschleimhaut können Dysphagie, sowie Gewichtsverlust und Aspiration auftreten. Somit sind starke Schmerzen, Probleme bei der Nahrungsaufnahme und Erblindung nur einige Komplikationen, welche sich zusätzlich zu den gesundheitlichen Einschränkungen stark auf die Lebensqualität auswirken (Kasperkiewicz *et al.*, 2012). Klinisch unterscheidet sich das Anti-Laminin 332 SHP nur unwesentlich von SHP Patienten mit anderen Zielantigenen. Lediglich ein häufigerer

Befall des Oropharynx wurde bei Anti-Laminin 332 Reaktivität beschrieben (Amber et al, 2016). Der Nachweis von Anti-Laminin 332 Reaktivität ist jedoch von großer Bedeutung, da bei etwa 30% der Patienten ein Malignom diagnostiziert wird (Egan *et al.*, 2001; Goletz *et al.*, 2019).

#### **1.4.4 Pathogenese und Therapie**

Die Pathogenese des SHP ist bislang unzureichend aufgeklärt worden. Die Entzündungsreaktion in SHP Patienten wird momentan als Folge des Toleranzverlustes gegenüber Proteinen der Basalmembranzzone beschrieben, welche in der Bildung von autoreaktiven T-Zellen, die mit autoreaktiven B-Zellen der regionalen Lymphknoten in Wechselwirkung treten, resultiert. Dies führt zur Generierung von Plasmazellen, die zirkulierende IgG- oder IgA-Antikörper produzieren. Unter Berücksichtigung residualer B-Zellen im Läsionsgewebe können die Antikörper auch lokal produziert werden. Der Toleranzverlust scheint bei Menschen, welche das HLA-DQB\*0301 exprimieren gehäuft aufzutreten (Delgado *et al.*, 1996; Olbrich *et al.*, 2019). Gebildete Antikörper binden an ihr Zielantigen in der Basalmembranzzone und leiten eine Entzündungsreaktion ein, welche in der Fixierung von Komplementfaktoren und einem Influx von Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen, Eosinophilen und T-Zellen resultiert. Proteine der MHC II-Klasse sind in der Konjunktiva von SHP Patienten hoch exprimiert. In diesem akuten Stadium der Erkrankung werden vor allem Mastzellen und Eosinophile festgestellt, wobei beide Zelltypen pro-fibrotische Zytokine produzieren und sekretieren können (Dart, 2017; Saw *et al.*, 2011).

Bisher existiert keine spezifische Therapie für die Behandlung des SHP. Die Basistherapie bilden meist systemische Kortikosteroide. Abhängig von der Schwere der Erkrankung, dem Krankheitsverlauf und der Lokalisation der betroffenen Schleimhäute wird die Behandlung mit Dapson, Azathioprin, Cyclophosphamid, IVIG oder Rituximab kombiniert (Chan *et al.*, 2002; Holtsche *et al.*, 2018).

#### **1.4.5 Epitope spreading beim Schleimhautpemphigoid**

Das Phänomen des *epitope spreading* wurde in verschiedensten Studien und auch den unterschiedlichsten Autoimmunerkrankungen beschrieben (Didona und Di Zenzo, 2018). Hierbei wird spekuliert, dass Anti-Laminin 332 Autoantikörper bei BP180 SHP Patienten über ein *epitope spreading* mittels physikalischer Interaktionen zwischen der BP180 C-terminalen Domäne mit Laminin 332 der epidermalen Basalmembranzzone entstehen können (Yasukochi *et al.*, 2016). Es wird des Weiteren angenommen, dass eine massive Zerstörung der Basalmembranzzone durch die Blasenbildung bei SHP Patienten zu einer erhöhten Freisetzung von intrazellulären Komponenten der Basalmembranzzone führt, wogegen vom Immunsystem wiederum Autoantikörper gebildet werden könnten (Chan *et al.*, 1998).

## 1.5 Mausmodelle

### 1.5.1 Allgemein

Mausmodelle sind bislang die einzige Möglichkeit komplexe Zusammenhänge, wie sie bei Autoimmunerkrankungen vorherrschen, zu untersuchen. Patienten, welche beispielsweise mit einer bullösen Autoimmundermatose diagnostiziert werden, haben den Toleranzverlust inklusive der Initiationsphase bereits durchlaufen, so dass die Entstehung der Autoimmunität am Patienten nur noch durch eine Anamnese und kaum noch durch molekularbiologische Methoden nachvollzogen werden kann. Zudem müssen die Patienten sofort behandelt werden, wodurch auch die Effektorphase und ein mögliches *epitope spreading* der Krankheit nicht unbeeinflusst über die Zeit nachvollzogen werden kann. Im Vergleich des Immunsystems von Menschen und Mäusen zeigen sich jedoch Unterschiede. Diese schränken den Transfer von in Mäusen generierten Daten auf den Menschen ein (Kasperkiewicz *et al.*, 2017b).

### 1.5.2 Mausmodelle von Pemphigoid-Erkrankungen

Eine durch Antikörpertransfer induzierte EBA in Mäusen wurde erstmals 2005 publiziert (Sitaru, 2005, Woodley 2005) Dabei wurde IgG von Kaninchen, welche zuvor mit unterschiedlichen immundominanten Fragmenten des murinen COL7 immunisiert wurden, oder IgG von EBA Patienten, in Mäuse verschiedener Stämme injiziert. Solche Modelle werden im Folgenden als passive Mausmodelle bezeichnet. Die Pathogenese war vollständig von dem Komplementfaktor C5 und einem intakten Fc-Fragment des injizierten IgG abhängig (Sitaru *et al.*, 2005). Auch der Transfer von Kaninchen Antikörpern, welche mit der nicht-kollagenen Domäne 1 (NC1) von COL7 immunisiert wurden, konnte in SKH Mäusen einen Phänotyp induzieren. Dabei konnte in allen getesteten Stämmen subepidermale Blasenbildung beobachtet werden (Woodley *et al.*, 2005). In darauf folgenden Studien wurden weitere immundominante Epitope, wie die von Willebrandt-Faktor-A2 (vWFA2) Subdomäne innerhalb der NC1 Domäne von COL7 nachgewiesen, welche als Zielantigen ebenfalls eine subepidermale Blasenbildung in Mäusen auslösen können (Iwata *et al.*, 2013). Ebenso wurde für die EBA gezeigt, dass der Transfer von isolierten Patientenantikörpern, welche gegen die NC1-Domäne von COL7 gerichtet waren, subepidermale Blasenbildung in SKH Mäusen auslöste. Jedoch hängt die Kreuzreaktivität der Patientenantikörper mit dem murinen COL7 von den spezifischen Zielstrukturen des einzelnen Patienten ab, sodass eine Induktion der Erkrankung in der Maus durch Patienten IgG begrenzt ist (Chen *et al.*, 2007; Woodley *et al.*, 2006).

Durch Immunisierung induzierte experimentelle EBA wurde erstmals mit mCOL7c, einem rekombinanten Fragment der murinen NC1-Domäne von COL7 erfolgreich in unterschiedlichen Mausstämmen induziert (Sitaru *et al.*, 2005). Solche Mausmodelle werden im Folgenden als aktive Mausmodelle bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mausstämmen durch die

aktive Immunisierung in der Lage sind Anti-Col7 Antikörper zu produzieren, die Immunantwort bei suszeptiblen Stämmen jedoch durch IgG2-Autoantikörper und bei nicht suszeptiblen Stämmen, durch IgG1-Autoantikörper dominiert ist. Die Ausprägung der Erkrankung wurde mit dem H2s Haplotyp in Mäusen assoziiert (Sitaru *et al.*, 2006). Auch mittels anderer Zielantigene innerhalb der NC1-Domäne des murinen COL7 konnte in den suszeptiblen Stämmen B6.SJL-H2s oder SJL/J eine experimentelle EBA generiert werden (Csorba *et al.*, 2014). Die aktiv induzierte EBA wird unter anderem zur Untersuchung genetischer Faktoren, des Ablaufes der Pathogenese sowie der Mechanismen des Toleranzverlustes nach der Immunisierung genutzt. Auch zur Aufdeckung und Untersuchung therapeutischer Targets eignen sich diese Modelle aufgrund des zeitlich gesehen relativ langen Krankheitsverlaufes (Iwata *et al.*, 2015). Mittlerweile stehen auch ein passives und ein aktives BP Mausmodell in adulten Mäusen zur Verfügung (Hirose *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2014).

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

Tiermodelle für das SHP wurden bisher nur für das Anti-Laminin 332 SHP etabliert. Dazu wurde Laminin 332 aus der extrazellulären Matrix von humanen Keratinozyten isoliert. Anschließend wurden Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer mit dem aufgereinigtem Laminin 332 immunisiert, um Anti-Laminin 332 Antikörper zu generieren. Neonatale Wildtyp BALB/c Mäuse entwickelten nach dem Transfer von Kaninchen-IgG nicht-entzündliche, subepidermale Blasen am Abdomen, Füßen und/oder Ohren innerhalb von 24 Stunden. Die direkte Immunfluoreszenz wies lineare Ablagerungen von IgG und C3 an der Basalmembranzzone der Haut auf (Lazarova *et al.*, 2000a; Lazarova *et al.*, 1996). Ein vergleichbarer Phänotyp konnte auch in adulten Mäusen gezeigt werden (Lazarova *et al.*, 2000b). In einem weiteren Modell wurde IgG von Patienten mit Anti-Laminin 332 SHP in SCID Mäuse transferiert, welchen zuvor humane Haut transplantiert worden war. Der Transfer führte zu subepidermaler Blasenbildung im Hauttransplantat und zeigte somit die *in vivo* Pathogenität der Patientenantikörper (Lazarova *et al.*, 2000b).

Ein passives Mausmodell des Anti-Laminin 332 SHP in adulten Mäusen wurde 2017 publiziert. Der Transfer von in Kaninchen generierten Antikörpern gegen den C-terminalen (c-term, aa2756-3330) und den mittleren (mid, aa1656-1985) Teil des mLAM $\alpha$ 3 Proteins (murine Homologe der durch eine Epitopkartierung nachgewiesenen humanen immundominanten Regionen der Laminin  $\alpha$  3 Kette) in adulte C57BL/6J Mäuse konnte bei Mäusen nach 12 Tagen ein klinisches Bild erzeugen, welches wesentliche Charakteristika von von der humanen Erkrankung widerspiegelt (Heppe *et al.*, 2017). Hierbei konnten lineare Ablagerungen von IgG und C3 in der peri-läsionalen Haut, der bukkalen Mukosa, der Konjunktiva, dem Ösophagus und der Zunge entlang der Basalmembranzzone nachgewiesen werden. Gestützt wurden die Daten von nachgewiesenen Spaltbildungen und entzündlichem Infiltrat in den Histologien dieser Gewebe. Durch endoskopische Untersuchungen des

Mundinnenraumes konnten auch Krusten und Erosionen der Mundschleimhaut bestätigt werden. Die Schwere der oralen Beeinflussung korrelierte mit der Gewichtsabnahme der Mäuse (Heppe *et al.*, 2017).

Durch ein Gen-knock-in in das murine *Lamb3* Gen konnte ein Mausmodell für die junctionale Epidermolysis bullosa entwickelt werden. Die Lebensdauer dieser Tiere beträgt im Schnitt drei Tage, wodurch die Eignung dieses Modelles eingeschränkt ist (Kasperkiewicz *et al.*, 2017a). Eine gezielter knock-out des *Lama3* Gens in Keratinozyten konnte in einem weiteren Mausmodell Hautentzündungen und fibrotische Strukturen auslösen. Da die Blasenbildung auf die interfollikuläre Epidermis beschränkt war, verloren die Tiere die Epidermis nicht und waren lebensfähig. Ihre klinischen Symptome waren jedoch auf die Nägel und die Fußsohlen beschränkt und es konnten keine Schleimhautbeteiligungen gezeigt werden (Poreba *et al.*, 2017). Daher kann auch dieses Mausmodell nicht für die Untersuchung von neuen Therapieoptionen für SHP Patienten genutzt werden. Auch mangelt es bislang an Mausmodellen, welche durch spontane Mutation ein SHP abbilden würden (Kasperkiewicz *et al.*, 2017b). Durch Immunisierung mit Laminin 332 oder Fragmenten davon sind bislang keine Mausmodelle beschrieben worden. Ein solches sogenanntes aktives Mausmodell für das Laminin 332 SHP würde großes Potenzial bieten, nicht nur um den Verlust der Immuntoleranz und Faktoren, welche diesen beeinflussen, zu untersuchen, sondern vor allem auch um neue Therapien für Patienten mit SHP in Langzeitstudien evaluieren zu können. Sollte ein solches Mausmodell auch die Schleimhäute betreffen und im Idealfall auch eine vernarbende Heilung zeigen, wie sie bei den Patienten vorliegt, könnte eventuell auch geklärt werden, warum dieselben Autoantikörper zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen in Menschen führen können, wie es bei EBA und SHP der Fall ist. Warum es zu einem *epitope spreading* kommt und wie man diese Erkrankung mit den schweren Einschränkungen an Lebensqualität der Patienten spezifischer therapieren könnte, indem man die Pathogenese nachvollziehen könnte, wären ebenfalls Kernfragen, die mit einem solchen Mausmodell eruiert werden könnten.

## **1.6 Zielsetzung**

Zur Aufschlüsselung der Pathogenese des Anti-Laminin 332 SHP konnten in den letzten Jahrzehnten wenige Fortschritte erzielt werden. Patienten können daher zumeist nicht optimal und nicht krankheitsspezifisch behandelt werden. Um spezifischere und effektivere Therapiemöglichkeiten zu etablieren bilden Tiermodelle eine gute und bei unzureichender Probenlage oftmals auch die einzige Basis. Dazu sollen in der vorliegenden Arbeit im ersten Teil Effektormechanismen und mögliche neue Therapieoptionen des Anti-Laminin 332 SHP sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht werden. Der erste Schritt besteht darin, ein geeignetes Schema zu entwickeln, um die verschiedenen klinischen Ausprägungen des neu entwickelten Anti-Laminin 332 SHP-Mausmodelles zu quantifizieren. Mittels

dieser Methodik soll dann überprüft werden, ob sich das passive Anti-Laminin 332 SHP-Mausmodell eignet, um Therapieoptionen zu testen. Dies kann am plausibelsten geprüft werden, indem eine Standardtherapie, welche beim Menschen zum Einsatz kommt, im Mausmodell eingesetzt wird und eine Reduktion der Krankheitsausprägung bewirkt. Anschließend sollen Therapieoptionen getestet werden, welche geringere Nebenwirkungen als die Standardtherapie aufweisen und bereits klinisch für andere Erkrankungen zugelassen sind. Mittels Zellkultur Experimenten sollen zudem die ersten Reaktionen der Zielzellen (Keratinocyten und Fibroblasten) auf die Bindung von Anti-Laminin 332 Antikörpern, auch in Kombination mit den zu testenden Wirkstoffen, eruiert werden. Dies zielt u.a. auf die funktionelle Relevanz des Laminin 332 bezüglich der Zelladhäsion, Migration und Wundheilung ab.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein aktives Anti-Laminin 332 SHP-Mausmodell entwickelt und charakterisiert werden. Da das passive Anti-Laminin 332 SHP-Mausmodell nur die Effektorphase der Erkrankung abbilden kann, ist die Entwicklung eines aktiven Modelles in adulten Mäusen vor allem relevant, um herauszufinden wie es zum Toleranzverlust und letztlich zur Bildung von Autoantikörpern gegen Laminin 332 kommen kann. Zudem sind neue Therapieoptionen in einem aktiven Mausmodell patientennäher zu evaluieren. Hierzu sollen neben verschiedenen Immunisierungsstrategien auch unterschiedliche Mausstämme untersucht werden. Die Verwendung unterschiedlicher Proteinfragmente der  $\alpha 3$  Kette des Laminin 332 soll zusätzlich dazu beitragen die Pathogenität der Epitope dieses Proteins zu definieren. Insgesamt hat die vorliegende Arbeit das Ziel, die Pathogenese des Anti-Laminin 332 SHP besser zu verstehen und neue Therapieoptionen für diese Erkrankung zu etablieren.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
-80°C Gefrierschrank <i>Ultra Low Temperature Freezer C660 Premium</i>	New Brunswick Scientific, England
Autoklav	Webeco, Selmsdorf, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tittlingen, Deutschland
Cryostat <i>Leica CM3050S</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar, Deutschland
Elektrophoresekammer <i>Mini Protean II</i>	BioRad Laboratories, München, Deutschland
ELISA-Reader <i>GloMAX</i>	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Endoskop, starre Optik	Storz, Bayern, Deutschland
Feinwaage <i>Analytical Plus</i>	Ohaus, Parsippany, New Jersey, USA
Feuchtigkeitskammer	Werner Hassa, Lübeck, Deutschland
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop <i>BZ-9000</i>	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Heizblock <i>Thermostat 5320</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlraum 4°C	Viessmann, Allendorf, Deutschland
Kühlzentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop	Helmut Hund, Wetzlar, Deutschland
MACS Quant	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer <i>MR3002</i>	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Neubauerkammer	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
pH Meter <i>pH526</i>	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer <i>Biophotometer</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten <i>Eppendorf Research</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe <i>accu-jet</i>	Brand, Wertheim, Deutschland
Rotator	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator <i>Certomat IS</i>	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Schüttler <i>Duomax 1030</i>	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Scil Vet abc Plus+	Scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland
Spannungsquelle <i>Electrophoresis Power Supply EPS 3500</i>	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Stabhomogenisator <i>Omni TH 3525</i>	Omni International, Georgia, USA
Sterilbank <i>Biowizard</i>	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Ultraschallsonde <i>Sonopuls</i>	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge <i>Avanti J-E</i>	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Vortex <i>Genie 2</i>	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Waage <i>Precision Standard</i>	Ohaus, Parsippany, New Jersey, USA
Zentrifuge <i>Centrifuge 5804R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
1,5ml, 2ml, 5ml Gefäße <i>SafeSeal Gefäß</i>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
15ml, 50ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5ml PE-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Centricons <i>Amicon-Ultra 15</i>	Millipore, Bradford, USA
Deckgläschen 24x60mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einbettmedium <i>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</i>	SakuraFinetek Europe B.V., Alphenaan den Rijn, Niederlande
Einbettgeschälchen <i>Tissue-Tek® Cryomold</i>	SakuraFinetek Europe B.V., Alphenaan den Rijn, Niederlande
Einmal-Feindosierungsspritze <i>Omnican F (30Gx1/2")</i>	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalküvetten <i>UV-Küvette micro</i>	Brand, Wertheim, Deutschland
ELISA-Platten <i>Maxisorp</i>	Nunc/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Homogenisator <i>OmniTh</i>	Omni International, Kennesaw, Georgia, USA
Kammerobjektträger-System, Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™	Nunc/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kanülen <i>BD Microlance 3 (30Gx1/2")</i>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
nicht bindende Mikrotiterplatten <i>PS-Plate 96K non-binding</i>	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulose Blotting Membran 0,45µm, Amersham™ Protran™	GE Healthcare, Amershan, England
Objektträger <i>Superfrost Plus</i>	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm <i>Laboratory Film</i>	Pechiney Plastic Packaging, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen 10µL, 200µL, 1000µL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 300µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Protein-G-Resin	GenScript Biotech Corp., New Jersey, USA
Serologische Pipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 5ml, 20ml <i>BD Discardit II</i>	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter <i>Minisart 0,22µm</i>	Sartorius stedim, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen T75cm <sup>2</sup> , T175cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb <i>CellStrainer 70µm</i>	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenbecher 500ml für Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 30ml für Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2.3: verwendete Chemikalien und Lösungen

Material	Firma
1-Step Turbo TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Merck, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Acetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid-Lösung 30%	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Albumin Fraction V (pH 7,0)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Bromphenolblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dapsone, Vetrinal analytical standard	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose, no Pyruvat	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fast green	Abcam, Cambridge, England
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco™/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Forskolin, analytical standard	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Glukose (D-Glukose)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Guanidin-HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Histofix® (4% Formaldehyd, phosphatgepuffert)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Imidazol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Lysogenebroth (LB)-Medium	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Maisöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methocel (Hydroxypropyl-methyl Zellulose)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-hydroxysuccinimide (NHS)-aktivierte Sepharose	GE Healthcare, München, Deutschland
Natriumazid ( $NaN_3$ )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Normales Kaninchen Serum (NR IgG)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Penicillin-Streptavidin	GE Healthcare, München, Deutschland
Polyethylenglykol, PEG400	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) 85%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail Set III, Animal Free	Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin, biotinfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNALater®	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roflumilast	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
TALON® Metal Affinity Resin	Takara Bio Europe, Paris, Frankreich
TiterMax® Gold	Alexis, Lörrach, Deutschland
Tris-Base	ServaElectrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Tris-Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAN biotech GmbH, Bayern, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland
Xylazin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2.1.4 Antikörper

Tabelle 2.4: verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Affe Anti-Kaninchen IgG FITC	1:100	Jackson Immuno Research, Ely, England
Maus Anti-His	1:1000	Millipore, Bradford, USA
Maus Anti-Maus C3 FITC	1:50	MP Biomedicals, Ohio, USA
Kaninchen Anti-Maus IgG HRP	1:1000	Dako Agilent, Kalifornien, USA
Ziege Anti-Maus IgA FITC	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Ziege Anti-Kaninchen IgG HRP	1:1000	Dako Agilent, Kalifornien, USA

## 2.1.5 Verwendete Kits

Tabelle 2.5: verwendete Kits

Bezeichnung	Firma
BrdU Zellproliferations-Assay	Abcam, Cambridge, England
cAMP intrazellulär ELISA	Abcam, Cambridge, England
CXCL-2/MIP-2 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minnesota, USA
IL-6 ELISA	R&D Systems, Minnesota, USA
LegendPlex	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
Mouse subclass ELISA quantitation set (IgA, IgE,	Biomol, Hamburg, Deutschland

IgG, IgG1, IgG2a/b/c, IgG3, IgM)	
Mykoplasmen-Detektions-Kit	Biontex, München, Deutschland
NextSeq HighOutput 150 cycles Kit	Illumina, Kalifornien, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

## 2.2 Software

Tabelle 2.6: verwendete Software

Software	Version
Adobe Illustrator CS2	Version 2.0
GraphPadPrism	Version 5.1
ImageJ Launcher	Freie Software
Microsoft Office, Excel, PowerPoint	Version 2010
OLYMPUS Fluoview	Version 4.1
REACTOME <a href="https://reactome.org/">https://reactome.org/</a>	Online Version 67
STRING <a href="https://version-10-5.string-db.org/">https://version-10-5.string-db.org/</a>	Online Version 10.5

## 2.3 Methoden zur Proteinherstellung, -aufreinigung und -quantifizierung

### 2.3.1 Proteinherstellung und -aufreinigung der c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 Fragmente

Tabelle 2.7: verwendete Puffer für die Proteinherstellung und -aufreinigung von mLAM $\alpha$ 3 Fragmenten

Bezeichnung	Zusammensetzung
TALON Waschpuffer, denaturierend	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O, 300mM NaCl, 6M Guanidin-HCl; pH 7,0 mit NaOH einstellen
TALON Elutionspuffer	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O, 300mM NaCl, 6M Guanidin-HCl 100mM Imidazol; pH 7,0 mit NaOH einstellen

Die Expression der Fragmente mid (aa1656-1985) und c-term (aa2756-3330) der mLAM $\alpha$ 3 Kette erfolgte als Fusionsprotein mit einem Hexahistidin-Tag und einer Carbenicillinresistenz, wobei die Firma Life Technologie (Darmstadt, Deutschland) die Plasmide hierzu synthetisierte. Als Expressionsvektor für die Klonierung der Gene wurde pRSETA genutzt und die Transformation erfolgte in *Escherichia coli* Origami. Dr. Stephanie Goletz optimierte den folgenden Expressionsvorgang. Mit jeweils einer Kolonie pro Fragment wurde, in je 200ml LB-Medium mit 100mg/ml Carbenicillin bei 200rpm und 37°C, eine Übernachtskultur in einem Schüttelinkubator angesetzt. Diese Vorkultur wurde mit insgesamt 3L LB-Medium, welches ebenfalls Carbenicillin enthielt zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,05-0,1 verdünnt. Für die Kultivierung des c-term mLAM $\alpha$ 3 Proteins wurde dem Medium zusätzlich 1% steril filtrierte Glukose zugesetzt. Bei 37°C und 200rpm wurden die Kulturen bis zu einer optischen Dichte von 0,4-0,6 in einem Schüttelinkubator angezüchtet und durch Zugabe von 100mg/ml IPTG die Expression der Proteine für 5 Stunden unter denselben Bedingungen induziert. Jeweils 1ml wurden vor der Induktion, sowie nach der Expression abgenommen, um später den Erfolg der Proteinproduktion überprüfen zu können. Anschließend

wurden die Bakterien bei 5000xg und 4°C für 20 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets von insgesamt 3l Bakterienkultur wurden in 50ml denaturierenden Waschpuffer, welcher 1:50 mit Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt wurde, resuspendiert. Diese Suspension wurde dann dreimal für 30 Sekunden mit 20 Impulsen (50% Leistung) auf Eis mit Ultraschall beschallt, um die Bakterien zu lysieren und die exprimierten Proteine freizusetzen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000xg und 4°C um die Bakterienzellreste zu pellettieren. Der entstandene Überstand, welcher nun die rekombinanten Proteine enthielt, inkubierte daraufhin mit 3ml TALON Matrix für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotator. Im Anschluss wurden auf einer Säule, ungebundene Proteine durch mehrfaches Waschen mit TALON Waschpuffer, von der Säule gespült, bis die OD<sub>600</sub> unter 0,05 lag. Die an der Matrix verbliebenen rekombinanten Proteine wurden mittels Elutionspuffer eluiert, dieses Eluat anschließend mittels Ultrafiltration in Amicon Filtern (15K) aufkonzentriert und in 6M Urea umgepuffert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der Expressionskontrolle folgte eine SDS-PAGE mit den genommenen Proben und den hergestellten Proteinen (siehe Abschnitt 2.3.2.).

### 2.3.2 Konzentrationsbestimmung rekombinanter Proteine

Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris-Puffer, pH 8,8	1,5M Tris-Base in Aqua dest.
Tris-Puffer, pH 6,8	0,5M Tris-Base in Aqua dest.
Laufpuffer	15g Tris-Base, 72g Glycin, 5g SDS in 1L Aqua dest.
5x Lämmli-Puffer	25ml 1,5M Tris-Puffer, 12g SDS, 60ml Glycerol, 13ml Aqua dest., 2ml 0,2% Bromphenolblaulösung, 37,3ml β-Mercaptoethanol
Sensitive Coomassie-Färbung	50g Aluminiumsulfat(14-18)-Hydrat, 100ml Ethanol, 0,2g Coomassie Brilliant Blue G250, 20ml Phosphorsäure in 1L Aqua dest.
10% SDS	10% SDS in Aqua dest.
10% APS	10% Ammoniumpersulfat in Aqua dest.

#### **Sammelgel (4%):**

2,35ml Aqua dest.

2,5ml 1,5M Tris-Puffer, pH8,8

5ml 30% Acrylamid

100µL 10% SDS

12µL TEMED

80µL 10% APS

#### **Trenngel (10%):**

3ml Aqua dest.

1,25ml 0,5M Tris-Puffer, pH 6,8

670µL 30% Acrylamid

50µL 10% SDS

12µL TEMED

70µL 10% APS

Die Bestimmung der Konzentration von rekombinant hergestellten Proteinen (mLAM $\alpha$ 3-mid und mLAM $\alpha$ 3-c-term, Abschnitt 2.3.1) erfolgte durch visuellen Vergleich der Intensität der Proteinbanden, gegen die Dicke der Intensität von Rinder-Serum-Albumin (BSA) in verschiedenen bekannten Konzentrationen (2mg/ml, 1,5mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml) in einem Coomassie-gefärbten Gel, mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (englisch *Sodiumdodecylsulfate-poly-acrylamide-gel-electrophoresis*), kurz SDS-PAGE. Hierzu polymerisierte zunächst das Trenngel in einer 0.75mm Gelkammer und wurde anschließend mit dem Sammelgel und einem Gelkamm (1, 5 oder 10 Taschen) versehen. Um die Proteine in den Proben für die SDS-PAGE zu denaturieren, wurden diese mit Lämmli-Puffer versetzt und bei 100°C für 5 Minuten erhitzt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisierte konnte die Elektrophoresekammer mit SDS Laufpuffer aufgefüllt, der Kamm entfernt, die Geltaschen mit Laufpuffer gespült und die Proben mit einem Volumen von 100 $\mu$ l/50 $\mu$ l/15 $\mu$ l pro Tasche für ein jeweils 1/5/10 Taschen-Gel in die Taschen pipettiert werden. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 150V und 50mA, so lange, bis die Lauffront aus dem Gel in den Laufpuffer austrat. Zuletzt wurde das Gel mit page blue nach Herstellerangaben angefärbt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Diese Methodik diente des Weiteren zur Kontrolle der Reinheit der gewonnenen mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragmente und auch zur Western-Blot Analyse (siehe Abschnitt 2.3.3).

### 2.3.3 Western-Blot und Neutralisation

Tabelle 2.8: verwendete Puffer für den Western-Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	5% Milchpulver in TBST
Inkubationspuffer	5% Milchpulver, 1% BSA in TBST
Transferpuffer	20% Methanol in Tris-Glycin
DAB	1 Tablette DAB in 10ml dest. Wasser, 12 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Der Western-Blot diente zur Verifizierung, dass sowohl die immunisierten Kaninchen (Abschnitt 2.3.4), als auch die immunisierten Mäuse (Abschnitt 2.4.8), Antikörper gegen die jeweils injizierten Proteine produzierten. Hierzu wurden 10 $\mu$ g des jeweiligen Proteins und 6 $\mu$ l des BroadRange Markers in einem 1 well Gel wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben aufgetrennt. Der Western-Blot erfolgte wie in (Groth *et al.*, 2011) beschrieben, mit kleinen Abweichungen: Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden eine Stunde bei 120V auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Um das Molekulargewicht durch den Marker später bestimmen zu können, wurde die Membran in FastGreen angefärbt, in destilliertem Wasser wieder weitestgehend entfärbt und die erforderlichen Markierungen vorgenommen. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden eine Stunde mit Blockierungspuffer geblockt und anschließend dreimal mit TBST für 10 Minuten gewaschen. Die Kaninchenserum wurden 1:40.000 und die Mausserum 1:5.000 mit Inkubationspuffer verdünnt und für

eine Stunde mit Streifen der Membran inkubiert. Um Antikörper, welche gegen ein bestimmtes Protein gerichtet sind, aus einem Serum zu entfernen wurden diese Seren mit 50µg von diesem Protein und 1:5.000 in Inkubationspuffer verdünnt über Nacht neutralisiert. Es folgte ein weiterer dreimaliger Waschschritt für je 10 Minuten mit TBST. Der Zweitantikörper wurde 1:1.000 in Inkubationspuffer verdünnt (Ziege Anti-Kaninchen IgG/HRP für die Kaninchenserum, Polyklonales Kaninchen Anti-Maus IgG/HRP für die Mausserum und die Positivkontrolle) und inkubiert ebenfalls für eine Stunde. Ein weiterer Waschvorgang wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Membranstreifen wurden für 2 Minuten in DAB gefärbt und danach mit destilliertem Wasser abgespült.

### 2.3.4 Herstellung von Kaninchen Anti-mLAMα3 IgG

Die unter 2.3.1 hergestellten rekombinanten Proteine mLAMα3 c-term und mLAMα3 mid wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und vier Aliquots mit je 500µg der gesamten Proteinmischung wurden an die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) geschickt. Diese immunisierten im Abstand von je 4 Wochen viermal New Zealand Kaninchen (SA8872, SA8778, SA8582, SA8543, SA7702) mit *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) und den erhaltenen Proteinen. Zur Gewinnung von Serum wurden den immunisierten Kaninchen alle 3 Wochen Blut abgenommen. Auf 6µm dicken Gefrierschnitten von gesunder muriner Schwanzhaut erfolgte die regelmäßige Bestimmung der Menge an IgG im Serum, welche spezifisch an die Maushaut binden (Antikörpertiter), siehe Abschnitt 2.6.4.

### 2.3.5 Antikörper-Aufreinigung

Tabelle 2.8: verwendete Puffer zur Antikörper-Aufreinigung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Wasch-/Bindungs-Puffer	20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O, 0,15M NaCl, pH 7,0
Glycinpuffer	0,1M Glycin, pH 2,8
Neutralisationspuffer	1M Tris-Base, pH 9,0

Protein G-Agarose diente zur Isolation von IgG Antikörpern aus Kaninchenserum. Die Seren stammten von mid und c-term mLAMα3 immunisierten Kaninchen, mit einem Titer über 1:8000; Kaninchen, welchen ohne Immunisierung (gesund) Serum abgenommen wurde; und Kaninchen welche mit mCol7c immunisiert wurden, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Ralf Ludwig zur Verfügung gestellt (Titer ≥ 1:20.000) wurden. Die Aufreinigung war mit kleinen Abweichungen nach Herstellerangaben wie folgt erfolgreich: Die Protein G-Agarose wurde zunächst mit Waschpuffer auf einer Säule äquilibriert, und die in PBS verdünnten Kaninchenserum inkubierten dann mit der Agarose für mindestens 1 Stunde bei 4°C auf einer Schwenkplatte. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die Säule bis zu einer OD von unter 0,05 mit Waschpuffer gewaschen. Mit 0,1M Glycin Puffer (pH 2,8) wurde das an die Matrix gebundene IgG gelöst und bis zu einer Adsorption von 0,1 in einem Gefäß aufgefangen, welches etwa 5-10ml Neutralisationspuffer enthielt, um einen vorzeitigen

Zerfall der IgG durch den niedrigen pH-Wert zu vermeiden. Mit dem Neutralisationspuffer wurde anschließend der pH-Wert auf 7,0-7,2 eingestellt. Durch Ultrazentrifugation (4000rpm, 4°C) in 30K Amicon Filtern konnte das Volumen des Eluates aufkonzentriert und mit 1xPBS umgepuffert werden. Da das isolierte Gesamt-IgG sowohl für Zellkulturexperimente als auch zur Injektion in Mäuse diente, musste es noch mit einem Spritzenvorsatzfilter (0,22µm) und einer Spritze sterilfiltriert werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDrop-Spektrophotometrie bei A280nm gegen PBS (Korrektionskoeffizient 0,74).

### 2.3.6 Affinitätsaufreinigung spezifischer Antikörper

Tabelle 2.9: verwendete Puffer zur spezifischen Affinitätsaufreinigung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lösung A	0,5M Ethanolamin, 0,5M NaCl, pH 8,3
Lösung B	0,1M Acetat, 0,5M NaCl, pH 4,0
Glycinpuffer	0,1M Glycin, pH 2,8

Das in Abschnitt 2.3.5 aufgereinigte Gesamt-Kaninchen-IgG beinhaltete neben den durch die Immunisierung von den Kaninchen hergestellten c-term und mid mLAMα3 IgG auch alle anderen IgG, welche durch äußere und innere Reize von dem Immunsystem des Kaninchens produziert wurden. Um ausschließlich diejenigen Antikörper aus dem Serum zu isolieren, welche gegen das c-term und das mid mLAMα3 Protein gerichtet sind, wurden die entsprechenden rekombinanten Proteine aus Abschnitt 2.3.1 separat an N-hydroxysuccinimid NHS-aktivierte Sepharose gebunden. Hierzu wurden zunächst 5ml der Sepharose mit dem 6x Volumen von 1mM HCl gewaschen und auf eine Polypropylen Säule geladen. Um die Proteine an die Matrix zu koppeln inkubierten je 6mg der Proteinfragmente bei Raumtemperatur für 90 min mit dem zweifachen Matrixvolumen in 6M Urea mit der Matrix auf einem Rotator. Der Durchfluss wurde aufgefangen, um später die Effizienz der Kopplung der Proteine an die Säule überprüfen und quantifizieren zu können. Es folgte ein Inkubationsschritt, in dem die Matrix 60 Minuten mit 10ml Lösung A bei RT unter Rotation inkubierte. Daraufhin folgte ein Waschvorgang, wobei jeweils dreimal abwechselnd mit je 10ml Lösung A bzw. Lösung B und zuletzt noch zweimal mit PBS gewaschen wurde. Die Effizienz der Kopplung konnte mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.3.2) ermittelt werden. Etwa 50mg Gesamt-Kaninchen-Anti-mLAMα3 mid+c-term IgG (siehe Abschnitt 2.3.4) inkubierten auf den hergestellten Säulen für eine Stunde auf einem Rotator bei RT. Da pro Säule nur die IgG mit den Epitopen von jeweils einem Fragment (mid oder c-term mLAMα3) isoliert werden konnten, wurde der Durchfluss aufgefangen um später noch auf die jeweils andere Säule, mit dem bislang nicht isoliertem spezifischem IgG, gegeben werden zu können. Die Sepharose wurde bis zu einer Adsorption von 0,05 mit PBS gewaschen und die gebundenen spezifischen Antikörper mit Glycinpuffer bis zu einer Adsorption von 0,01 eluiert. Zur Stabilisierung der Antikörper wurde der pH-Wert des Eluates auf 7,2

eingestellt. Die Lagerung der Matrix erfolgte bei 4°C in 6ml PBS mit 0,09% Natriumazid. Zur Reduktion des Eluatvolumens erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 4000rpm und 4°C in 15K Amiconfiltern, womit auch der Puffer gegen PBS ausgetauscht wurde. Analog wie bei der Gesamt-IgG Aufreinigung wurde auch das spezifische IgG steril filtriert und die Konzentration, sowie der Titer bestimmt.

## **2.4 Experimente mit Mäusen**

Das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein genehmigte alle hier beschriebenen Mausexperimente. Die Genehmigungen liegen unter den folgenden Nummern der Tierversuchsvorhaben vor: 95-7/13, 40-3/15, 20-2/17, 112-8/17.

Die Durchführung der Mausexperimente erfolgte in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck in einem offenen und geschlossenen Haltungssystem. Vor und während des Versuchszeitraumes wurden die Tiere bei einer Umgebungstemperatur von 21-23°C und einem 12h hell-dunkel-Zyklus in Gruppen von bis zu 5 Mäusen auf Sägespäne-Einstreu gehalten. Sie erhielten Pellettfutter und Wasser *ad libitum*. Die Narkose zur Dokumentation des klinischen Haut-Scores (betroffene Körperoberfläche), zur aktiven Immunisierung (siehe Abschnitt 2.4.8), zur Endoskopie des Mundinnenraumes, zur Probenentnahme während des Versuchsablaufes und zum Töten der Mäuse, erfolgte intraperitoneal mit einer Mischung aus Ketamin (10mg/ml) und Xylazin (1,5mg/ml) in einem Volumen von 100-200µl. Um sogenannte Cage-Effekte, u.a. durch den Einfluss des Mikrobioms, zu vermeiden wurden die experimentellen Gruppen innerhalb der Käfige gemischt.

### **2.4.1 Entwicklung eines quantitativen Bewertungsverfahrens für das Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid-Mausmodell**

Grundlage zur Entwicklung eines quantitativen Bewertungsverfahrens (englisch *Score*), welches die Hauptcharakteristika des Antikörpertransfer Mausmodelles für das Laminin 332 SHP gleichermaßen berücksichtigt, stellten die Mausversuche aus der Publikation (Heppe *et al.*, 2017) dar. Der zu entwickelnde Score sollte die Haut, die oralen und die konjunktivalen Läsionen, sowie den Verlust von Körpergewicht über die Zeit, quantifizieren und gleichermaßen gewichten und somit die Grundlage zur Überprüfung eines eventuellen Therapieerfolges sein. Aufzeichnungen des Körpergewichts über die Zeit, endoskopische Videodokumentationen an Tag 12, paraffin-eingebettete Konjunktiven von Tag 12 und die Betroffene Körperoberfläche über die Zeit stellten den Datenpool dar, welcher zur Entwicklung des Scores genutzt wurde. Grundlage der Auswertung war ein statistisch signifikanter Unterschied der einzelnen verwendeten Kriterien, wobei ein p-Wert < 0,5 als statistisch signifikant angenommen wurde.

### 2.4.2 Verwendete Mausstämme

Für das Antikörpertransfer Mausmodell des Anti-Laminin 332 SHP und der EBA wurden C57Bl/6J Mäuse verwendet. Die Mäuse stammten sowohl aus der internen Zucht der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck und von Prof. Dr. Ralf Ludwig als auch von dem kommerziellen Hersteller Charles River (Bayern, Deutschland). Für das immunisierungsinduzierte Mausmodell des Anti-Laminin 332 SHP wurden neben den C57Bl/6J Mäusen auch Mausstämme mit genetisch verändertem Hintergrund verwendet: SJL/J und B6.SJL-H2<sup>s</sup> C3<sup>e</sup>/1CyJ kurz B6.S Mäuse. Alle Experimente wurden an adulten Mäusen mit annähernd gleicher Geschlechtsverteilung innerhalb der Gruppen durchgeführt. Nach dem Transfer der Mäuse in die Gemeinsame Tierhaltung zu Lübeck wurden Versuche an den Tieren erst nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens 14 Tagen gestartet.

### 2.4.3 Antikörpertransfer Mausmodelle

Hierbei handelt es sich um sogenannte passive Mausmodelle, da die pathogenen Antikörper nicht von der Maus selber produziert werden, sondern wiederholt injiziert werden müssen. Das Antikörpertransfer Mausmodell des SHP wurde wie in Heppe *et al.*, 2017 publiziert durchgeführt (Heppe *et al.*, 2017). Hierzu wurden 6mg Gesamt-IgG (siehe Abschnitt 2.3.5) pro Injektion pro Maus subkutan (s.c.) in den Nacken injiziert. Die Injektionen erfolgten parallel zur Gewichtsbestimmung an den Tagen 0, 2, 4, 6, 8 und 10. Der klinische Haut-Score, welcher den prozentualen Anteil an betroffener Körperoberfläche einer Maus darstellt, wurde an den Tagen 0, 4, 8 und 12 bestimmt. Hierzu wurden den verschiedenen Körperpartien der Maus Prozentanteile der Gesamtkörperoberfläche wie folgt zugewiesen und der jeweilige Prozentanteil in Form von Blasenbildung, Erosionen, Erythemen und Alopezie dieser Partien bestimmt (Sitaru et al., 2005): je Ohr 2,5%, je Auge 0,5%, Schnauze 2,5%, Mundschleimhaut 2,5%, Kopf und Nacken 9%, je Vorderbein 5%, je Hinterbein 10%, Schwanz 10% und Rumpf 40%. An dem letzten Versuchstag erfolgte eine endoskopische Untersuchung des Mundinnenraumes, welche unter Narkose stattfand. Hierbei wurde der Mundinnenraum bis hin zum Larynx gefilmt, um eventuelle Läsionen festzustellen. Dazu diente ein starres Endoskop mit einem Durchmesser von 2,7mm und einer LED-Lichtquelle, welches freundlicherweise von Prof. Dr. Christian Sina vom Institut für Ernährungsmedizin zur Verfügung gestellt wurde. Ebenfalls am letzten Tag wurden die Mäuse durch Genickbruch und Ausbluten getötet und Proben zur histopathologischen Aufbereitung (in 4% Formaldehyd, Raumtemperatur), zur Immunfluoreszenzmikroskopie (in Tissue-Tek® O.C.T. -20°C), zur intrazellulären cAMP Bestimmung (in flüssigem Stickstoff) oder zur RNA Isolierung (in RNALater®) entnommen. Blut aus dem Herzen diente zur Gewinnung von Serum. Um ein differentielles Blutbild am scil Vet abc Plus+ zu erstellen wurde zudem EDTA-Blut verwendet. Das Gerät und dessen Benutzung erfolgten mit freundlicher Hilfe von Laurence Johansson und Dr. Gabriela Riemekasten, Klinik für Rheumatologie

und klinische Immunologie, UKSH Lübeck. Das Antikörpertransfer Mausmodell der EBA wurde wie in (Sitaru *et al.*, 2005) beschrieben durchgeführt, wobei klinische Untersuchungen und Proben analog zum SHP-Mausmodell vollzogen bzw. genommen wurden.

#### 2.4.4 Pathogenese des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodelles

Um eventuelle Unterschiede zwischen den histologischen und den klinischen Befunden detektieren zu können wurden Mäuse wie unter 2.4.3 beschrieben behandelt, jedoch nach 4, 8 und 12 Tagen (je n=7) getötet und die folgenden Proben zur histologischen Aufbereitung (siehe Abschnitt 2.6) genommen: Ohr, Ösophagus, Wange, Zunge, Konjunktiva, läsionale, periläsionale und nicht läsionale Haut (vom Bauch).

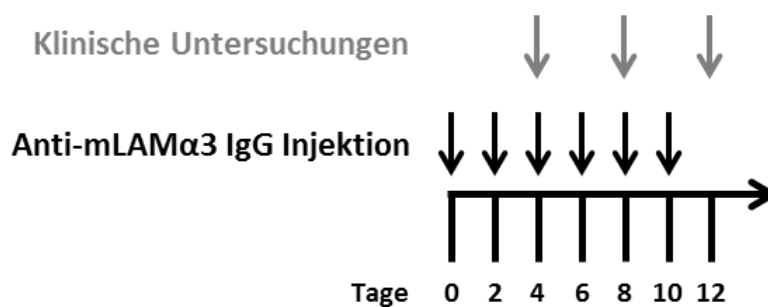


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Anti-mLAMA3 IgG Injektionen und Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf und der Krankheitsausprägung während der Pathogenese des passiven SHP-Mausmodelles

#### 2.4.5 Untersuchung der Pathogenität von mid- und c-term Anti-mLAMA3 IgG

Bei 20 Seren von humanen Laminin 332 SHP Patienten, konnten 2 immundominante Regionen auf der  $\alpha 3$  Kette des Laminin 332 identifiziert werden (Heppe *et al.*, 2017). Heppe *et al.* etablierten ein Mausmodell durch den Antikörpertransfer von Kaninchen IgG, welche gegen die murinen Homologe dieser Bereiche immunisiert wurden. Um herauszufinden, ob es Unterschiede in der Pathogenese oder den klinischen Phänotypen gibt, wenn nur Antikörper gegen entweder das mid oder das c-term mLAMA3 Protein injiziert werden, wurde das in 2.3.5 aufgereinigte Gesamt-IgG spezifisch aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.3.6). Hiervon wurden dann den Mäusen Titer-äquimolare Mengen (c-term mLAMA3 1mg/Injektion/Maus und mid mLAMA3 0,5mg/Injektion/Maus; siehe Abschnitt 2.6.4), nach dem in Abbildung 1 dargestellten Injektions- und Untersuchungsschema, injiziert.

#### 2.4.6 Abgrenzung des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell

Es existieren bereits Antikörpertransfer und Immunisierung-induzierte Mausmodelle des BP und der EBA (Schulze *et al.*, 2014; Sitaru *et al.*, 2005). Diese Mausmodelle ähneln sich in der Intensität und Lokalität des klinischen Phänotyps und der genetischen Suszeptibilität. Um abgrenzen zu können, dass nicht Antikörper, welche gegen Strukturproteine der dermo-epidermalen Junktionszone gerichtet sind, im Allgemeinen, denselben Phänotypen in Mäusen induzieren, wurde das Antikörpertransfer Mausmodell des SHP mit dem der EBA verglichen. Hierzu wurde zunächst die

Menge an Gesamt IgG (mLAM $\alpha$ 3 und mCol7c) bestimmt die in beiden Modellen eine moderate Krankheit auslöst (zwischen 5 und 8% betroffene Körperoberfläche). Für das SHP-Mausmodell wurden die Konzentrationen 5, 6 und 7 mg/Injektion/Maus und für das EBA Mausmodell die Konzentrationen 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 mg/Injektion/Maus, nach dem in Abbildung 1 dargestellten Versuchsaufbau über 12 Tage, austitriert. Da eine konjunktivale oder orale Beteiligung für das EBA Mausmodell bislang nicht untersucht wurde, kamen die unter Abschnitt 2.4.1 benannten Kriterien zum Vergleich der beiden Modelle zur Anwendung. Des Weiteren wurden die beiden Mausmodelle bis Tag 28 nach dem in Abbildung 2 dargestellten Schema beobachtet, um den Heilungsprozess im direkten Vergleich zu quantifizieren.

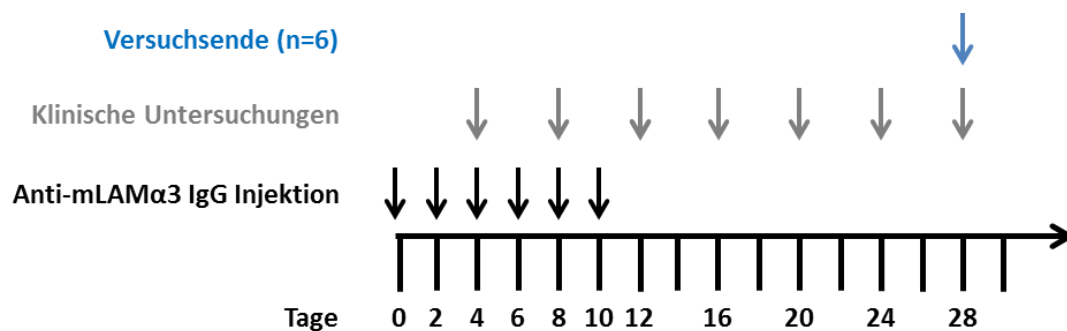


Abbildung 2: Schematische Übersicht des Ablaufes der Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Heilung und der Pathogenese des experimentellen SHP.

#### 2.4.7 Therapieoptionen im Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell

Um zu untersuchen, ob das experimentelle SHP-Mausmodell zur Evaluierung neuer Therapieoptionen geeignet ist, wurde eine etablierte Standardtherapie, welche bei der Behandlung von Anti-Laminin 332 SHP Patienten zum Einsatz kommt, auf Ihren Therapieerfolg im Mausmodell getestet. Hierzu diente Dapsone (Schmidt und Zillikens, 2013) in einer Konzentration von 100mg/kg/Tag welches in 5% DMSO und Maisöl resuspendiert und den Mäusen in einem prophylaktischen Ansatz, einen Tag vor der Induktion der Erkrankung (Abbildung 3), täglich über *orale gavage* verabreicht wurde. Demselben Behandlungsschema folgend wurden Roflumilast (in 0,5% v/v PEG400 bei 70°C für 10min gelöst und in 4% w/v Methylzellulose resuspendiert) mit einer Konzentration von 5mg/kg/Tag und Disulfiram (in Olivenöl resuspendiert) mit einer Konzentration von 200mg/kg/Tag als mögliche neue Therapieoptionen angewandt. Zur Behandlung der konjunktivalen Läsionen wurde das Disulfiram in 2% Methocel (w/v) gelöst und in einer Konzentration von 300 $\mu$ M therapeutisch (Abbildung 3) eingesetzt. Die Behandlung mit Roflumilast wurde zusätzlich ebenfalls therapeutisch nach dem in Abbildung 3 dargestellten Schema durchgeführt. Die Behandlungen und die Bestimmung der Krankheitsaktivität erfolgten verblindet.

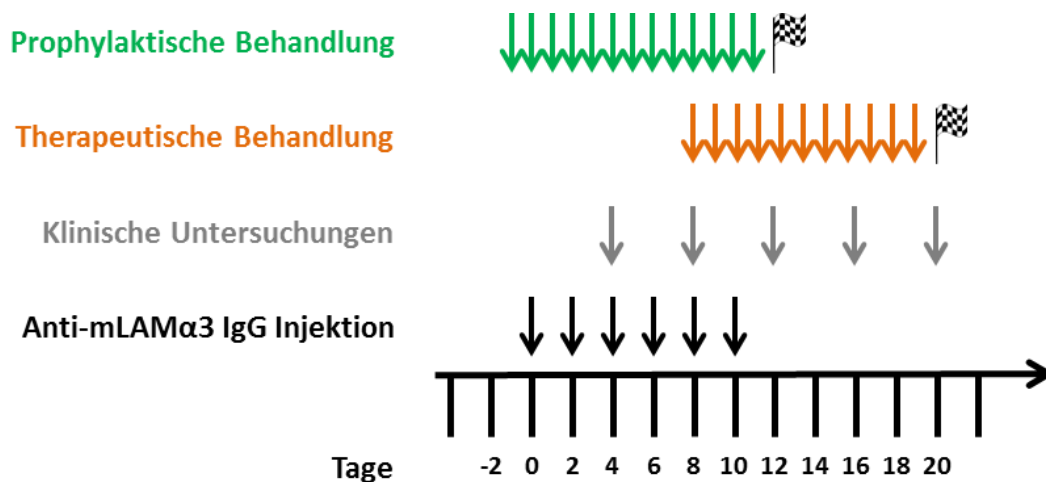


Abbildung 3: Schematische Übersicht der Behandlungsstrategien im Antikörpertransfer SHP-Mausmodell.

#### 2.4.8 Quantifizierung des intrazellulären cAMP Gehaltes in Haut und Mundschleimhaut

Um zu bestätigen, dass die Behandlung der Mäuse mit Roflumilast sowohl in der Haut, als auch in der Schleimhaut zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP Gehaltes geführt hat und somit der PDE4 Inhibitor gleichermaßen adsorbiert wurde, wurden Gewebeproben von läsionaler Haut und bukkaler Mukosa von Roflumilast und Vehikel behandelten SHP Mäusen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Diese wurden anschließend auf Eis aufgetaut, gewogen, in 0,1M steriler Salzsäure mit einem Homogenisator zerkleinert und verbliebene Zellreste ab zentrifugiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels BCA Assay nach Herstellerangaben. Intrazelluläres cAMP wurde mittels cAMP ELISA ebenfalls nach Herstellerangaben quantifiziert.

#### 2.4.9 Entwicklung eines aktiven Mausmodelles für das Schleimhautpemphigoid

Die Entwicklung eines durch Immunisierung induzierten Mausmodelles für das SHP erfolgte in zwei Stufen: Zunächst wurde in den Wochen 0, 3, 6 und 9 den narkotisierten Versuchstieren (B6.S und SJL/J)  $60\mu\text{g}$  mid+c-term mLAM $\alpha$ 3 (1:1) in 6M Urea 1:1 gemischt mit dem Adjuvanz Titermax in einem Volumen von maximal  $60\mu\text{l}$  s.c. injiziert (in Woche 0 in die Fußsohle, in Woche 3 in die Schwanzbasis, in Woche 6 in die Fußsohle, in Woche 9 in die Schwanzbasis). Die Adjuvanz Kontrollmäuse erhielten 6M Urea 1:1 gemischt mit Titermax. In der Stufe wurden den Mäusen zusätzlich an den Tagen 0 und 2 der Immunisierungen  $200\text{ng}$  Pertussis Toxin in einem Volumen von etwa  $20\mu\text{l}$  i.p. injiziert. Bei der letzten Versuchsstufe wurden die Mäuse separat mit  $60\mu\text{g}$  mid oder c-term mLAM $\alpha$ 3 Protein, nach dem eben beschriebenen Injektionsschema, immunisiert. Die Hautläsionen wurden nach dem in Abschnitt 2.4.1 entwickeltem Score-System quantifiziert. Augenschäden der Tiere wurden mittels Fluorescein angefärbt und mit einer Blaulichtlampe sichtbar gemacht. Hiervon wurden Fotos mittels ImageJ im Verhältnis gesunder-zu-angefärbter Augenanteil in Prozent ausgewertet. Die Untersuchung, sowie auch die Proben der Augen wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Mahdy Ranjbar gemacht und letztere von Frau Christine Örün (beide Klinik für experimentelle

Ophthalmologie, Universität zu Lübeck) eingebettet und 5µm dicke Schnitte verschiedener Schichten davon H&E gefärbt. Die Seren wurden wie in 2.3.3 beschrieben im Western-Blot gegen die c-term und mid mLAMα3 Proteine getestet. Des Weiteren wurde die Menge an Gesamt IgG, IgM und IgA mittels ELISA nach Herstellerangaben ermittelt und auch die Menge an spezifischem IgA, IgM, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c und IgG3 mit nachfolgendem Protokoll: eine 96 well Maxisorb Platte wurde mit 250ng mid oder c-term mLAMα3 Protein in einem Volumen von 50µl pro well für 3h beschichtet. Anschließend wurde nicht gebundenes Protein durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt und unspezifische Bindungsstellen mit 5% MMP in PBS-T über Nacht bei 4°C geblockt. Seren von immunisierten Mäusen wurden 1:10.000 und 1:50.000 in 5% MMP eingesetzt und schüttelnd 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS-T und die Inkubation des 2. Antikörpers (1:20.000 5% MMP in PBS-T) für 1h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wie zuvor beschrieben wurden 50µl Turbo TMB pro Vertiefung zugefügt und die Reaktion von IgG1 nach 1min30sek, IgG2a und IgG2b nach 1min und IgG3 nach 10min mit 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Adsorption wurde bei 450nm gemessen und gegen den Standard (nach Herstellerangaben) ausgewertet.

## **2.5 Transkriptomanalyse**

Das Transkriptom der läsionalen Haut und der Mundschleimhaut von den Versuchsgruppen, welche mit Roflumilast bzw. dem Vehikel prophylaktisch behandelt wurden, sowie von den Kontrollmäusen, welchen nicht-pathogenes Kaninchen IgG injiziert wurde, wurde analysiert. Hierzu wurden die entsprechenden Gewebeproben am letzten Versuchstag entnommen und über Nacht bei 4°C in RNAlater® und anschließend ohne RNAlater® bei -80°C gelagert. Die RNA Isolierung wurde in Kollaboration von Dr. Sven Künzel (Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie, Plön, Deutschland) durchgeführt, ebenso wie die darauffolgende NGS Analyse. Die Sequenzierung erfolgte mittels eines NextSeq HighOutput 150 cycles Kit. Die statistischen Auswertungen (Alignment an das Referenzgenom GRCm38p6 und anschließende Quantifizierung der RNA Sequenzen via Pseudo-alignment mittels Kallisto) der *Principle Component Analyse* (PCA), der differentiell exprimierten Gene, der Signalweg- und der *Gene Set Enrichment*-Analyse (mittels GAGE) wurde freundlicherweise von Dr. Anke Fähnrich und Prof. Hauke Busch (beide Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie, Universität zu Lübeck) durchgeführt. Die Venny, STRING und die REACTOME Analysen erfolgten online am 21.2. und 7.2.2019.

## **2.6 Histologische Färbungen**

### **2.6.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung**

Gewebeproben der Mäuse wurden in 4 %igem Formalin fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet. Aus mindestens zwei Ebenen, mit etwa 100 µm Abstand, wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt und

mit Hämatoxylin und Eosin nach Standardprotokoll gefärbt. Ein semi-quantitatives Bewertungsverfahren wurde herangezogen, um das Ausmaß von infiltrierenden, inflammatorischen Zellen zu bestimmen (Ludwig *et al.*, 2005): 0=keine, 1=geringe, 2=mittlere, 3=sehr hohe Anzahl an inflammatorischen Zellen. Die Bewertung erfolgte verblindet.

### **2.6.2 Direkte und indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Für die direkte Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden 6µm dicke Kryoschnitte von den verschiedenen Geweben der experimentellen Gruppen mit FITC-markiertem polyklonalem Kaninchen-Anti-Maus-IgG, Anti-Maus-C3 und Anti-Maus-IgA (Tabelle 2.4) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden 5µm dicke Schnitte von gesunder Maushaut (Mausschwanz) mit Seren von immunisierten Kaninchen oder Mäusen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und, nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit PBS, zum Nachweis mit einem FITC-markiertem Zweitantikörper sichtbar gemacht (Tabelle 2.4). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

## **2.7 Zellkulturexperimente**

### **2.7.1 Kultivierung von Zellen und Beschreibung der verwendeten Zelllinien**

Die Kultivierung der C5N immortalisierten murinen Keratinozyten (ein freundliches Geschenk von Dr. Allan Balmain, USA mit Hilfe der Verteilung von Dr. Christina Seebode, Universität Rostock) sowie der L929 immortalisierten murinen Fibroblasten (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland) erfolgte in DMEM medium in T75 Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Einmal pro Woche wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde mit 10% FCS nach 15min gestoppt, die Zellen geerntet, bei 1200rpm für 6min pelletiert und in Medium resuspendiert. Für die weitere Verwendung wurden die Zellen 1:40 ausgesät. Ein Test auf Mykoplasmen erfolgte vor und nach den Versuchen nach den Angaben des Herstellers.

### **2.7.2 Fluoreszenznachweis der Bindung von Anti-mLAMα3 IgG an kultivierte Keratinozyten und Fibroblasten**

$5 \cdot 10^5$  Zellen wurden in je eine Kammer eines Kammerobjektträgers pipettiert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit Formalin fixiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurden die Objektträger bei 4°C über Nacht mit 1% BSA (biotinfrei) in PBS inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS und eine Inkubation mit 200µg/well Anti-mLAMα3 IgG, normalem Kaninchen IgG und Anti-mNC15A IgG (15. nicht-kollagene Domäne des BP180) jeweils in PBS gelöst und für mindestens 2h bei 37°C. Nach einem erneuten dreimaligen Waschen mit PBS wurde der entsprechende Zweitantikörper Anti-Kaninchen-IgG FITC (Tabelle 2.4) 1:100 in PBS für eine Stunde bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (Tabelle 2.4) 1:1000 in H<sub>2</sub>O nachdem ungebundene Detektionsantikörper

durch dreimaliges Waschen mit PBS herunter gespült wurden. Nachdem die Objektträger mit Fluoromount (Tabelle 2.3) eingedeckelt wurden, erfolgte die fotografische Dokumentation am Keyence Fluoreszenzmikroskop (Tabelle 2.1). Ebenfalls erfolgte eine Visualisierung am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 mittels OLYMPUS Fluoview (Tabelle 2.6) mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Systemische Entzündungsforschung, Universität zu Lübeck und Frau Dr. Lenche Chakievska (Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie, Universität zu Lübeck).

### **2.7.3 Scratch Assay**

Der sogenannte Scratch Assay diente zur Überprüfung der Migration der Zellen durch und während einer Behandlung (Liang *et al.*, 2007) mit normalem Kaninchen IgG, Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG (jeweils 3, 6, 9mg/ml) mit und ohne Roflumilast (0,1, 1, 10 $\mu$ M) bzw. dem entsprechenden Vehikel (Methocel). Als Negativkontrolle diente Medium, sowie Medium, bei dem der höchste Volumenanteil der Behandlungen mit PBS ersetzt wurde, um einen eventuellen Nährstoffmangel zu eruieren. Forskolin, ein cAMP Aktivator stellte die Funktionskontrolle (1, 10, 100 $\mu$ M) zum Roflumilast dar. 5\*10<sup>6</sup> Zellen pro well wurden in 500 $\mu$ l in 24 well Platten über Nacht bis zu mindestens 90% Konfluenz wachsen gelassen und mit einer sterilen 1000 $\mu$ l Eppendorfspitze eine gerade Linie in jedes well gezogen, so dass die Zellen hier mit definiertem Abstand abgelöst wurden. Die Platten wurden 3-mal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend die entsprechenden Behandlungen zugesetzt. Zu den Zeitpunkten: 0, 3, 6, 12, 24, 42 und 48 Stunden wurden von den zunächst zellfreien Kratzern Fotos gemacht. Das Schließen des definierten Abstandes mit Zellen über die Zeit wurde mit ImageJ als ‚prozentuale geschlossene Fläche in Pixeln‘ ausgewertet.

### **2.7.4 Quantifizierung von IL-6 und CXCL2 im Zellkulturüberstand**

Die Zellen wurden pro well mit 5\*10<sup>5</sup> Zellen in 24 well Platten ausgesät und für 24 Stunden wie unter 2.7.3 beschrieben behandelt. Nach dieser Zeit wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und vermeidlicher Zellreste im Überstand abzentrifugiert. Die Zellkulturüberstände wurden zur IL-6, CXCL2 Quantifizierung mittels ELISA sowie für die LegendPlex Untersuchung verwendet. Die Quantifizierung von IL-6 und CXCL2 erfolgte mittels ELISA und mittels LegendPlex nach den Protokollen der Hersteller.

## **2.8 Statistische Auswertungen**

GraphPadPrism und SigmaPlot wurden für die statistischen Auswertungen verwendet. Die jeweiligen verwendeten statistischen Tests, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) und der zugehörige Stichprobenumfang ( $n$ ), stehen bei den zugehörigen Abbildungen. Generierte Datensätze wurden auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Bei einer Bestätigung der Normalverteilung erfolgte die anschließende statistische Analyse von metrischen Datensätzen mittels t-Tests bzw. One-way-ANOVA für zwei bzw. mehrere Gruppen. Datensätze, welche als zusätzliche Einflussgröße die

Zeit innehatten, wurden mittels Two-way-ANOVA auf Unterschiede getestet. Als Post-Hoc Analyse wurde hier bei mehreren Gruppen der Tukey's multiple comparisons test verwendet. Die statistische Auswertung ordinaler, nicht-parametrischer Datensätze, wie beispielsweise bei der Quantifizierung der Schwere der konjunktivalen Spaltbildung, erfolgte über einen Kruskal-Wallis Test durch einen One-Way ANOVA *on-ranks* Test mit Student-Newman-Keuls Post-Hoc Test bei mehreren zu vergleichenden Gruppen. Alle Daten wurden als Mittelwert und mit Standardabweichung dieses dargestellt. Ein p-Wert  $<0,5$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

## **3. Ergebnisse**

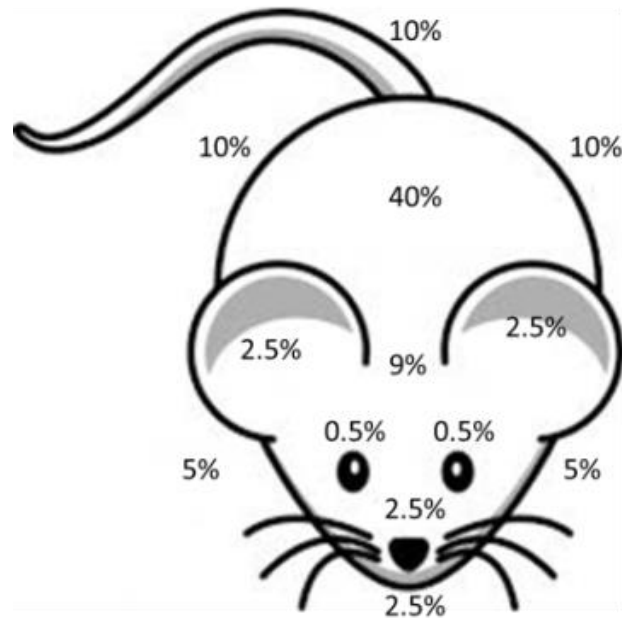
### **3.1 Entwicklung eines quantitativen Bewertungsverfahrens für das Antikörpertransfer Mausmodell des Schleimhautpemphigoid**

#### **3.1.1 Voraussetzungen und Ansprüche an das Bewertungsverfahren**

Das Bewertungsverfahren sollte dazu dienen, die Hauptcharakteristika des Antikörpertransfer SHP-Mausmodelles so zu quantifizieren, dass es als Grundlage zur Evaluierung neuer Therapieoptionen geeignet ist. Besonders die betroffene Körperoberfläche, die oralen Läsionen, sowie die Läsionen der Konjunktiva und auch der Gewichtsverlust der Mäuse spiegelten hierbei den klinischen Phänotypen von Laminin 332 SHP Patienten wider und wurden daher zur Entwicklung des Bewertungsverfahrens herangezogen. Diese Merkmale sollten so gewichtet werden, dass sie alle mit demselben Wert in einen Gesamtkrankheitsaktivität Score einfließen. Des Weiteren sollten die einzelnen Verfahren praktikabel, reproduzierbar und genau definiert sein. Um diese Ansprüche zu erfüllen, wurden verschiedene Bewertungsmöglichkeiten angewandt und statistisch ausgewertet. Der Datenpool stellte sich aus den Mausexperimenten von Eva-Nina Heppe zusammen (Heppe *et al.*, 2017), wo das hier entwickelte Bewertungsverfahren bereits publiziert wurde. Bewertungsverfahren, welche ausgetestet wurden, aber nicht den geforderten Kriterien genügten, werden hier nicht weiter erläutert. Eine Validierung des entwickelten Bewertungsverfahrens fand durch den in 3.1.7 beschriebenen Versuch statt.

#### **3.1.2 Die betroffene Körperoberfläche**

Um einen Vergleich des Antikörpertransfer SHP-Mausmodelles mit anderen etablierten Mausmodellen von Autoimmunerkrankungen zu gewährleisten, wurde sich an einem bereits publizierten Verfahren orientiert (Sitaru *et al.*, 2005). Dieses stellt die prozentual betroffene Körperoberfläche einer Maus dar, wobei den einzelnen Körperpartien definierte Prozente an der Gesamtkörperoberfläche zugewiesen werden. Die genaue Verteilung ist in Abbildung 4 dargestellt.

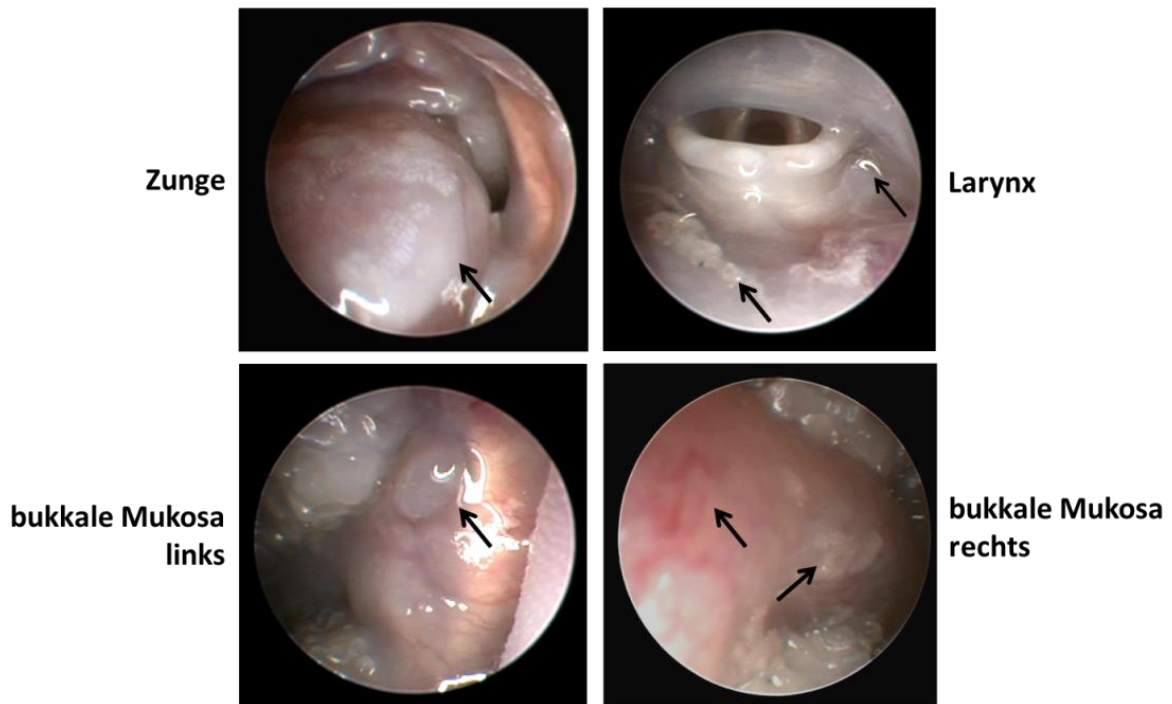


**Abbildung 4: Prozentualer Anteil der einzelnen Körperregionen einer Maus an ihrer Gesamtoberfläche.** Quantifiziert wurden Blasen, Krusten und/oder Erosionen in Prozent der jeweiligen Körperpartie.

Alle vier Tage wurde der prozentuale Anteil der Körperpartien dokumentiert, welcher Blasen, Krusten oder Erosionen aufwies. Die Summe der Krankheitsaktivität der einzelnen betroffenen Körperteile ergab dann die Krankheitsaktivität für die gesamte Körperoberfläche. Die statistische Auswertung erfolgte über die Zeit mittels Two-way Analysis of Variance (ANOVA).

### 3.1.3 Die oralen Läsionen

Im passiven SHP Modell kann prinzipiell jeder Bereich des Mundes der Maus von Krusten und Erosionen bis hin zu blutgefüllten Blasen betroffen sein. Um die endoskopischen Videoaufnahmen am letzten Versuchstag zu quantifizieren, war das effektivste und aussagestärkste Verfahren, das Zählen von erkrankten Mundarealen. Hierbei wurde der Mund der Maus in vier Bereiche eingeteilt: rechte und linke Wangeninnenseite, Zunge und Larynx/Pharynx/Gaumen. Gewertet werden Krusten, Erosionen und Blasen unabhängig von ihrer Schwere oder Häufigkeit (Abbildung 5). Die statistische Auswertung erfolgte, da es sich um ordinale, nicht-parametrische Datensätze handelt, über einen Kruskal-Wallis One-Way ANOVA *on-ranks* Test mit Student-Newman-Keuls Posthoc-Test.



**Abbildung 5:** Zur Quantifizierung der oralen Läsionen wurde der Mund der Maus mittels Endoskopie untersucht und zur Auswertung in vier Regionen eingeteilt (Zunge, bukkale Mukosa links und rechts, Larynx/Pharynx/Gaumen). Pro befallene Region (Pfeile) wurde ein Punkt vergeben, so dass der maximale Score 4 beträgt. Quantifiziert wurden Blasen, Krusten und/oder Erosionen unabhängig von Ihrer Ausprägtheit oder Anzahl.

### 3.1.4 Die konjunktivale Spaltbildung

Zur Quantifizierung der Schwere von konjunktivalen Läsionen der Mäuse wurden Biopsien der Konjunktiva am letzten Versuchstag entnommen und in Paraffin eingebettet. Aus drei Tiefen der konjunktivalen Biopsien, mit einem Abstand von etwa 100µm, wurden Schnitte mit einer Dicke von 5µm H&E gefärbt. Von diesen wurde nur der Schnitt mit dem größten Spalt ausgewertet wobei die folgenden Kriterien erfüllt sein mussten:

- a) Der Spalt liegt nicht an den Enden des Schnittes, da die Konjunktiva hier durch den Schneidevorgang abgerissen sein könnte und es sich nicht um eine Spaltbildung durch die induzierte Krankheit handelt.
- b) Die zur Bewertung der konjunktivalen Spaltbildung benutzte Konjunktiva hat eine Länge von mindestens 1000µm.
- c) Die Position der Spaltbildung ist an der richtigen Stelle zwischen Epidermis und Dermis lokalisiert, um auszuschließen, dass es sich um Artefakte durch den Schneidevorgang handelt

Die Länge der Spaltbildung in der Konjunktiva wurde mittels ImageJ ermittelt und nach den folgenden Kategorien gewertet:

**Tabelle 3.1: Gewichtung der Länge der konjunktivalen Spaltbildung.** Die ermittelte Spaltbildung wird in Kategorien von je 100µm eingeteilt und kategorisch einem Score zugeordnet.

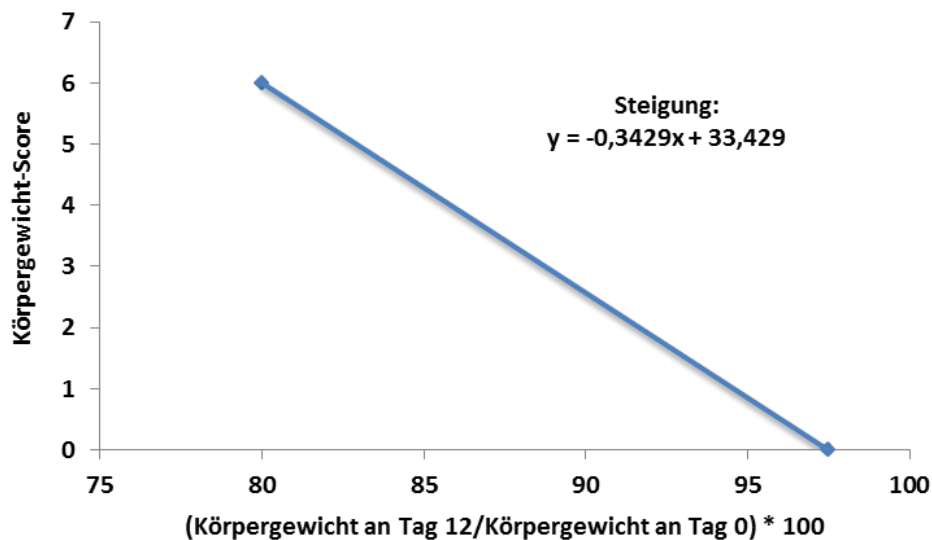
Länge der Spaltbildung	Score
Kein Spalt	0
< 100µm	1
< 200µm	2
< 300µm	3
≥ 300µm	4

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu 3.1.3

### 3.1.5 Der Gewichtsverlust

Als Datenpool zur Entwicklung eines Verfahrens, welches den Gewichtsverlust von erkrankten Mäusen quantifiziert, dienten Aufzeichnungen in Gramm an den Versuchstagen 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12. Um die Gewichtsdaten verschiedener experimenteller Gruppen und Geschlechter vergleichbar zu machen, wurden diese zunächst normalisiert, wobei das Gewicht am Beginn des Versuches (Tag 0) als 100% gesetzt wurde. Da die Berechnung der Fläche unter der Kurve über die Zeit nicht in allen Experimenten zu signifikanten Unterschieden führte, wurde der Gewichtsverlust an Tag 12 im Vergleich zum Ausgangsgewicht zur Quantifizierung herangezogen. Da auch dies nicht zu signifikanten Unterschieden in den meisten der experimentellen Gruppen führte, wurde der Gewichtsverlust linear betrachtet. Hierzu wurde die Steigung der Gerade, nach der in Abbildung 6 dargestellten Formel, verwendet, um jedem Gewicht eine Wertung zuzuweisen. Normale Gewichtsschwankungen der Mäuse, sowie auch Messtoleranzen wurden durch eine Grenze von 2,5% Gewichtsreduktion, welche als unbewertet/“normal“ festgesetzt wurde, berücksichtigt. Gewichtsreduktionen von mehr als 20% der Mäuse sind in den Tierversuchsanträgen als definitive Abbruchkriterien definiert (sofortiges Töten der Maus), so dass hier nicht von einer Bewertung ausgegangen werden konnte und weswegen dies die untere Grenze der Bewertung darstellte. Die Auswertung erfolgte über einen Kruskal-Wallis-Test.

Der Gewichtsverlust wurde auf ein minimales Maß reduziert, um die Belastung der Mäuse so gering wie möglich zu halten, und fand daher im Rahmen der folgenden Experimente selten Anwendung.



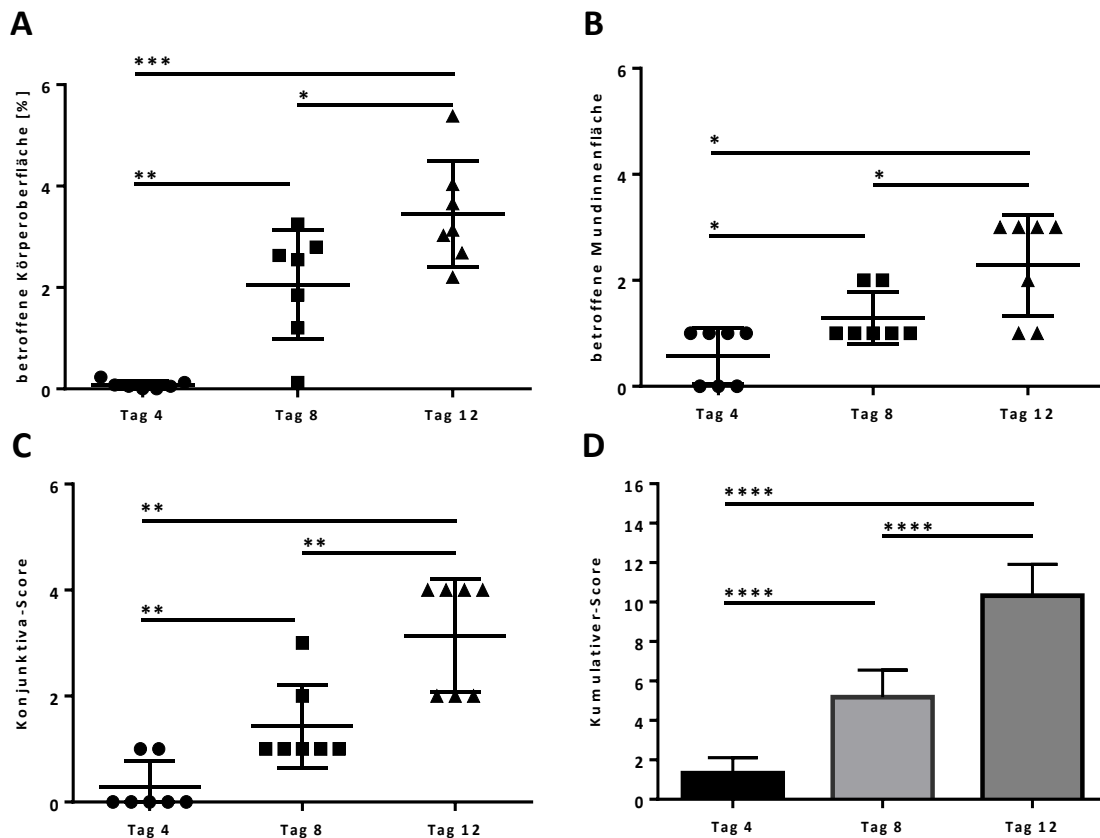
**Abbildung 6: Lineares Bewertungsverfahren zur Quantifizierung des Gewichtsverlustes.** Der Gewichtsverlust an Tag 12 normalisiert zum Ausgangsgewicht kann in die Gleichung der Steigung eingegeben werden, um den Score für dieses Merkmal zu ermitteln.

### 3.1.6 Die Gesamtkrankheitsaktivität

Die hier entwickelten Quantifizierungsmethoden der Hauptcharakteristika des Anti-Laminin 332 SHP-Mausmodelles sollten zu einer Gesamtkrankheitsaktivität zusammengefasst werden, um eine Aussage über den Allgemeinzustand der Maus und nicht nur spezifisch für einzelne Gewebe treffen zu können. Aussagestärkstes Merkmal stellt die betroffene Körperoberfläche dar, da hier eine stetige Zahlenordnung und keine nominale, wie bei den anderen Charakteristiken vorliegt. Daher wurde ein Korrekturfaktor eingeführt, welcher jedes Merkmal separat auf den Wert der betroffenen Körperoberfläche anpasst, so dass jedem Merkmal dieselbe Gewichtung in der Gesamtkrankheitsaktivität zukam. Die statistische Auswertung erfolgte analog zu 3.1.3.

### 3.1.7 Das entwickelte Bewertungsverfahren eignet sich zur Differenzierung der Hauptcharakteristika des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid Mausmodelles

Das retrospektiv entwickelte Bewertungsverfahren für das Antikörpertransfer SHP-Mausmodell sollte in diesem Versuch auf seine praktische Anwendung hin geprüft werden. Hierzu wurden 21 Mäusen Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an jedem zweiten Versuchstag injiziert und alle 4 Tag jeweils 7 Mäuse getötet und nach dem entwickelten Verfahren analysiert. Für die betroffene Körperoberfläche, die betroffene Mundinnenfläche, sowie auch für den Konjunktiva-Score, ist bereits zwischen dem 4. und dem 8. Versuchstag eine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Auch zwischen dem 8. und dem 12. Versuchstag besteht in diesen Kriterien eine statistische Signifikanz (Abbildung 7 A-C). Den Mäusen wurden zur Stabilisierung des Körpergewichtes eingeweichte Futter-Pellets direkt in den Käfig gelegt, um die Nahrungsaufnahme für die Tiere zu erleichtern. Keine der Mäuse verlor, trotz oraler Läsionen, über die Zeit mehr als 2,5% Körpergewicht, womit eine Grundlage für dieses Mausmodell zur Evaluierung neuer Therapien gelegt werden konnte.



**Abbildung 7: Hauptcharakteristika des Antikörpertransfer SHP-Mausmodelles im zeitlichen Verlauf mit den entwickelten Bewertungsverfahren.** [A] betroffene Körperoberfläche [B] betroffene Mundinnenfläche [C] Konjunktiva-Score [D] kumulativer Score der Krankheitsaktivität.

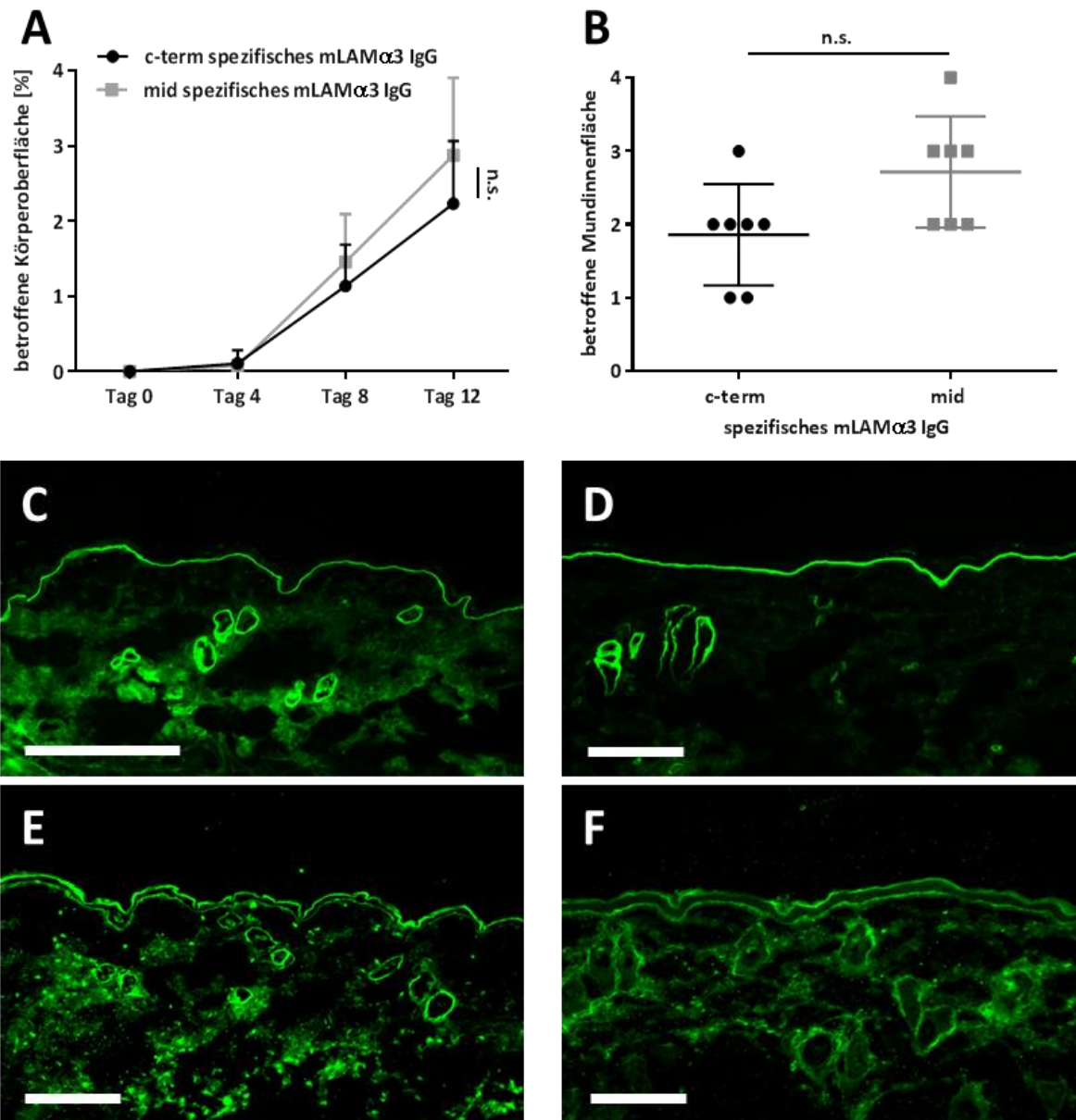
In der kumulativen Bewertung, der Gesamtkrankheitsaktivität zeigten sich die größten Unterschiede im zeitlichen Verlauf, wodurch auch eine übergreifende Gesamtquantifizierung des Allgemeinzustandes möglich ist (Abbildung 7 D).

### 3.2 Charakteristika des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodelles

#### 3.2.1 Antikörper gegen Epitope der mittleren und der C-terminalen Region von mLAM $\alpha$ 3 sind gleichermaßen pathogen

Um Unterschiede in der Pathogenität oder dem Krankheitsverlauf zwischen IgG gegen die mittlere (mid) oder die C-terminale Region (c-term) der murinen Laminin  $\alpha$ 3 Kette zu untersuchen, wurden beide IgG Fraktionen spezifisch aufgereinigt und separat in C57BL/6J Mäuse injiziert (n=7 pro Gruppe). Damit die Bindungskapazität der spezifischen IgG nicht die Ergebnisse verfälscht, wurde zunächst in der indirekte Immunfluoreszenz auf muriner Haut der jeweilige Anti-Basalmembran Titer bestimmt (Titer Anti-c-term mLAM $\alpha$ 3 IgG, 1:8000; Titer Anti-mid mLAM $\alpha$ 3 IgG, 1:4000) und dann das spezifische IgG den Mäusen in einer Titer-äquimolaren Menge injiziert (c-term mLAM $\alpha$ 3 IgG Einzeldosis: 0,5mg/ml, mid mLAM $\alpha$ 3 IgG Einzeldosis: 1mg/ml). Zwischen IgG welche gegen das mid und welche gegen das c-term Fragment gerichtet sind gab es keinen Unterschied im Verlauf oder in der Ausprägung der Krankheit im passiven SHP-Mausmodell (Abbildung 8). Auch die Konjunktiva

(nicht gezeigt) und die Mundschleimhaut (Abbildung 8 B) waren gleichermaßen betroffen, ebenso wie die Ablagerung von IgG (Abbildung 8 C, D) und C3 (Abbildung 8 E, F) in den genannten Geweben.

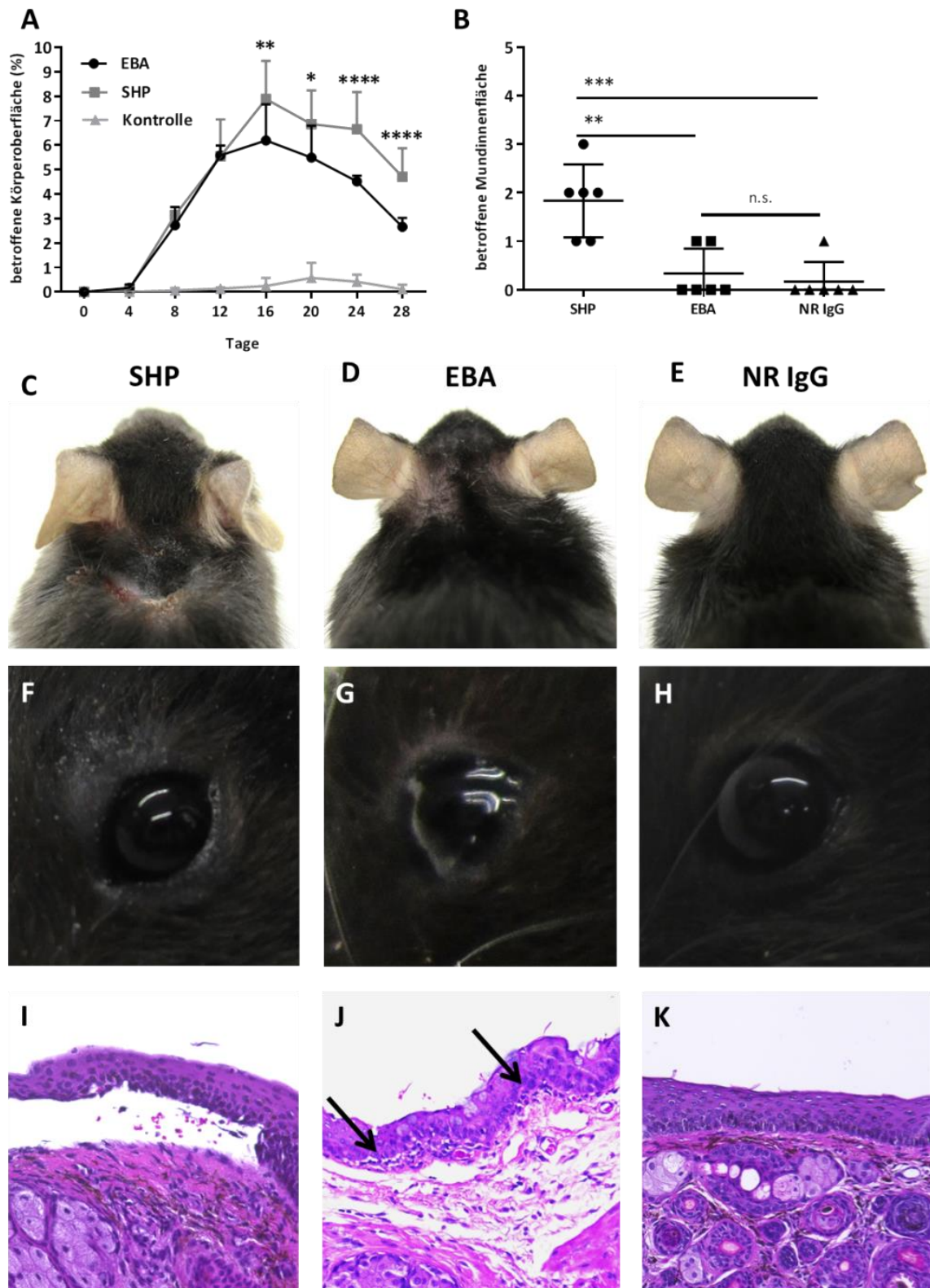


**Abbildung 8:** Keine Unterschiede in der Krankheitsaktivität zwischen Mäusen, welchen spezifisches IgG gegen unterschiedliche Abschnitte der mLAMα3 Kette (c-term und mid) injiziert wurden. Weder im zeitlichen Verlauf der betroffenen Haut [A], noch in der Spaltbildung der Konjunktiven (nicht gezeigt) oder bezüglich der Läsionen im Mundinnenraum [B] konnten Unterschiede zwischen c-term und mid mLAMα3 IgG injizierten Mäusen festgestellt werden. Es wurden auch keine Unterschiede in der Intensität der IgG- [C, D] und C3-Ablagerung [E, F] entlang der DEJ mittels direkter Immunfluoreszenz-Mikroskopie periläsionaler Haut zwischen den beiden Gruppen gefunden [c-term, C, E; mid, D, F] Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Bild. Tukey's multiple comparisons test (Two-way-ANOVA), n.s. = nicht signifikant. Maßstabsbalken = 100μm.

### 3.2.2 Abgrenzung des Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell

Für die blasenbildenden Autoimmunerkrankungen EBA und BP wurden bereits Mausmodelle etabliert und veröffentlicht (Schulze *et al.*, 2014; Sitaru *et al.*, 2005). Beide Modelle weisen auf der Haut Krusten und Erosionen auf. Auch das hier charakterisierte passive SHP Modell zeigt am Kopf, dem Nacken und an den Vorderläufen der Mäuse Läsionen der Haut. Um das SHP Modell von den

anderen Mausmodellen der Pemphigoiderkrankungen, hier am Beispiel der EBA, abzugrenzen, wurde eine Gesamt-IgG Konzentration von Anti-mLAM $\alpha$ 3 und Anti-mCol7c IgG austitriert, welche zu einer äquivalenten betroffenen Körperoberfläche an Tag 12 bei den Mäusen führte. Da beim SHP-Mausmodell die Schleimhäute prädominant betroffen und die Läsionen der Körperoberfläche im Vergleich dazu schwächer ausgeprägt sind, wurde für hierfür eine kumulative Dosis von 36mg und für das EBA Mausmodell nur 0,75mg gesamt-IgG benötigt. An Tag 12 zeigten sich ausgeprägte orale und konjunktivale Läsionen mit einem durchschnittlichen Score von respektive 3,5 und 3,0 im SHP Modell. Beim EBA Mausmodell konnte nur in einer von 6 Mäusen ein Score von 1 für die betroffene Mundschleimhaut und in 2 von 6 Mäusen eine geringe Spaltbildung (Score 1) in der Konjunktiva quantifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Um Langzeiteffekte der Mausmodelle zu eruieren, wurde nach der letzten Injektion der IgG an Tag 10 der Verlauf der Heilung in beiden Mausmodellen bis Tag 28 beobachtet. Hierbei stellte sich heraus, dass die Hautläsionen von EBA Mäusen tendenziell schneller abheilen als bei SHP induzierten Mäuse. An Tag 28 war die betroffene Körperoberfläche der passiven EBA um über 50% gegenüber dem Höchstwert an Tag 16 abgeheilt, während die des passiven SHP erst um ein Drittel am Versuchsende, gegenüber dem Höchstwert an Tag 16, abgeheilt war (Abbildung 9 A). Nur im SHP-Mausmodell wurden Läsionen im Mundinnenraum und eine signifikant erhöhte Spaltbildung der Konjunktiva festgestellt, wobei im EBA Mausmodell nur geringe konjunktivale Beteiligung (3 von 7 Mäusen zeigten histologisch inflammatorisches Infiltrat und eine geringe Spaltbildung) und nur in 2 Mäusen je ein befallenes Mundviertel festgestellt werden konnte (Abbildung 9 B). Histologisch unterschied sich die konjunktivale Spaltbildung im EBA Modell ebenfalls von der des SHPs, obwohl im klinischen Bild der Mäuse eine deutliche Schwellung und teilweise auch Krusten an der Konjunktiva festgestellt werden konnten (Abbildung 9 F-H). Nur wenige Entzündungszellen und minimale epidermale Ablösungen konnte bei dem Antikörpertransfer EBA Mausmodell in der H&E gefärbten Histologie der Konjunktiven gesehen werden, wohingegen die Epidermis der Konjunktiven beim SHP-Mausmodell über mehrere 100 $\mu$ m abgelöst war und ein mittleres bis starkes Infiltrat mit Entzündungszellen zeigte (Abbildung 9 I-K).

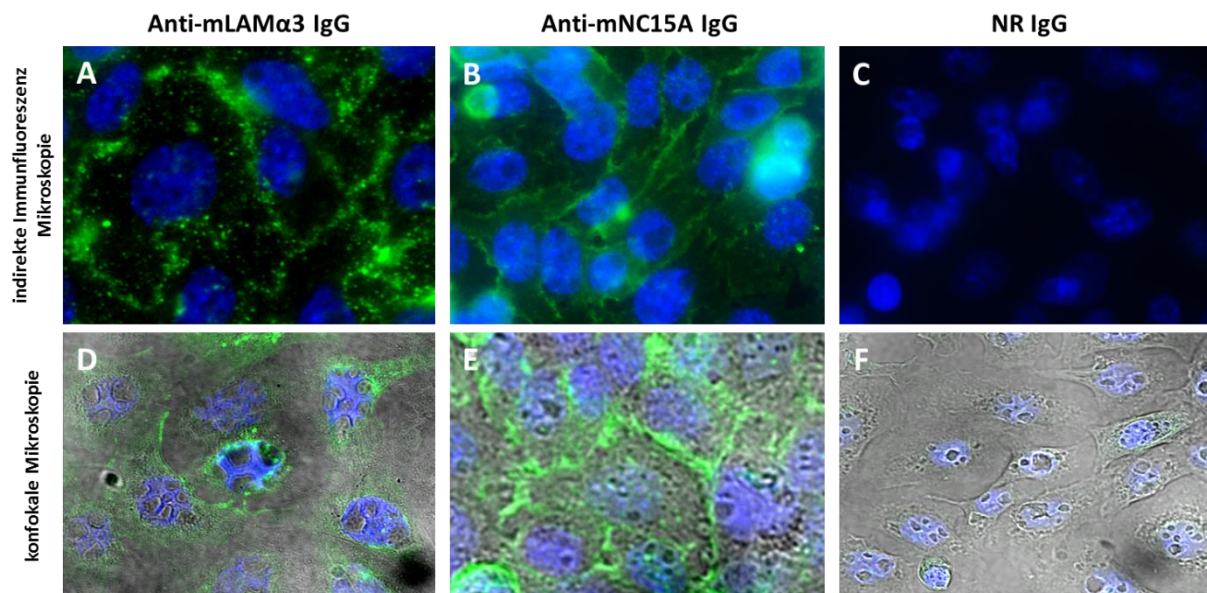


**Abbildung 9: Das Mausmodell der EBA und des SHP unterscheiden sich bezüglich ihrer phänotypischen Ausprägung untereinander und im Vergleich zu Mäusen, denen normales Kaninchen IgG (NR IgG) injiziert wurde.** Sowohl im zeitlichen Verlauf der betroffenen Haut [A], als auch in der Spaltbildung der Konjunktiven [I, J, K] und bezüglich der Läsionen im Mundinnenraum [B] konnten Unterschiede, zwischen Mäusen bei denen ein experimentelles SHP mittels Injektion von Anti-mLam $\alpha$ 3 IgG [C, F, I] und Mäusen bei denen eine experimentelle EBA mittels Anti-mCol7c IgG induziert wurde [D, G, J], nach insgesamt 28 Tagen, im Vergleich zu gesunden Mäusen, denen normales Kaninchen IgG injiziert wurde [E, H, K], festgestellt werden. [D] Die schnellere Heilung der EBA Mäuse zeigt sich auch in den klinischen Bildern [C-H] und in den Histologien der Konjunktiven [I-K] an Tag 28 (abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Bild). Tukey's multiple comparisons test (Two-way-ANOVA) \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , n.s. = nicht signifikant.

### 3.3 Initiale Reaktionen im Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell

#### 3.3.1 Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG bindet an Keratinozyten und Fibroblasten

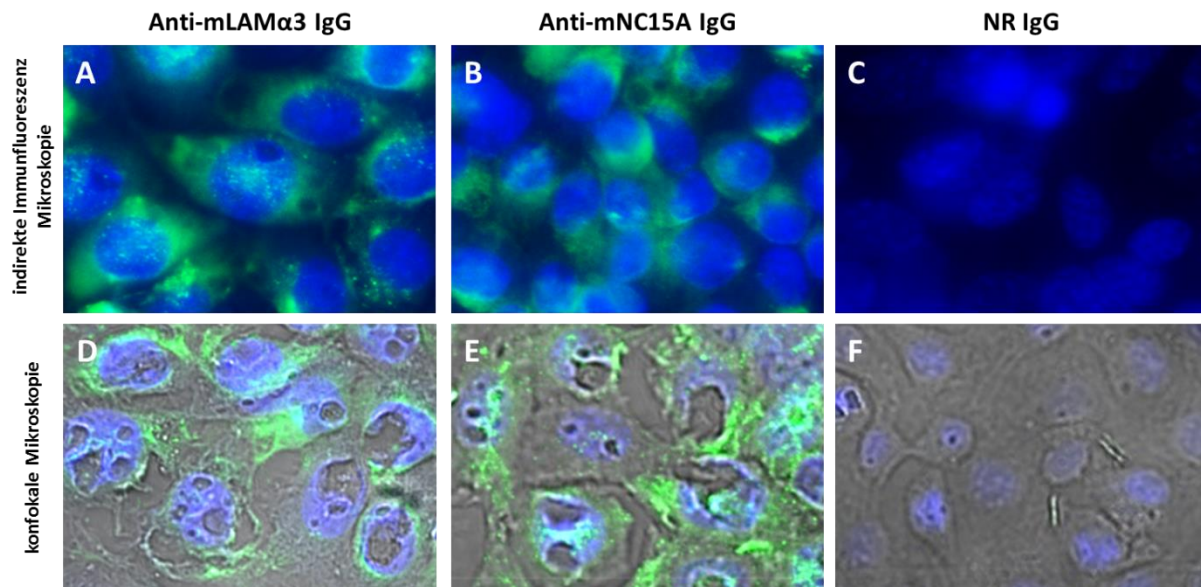
Die ersten Zellen, an welche nach einer subkutanen Injektion Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG im Mausmodell bindet, sind theoretisch Keratinozyten und Fibroblasten. In diesem Versuch sollten daher die initialen Zellreaktionen auf Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG untersucht werden. Hierzu wurden zunächst fixierte und permeabilisierte murine Keratinozyten (C5N) und Fibroblasten (L929) mit Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG inkubiert und mit einem Zweitantikörper visualisiert. Die Zellkerne wurden zur Verdeutlichung der Position der Bindung mit DAPI angefärbt. Insgesamt wurde dieser Versuch an drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Anti-mNC15A IgG, welches in Mäusen einen Phänotypen ähnlich des menschlichen bullösen Pemphigoides auslöst und in der Zellkultur ein wabenähnliches Muster direkt an den Zell-Zellkontakten ausbildet (Schmidt *et al.*, 2000). Als Negativkontrolle diente normales Kaninchen IgG (NR IgG).



**Abbildung 10: Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG bindet an murine Keratinozyten.** Indirekte und konfokale Immunfluoreszenz Mikroskopie von Keratinozyten, welche mit Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG [A, D], Anti-mNC15A IgG [B, E] oder mit normalen Kaninchen IgG (NR IgG) [C, F] inkubiert wurden. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Bild von ursprünglichen n=6 pro Gruppe. Anti-Kaninchen-IgG-FITC=grün und DAPI=blau (Zellkerne).

Mittels indirekter und konfokaler Immunfluoreszenz Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG sowohl an Keratinozyten (Abbildung 10), als auch an Fibroblasten bindet (Abbildung 11). Die Positivkontrolle, das Anti-mNC15A IgG zeigte bei den Keratinozyten (Abbildung 10 B, E) das erwartete wabenähnliche Muster in der Färbung, welches für eine hauptsächlich extrazelluläre Lokalisation des BP180 an den Grenzen der Zell-Zell-Kontakte spricht. In den Fibroblasten hingegen erfolgte die Detektion primär intrazellulär (Abbildung 11 B, E). Die Lokalisation des Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG zeigte sich bei den Keratinozyten, als auch den Fibroblasten sowohl im Bereich der extrazellulären Matrix als auch intrazellulär im Zytoplasma der Keratinozyten (Abbildung 10 A, D und Abbildung 11 A,

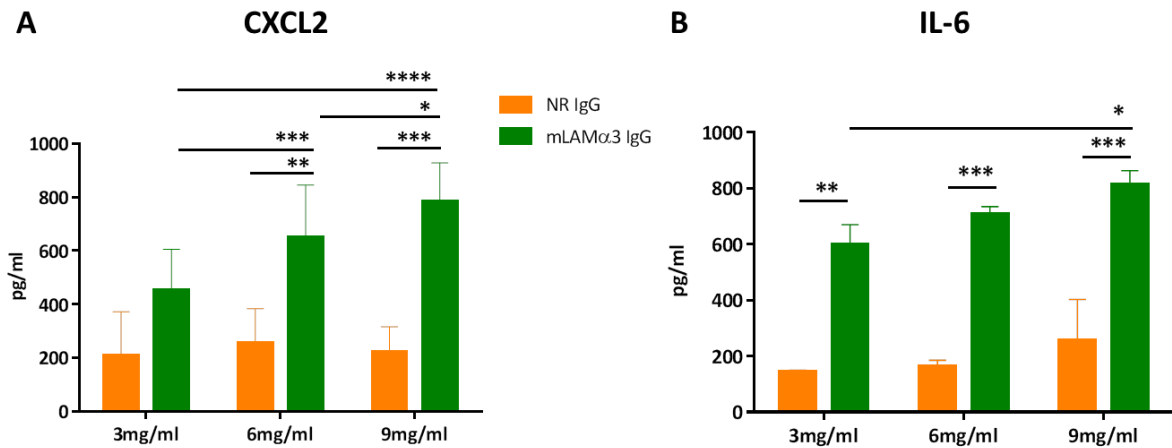
D). Normales Kaninchen IgG (NR IgG) hat, wie erwartet, nicht an die kultivierten Keratinozyten oder die Fibroblasten gebunden (Abbildung 10 und 11 C, F).



**Abbildung 11: Anti-mLAMA3 IgG bindet an murine Fibroblasten.** Indirekte und konfokale Immunfluoreszenz Mikroskopie von Fibroblasten, welche mit mLAMA3 IgG [A, D], mNC15A IgG [B, E] oder mit normalen Kaninchen IgG (NR IgG) [C, F] inkubiert wurden. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Bild von ursprünglichen n=6 pro Gruppe. Anti-Kaninchen-IgG-FITC=grün und DAPI=blau (Zellkerne).

### 3.3.2 Anti-mLAMA3 IgG induziert die Sekretion von IL-6 und CXCL2 von Keratinozyten *in vitro*

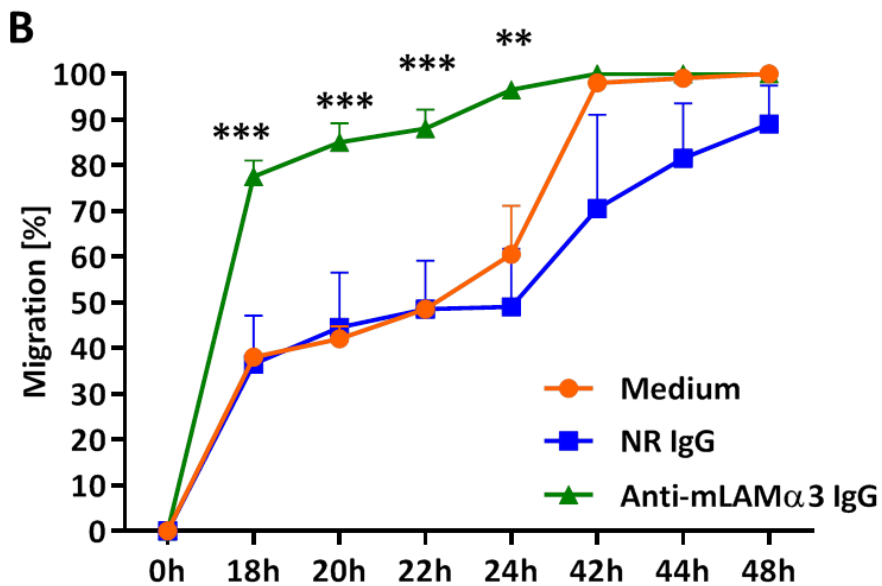
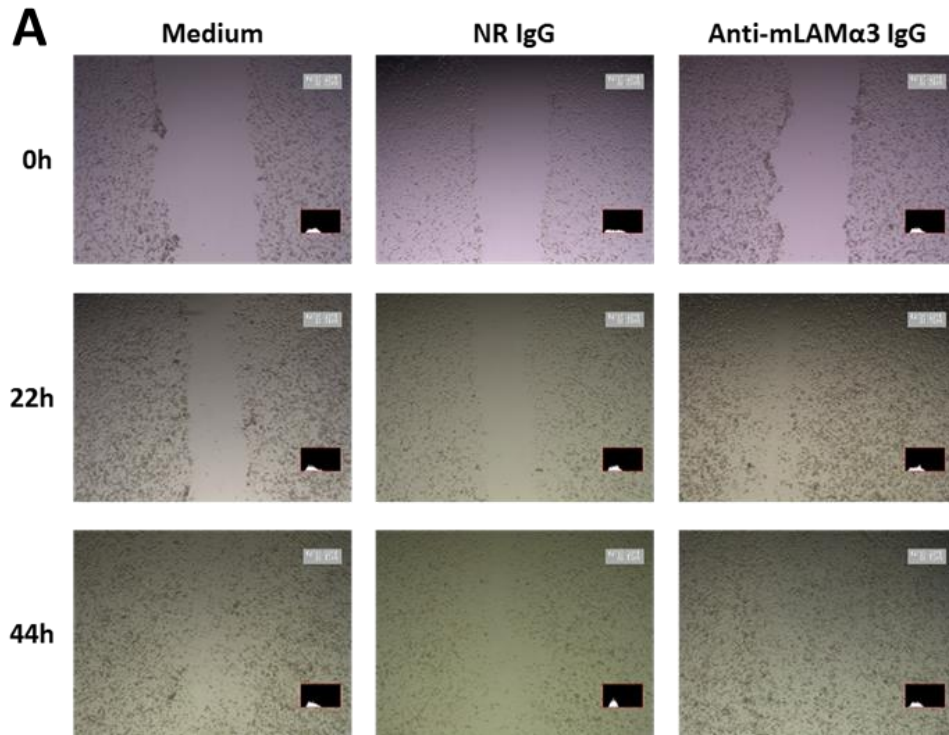
Um die initialen Reaktionen von Keratinozyten nach der Bindung von Anti-mLAMA3 IgG zu untersuchen, wurden zu 90% konfluente Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des IgG behandelt. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf verschiedene Zytokine untersucht. IL-6 und IL-8 werden von Keratinozyten, welche mit Autoantikörpern von BP Patienten behandelt wurden, exprimiert und sezerniert (Schmidt *et al.*, 2000). Für das humane IL-8 existiert bei den Mäusen kein strukturelles Homolog, weswegen das funktionelle Homolog, CXCL2 (auch MIP-2, *macrophage inflammatory protein-2*), für die Untersuchungen genutzt wurde. Sowohl die Keratinozyten als auch die Fibroblasten (nicht gezeigt) sekretieren CXCL2 (Abbildung 12 A) und IL-6 (Abbildung 12 B) nach Behandlung mit Anti-mLAMA3 IgG. Diese Reaktion korrelierte mit der eingesetzten Anti-mLAMA3 IgG Konzentration (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Freisetzung von CXCL2 und IL-6 nach Bindung von Anti-mLAMα3 IgG an kultivierte Keratinozyten.** Keratinozyten, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen von Anti-mLAMα3 IgG für 24h behandelt wurden, sezernierten konzentrationsabhängig CXCL2 [A] und IL-6 [B] ins Medium, wohingegen die Behandlung der Zellen mit normalen Kaninchen IgG (NR IgG) zu keiner Ausschüttung der Signalmoleküle führte. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n=5 unabhängigen Experimenten. Tukey's multiple comparisons test (Two-way-ANOVA) \*<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

### 3.3.3 Anti-mLAMα3 IgG erhöht die Migration von Keratinozyten

Um zu untersuchen ob, beziehungsweise wie, sich die Bindung des Anti-mLAMα3 IgG an die Keratinozyten funktionell auswirkt, wurde ein sogenannter „Scratch-Assay“ (oder auch „Wundschluss-Assay“) durchgeführt. Hierbei wird die Migration der Keratinozyten über die Zeit bei verschiedenen Behandlungen beobachtet und quantifiziert. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen, oder Zellen, welche mit nicht-pathogenem IgG inkubiert wurden, migrierten Keratinozyten, welche mit Anti-mLAMα3 IgG behandelt wurden signifikant schneller (Abbildung 13 A und B). Bereits nach 18 Stunden hatten die Keratinozyten dieser Behandlungsgruppe doppelt so viel Fläche besiedelt, wie die Medium-Kontrolle (Abbildung 13 B). Kein Unterschied war zwischen der Medium-Kontrolle und der Behandlung der Keratinozyten mit normalen Kaninchen IgG festzustellen.

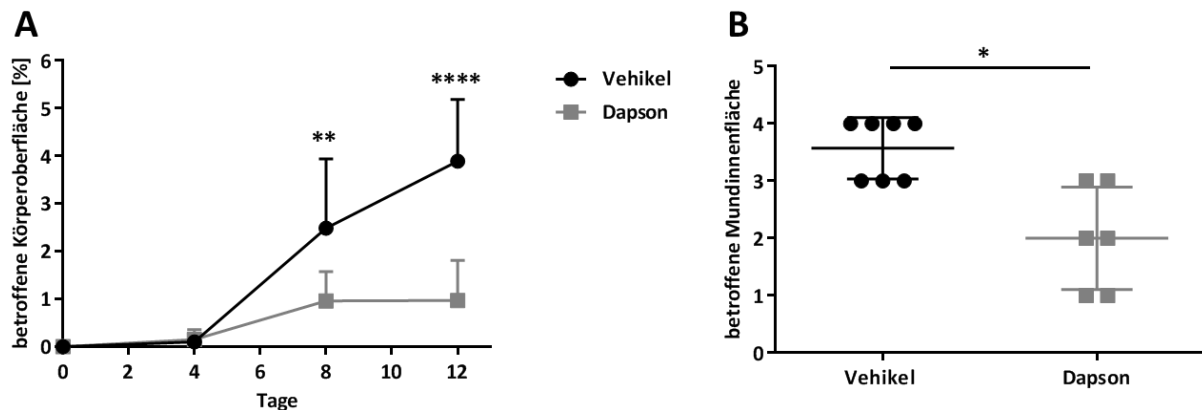


**Abbildung 13: Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG erhöht die Migration von Keratinozyten.** Im sogenannten Wundheilungs-Assay zeigte die Behandlung mit 6mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG einen schnelleren „Wundschluss“ als unbehandelte (Medium) oder mit 6mg normalen Kaninchen IgG (NR IgG) behandelte Keratinozyten [B]. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n=5 unabhängigen Experimenten. Tukey's multiple comparisons test (Two-way-ANOVA) \* $<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

### 3.4 Validierung von anti-entzündlichen Substanzen im Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell

#### 3.4.1 Prophylaktische Gabe von Dapson

Eine bestehende Therapieoption für Anti-Laminin 332 SHP Patienten ist die Gabe von Dapson. Um zu überprüfen, ob das Antikörpertransfer SHP-Mausmodell zur Untersuchung von neuen Behandlungsmöglichkeiten für Patienten geeignet ist, wurde zunächst diese Standardtherapie mit 100mg/kg/Tag Dapson im Mausmodell validiert. Die Behandlung erfolgte verblindet, über eine Fütterungsnadel, beginnend einen Tag vor der Injektion von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG für 11 konsekutive Tage in zwei unabhängigen Versuchen. Sowohl die betroffene Körperoberfläche ( $p=0,0221$ ), als auch die betroffene Mundinnenfläche ( $p=0,0117$ ) zeigten einen statistisch signifikanten Therapieerfolg an Tag 12 nach Gabe von Dapson ( $n=6$ , Weibchen) im Vergleich zu Mäusen die das Lösungsmittel des Medikamentes (Methocel) erhielten ( $n=7$ , Weibchen). Hautläsionen konnten so um ca. 75% (Abbildung 14 A) und orale Läsionen um ca. 60% reduziert werden (Abbildung 14 B). Um einen eventuellen geschlechtsspezifischen Effekt im Mausmodell auszuschließen, wurden in einem zweiten, unabhängigen, ebenfalls verblindeten, Versuch männliche Mäuse ( $n=7$  pro Gruppe) nach demselben Versuchsschema wie die Weibchen getestet. Auch hier wurden Mäuse aus der Dapsongruppe statistisch signifikant weniger krank im Vergleich zu Mäusen, welche das Lösungsmittel erhielten, ebenfalls sowohl bezüglich der Haut, als auch bezüglich der Schleimhaut (nicht gezeigt).



**Abbildung 14:** Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf und betroffene Mundinnenfläche an Tag 12 von Antikörpertransfer SHP Mäusen, welche täglich mit Dapson oder Methocel behandelt wurden. Nach der Injektion von insgesamt 36mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG zeigten Mäuse, die das Lösungsmittel erhielten (Vehikel,  $n=7$ ) eine signifikant erhöhte Krankheitsaktivität im Vergleich zur Dapsongruppe ( $n=6$ ). Dieser Unterschied war bereits an Tag 8 statistisch signifikant [A]. Der Behandlungserfolg im Krankheitsverlauf wurde auch im Mund deutlich, wo weniger Mundviertel bei Mäusen, welche mit Dapson behandelt wurden von Läsionen befallen waren, als bei unbehandelten Mäusen [B]. Dargestellt ist einer von insgesamt 2 experimentellen Ansätzen. A, Two-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test; B, Mann Whitney test; \* $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ .

### 3.4.2 Inhibierung der Aldehyddehydrogenase

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob sich die Inhibierung der Aldehyddehydrogenase (ALDH) mittels Disulfiram als mögliche neue Therapieoption für SHP Patienten eignen könnte. Diese mögliche neue Therapieform wurde 2016 für *in vitro* Daten publiziert (Ahadome *et al.*, 2016) und sollte hier anhand des Antikörpertransfer Mausmodelles für das SHP eruiert werden. Dazu wurden Mäusen (n=7 pro Gruppe) einen Tag vor Induktion der Erkrankung bis zum 11. Versuchstag täglich 200mg/kg Disulfiram, oder das Lösungsmittel (Olivenöl) p.o. verabreicht. Die Behandlung mit Disulfiram hatte keinen Effekt auf die Ausprägung der oralen Läsionen an Tag 12 (Abbildung 15 B). Obschon eine Tendenz für eine weniger betroffene Körperoberfläche ( $p=0,0521$ ) durch die Inhibierung der ALDH zu sehen ist, so ist dieser Unterschied bis Tag 12 statistisch nicht signifikant (Abbildung 15 A).

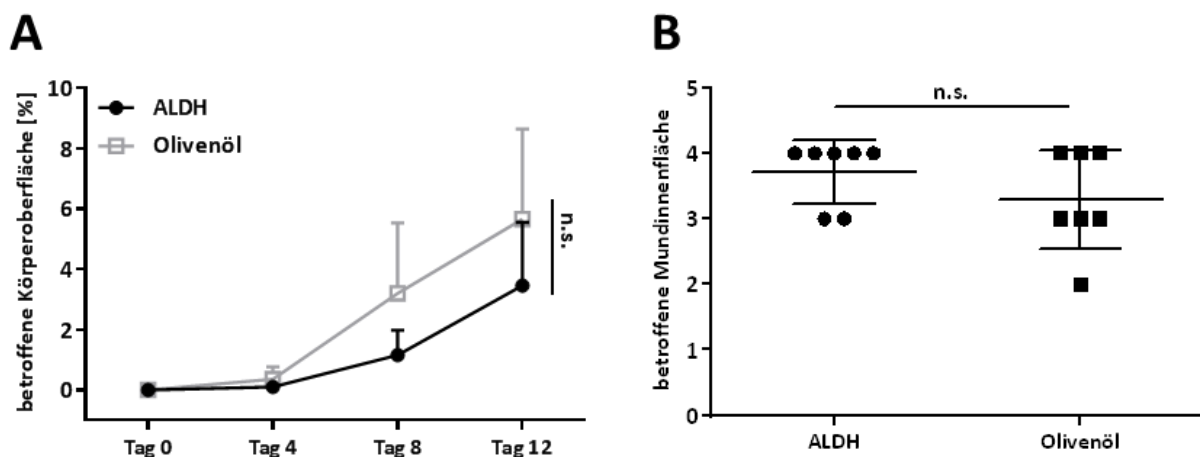
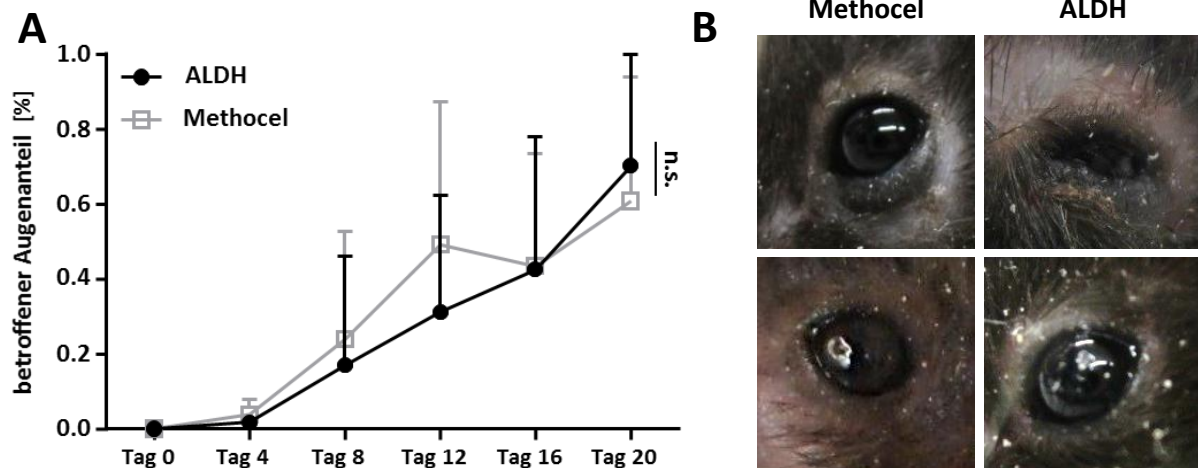


Abbildung 15: Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf und betroffene Mundinnenfläche an Tag 12 von Antikörpertransfer SHP Mäusen, welche täglich mit Disulfiram oder Olivenöl behandelt wurden [A] Nach der Injektion von insgesamt 36mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG zeigten Mäuse, die mit Disulfiram (ALDH Inhibitor) behandelt wurden, im Vergleich zur Vehikel-Gruppe, welche das Lösungsmittel erhielten, keine statistisch signifikante Besserung der betroffenen Körperoberfläche. [B] Auch im Mundinnenraum der Mäuse konnte kein Therapieerfolg mittels Endoskopie festgestellt werden. A, Two-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test; B, Mann Whitney test; n.s. = nicht signifikant.

In folgenden Versuchen wurde daher die Möglichkeit des lokalen Einsatzes von Disulfiram zur Verbesserung der konjunktivalen Läsionen getestet. Hierbei wurde Disulfiram in einer Konzentration von 300 $\mu$ M in 2% (w/v) Methocel gelöst und den erkrankten Mäusen (n=7 pro Gruppe) ab Tag 8 täglich bis Tag 20 in Form von Augentropfen verabreicht. Für die Auswertung wurden die Augen nicht zur Gesamtkörperoberfläche kategorisiert, sondern als eigenständige Körperpartie (100%) bei der ein Behandlungserfolg verifiziert werden sollte. Gewertet wurde der prozentuale Anteil beider Augen, so dass jedes Auge mit 50% in den Gesamtanteil der betroffenen Augenfläche einfließt. Schwellungen, Krusten und Erosionen wurden gleichermaßen, und unabhängig von ihrer Schwere oder Ausprägung, bewertet.



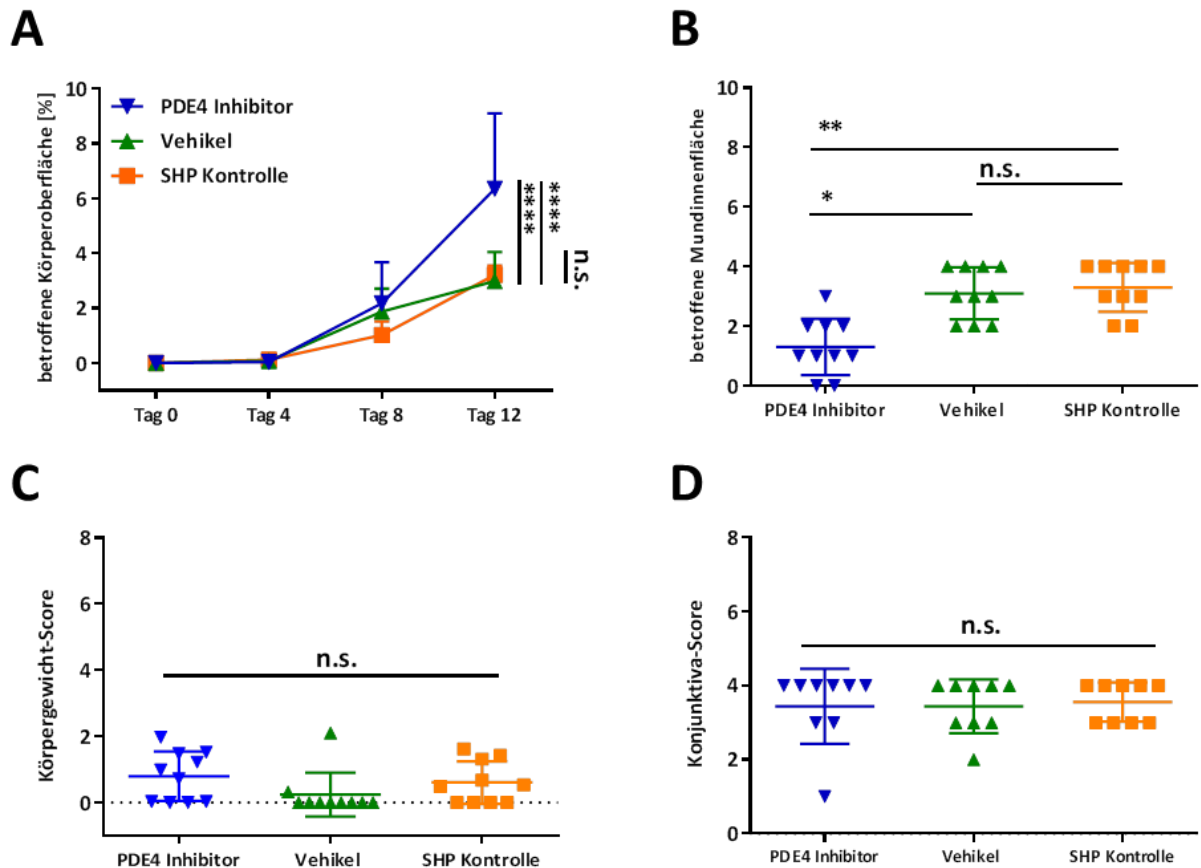
**Abbildung 16: Betroffener Augenanteil im zeitlichen Verlauf und klinische Aufnahmen der Augen an Tag 20, von SHP erkrankten Mäusen, welche täglich Disulfiram- bzw. Methocel-Augentropfen erhielten.** Mäuse, die mit Disulfiram (ALDH) nach Induktion des experimentellen SHP behandelt wurden zeigten keine statistisch signifikante Besserung der Läsionen an den Augen über die Zeit, im Vergleich zur Vehikel-Gruppe, welche das Lösungsmittel Methocel in Form von Augentropfen erhielten [A]. Dies ist auch anhand der klinischen Bilder der Augen am letzten Versuchstag zu erkennen [B]. Dargestellt sind je 2 Bilder pro Gruppe, welche eine 100% Betroffenheit des Auges zeigten. Tukey's multiple comparisons test (Two-way ANOVA) n.s. = nicht signifikant

An Tag 8, dem Beginn der Anwendung der Augentropfen, hatten die Mäuse einen durchschnittlich betroffenen Augenanteil von etwa 20%. Über den gesamten Behandlungszeitraum von 12 Tagen konnten keine Verbesserungen der konjunktivalen Läsionen durch die lokale Behandlung festgestellt werden (Abbildung 16 A). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den klinischen Bildern der Augen (Abbildung 16 B) und in der histologischen Quantifizierung (konjunktivaler Score) wider, in der kein Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe gefunden wurde (nicht gezeigt).

### 3.4.3 Prophylaktische Gabe von Roflumilast

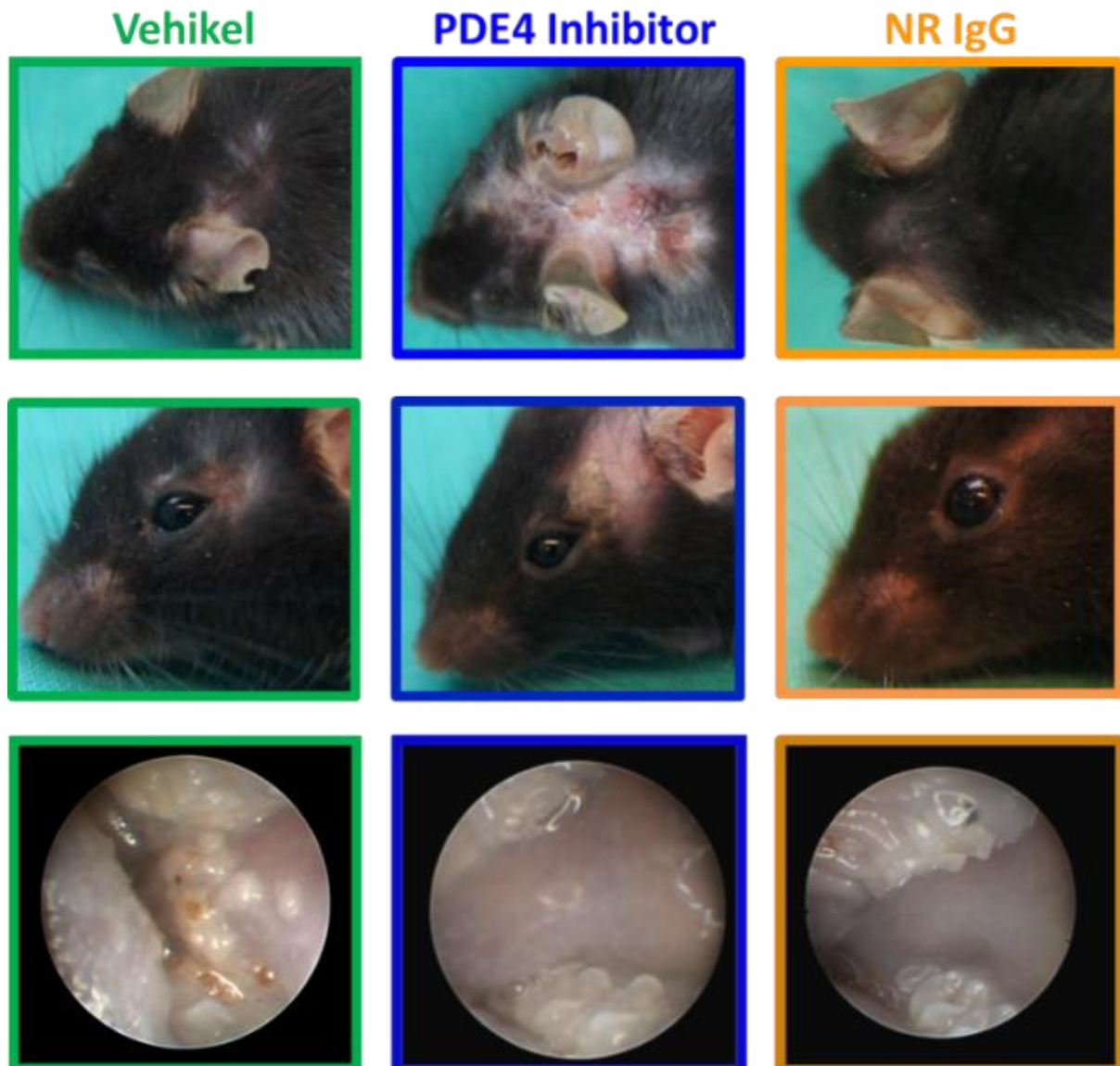
Die Inhibierung der Phosphodiesterase 4 (PDE4) ist bereits zur Behandlung von verschiedenen Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Psoriasis vulgaris zugelassen. In dem vorliegenden Ansatz sollte geprüft werden, ob diese Behandlungsstrategie auch für das SHP geeignet ist. Roflumilast führt zu einer kompetitiven Hemmung der PDE4, wodurch cAMP nicht mehr zu AMP hydrolysiert wird und infolgedessen in den Zellen akkumuliert. Das cAMP ist ein sogenannter *second messenger*, welcher allgemein zu einer reduzierten Freisetzung von entzündlichen Mediatoren aus Zellen führt. In diesem Zusammenhang, sollten daher auch Signalwege inhibiert werden, die an der Pathogenese des SHP im Mausmodell beteiligt sind. Um dies zu gewährleisten wurde Roflumilast verwendet, da es sich hierbei um einen zugelassenen spezifischen PDE4 Inhibitor handelt, welcher oral verabreicht werden kann. Die Behandlung der Mäuse erfolgte einen Tag vor dem Beginn der Krankheit täglich für 12 konsekutive Tage mit 5mg/kg Roflumilast in 4% (w/v) Methocel über *orale gavage* (Schlundsonde). Überraschenderweise zeigten Mäuse der PDE4 Behandlungsgruppe statistisch signifikant mehr Hautläsionen an Tag 12, als die Tiere, die mit dem Vehikel behandelt

wurden oder gar keine Behandlung bekamen (Kontrollgruppe) (Abbildung 17 A). Im Gegensatz dazu konnte Roflumilast die betroffenen Mundareale von erkrankten SHP Mäusen um mehr als 50%, im Vergleich zu der Vehikel- und SHP-Kontrollgruppe, reduzieren (Abbildung 17 B). Bezüglich der Reduktion des Körpergewichtes und des konjunktivalen Scores zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 17 C und D).



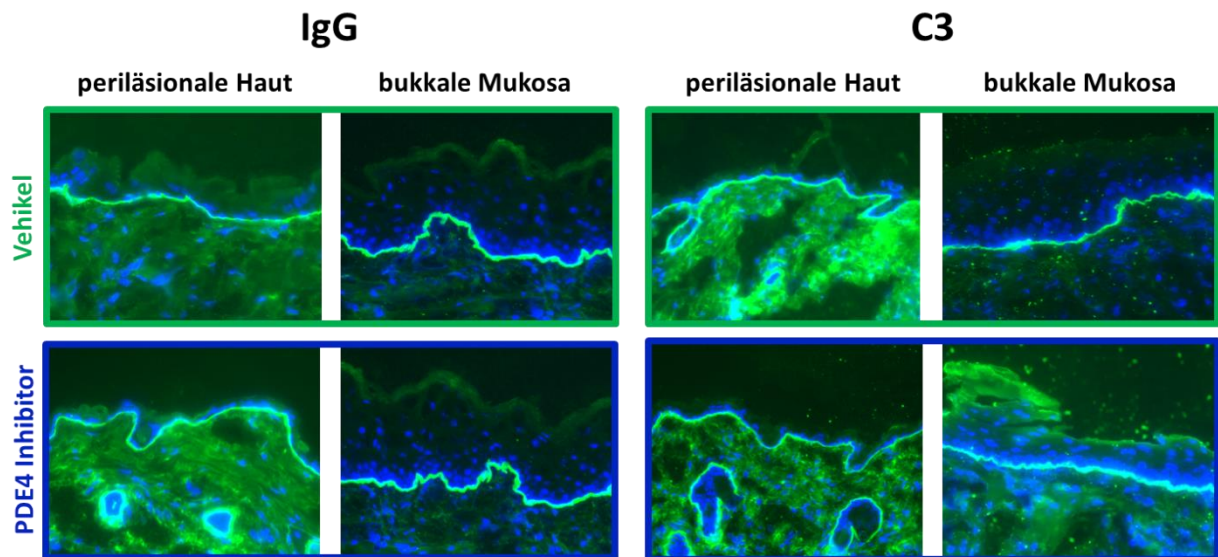
**Abbildung 17: Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf und betroffene Mundinnenfläche, Körpergewicht- und Konjunktiva-Score an Tag 12 von passiv erkrankten SHP Mäusen, welche mit Roflumilast bzw. dem Vehikel Methocel behandelt wurden.** Nach der Injektion von insgesamt 36mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG zeigten Mäuse, die mit Roflumilast behandelt wurden, im Vergleich zur Vehikel-Gruppe, eine statistisch signifikante Verschlechterung der betroffenen Körperoberfläche [A]. Im Mundinnenraum der Mäuse konnte mittels Endoskopie eine signifikante Reduktion der Läsionen festgestellt werden [B]. Weder beim Gewicht- [C] noch beim Konjunktiva-Score [D] konnten Unterschiede zwischen Mäusen, welche mit PDE4-Inhibitor behandelt wurden im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe und den unbehandelten Kontrolltieren festgestellt werden. Tukey's multiple comparisons test (Two-way-ANOVA), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , n.s. = nicht signifikant.

Die unterschiedlichen Krankheitsaktivitäten waren auch sehr deutlich am klinischen Phänotypen der Mäuse an Tag 12 zu sehen, wo die Krusten und Erosionen der Haut, besonders im Nacken und um die Augen herum, in der PDE4 Inhibitor-Gruppe deutlich ausgeprägter waren, als in der Vehikel-Gruppe (Abbildung 18). Mäuse, denen normales Kaninchen IgG injiziert wurde, dienten in diesem Experiment als Negativkontrolle. Endoskopische Aufnahmen an Tag 12 zeigen deutlich den Behandlungserfolg von Roflumilast auf die Mundschleimhaut (Abbildung 20).



**Abbildung 18: Klinischer Phänotyp und Endoskopie von passiven SHP Mäusen, welche mit Roflumilast (PDE4 Inhibitor) oder dem Vehikel behandelt wurden, sowie Mäusen denen normales Kaninchen IgG (NR IgG) injiziert wurde an Tag 12, sowie endoskopische Aufnahme der bukkalen Mukosa.** Dargestellt sind jeweils 3 repräsentative Bilder pro Gruppe von insgesamt n=10 der Vehikel und PDE4 Inhibitor Gruppe und n=3 der NR IgG Gruppe an Tag 12.

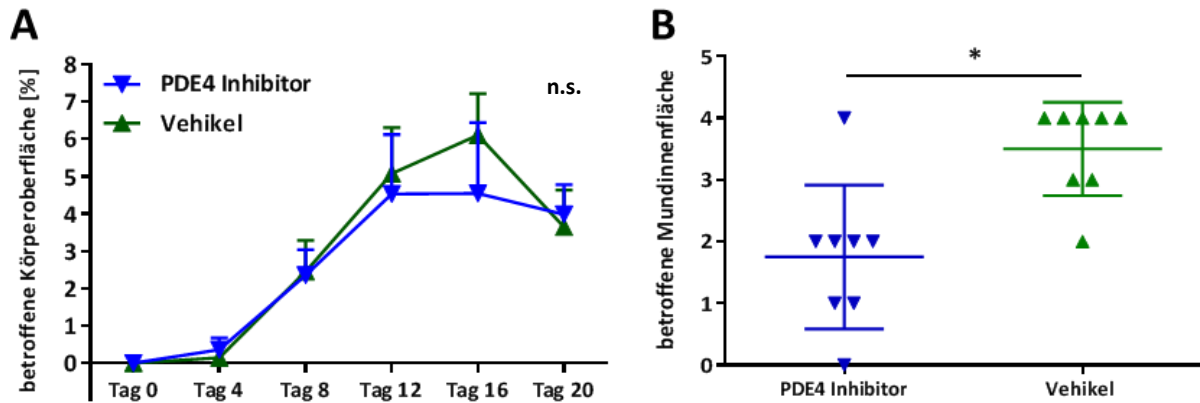
Diese differenziellen Ergebnisse der Roflumilast Behandlung wurden zunächst in einem zweiten, unabhängigen und ebenfalls verblindeten Versuch verifiziert. Auch bei dieser Wiederholung konnte ein statistisch signifikanter Behandlungserfolg in Bezug auf die oralen Läsionen und eine Verschlechterung der Hautläsionen, ebenfalls statistisch signifikant, festgestellt werden (nicht gezeigt). Um daher auszuschließen, dass die Heilung des Mundinnenraumes der Behandlungsgruppe durch eine verminderte, oder vielmehr verhinderte, Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG Bindung oder eine reduzierte C3 Ablagerung an der dermo-epidermalen Junktionszone hervorgerufen wurde, erfolgte eine direkte Immunfluoreszenz der entsprechenden Gewebe durchgeführt. Hierbei konnten keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität für den Nachweis von IgG und C3, weder in der peri-läsionalen Haut noch in der Mundschleimhaut, festgestellt werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Direkte Immunfluoreszenz Mikroskopie von IgG und C3 Ablagerungen periläsionaler Biopsien**, zeigt weder einen Unterschied in der Fluoreszenzintensität entlang der dermal-epidermalen Junctionszone zwischen Haut [A, E und C, G] und Schleimhaut [B, F und D, H], noch zwischen der Behandlung mit Vehikel [A-D] und PDE4 Inhibitor [E-H]. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Bild von n=6 Färbungen pro Gruppe und Gewebe.

### 3.4.4 Quasi-therapeutischer Einsatz von Roflumilast

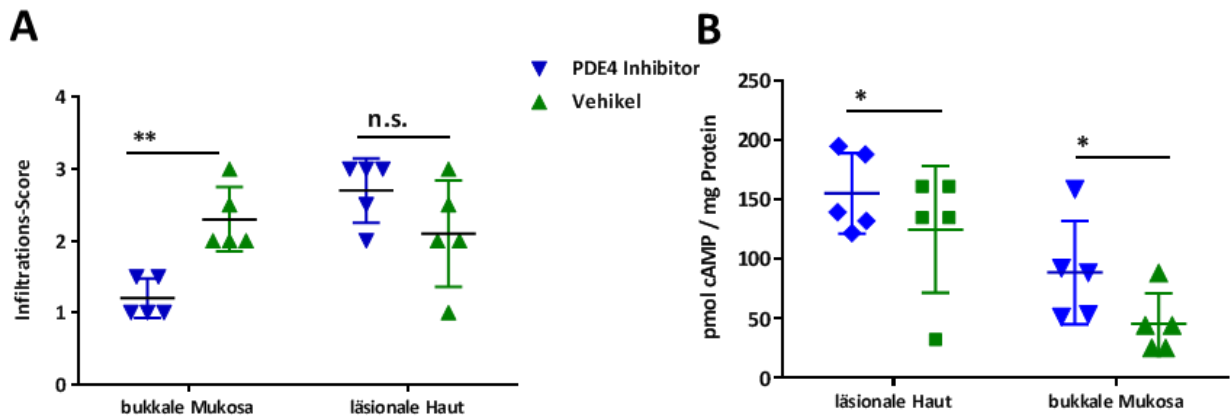
Da die Inhibierung der PDE4 eine starke Reduktion der oralen Läsionen im passiven SHP-Mausmodell im prophylaktischen Ansatz bewirkte, sollte in der Folge geprüft werden, ob dieser Therapieeffekt auch zu verzeichnen ist, wenn die Behandlung bei bereits ausgebildeten Läsionen eingeleitet wird. Dieser quasi-therapeutische Effekt ist näher an der Situation der SHP Patienten, welche nach Beginn der Erkrankung einen Arzt aufsuchen und daraufhin Medikamente erhalten. Die Behandlung der Mäuse erfolgte nach dem Auftreten erster Läsionen beginnend an Tag 8 für 12 konsekutive Tage täglich mit 5mg/kg Roflumilast über *orale Gavage*. Die Behandlung zeigte keinen Erfolg in Bezug auf die Hautläsionen (Abbildung 20 A), jedoch eine statisch signifikante Reduktion der betroffenen Mundareale um mehr als 50% an Tag 20 des Versuches, im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe (Abbildung 20 B).



**Abbildung 20: Krankheitsaktivität im zeitlichen Verlauf und betroffene Mundschleimhaut an Tag 20 von passiven SHP Mäusen, welche täglich ab Tag 8 mit Roflumilast bzw. dem Vehikel behandelt wurden.** Nach der Injektion von insgesamt 36mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG zeigten Mäuse, die mit Roflumilast behandelt wurden, im Vergleich zur Vehikel-Gruppe, welche das Lösungsmittel erhielten, keine statistisch signifikante Besserung der betroffenen Körperoberfläche [A]. Die Mundschleimhaut der mit Roflumilast behandelten Mäuse zeigte mittels Endoskopie signifikant weniger Läsionen als die Vehikel-behandelten Tiere [B]. Kolmogorov-Smirnov Test (Two-way-ANOVA) [A], n.s. = nicht signifikant, T-Test [B], \*  $p < 0,05$ .

### 3.4.4 Erhöhter cAMP Gehalt in Haut und Schleimhaut durch Roflumilast *in vivo*

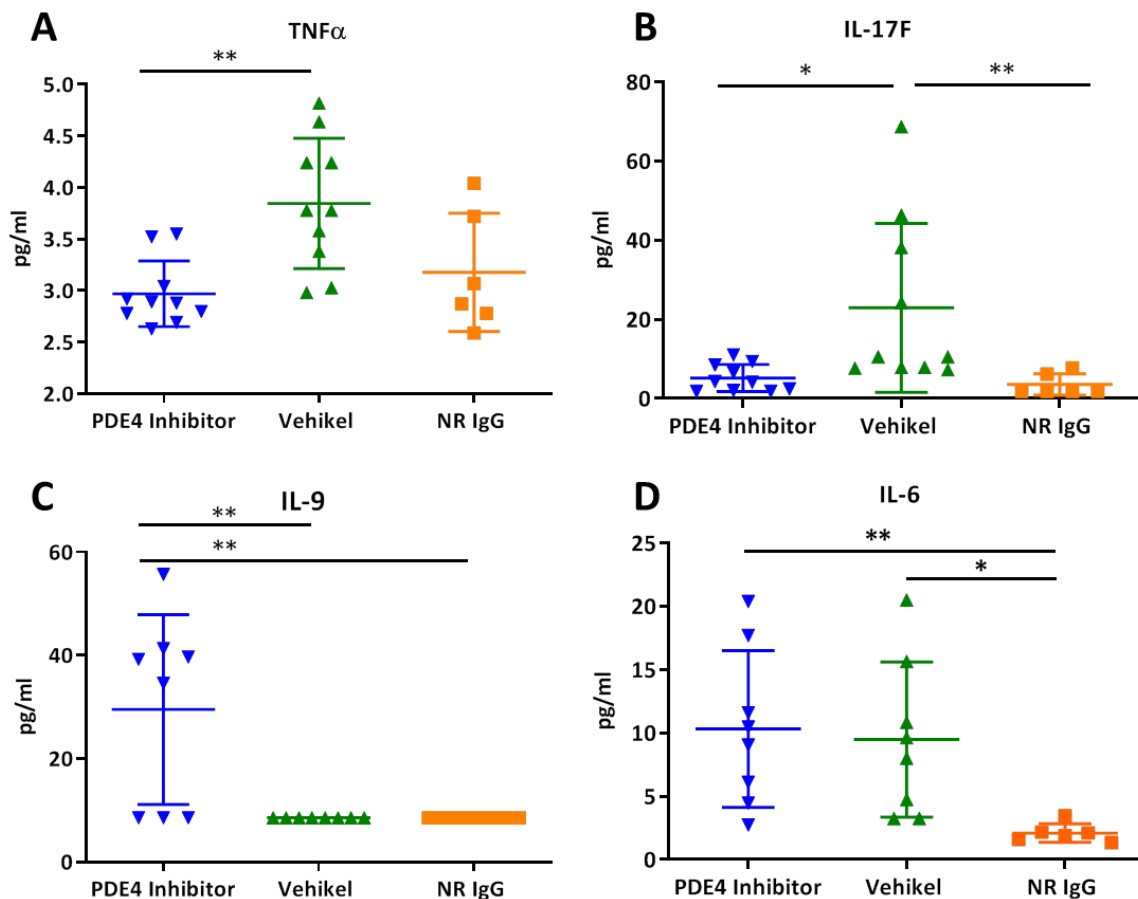
Die klinischen Unterschiede zwischen Haut und Mundschleimhaut, bei der prophylaktischen Gabe von Roflumilast (Abbildung 18), spiegeln sich auch mikroskopisch bei der semi-quantitativen Bewertung des entzündlichen Infiltrates der Histologien von läSIONaler Haut und Mundschleimhaut wider. Hierzu wurde das Entzündungsinfiltrat anhand von H&E Färbungen von läSIONaler Haut und Mundschleimhaut von Vehikel und PDE4 Inhibitor behandelten Mäusen (jeweils  $n=5$ ) aus drei verschiedenen Tiefen der Gewebeproben quantifiziert. Es zeigte sich für die bukkale Mukosa der Roflumilast Gruppe nur ein schütteres inflammatorisches Infiltrat, wohingegen bei der Vehikel Gruppe eine statistisch signifikant stärkeres Entzündungsinfiltrat vorlag. Kein Unterschied zeigte sich jedoch zwischen der Stärke des Entzündungsinfiltrates in der Haut der Roflumilast-behandelten Mäuse im Vergleich zu den Tieren der Vehikel Gruppe (Abbildung 21 A). Um ausschließen zu können, dass Roflumilast unterschiedlich von Haut und Schleimhaut absorbiert wurde, wurden Gewebeproben lysiert und der intrazelluläre cAMP Gehalt mittels ELISA im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge quantifiziert. Hierbei zeigte sich in beiden Geweben für die PDE4 behandelte Gruppe ein signifikanter Anstieg an intrazellulärem cAMP (Abbildung 21 B), wodurch von einer gleichmäßigen Absorption der unterschiedlichen Gewebe ausgegangen werden kann.



**Abbildung 21: Semi-quantitative Bestimmung der Dichte des inflammatorischen Infiltrates und Quantifizierung des intrazellulären cAMP Gehaltes in läSIONALER Haut und bukkaler Mukosa von PDE4 Inhibitor- und Vehikel-behandelten Mäusen.** Der Infiltrations-Score setzt sich aus jeweils n=5 H&E gefärbten Histologien aus jeweils drei verschiedenen Gewebstiefen zusammen, bei denen die Zahl der Entzündungszellen in jeweils 5 Gesichtsfelder semi-quantitativ bestimmt wurde. Bei der bukkalen Mukosa in der PDE4 Inhibitor Gruppe ist hierbei eine deutliche Reduktion an Entzündungszellen zu sehen [A]. Der intrazelluläre cAMP Gehalt wurde aus Gewebeprobe mit n=5 pro Gruppe und insgesamt 3 Wiederholungen pro Gewebe, mittels ELISA ermittelt und ist als Anteil der Gesamtproteinmenge dargestellt. In beiden Geweben ist der cAMP Gehalt in der PDE4 Inhibitor Gruppe signifikant höher als in der Vehikel Gruppe [B]. Two-way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test, n.s. = nicht signifikant, \* p<0,05, \*\* p<0,01.

### 3.4.5 Roflumilast reduziert TNF $\alpha$ und IL-17F *in vivo*

Zunächst sollte die systemische Auswirkung der Inhibierung der PDE4 anhand von Serumproben der einzelnen Gruppen geprüft werden. Hierzu wurde ein Multi-Zytokin-Screening mittels Legendplex durchgeführt. Keine Unterschiede zeigten sich für die Serumspiegel von IL-17A, IL-2, IL-4, IL-13, IFN $\gamma$  und IL-5. Für TNF $\alpha$  und IL-17F konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Serumspiegel durch die Behandlung mit Roflumilast, im Vergleich zur Vehikel Behandlung, festgestellt werden (Abbildung 22 A und B). Für IL-9 hingegen zeigte sich eine deutliche Erhöhung im Serum von PDE4 Inhibitor behandelten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die mit dem Lösungsmittel behandelt wurden und Mäusen denen normales Kaninchen IgG injiziert wurde und Tiere, die unbehandelt blieben (Abbildung 22 C). Statistisch signifikant erhöhte IL-6 Spiegel fanden sich in den SHP Mäusen unabhängig vom Behandlungsarm im Vergleich zu nicht erkrankten Mäusen, die normales Kaninchen IgG erhalten hatten (Abbildung 23 D).



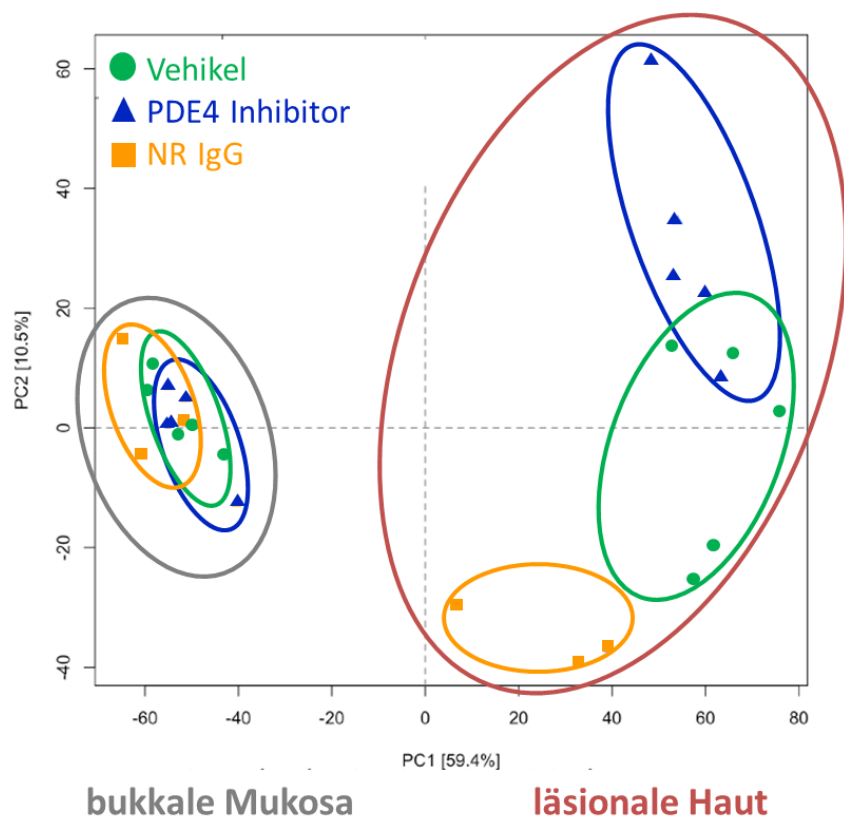
**Abbildung 22: Legendplex-Analyse der Seren von Anti-mLAMA3 SHP Mäusen welche mit Roflumilast (PDE4 Inhibitor) oder dem Lösungsmittel (Vehikel) behandelt wurden, sowie Mäusen, denen normales Kaninchen IgG (NR IgG) injiziert wurde.** Die Serumspiegel von TNF $\alpha$  und IL-17F konnten durch die Behandlung mit dem PDE4 Inhibitor reduziert werden [A, B], wohingegen IL-9 hierdurch erhöht im Serum nachgewiesen wurde [C]. Der Serumspiegel von IL-6 wurde durch die Roflumilastbehandlung in passiven SHP Mäusen nicht erniedrigt und ist im Vergleich zu gesunden Tieren ebenso erhöht, wie bei der Vehikel Gruppe [D]. One-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test n.s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.4.6 Transkriptomanalyse der Haut und Schleimhaut von Roflumilast- und Vehikel-behandelten Schleimhautpemphigoid Mäusen

Um den Unterschied der Roflumilast Behandlung, auf die Haut und Schleimhaut im Mausmodell des SHP aufzudecken, wurde eine Transkriptomanalyse von läSIONALER Haut und Mundschleimhaut in den drei Versuchsgruppen, Vehikel-Gruppe (n=5 pro Gewebe, grün), Roflumilast-Gruppe (n=5 pro Gewebe, blau) und Mäuse die mit normalen Kaninchen IgG injiziert wurden (n=3 pro Gewebe, orange) statt mit Anti-Laminin 332 IgG wie die ersten beiden Gruppen, untersucht. Zur Verdeutlichung ist im Folgenden die bukkale Mukosa grau und die läSIONALE Haut rot in den Abbildungen gekennzeichnet. Die Sequenzierung erfolgte mit 20 Millionen *reads* pro Probe. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf Gene, welche einen q-Wert  $< 0,05$  aufwiesen.

In der *Principle Component* Analyse, der 5.000 variabelsten Gene der einzelnen Versuchs- und Gewebegruppen, sind zunächst deutliche Gruppierungen zwischen bukkaler Mukosa und läSIONALER Haut zu erkennen ( $p = 3.84e-07$ , Wilcoxon-Test der 1. Hauptkomponente). Innerhalb der läSIONALen Haut sind auch die Versuchsgruppe Vehikel gegen NR IgG ( $p = 0.03571$ ) und zumindest ein starker

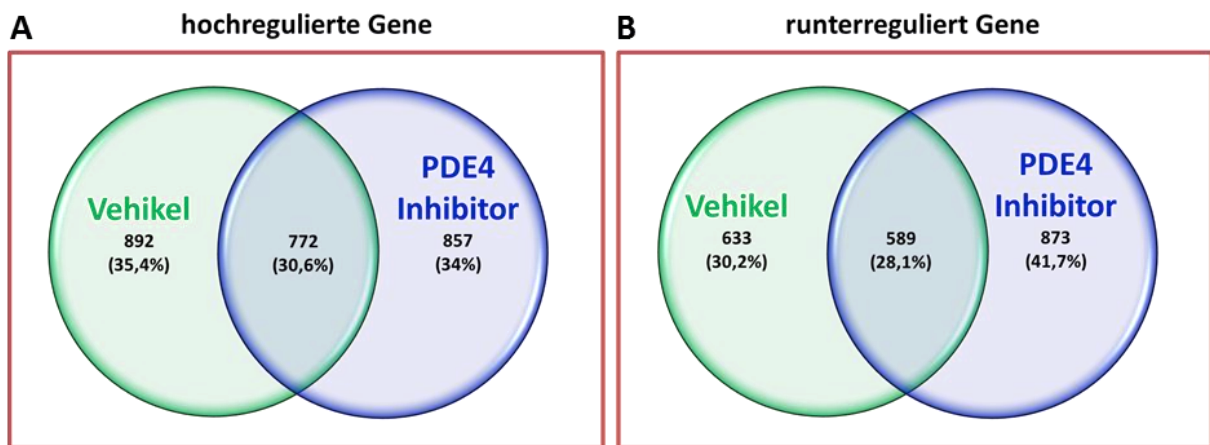
Trend für die unterschiedliche Verteilung der Gruppen PDE4 Inhibitor und Vehikel ( $p=0.05714$ ) erkennbar (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Principle Component Analysis der 5.000 variabelsten Gene.** Dargestellt sind die Komponenten der bukkale Mukosa (grau) und der läsionalen Haut (rot) von Anti-mLAM $\alpha$ 3 SHP Mäusen welche mit Roflumilast (PDE4 Inhibitor, blau) oder dem Lösungsmittel (Vehikel, grün) behandelt wurden, sowie Mäusen, denen normales Kaninchen IgG (NR IgG, orange) injiziert wurde. Die sichtbaren Cluster der einzelnen Gewebe und Versuchsgruppen wurden zur Verdeutlichung farblich markiert.

Eine differentielle Genanalyse wurde durchgeführt, um die gewebsspezifische Antwort innerhalb der Gruppen analysieren und speziell hoch- und runterregulierte Transkripte identifizieren zu können. Zur Ermittlung von gewebsspezifischen Signalwegen wurde die Genexpression, welche durch die Injektion von normalem Kaninchen IgG induziert wurde, von der Vehikel- und der PDE4 Inhibitor-Gruppe subtrahiert. Übrig blieben solche Gene, welche zum einen spezifisch für das SHP Modell (Vehikel Gruppe) und zum anderen spezifisch für die Beeinflussung dieser Signale durch den PDE4 Inhibitor sind (PDE4 Inhibitor Gruppe). 879 Gene wurden in der Schleimhaut der Vehikel Gruppe als hochreguliert und 434 Gene als herunterreguliert identifiziert. Für die läsionale Haut, konnte bei den hochregulierten Genen jeweils etwa ein Drittel der Gene exklusiv dem PDE4 Inhibitor zugeordnet werden und ein Drittel der Krankheitsentwicklung im Anti-Laminin 332 SHP-Mausmodell. Das restliche Drittel der Gene fand sich sowohl in der Behandlungs- als auch in der Vehikel-Gruppe hochreguliert (Abbildung 24 A). Im Vergleich dazu zeigten sich prozentual mehr herunterregulierte Gene

innerhalb der läsionalen Haut der Roflumilast behandelten Mäuse, über 40%, im Vergleich zu Mäusen, welche nur das Vehikel bekamen, 30%, als exklusiv (Abbildung 24 B).



**Abbildung 24:** Venn-Diagramm der hoch- und herunterregulierten Gene der läsionalen Haut von Vehikel- und PDE4 Inhibitor-behandelten Anti-mLAM $\alpha$ 3 SHP Mäusen.

Online (reactome.org) wurde eine Überrepräsentationsanalyse durchgeführt, um festzustellen, ob bestimmte Signalwege in den Proben überrepräsentiert sind und daher nicht zufällig. Der statistische Test (hypergeometrische Verteilung), welcher hierbei Verwendung fand, lieferte zusätzlich einen Wahrscheinlichkeitswert, der mit der Benjamani-Hochberg-Methode auch auf falsche Entdeckungsraten (*false discovery rate*, FDR) hin korrigiert wurde. Die Analyse erfolgte für humane Signalwege, wobei murine Gene in ihre humanen Äquivalente umgeschrieben wurden. Von den 1664 eingegebenen Genen, welche in den Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG injizierten Mäusen der Vehikel-Gruppe in läsionaler Haut hochreguliert waren, erkannte die Software 988 Gene. 1485 Signalwege wurden von mindestens einem der eingegebenen Gene benutzt. In Tabelle 3.1 sind Signalwege der läsionalen Haut des experimentellen SHP-Mausmodelles der Vehikel-behandelten Versuchsgruppe aufgelistet, welche statistisch überrepräsentiert sind. Auffällig sind besonders die Beteiligung des Immunsystems, vor allem der Neutrophilen Degranulierung, sowie die starken Umstrukturierungen von Kollagen und extrazellulärer Matrix.

Tabelle 3.1: Überrepräsentierte Signalwege der läsionalen Haut von Vehikel-behandelten SHP Mäusen, welche mittels Reactome.org identifiziert wurden.

Überrepräsentierte, hochregulierte Signalwege läsionaler Haut der Vehikel Gruppe	Entitäten				
	Gefunden	Total	Verhältnis	p-Wert	FDR
Neutrophilen Degranulierung	155	480	0,034	1,11E-16	1,78E-13
Angeborenes Immunsystem	255	1,324	0,093	5,93E-10	4,75E-7
Extrazelluläre Matrixorganisation	86	329	0,023	3,55E-9	1,9E-6
Kollagen Bildung	39	104	0,007	1,33E-8	5,35E-6
Assemblierung von Kollagenfibrillen und anderen multimeren Strukturen	29	67	0,005	5,1E-8	1,64E-5
Kollagen Degradation	29	69	0,005	9,35E-8	2,5E-5
Immunsystem	452	2803	0,198	9,19E-7	2,1E-4
Kollagen Biosynthese und modifizierende Enzyme	27	76	0,005	5,59E-6	1,12E-3
Abbau der extrazellulären Matrix	41	148	0,01	1,15E-5	2,04E-3
Integrin-Zell-Oberflächen Interaktionen	28	86	0,006	1,8E-5	2,88E-3
Interleukin-4 und Interleukin-13 Signaltransduktion	52	211	0,015	2,00E-05	2,9E-3
Signal regulierende Proteininteraktionen	10	18	0,001	1,74E-4	2,32E-2
Signaltransduktion der Interleukin-2 Familie	17	47	0,003	2,3E-4	2,83E-2
Chemokin Rezeptoren bindende Chemokine	17	48	0,003	2,92E-4	3,11E-2
Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen	14	35	0,002	2,98E-4	3,11E-2
Kollagenketten Trimerisierung	16	44	0,003	3,27E-4	3,11E-2
Signaltransduktion durch Interleukine	146	836	0,059	3,52E-4	3,13E-2
Elastische Faserbildung	16	46	0,003	5,24E-4	4,4E-2
Bildung des <i>cornified envelope</i>	33	138	0,01	9,82E-4	7,85E-2

FDR, *false discovery rate*

In der bukkalen Mukosa der Vehikel-behandelten experimentellen SHP Versuchsgruppe wurden 879 hochregulierte und 434 herunterregulierte Gene mit einem  $p < 0,05$  identifiziert. Die bukkale Mukosa der Vehikel Gruppe zeigte die in Tabelle 3.2 aufgelisteten überrepräsentierten Signalwege, welche hochreguliert waren. Im Unterschied zu den Signalwegen, welche in der läsionalen Haut der Vehikelgruppe hochreguliert und überrepräsentiert waren (siehe Tabelle 3.1), waren vor allem die Interleukin-10 und Interleukin-33 Signaltransduktionswege in der Mundschleimhaut aktiviert. Im Vergleich dazu waren die Kollagene und extrazelluläre Matrix weder im Abbau noch im Aufbau in den Transkripten der bukkalen Mukosa Vehikel-behandelter SHP Mäuse zu finden. Bei der Betrachtung solcher Gene, welche für die Mundschleimhaut spezifisch sind, also wenn von den Mundschleimhaut hochregulierten Genen der Vehikel Gruppe, die Gene abgezogen werden, welche in derselben Gruppe auch in der läsionalen Haut als hochreguliert gefunden wurden, so konnte durch die Überrepräsentationsanalyse mittels reactome.org, der Interleukin-10 Signalweg, mit 18 von 86 getroffenen Genen, einem p-Wert von  $6,25E-08$  und einer *false discovery rate* (FDR) von  $5,39E-08$ , als statistisch signifikant identifiziert werden.

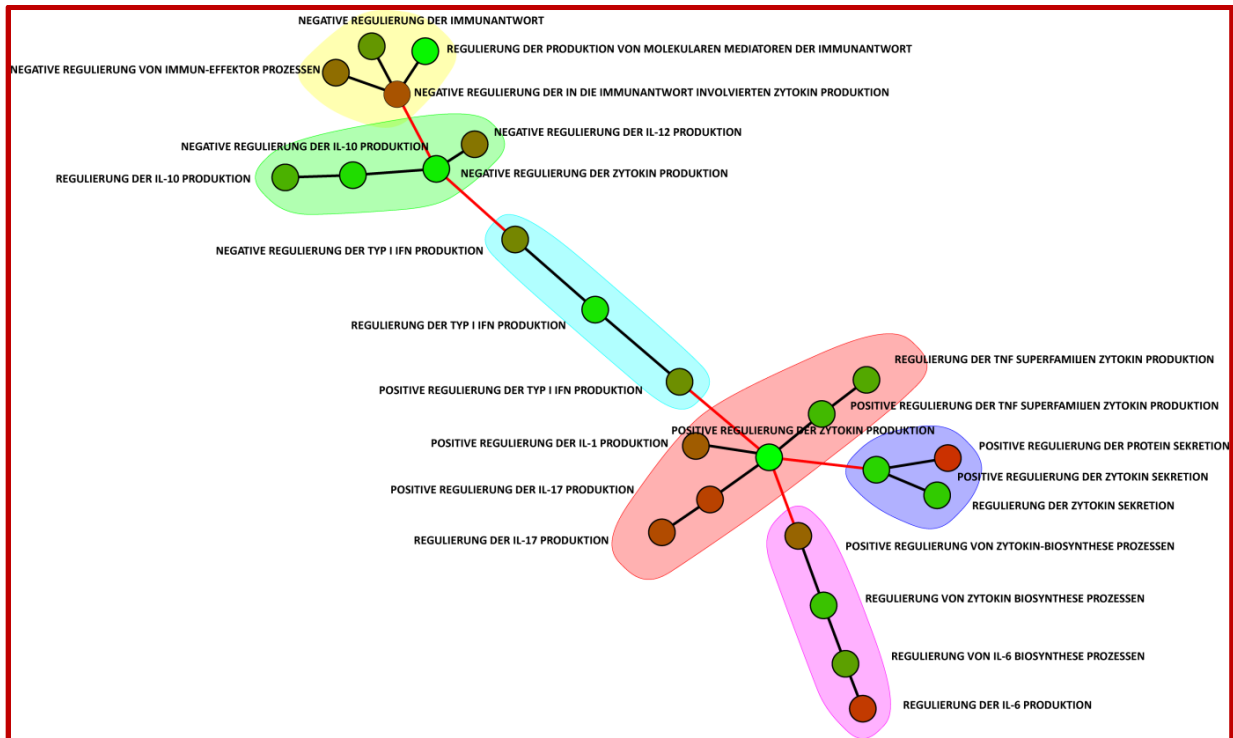
Tabelle 3.2: Überrepräsentierte Signalwege der bukkalen Mukosa von Vehikel behandelten SHP Mäusen, welche mittels Reactome.org identifiziert wurden.

Überrepräsentierte hochregulierte Signalwege der Mundschleimhaut der Vehikel Gruppe	Entitäten				
	Gefunden	Total	Verhältnis	p-Wert	FDR
Neutrophilen Degranulation	87	480	0,034	2,22E-15	2,34E-12
Interleukin-10 Signaltransduktion	31	86	0,006	3,60E-13	1,90E-10
Angeborenes Immunsystem	155	1,324	0,093	2,32E-10	8,13E-08
Immunsystem	269	2822	0,198	2,06E-08	5,43E-06
Signaltransduktion durch Interleukine	77	639	0,045	3,76E-06	7,90E-04
Chemokin-Rezeptoren bindende Chemokine	15	57	0,004	1,76E-05	0,003
Bildung des <i>cornified envelope</i>	24	138	0,01	6.19E-05	0,009
Interleukin-4 und Interleukin-13 Signaltransduktion	29	211	0,015	5,85E-04	0,077
Signaltransduktion des Interleukin-33	3	4	2,81E-04	0,003	0,255

FDR, false discovery rate

Nach Abzug differentiell exprimierter Gene der Kontroll Versuchsgruppe (NR IgG) von der PDE4 Behandlungs Gruppe der Mundschleimhaut, waren keine statistisch signifikanten differentiell exprimierten Gene zwischen der PDE4-Behandlungsgruppe und der Vehikelgruppe nachweisbar, so dass hier von einer vollständigen Heilung des Mundinnenraumes durch die Roflumilast Behandlung ausgegangen werden kann.

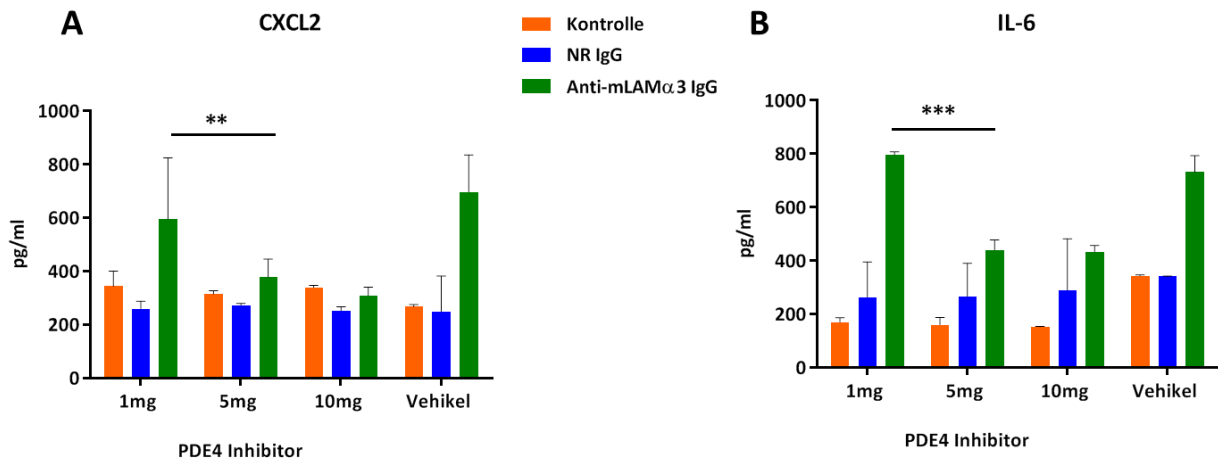
Die identifizierten Gene der differentiellen Genanalyse wurden auch mit dem *Gene Ontology* (GO) Klassifizierungssystem als Gen-Anreicherungsanalyse von Frau Dr. Anke Fähnriche, Universität zu Lübeck ausgewertet. Hierbei wurden hochregulierte Gene in Abhängigkeit von ihren funktionellen Eigenschaften einem Satz vordefinierter Klassen, zugeordnet. Die visuelle Gruppierung der murinen Signalwege der läSIONalen Haut von Vehikel-behandelten SHP Mäusen, welche ein Netzwerk bilden, ist in Abbildung 26 dargestellt. Interessanterweise sind die Interleukine-10, und -12 runter-, und die Interleukine-1, -17, -6 und TNF hochreguliert. Für dieselbe Analyse der Mundschleimhaut konnte eine gesteigerte Regulierung der Interleukine-1, -6, 10 und 12 festgestellt werden und eine gleichzeitige reduzierte Regulierung für Interleukin-6.



**Abbildung 26: Netzwerk der Gene Ontology Genanreicherungsanalyse.** Dargestellt sind Signalwege von differentiell exprimierter mRNA der läsionalen Haut von mit Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG injizierten Mäusen, welche mit dem Vehikel behandelt wurden, abzüglich den Werten der differentiell exprimierten mRNA läsionaler Haut von NR IgG injizierten Mäusen, welche ein Netzwerk bilden. Einschlusskriterien der differentiell exprimierten Gene waren ein q-Wert kleiner 0,01 und ein b-Wert größer 2. Gruppierende Signalwege sind farblich eingekreist. Rote Linien indizieren einen Zusammenhang der Gruppierungen und schwarze Linien einen Zusammenhang der Signalwege.

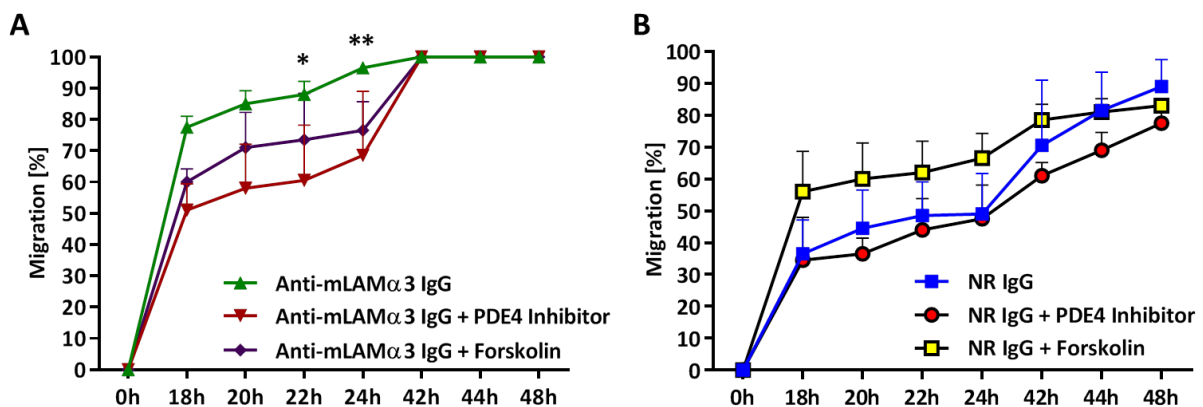
### 3.4.7 Roflumilast verringert die Sekretion von IL-6 und CXCL2 von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG behandelten Keratinozyten

Die Transkriptomanalyse zeigte einen Einfluss von IL-6 und dem Rezeptor Cxcr2 des CXCL2 Liganden. Zu beiden Botenstoffen konnte bereits gezeigt werden, dass sie von Keratinozyten, welche mit Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG behandelt wurden, vermehrt sekretiert werden (siehe Abschnitt 3.3.2). Daher sollte hier geprüft werden, ob die Ausschüttung dieser Chemokine durch die Inhibierung der PDE4 verringert werden kann. Im Vergleich zur Behandlung mit dem Lösungsmittel des PDE4 Inhibitors und im Vergleich zur Behandlung mit normalem Kaninchen IgG konnte der PDE4 Inhibitor Roflumilast in Konzentrationen über 5mg/ml die Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG induzierte Sekretion von CXCL2 (Abbildung 27 A) und IL-6 (Abbildung 27 B) auf das Niveau der Kontrollen reduzieren.



**Abbildung 27: Inhibition der PDE4 reduziert die Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG induzierte Sekretion von CXCL2 und IL-6 von kultivierten Keratinozyten.** Keratinozyten, welche mit 6mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG, 6mg normalen-Kaninchen IgG (NR IgG) oder PBS, als Kontrolle für den Medium-Verlust durch die Behandlung behandelt wurden, wurden zusätzlich mit dem Lösungsmittel Methocel (Vehikel) oder unterschiedlichen Konzentrationen von Roflumilast ko-inkubiert. Nach 24h wurde der Überstand genutzt, um sekretiertes CXCL2 [A] und IL-6 [B] mittels ELISA im Zellkulturüberstand zu messen. Sowohl die CXCL2 als auch die IL-6 Konzentrationen, welche durch die Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG Behandlung stark anstiegen, konnten durch die ko-Inkubation mit mindestens 5mg/ml Roflumilast inhibiert werden. Two-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

In Abschnitt 3.3.3 konnte festgestellt werden, dass die Migration von Keratinozyten, welche mit Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG behandelt wurden, gesteigert ist. Die zusätzliche Inhibition der PDE4 bzw. die Aktivierung von cAMP mittels Forskolin konnte die durch das Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG gesteigerte Migration der Keratinozyten wieder reduzieren (Abbildung 28 A), hatte aber auf die Migration der Keratinozyten in Kombination mit normalem Kaninchen IgG oder ohne weitere Behandlung keine Auswirkungen (Abbildung 29 B).



**Abbildung 28: Die durch Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG induzierte, gesteigerte Migration von Keratinozyten normalisiert sich durch die Inhibition von PDE4.** Im sogenannten Wundheilungsassay zeigte sich ein schnellerer „Wundschluss“ durch die Inkubation mit 6mg Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG [A]. Die erhöhte Migration der Keratinozyten durch Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG wurde durch die zusätzliche Behandlung mit 5mg/ml PDE4 Inhibitor und durch die Aktivierung von cAMP mittels 0,1 $\mu$ M Forskolin reduziert [A]. Beide Behandlungen hatten keinen Einfluss auf die Migration der Keratinozyten in Kombination mit normalem IgG (NR IgG) [B]. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n=5 unabhängigen Experimenten. Tukey's multiple comparisons test (Two-way-ANOVA) \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

### **3.5 Entwicklung, Charakterisierung und Validierung eines aktiven Schleimhautpemphigoid-Mausmodelles**

#### **3.5.1 Die Injektion von c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 kann die Immuntoleranz in B6.S und SJL/J Mäusen brechen und eine Autoimmundermatose induzieren**

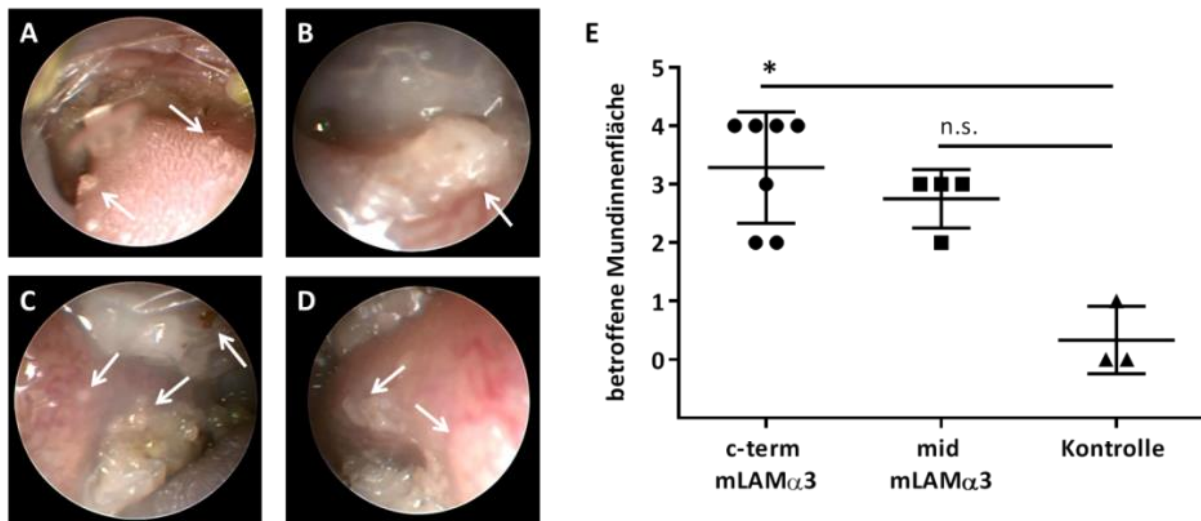
In einer Mischung aus c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 Protein mit insgesamt 60 $\mu$ g Protein 1:1 gemischt mit dem Adjuvanz Titermax<sup>TM</sup> konnte weder bei einer einmaligen noch einer viermaligen Immunisierung eine Autoimmundermatose in Mäusen induziert werden. Auch der Zusatz von Pertussis Toxin konnte die Immuntoleranz der B6.S und SJL/J Mäuse über einen Versuchszeitraum von maximal 20 Wochen nicht brechen (Daten nicht gezeigt). Eine Möglichkeit die Immuntoleranz der Mäuse dennoch zu überwinden und eine Autoimmundermatose auszulösen, bestand in der Erhöhung der Konzentration des injizierten Proteins. Daher wurden die Proteine separat mit jeweils 60 $\mu$ g pro Immunisierung insgesamt viermal appliziert. Nach 6 Wochen, und somit nach der dritten Immunisierung, konnten die ersten Anzeichen eines klinischen Phänotyps in SJL/J Mäusen gesehen werden. In einem ersten Versuch wurden SJL/J Mäuse (Charles River) über einen Versuchszeitraum von 16 Wochen verwendet und in der Wiederholung zur Verifizierung der Ergebnisse SJL/J (interne Zucht) und B6.S (interne Zucht) Mäuse über einen Versuchszeitraum von 14 Wochen. Danach wurde die gesamte Tierhaltung aufgrund einer Infektion geschlossen und alle Mäuse getötet. Die Tiere wurden im Nachgang als negativ für den Ausbruchserreger getestet (Daten nicht gezeigt).

#### **3.5.2 Das aktive Laminin 332 Schleimhautpemphigoid-Mausmodell spiegelt wesentliche Merkmale der Patienten wider**

##### **a) Läsionen der Mundschleimhaut**

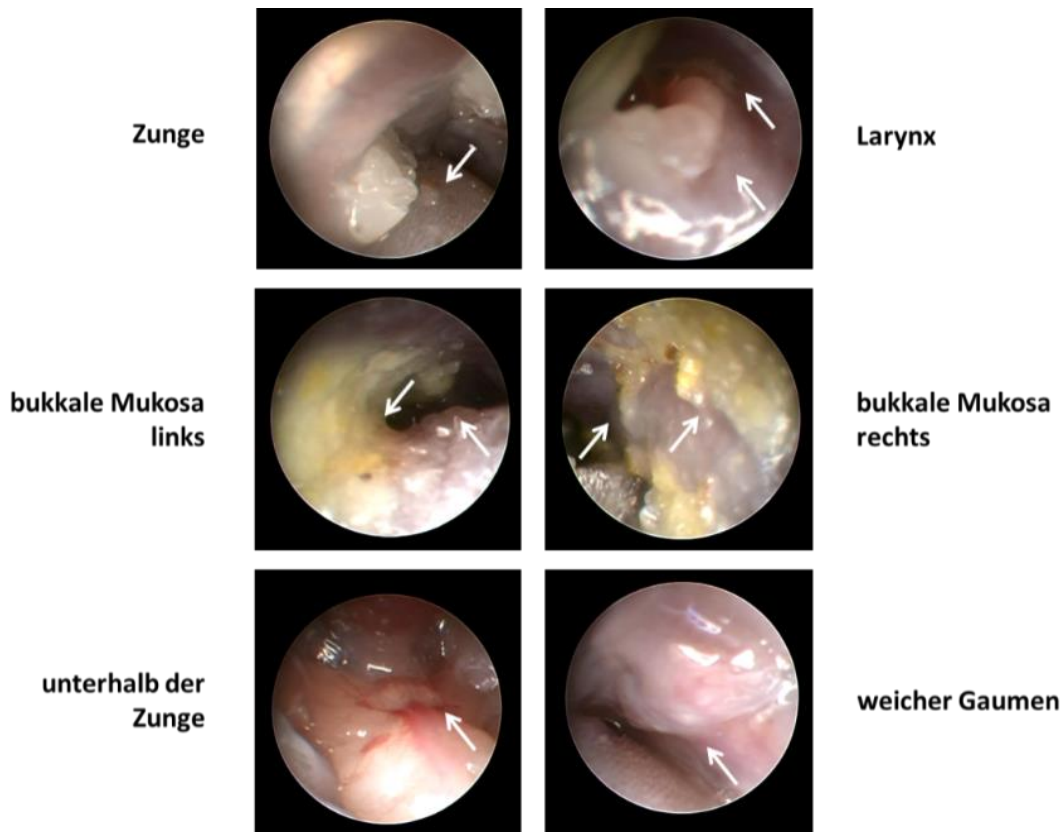
Mehr als 90% der SHP Patienten mit IgG Reaktivität gegen Laminin 332 zeigen eine Beteiligung des Oropharynx (Amber *et al.*, 2018). Eine dominante Beteiligung der Mukosa ist darüber hinaus bei der Diagnostik eines SHP als Kriterium definiert (Chan *et al.*, 2002). Blasen, Krusten und Erosionen des Mundinnenraumes konnten in allen drei Durchgängen des durch Immunisierung induzierten Mausmodell des SHP, im Folgenden als „aktives Mausmodell“ bezeichnet, mittels Endoskopie am letzten Versuchstag nachgewiesen werden. Im Pilotversuch der SJL/J Mäuse zeigten sich stark ausgedehnte Erosionen, Ödeme und Blasen im Mundinnenraum (Abbildung 29 A-D) jeder mLAM $\alpha$ 3-immunisierten Maus. Auf Grund der Tatsache, dass eine c-term und vier mid mLAM $\alpha$ 3-immunisierte SJL/J Mäuse des ersten Versuches nicht überlebten, war nur der Unterschied zwischen c-term und den Adjuvanz immunisierten Mäusen, nicht aber der zwischen mid mLAM $\alpha$ 3 und Adjuvanz immunisierten Mäusen, statistisch signifikant (Abbildung 29 E). Die Ursache für das verfrühte Ableben der Mäuse blieb unklar. Während des Versuchszeitraumes verloren alle Mäuse über die Zeit an Gewicht im Vergleich zum Ausgangsgewicht vor der ersten Behandlung (Daten nicht gezeigt),

wobei zwei von vier mid mLAM $\alpha$ 3 und fünf von sieben c-term mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen diesen Gewichtsverlust bis zum Versuchsende nicht wieder aufholten.



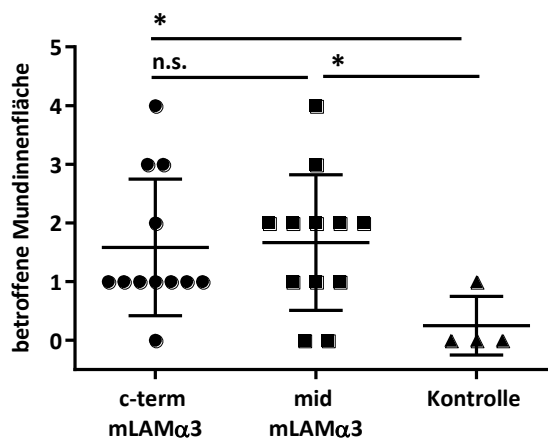
**Abbildung 29: Orale Läsionen in Woche 16 der c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten SJL/J Mäuse.** Mittels Endoskopie konnten Blasen, Krusten und Erosionen an der Zunge [A], dem Larynx [B] und der bukkalen Mukosa links [C] und rechts [D] identifiziert werden. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Belastung der Mundinnenfläche der immunisierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen, welche nur das Adjuvanz erhielten [D]. Dargestellt ist je ein repräsentatives Bild. Two-way ANOVA mit Mann Whitney Test \*  $p < 0,05$ , n.s.=nicht signifikant.

Endoskopisch konnte nachgewiesen werden, dass jeder Abschnitt des Mundinnenraumes betroffen sein kann, selten jedoch der harte Gaumen. Letzteres könnte allerdings der Tatsache geschuldet sein, dass diese Region durch den steilen Winkel schwer mit dem Endoskop zu erfassen ist. Dies zeigte sich auch in den B6.S Mäusen nach der 14. Versuchswoche, wo Blasen, Krusten, Erosionen und Schwellungen im gesamten Mundbereich inklusive des Bereichs unterhalb der Zunge sichtbar waren (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Orale Läsionen in Woche 14 der c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten B6.S Mäuse.** Mittels Endoskopie konnten Schwellungen, Blasen, Krusten und Erosionen (weiße Pfeile) an- und unter der Zunge, dem Larynx, der linken und rechten bukkalen Mukosa sowie am weichen Gaumen identifiziert werden. Dargestellt ist je ein repräsentatives Bild pro Mundareal.

Auch in den B6.S Mäusen konnten durch Quantifizierung der betroffenen Mundinnenflächen nach 14 Wochen eine signifikant erhöhte Affektion der oralen Mukosa festgestellt werden. Auch in diesem Stamm war kein Unterschied zwischen den beiden mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragmenten im Bezug auf die Schwere oder die lokale Ausprägung innerhalb der betroffenen Mundinnenfläche offensichtlich (Abbildung 31).

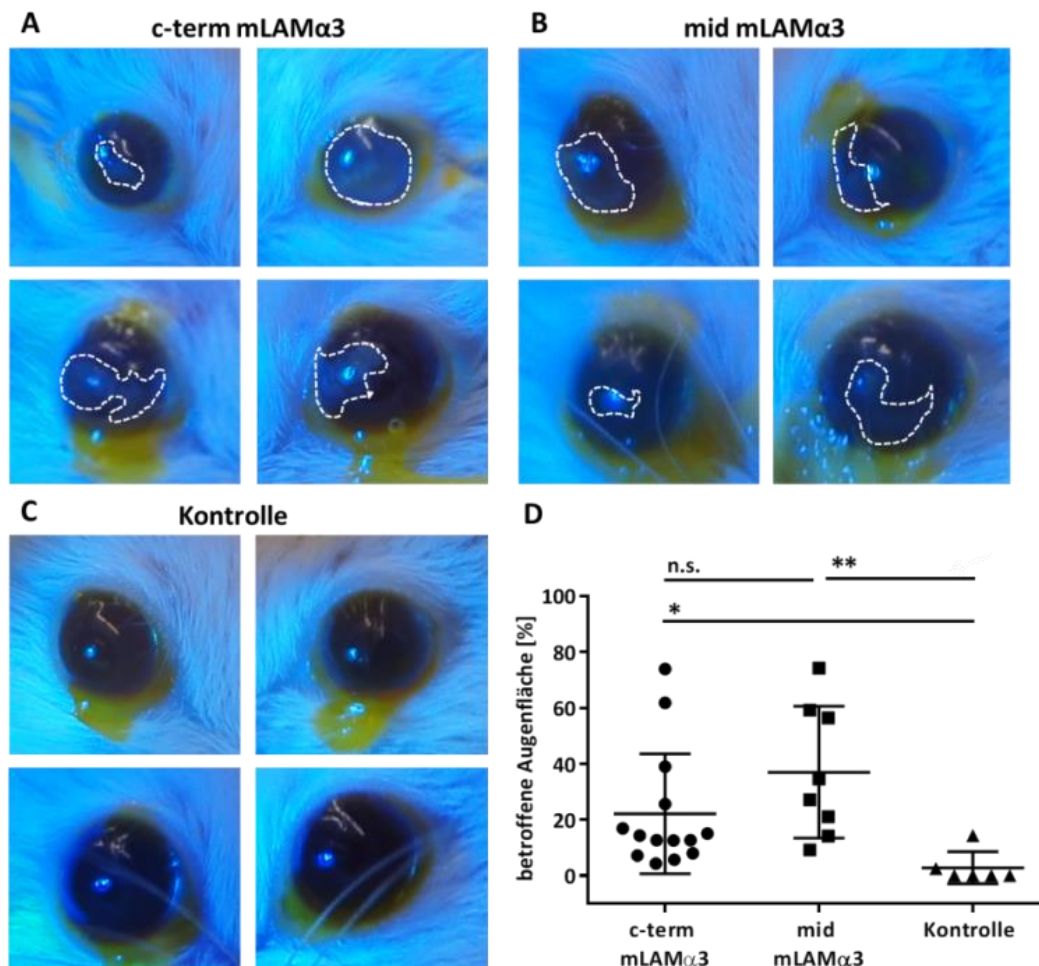


**Abbildung 31: Die Quantifizierung der betroffenen Mundinnenfläche der c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten B6.S Mäuse in Woche 14 ergab eine signifikante Beteiligung der Mundinnenfläche der immunisierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen die nur das Adjuvanz erhielten.** Kein Unterschied war im Ausmaß der oralen Läsionen zwischen den c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen festzustellen. 2-way ANOVA mit Mann Whitney Test \* $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant.



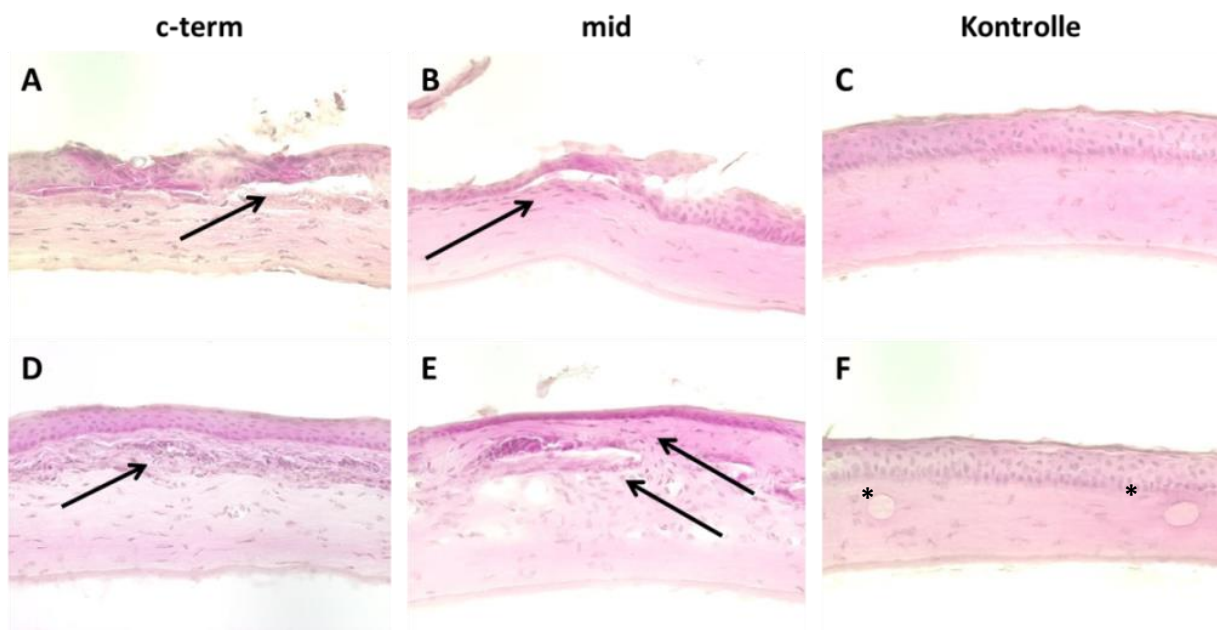
## b) Läsionen der Augen

Die ersten Auffälligkeiten nach 6 Wochen des Pilotversuches durch Immunisierung mit c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 waren an den Augen zu sehen. Hier zeigten sich bei den roten Augen der SJL/J Mäuse weiße Areale, die zunehmend an Größe gewannen und auch bis zum Ende des Versuches bei einigen Versuchstieren zu einer vollkommenen Trübung der Augen führten. Nach 16 Wochen wurden die Augen daher mit Fluorescein angefärbt, mit einer Blaulichtlampe sichtbar gemacht und fotografiert. Die Fotos von den Augen wurden anschließend mittels ImageJ ausgewertet. Hierbei zeigten sich bei allen Mäusen der Versuchsgruppen in jedem Auge Veränderungen, welche statistisch signifikant waren im Vergleich zu den Kontrollmäusen, wobei es aber keinen Unterschied in Bezug auf die Stärke, oder die Ausprägung der Bindehautbeeinflussung zwischen der c-term und der mid Protein Immunisierung gab (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Läsionen der bulbären Bindehaut und Kornea in Woche 16 von SJL/J Mäusen, welche mit c-term bzw. mid mLAM $\alpha$ 3 oder dem Adjuvanz immunisiert wurden.** Sowohl c-term- [A] als auch mid mLAM $\alpha$ 3- [B] immunisierte Mäuse zeigten ausgeprägte Läsionen der bulbären Bindehaut und Kornea (weiß gestrichelte Linien), welche mit Fluorescein angefärbt und mit einer Blaulichtlampe sichtbar gemacht wurden. Innerhalb der Kontroll-Gruppe, welche nur das Adjuvanz erhalten hatten, waren kaum Beeinträchtigungen sichtbar [C]. Mittels ImageJ erfolgte die Quantifizierung der angefärbten Fläche als prozentualer Anteil der gesamten Fläche, wobei hier ein signifikanter Unterschied zwischen immunisierten und Kontroll-Mäusen, welche nur das Adjuvanz erhielten zu sehen ist [D]. Abgebildet sind jeweils das linke und rechte Auge von 2 repräsentativen Mäusen pro Gruppe. Two-way ANOVA mit Mann Whitney Test \* p<0,05, \*\* p<0,01, n.s. = nicht signifikant.

Um die Veränderungen der Bindehaut und Kornea weiter zu charakterisieren, wurden die Augen in Paraffin eingebettet und Kryoschnitte von verschiedenen Gewebstiefen H&E gefärbt. In diesen Histologien konnten die Beschädigungen der Kornea, welche mittels Fluorescein und Blaulicht makroskopisch sichtbar gemacht wurden, auch mikroskopisch bestätigt werden. Es fanden sich sowohl Spaltbildungen zwischen Epithel und Stroma als auch ein inflammatorisches Infiltrat unterhalb des Epithels in den Augen der Versuchsgruppen, nicht aber in den Augen der Kontrollgruppe (Abbildung 35). Rundliche Veränderungen, welche in einer Schnitt-Tiefe der Kontrollgruppe zu sehen waren (Abbildung 35 F) sind am ehesten als artifiziell zu interpretieren und waren auch die einzige Auffälligkeit dieser Gruppe. Es waren histologisch keine Unterschiede der Augen von c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen bezüglich Lokalisation oder Ausprägung der Spaltbildung zu erkennen.

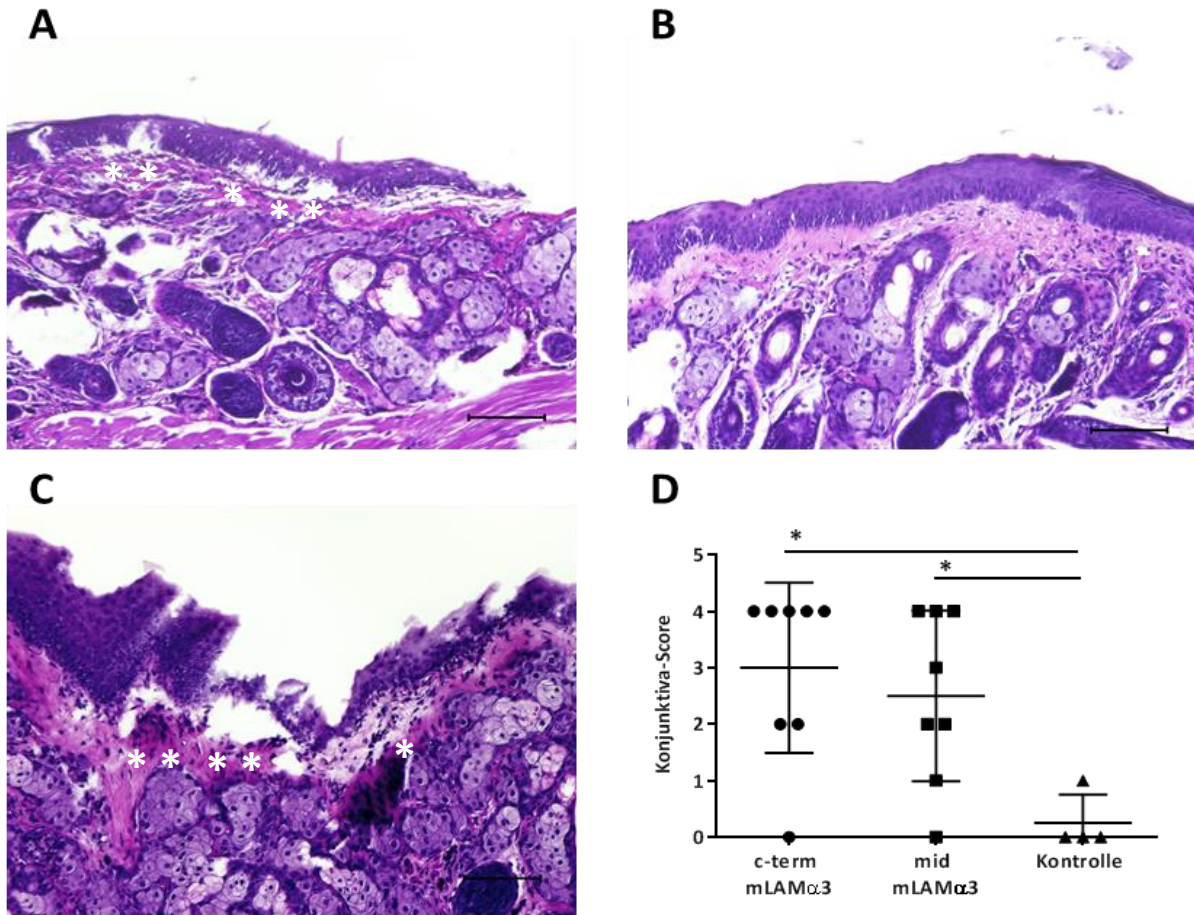


**Abbildung 35: Histologie der Kornea von mit c-term-, mid mLAM $\alpha$ 3 und mit Adjuvanz allein immunisierten SJL/J Mäusen in Woche 16.** Sowohl c-term- [A, D] als auch mid mLAM $\alpha$ 3- [B, E] immunisierte Mäuse zeigten histologisch Spaltbildungen zwischen Epithel und Stroma [A, B], sowie ein erhöhtes inflammatorisches Infiltrat der Kornea (Pfeile) und subepitheliale Veränderungen [D, E], n=4. Mäuse die nur mit dem Adjuvanz immunisiert wurden [C, F] wiesen keine Spaltbildung und kein inflammatorisches Infiltrat der Kornea auf, n=2. Es zeigten sich allerdings rundliche Läsionen [F] bei den Kontrollen (Sternchen). Abgebildet sind jeweils 2 repräsentative Bilder pro Gruppe.

Auch die Augen der B6.S Mäuse zeigten Veränderungen und vor allem Trübungen durch die Immunisierung mit mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragmenten (Abbildung 36 A und B). Nur drei c-term und vier mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierte Mäuse von insgesamt 12 pro Gruppe hatten nach 14 Wochen Versuchsdauer keine Läsionen an der Bindehaut/Kornea. Die betroffenen Augenflächen der Augen von c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen war signifikant größer als bei Mäusen, die mit dem Adjuvanz allein immunisiert wurden (Abbildung 36 D).



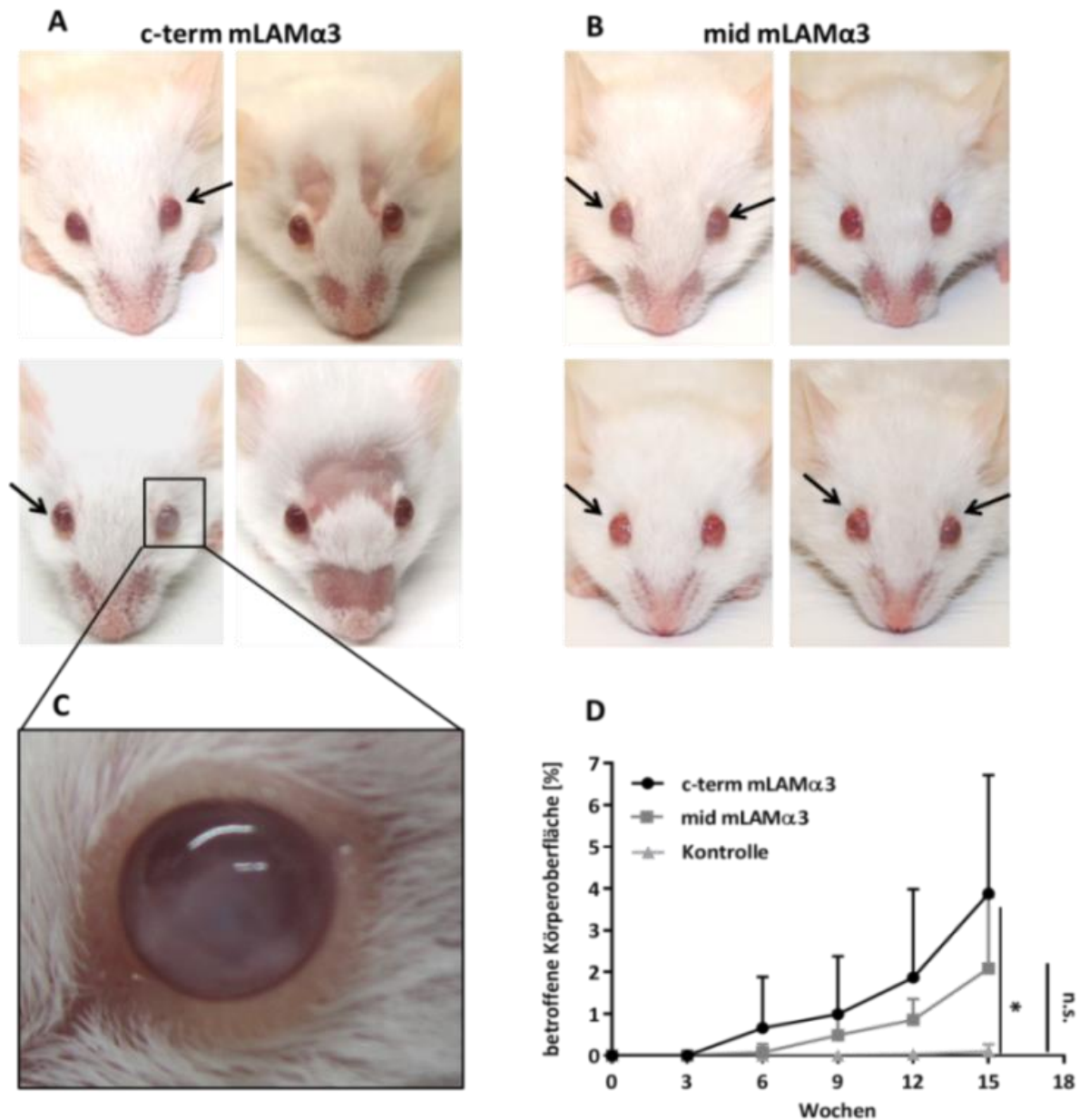




**Abbildung 38: H&E gefärbte Schnitte der Konjunktiven von B6.S Mäusen des aktiven SHP Modells.** Die Immunisierung mit c-term [A] und mid [C] mLAMα3 Protein führte nach 14 Wochen histologisch zur Spaltbildung der Konjunktiva (Sternchen) und Infiltrat von Leukozyten, wohingegen die Histologien von Mäusen, welche nur das Adjuvanz erhielten, weder eine Spaltbildung noch ein zelluläres Infiltrat zeigten [B]. Dargestellt ist je ein repräsentatives Bild pro Gruppe. Die Quantifizierung der Spaltbildungen ergab eine statistisch signifikante stärkere Pathologie in den Konjunktiven der mLAMα3-Immunisierungsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren [D]. Hierbei ist kein Unterschied in der Ausprägung oder der Schwere der Spaltbildung zwischen den beiden Proteinfragmenten festzustellen. Unpaired t-test mit Posthoc Mann-Whitney test \*  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant. Maßstabsbalken = 100µm.

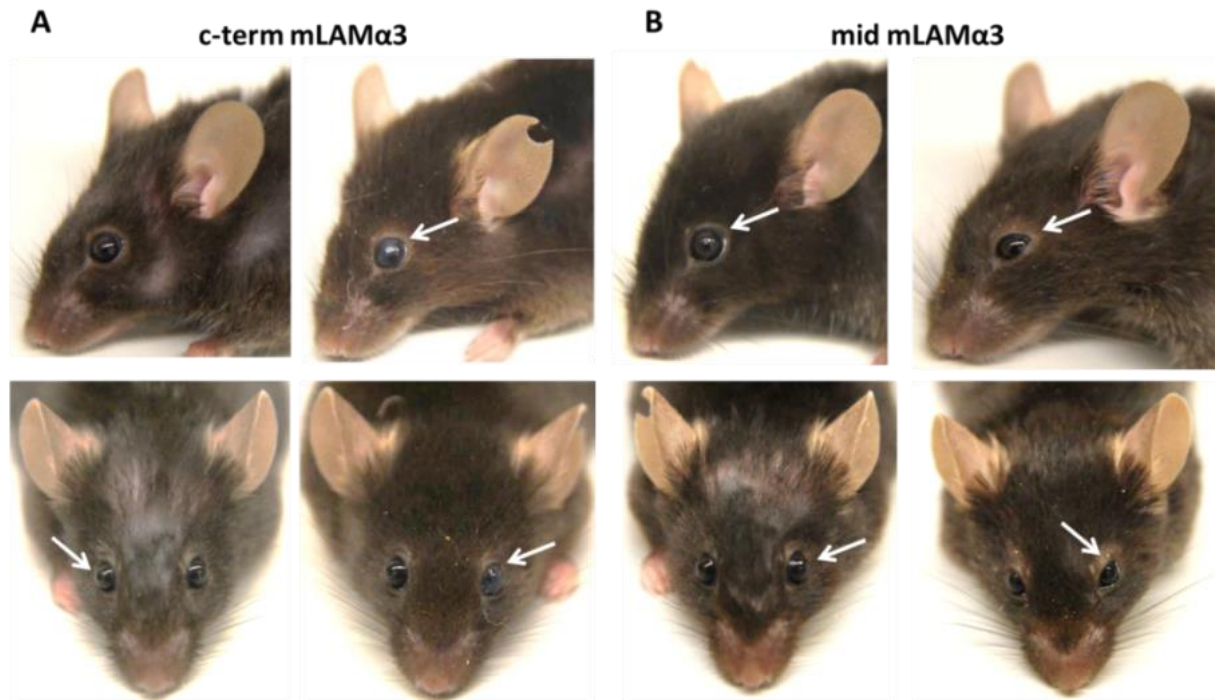
#### d) Läsionen der Haut

Nur etwa jeder fünfte SHP Patient zeigt klinisch auch Läsionen der Haut (Amber *et al.*, 2018). In den verschiedenen Immunisierungsversuchen konnten ebenfalls bei einigen Mäusen Läsionen der Haut festgestellt werden. Im ersten Versuch mit SJL/J Mäusen zeigten sich die ersten Hautläsionen in der sechsten Woche. Am Ende des Versuches waren bei zwei von sieben c-term und bei einer von vier mid immunisierten mLAMα3 Mäusen deutliche Hautläsionen zuerkennen (Abbildung 39 A und B). Diese waren vor allem im Bereich um die Augen und die Schnauze lokalisiert. Für die betroffene Körperoberfläche entstand hierdurch eine statistische Signifikanz für die c-term mLAMα3 immunisierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die hohe Standardabweichung, die durch diejenigen Mäuse zustande kam, welche keine oder nur geringe Hautläsionen aufwiesen, spiegelt die Unterschiede innerhalb der Gruppen für die betroffene Körperoberfläche wider (Abbildung 39 D).



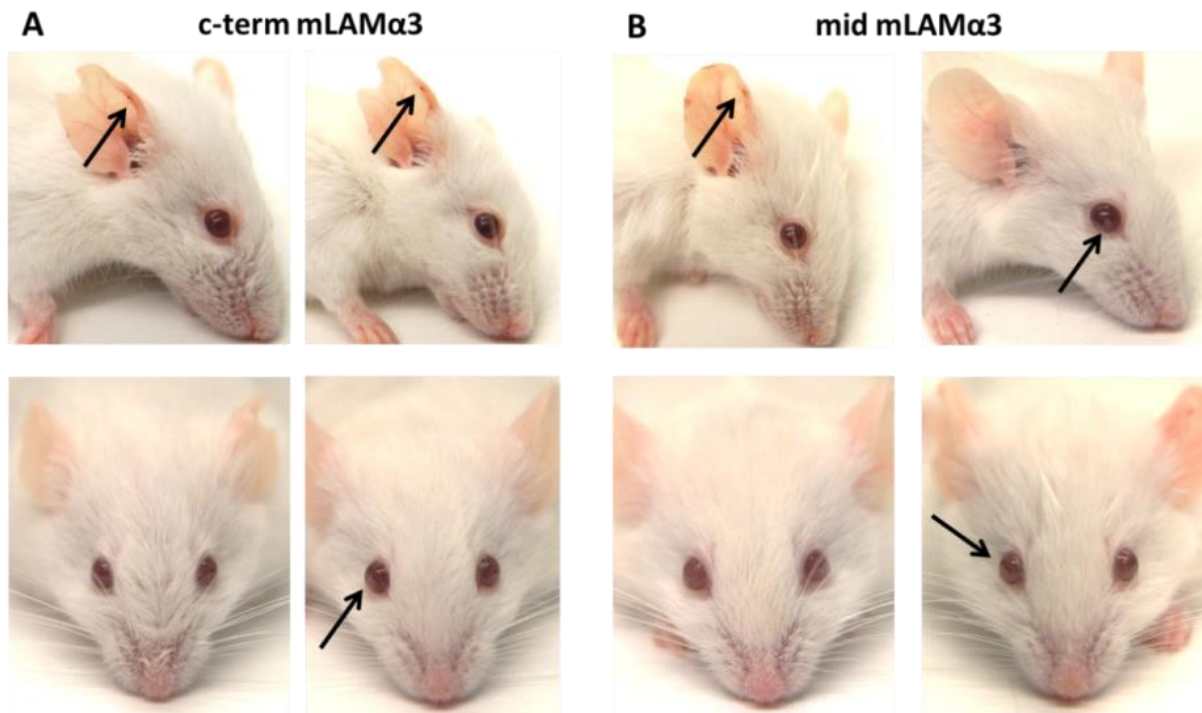
**Abbildung 39: Hautläsionen in Woche 16 von SJL/J Mäusen, welche mit c-term bzw. mid mLAMα3 immunisiert wurden sowie deren betroffene Körperoberfläche über die Zeit.** Man erkennt Läsionen der Haut im Bereich der Augen (Pfeile) und der Schnauze bei 2 von insgesamt 6 c-term immunisierten mLAMα3 Mäusen [A] und bei 1 von insgesamt 4 mid immunisierten mLAMα3 Mäusen im Bereich der Schnauze [B]. Dargestellt sind 4 Bilder pro Gruppe. Die Quantifizierung der betroffenen Körperoberfläche über die Zeit zeigt eine hohe Standardabweichung und nur für c-term mLAMα3 immunisierte Mäuse eine statistische Signifikanz [D]. Two-way ANOVA mit Mann Whitney Test \* p<0,05, n.s. = nicht signifikant.

Bei der Immunisierung mit mLAMα3 Fragmenten der B6.S Mäuse konnten im Versuchszeitraum von 14 Wochen keine Blasen, Krusten oder Erosionen an der Haut festgestellt werden. Auffällig war jedoch ein erhöhter Fellverlust im Bereich des Kopfes und des Nackens bei den Versuchs- (Abbildung 40 A und B) nicht aber bei den Kontroll-Mäusen (nicht gezeigt). Jeweils zwei der zwölf Tiere pro Versuchsgruppe wiesen deutlich sichtbaren Fellverlust auf. Die betroffenen Partien finden sich in Arealen, in denen sich die Mäuse vermehrt gekratzt bzw. geputzt haben.



**Abbildung 40: B6.S Mäuse in Woche 14, welche mit c-term bzw. mid mLAM $\alpha$ 3 immunisiert wurden.** Fotos der Mäuse zeigten vor allem Fellverlust im Bereich des Kopfes. Hierbei konnten keine Unterschiede bezüglich der Ausprägung oder Lokalisation zwischen Mäusen welche mit dem c-term [A] oder dem mid mLAM $\alpha$ 3 Protein [B] immunisiert wurden, festgestellt werden. Dargestellt sind Bilder von je zwei Mäusen pro Gruppe, bei denen ein Fellverlust festgestellt werden konnte. Deutlich an den klinischen Bildern sind auch die Läsionen der Augen zu sehen, welche mit Pfeilen gekennzeichnet sind.

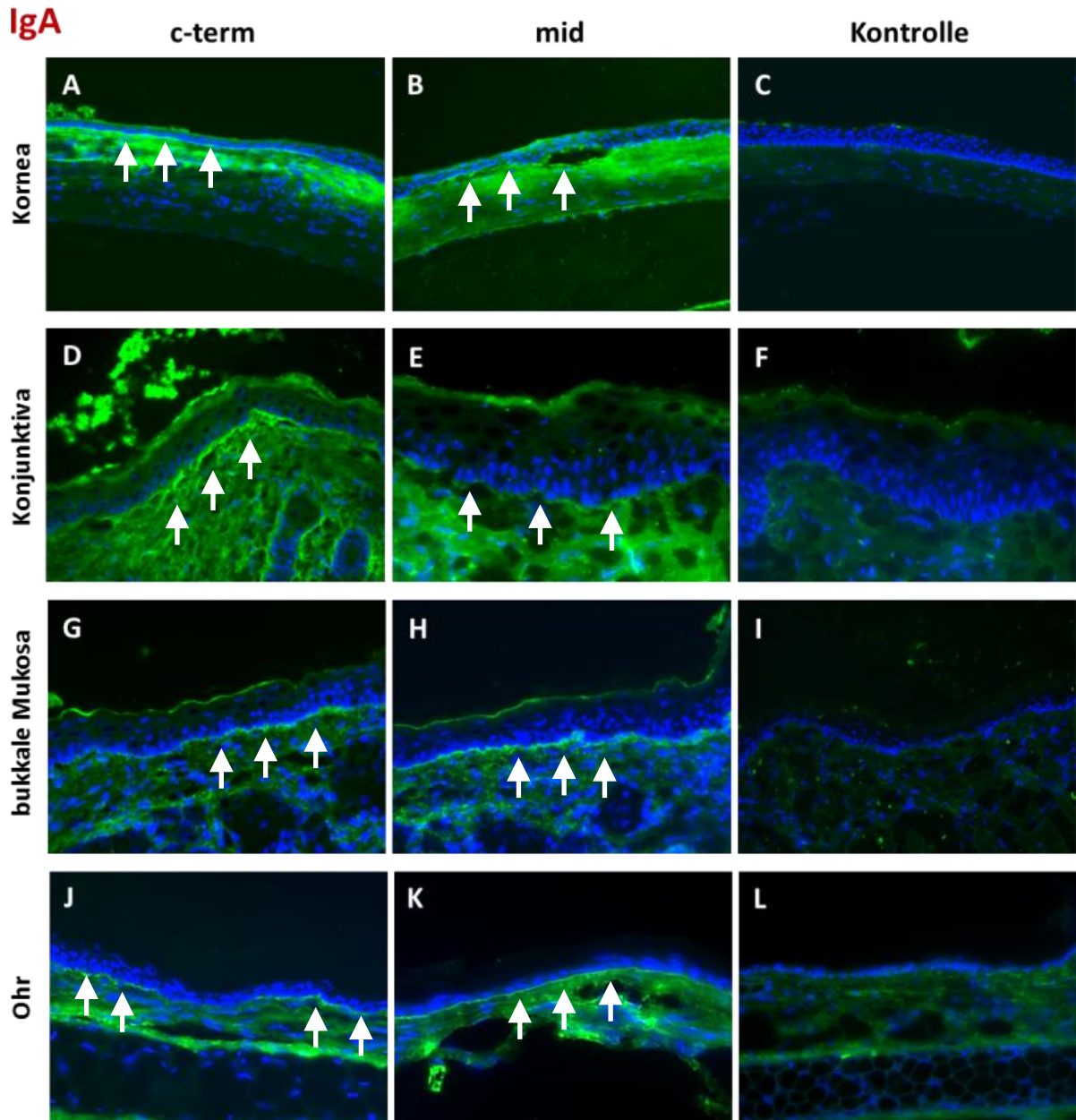
Bei der Wiederholung der Immunisierungsstrategie konnten nach 14 Wochen in SJL/J Mäuse nur geringe Krusten und Erosionen an den Ohren und im Bereich der Konjunktiva rund um die Augen, festgestellt werden (Abbildung 41 A und B).



**Abbildung 41: SJL/J Mäuse in Woche 14, welche mit c-term bzw. mid mLAM $\alpha$ 3 immunisiert wurden.** Die Fotos der Mäuse zeigen minimale Krusten und Erosionen an den Ohren. Dies waren die einzigen Auffälligkeiten, welche kutan bis zum Versuchsende zu verzeichnen waren. Dargestellt sind Bilder von je 2 Mäusen pro Gruppe, bei denen Auffälligkeiten der Haut festgestellt werden konnten.

### 3.5.3 Direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Haut, Mundschleimhaut und Konjunktiva

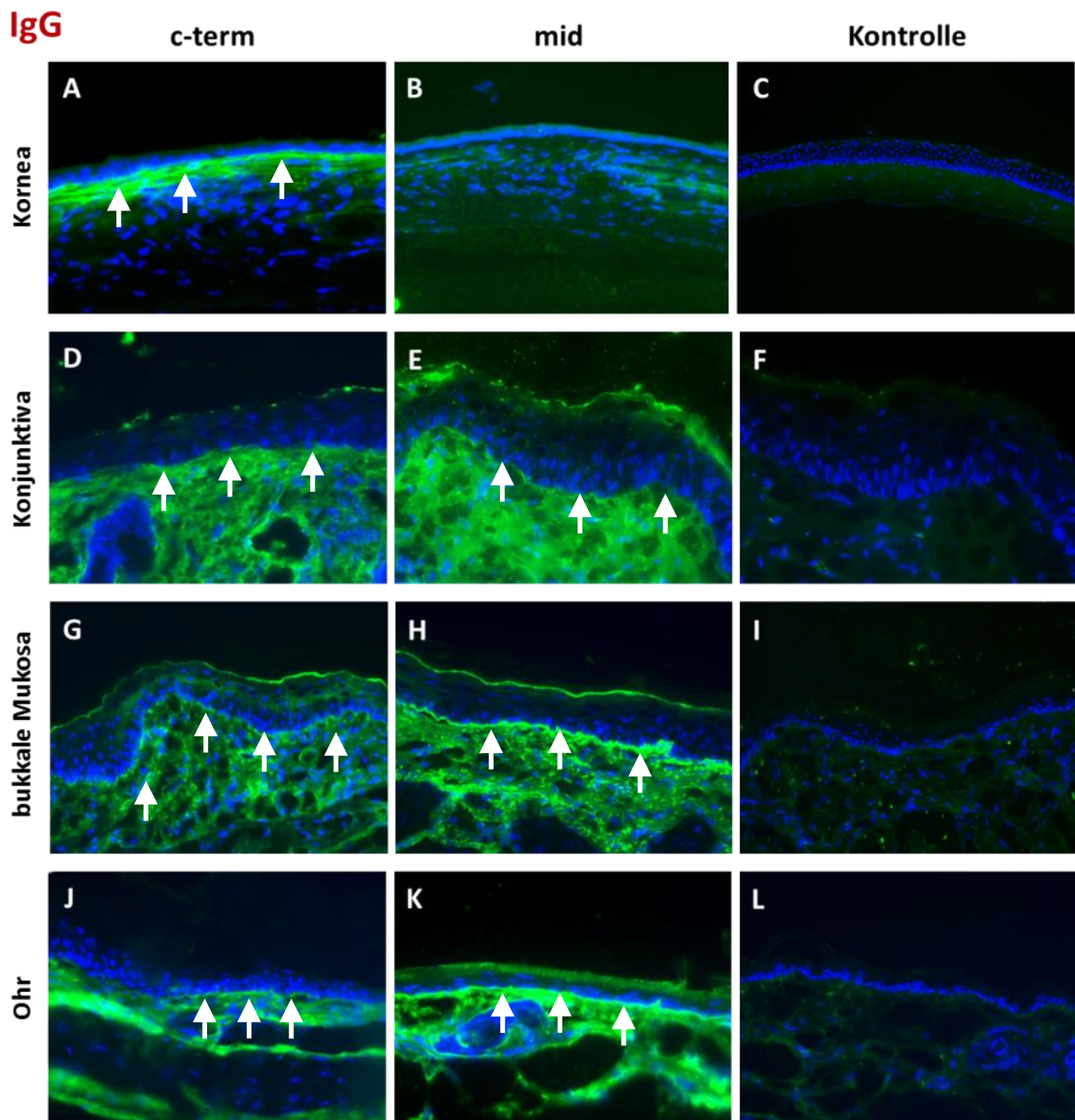
Um zu überprüfen, ob die Mäuse tatsächlich Autoantikörper aufgrund der injizierten Proteine gebildet haben, welche an der dermo-epidermalen Junktionszone binden, wurden Kryoschnitte verschiedener Gewebe mit Antikörpern gegen murines IgA, IgG und den murinen Komplementfaktor 3 (C3) inkubiert und mittels direkter Immunfluoreszenz detektiert. Alle gefärbten Schnitte und Gewebe, welche von sowohl c-term (Abbildung 42, A, D, G, J), als auch mid mLAM $\alpha$ 3 (Abbildung 42, B, E, H, K) immunisierten Mäusen stammten, zeigten lineare IgA Ablagerungen entlang der Basalmembran, wohingegen bei Proben von nur mit dem Adjuvanz immunisierten Mäusen (Abbildung 42, C, F, I, L) keine Fluoreszenz in diesem Bereich zu sehen ist.



**Abbildung 42: Direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Biopsien mit Ablagerungen von IgA entlang der Basalmembranzzone.** Kryoschnitte periläsionaler Biopsien der Kornea [A-C, n=4 SJL/J c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisiert, n=2 Kontrolle], der Konjunktiva [D-F, n=6 pro Mauslinie und Protein], der bukkalen Mukosa [G-I, n=6 pro Mauslinie und Protein] und von Ohren von Mäusen, welche mit dem c-term [A,D,G,J] oder dem mid [B,E,H,K] mLAM $\alpha$ 3 Protein immunisiert wurden, sowie von Kontrollmäusen die lediglich das Adjuvanz erhielten [C,F,I,L, n=3 pro Mauslinie], wurden mit Anti-Maus IgA FITC (grün) angefärbt und Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt. Alle Gewebeproben, unabhängig ob c-term oder mid mLAM $\alpha$ 3 immunisiert, zeigten eine lineare IgA Deposition entlang der Basalmembranzzone (Pfeile), welche bei den Kontrollgeweben nicht zu sehen ist. Abgebildet ist je ein repräsentatives Bild pro Gruppe.

IgG Autoantikörper gegen die Basalmembranzzone konnten bei allen Mäusen, welche mit c-term oder mid mLAM $\alpha$ 3 immunisiert wurden in allen Gewebeproben der Ohren, der bukkalen Mukosa und der Konjunktiva nachgewiesen werden (Abbildung 43 G-H und J-K). Bei der Kornea waren drei von vier der c-term mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Gruppe positiv in der direkten Immunfluoreszenz für IgG (Abbildung 43 A). Zwei von vier Mäusen, der mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Gruppe, waren negativ für

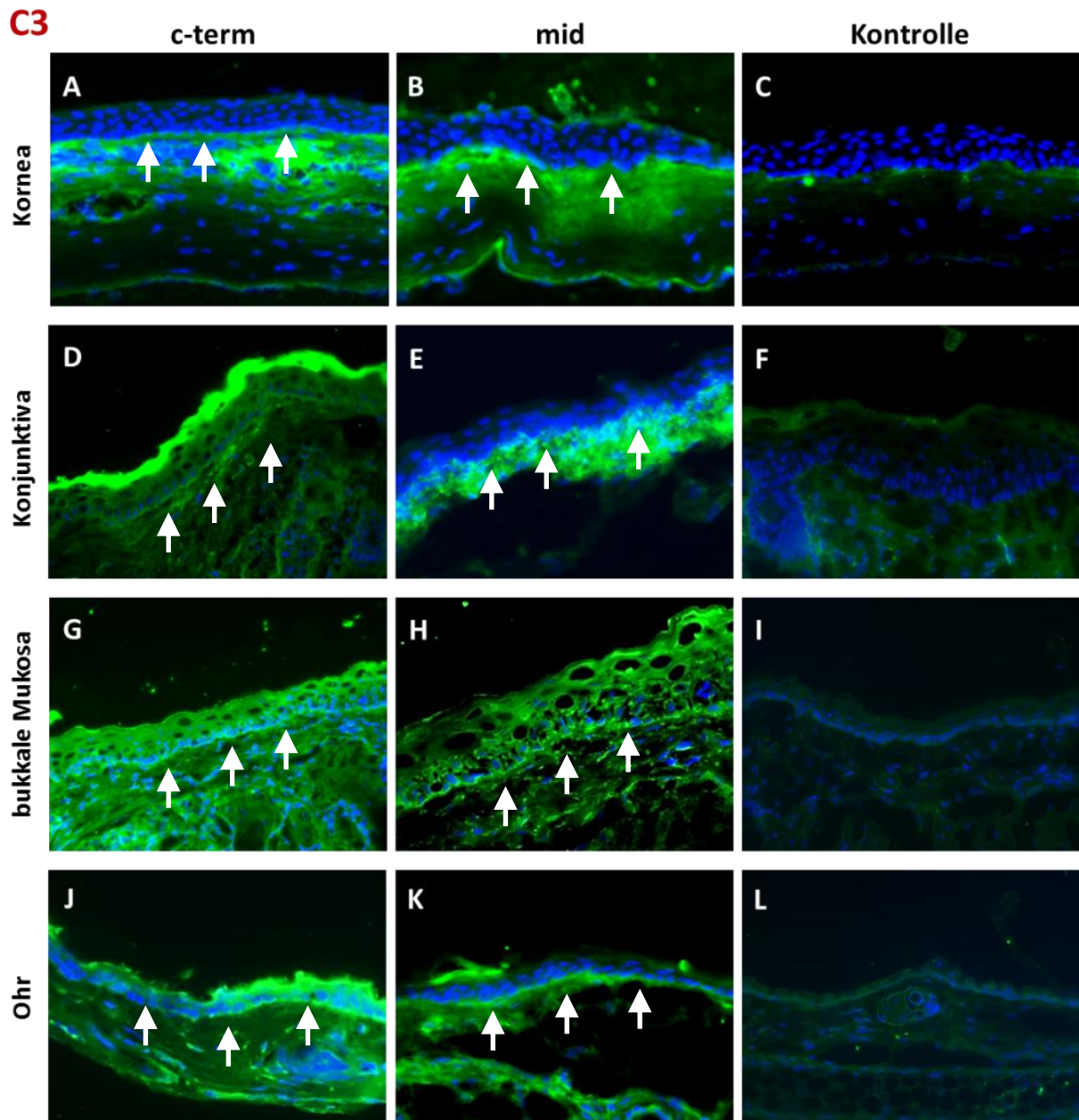
eine IgG Ablagerung an der Kornea (Abbildung 43 B). Alle Gewebeproben der Kontrollmäuse waren negativ.



**Abbildung 43: Direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Biopsien mit Ablagerung von IgG entlang der Basalmembranzone.** Kryoschnitte periläsionaler Biopsien der Kornea [A-C, n=4 SJL/J c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisiert, n=2 Kontrolle], der Konjunktiva [D-F, n=6 pro Mauslinie und Protein], der bukkalen Mukosa [G-I, n=6 pro Mauslinie und Protein] und von Ohren von Mäusen, welche mit dem c-term [A,D,G,J] oder dem mid [B,E,H,K] mLAM $\alpha$ 3 Protein immunisiert wurden, sowie von Kontrollmäusen die lediglich das Adjuvanz erhielten [C,F,I,L, n=3 pro Mauslinie], wurden mit Anti-Maus IgG FITC (grün) angefärbt und Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt. Gewebeproben der Konjunktiva, der bukkalen Mukosa und vom Ohr zeigten in allen Färbungen, unabhängig ob c-term oder mid mLAM $\alpha$ 3 immunisiert, eine lineare IgG Deposition entlang der Basalmembranzone (Pfeile), welche bei den Kontrollgeweben nicht zu sehen ist. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Bild.

Ablagerungen von Komplementfaktor 3 (C3) an der Basalmembranzone konnten in allen Gewebeproben der c-term (Abbildung 44, A, D, G, J) und der mid mLAM $\alpha$ 3 (Abbildung 44, B, E, H, K)

immunisierten Mäuse, nicht aber in den Geweben der Kontrollgruppe (Abbildung 44, C, F, I, L) gefunden werden.

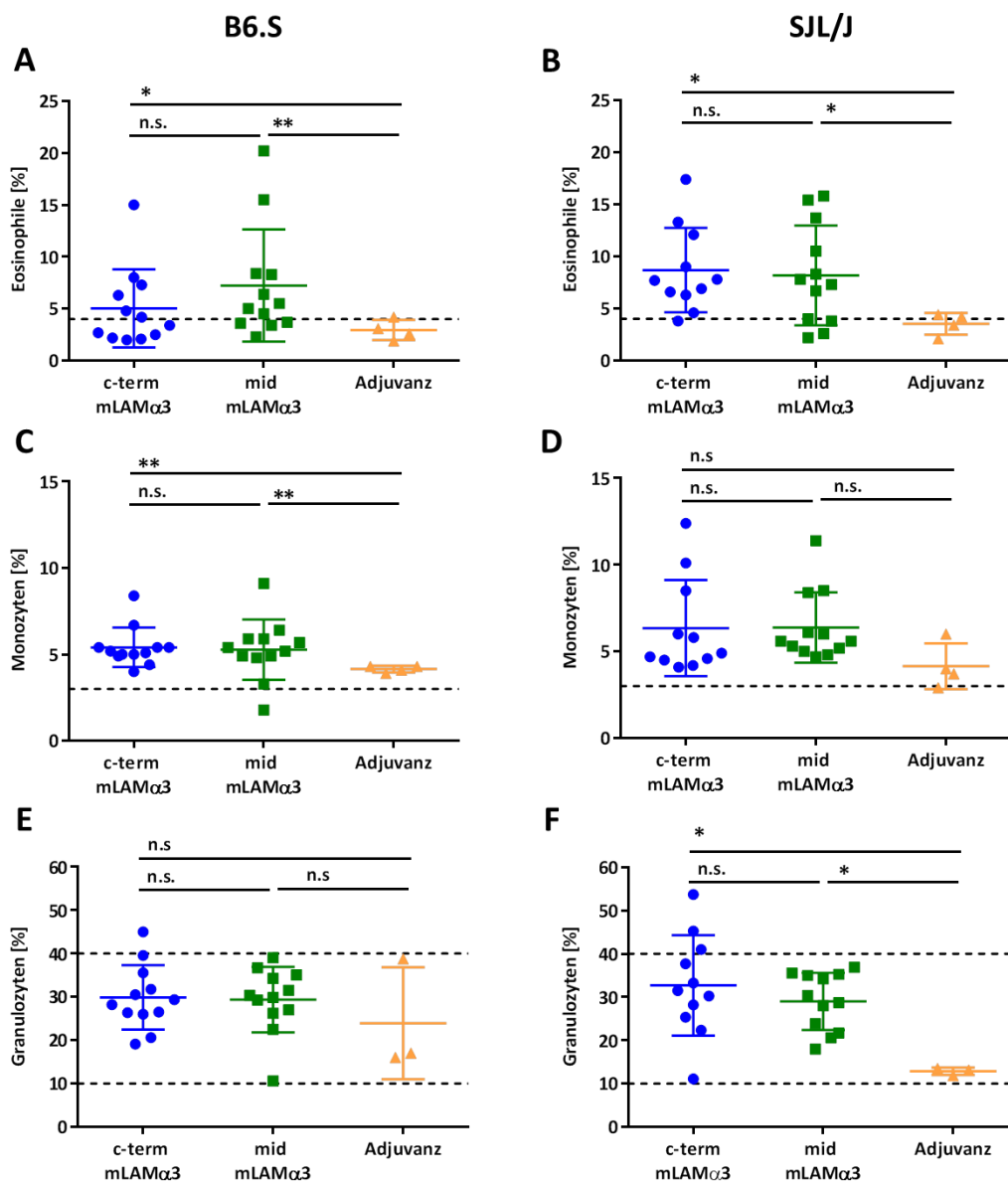


**Abbildung 44: Direkte Immunfluoreszenz periläsionaler Biopsien mit Ablagerung von C3 entlang der Basalmembranzone.** Kryoschnitte periläsionaler Biopsien der Kornea [A-C, n=4 SJL/J c-term und mid LAM $\alpha$ 3 immunisiert, n=2 Kontrolle], der Konjunktiva [D-F, n=6 pro Mauslinie und Protein], der bukkalen Mukosa [G-I, n=6 pro Mauslinie und Protein] und von Ohren von Mäusen, welche mit dem c-term [A,D,G,J] oder dem mid [B,E,H,K] LAM $\alpha$ 3 Protein immunisiert wurden, sowie von Kontrollmäusen die lediglich das Adjuvanz erhielten [C,F,I,L, n=3 pro Mauslinie], wurden mit Anti-Maus C3 FITC (grün) angefärbt und Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt. Alle Gewebeprobe, unabhängig ob c-term oder mid LAM $\alpha$ 3 immunisiert, zeigten eine lineare C3 Deposition entlang der Basalmembranzone (Pfeile), welche bei den Kontroll-Geweben nicht zu sehen ist. Abgebildet ist je ein repräsentatives Bild pro Gruppe.

### 3.5.4 Periphere eosinophile Granulozyten

Um zu untersuchen, ob sich die in den Geweben gefundene Entzündungsreaktion auch im peripheren Blut widerspiegelt, wurden EDTA-Blutproben am Ende der 14. Woche von den Mäusen

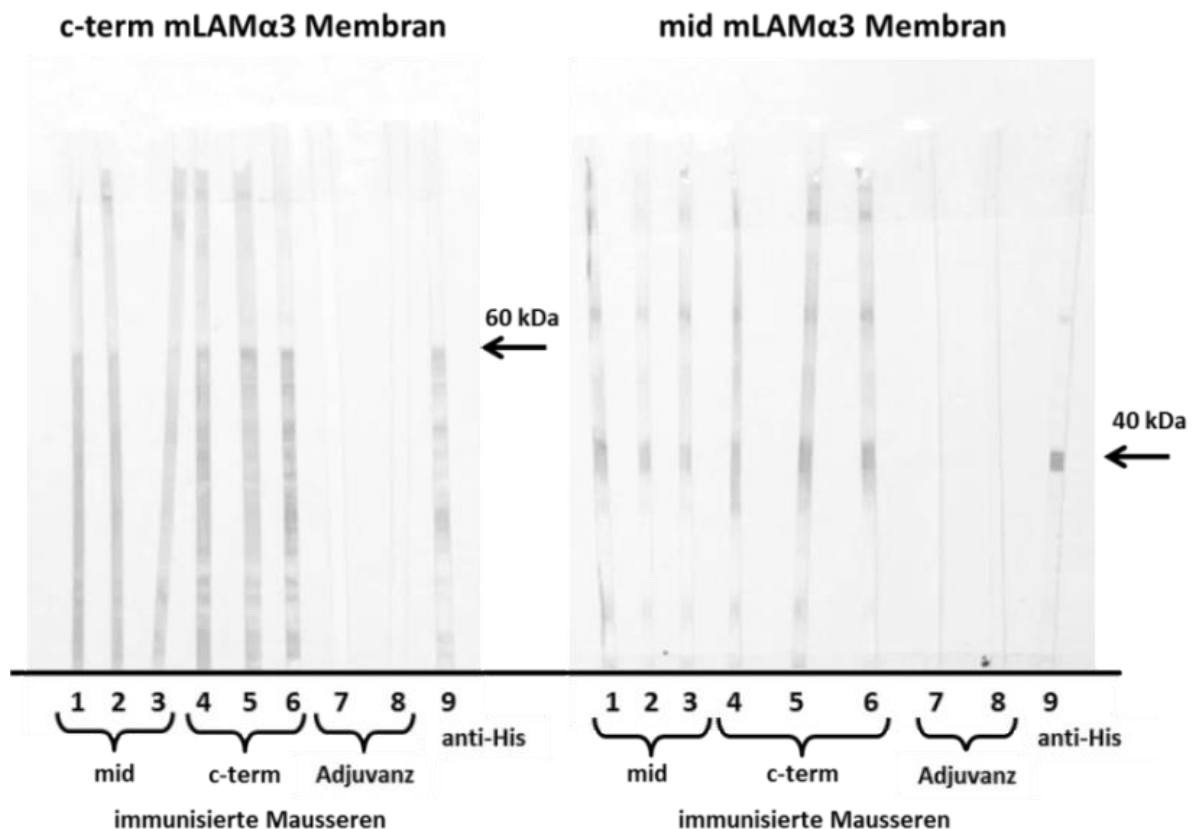
genommen und ein differenzielles Blutbild erstellt. Eosinophile waren in beiden untersuchten Mausstämmen bei den mit mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen erhöht (Abbildung 45 A, B). Unterschiede waren zwischen den beiden Mausstämmen für Monozyten und Granulozyten zu erkennen. Während Monozyten nur in den B6.S Mäusen prozentual mehr im Blut vorgefunden wurden und nicht bei den SJL/J Mäusen (Abbildung 45 C, D), so verhielt sich dies bezüglich der Granulozyten umgekehrt. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der mLAM $\alpha$ 3 Immunisierungs- und der Kontroll-Gruppe nur in den SJL/J Mäusen (Abbildung 45 E, F). Es konnte kein Unterschied zwischen c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen im differenziellen Blutbild festgestellt werden.



**Abbildung 45: Differenzielles Blutbild von mit c-term und mit mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten B6.S und SJL/J Mäusen und Mäusen, die nur das Adjuvanz erhalten hatten in Woche 14.** Die gestrichelten Linien geben die Grenzen für normale Blutwerte von C57BL/6J Mäusen als Richtwert an. One-way ANOVA mit Mann Whitney Test \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , n.s. = nicht signifikant.

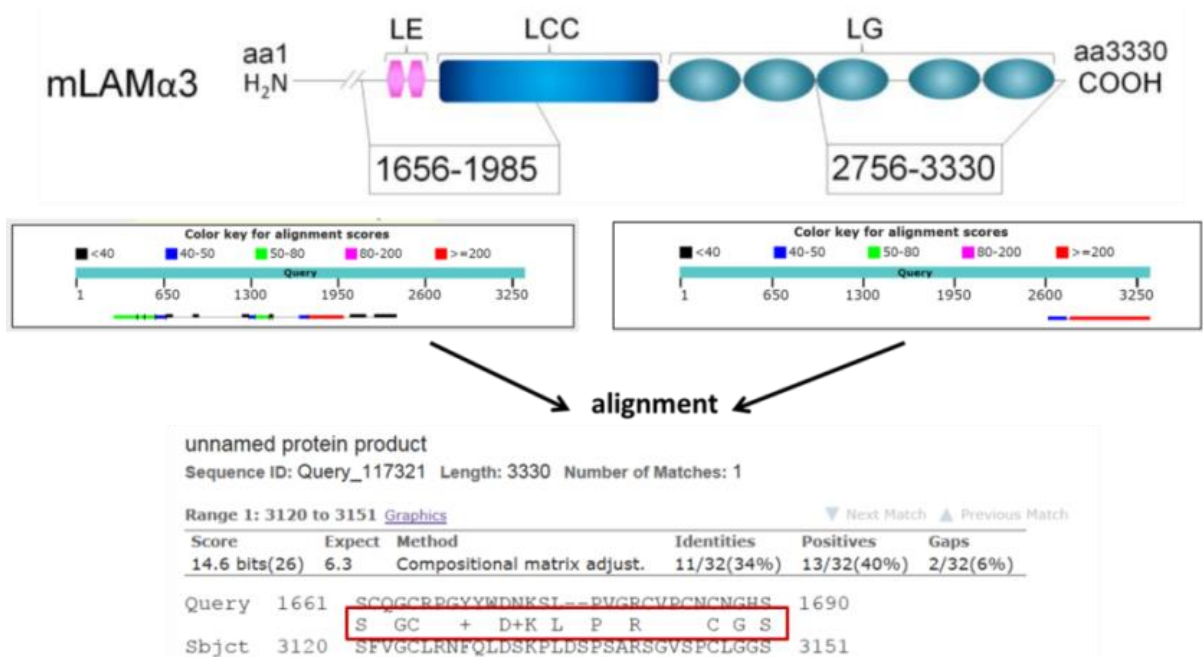
### 3.5.5 Anti-c-term mLAM $\alpha$ 3 und Anti-mid mLAM $\alpha$ 3 IgG im Serum

Seren von mit c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen wurden im Western-Blot auf Ihre Reaktivität mit den jeweiligen Proteinen getestet. Hierbei sollte das jeweils nicht zur Immunisierung genutzte Protein als Negativkontrolle dienen sollte. Überraschenderweise konnte jedoch für alle Seren von c-term immunisierten Mäusen auch eine Reaktivität mit dem mid mLAM $\alpha$ 3 Protein detektiert werden und *vice versa* (Abbildung 46).



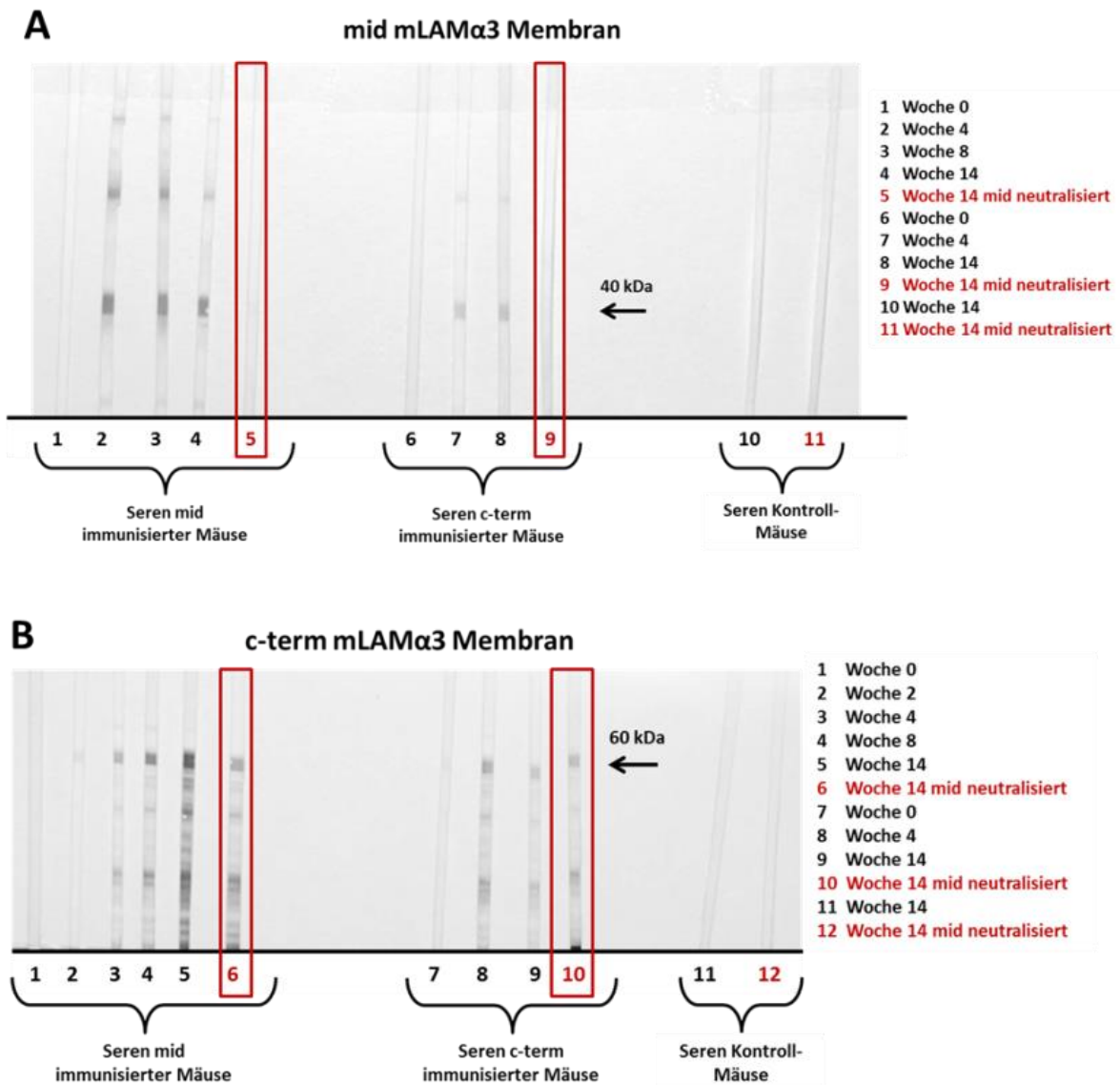
**Abbildung 46: Western-Blot der Seren von c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen in Woche 14.** Jeweils drei Seren der mid [1-3] und c-term mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäuse [4-6] und zwei Seren von Mäusen, die nur mit dem Adjuvanz immunisiert wurden [7-8], wurden im Western-Blot auf ihre Reaktivität gegen das injizierte und das nicht-injizierte mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragment getestet. Als Kontrolle diente ein Anti-His Antikörper [9] (Pfeile). Alle getesteten Seren reagierten sowohl mit dem Protein mit dem immunisiert wurde, als auch mit dem Protein mit dem nicht immunisiert wurde.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre eine Sequenzhomologie zwischen dem c-term und dem mid mLAM $\alpha$ 3 Proteinen, so dass die Immunisierung mit c-term mLAM $\alpha$ 3, zur Produktion von Antikörpern führte, welche auch Epitope des mid mLAM $\alpha$ 3 Protein erkennen können. Daher wurde ein *Alignment* der Sequenzen mittels BLAST durchgeführt, um Sequenzhomologien zu identifizieren. Demnach existiert ein Abschnitt von 32 Aminosäuren zwischen den beiden c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 Protein-Sequenzen, in dem 11 Aminosäuren identisch und weitere 2 Aminosäuren strukturanalog zueinander sind (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Alignment der c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragmente mittels BLAST zeigt eine Sequenzhomologie von 11 Aminosäuren über einen Abschnitt von insgesamt 32 Aminosäuren.** Dargestellt ist die mLAM $\alpha$ 3 Kette mit dem mid mLAM $\alpha$ 3 Fragment (aa 1656-1985) und dem c-term mLAM $\alpha$ 3 Fragment (aa 2756-3330), welche rekombinant hergestellt und zur Immunisierung der Mäuse verwendet wurden. Das Alignment mittels der online Datenbank BLAST ergab 11 Aminosäuren innerhalb eines Abschnittes von 32 Aminosäuren, bei denen eine Sequenzhomologie zwischen den beiden Fragmenten vorliegt (roter Kasten).

Um zu überprüfen, ob es wirklich durch eine Sequenzhomologie zur Bildung von c-term mLAM $\alpha$ 3 reaktiven Autoantikörpern in mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen gekommen ist (und umgekehrt), wurden mid mLAM $\alpha$ 3 spezifische Antikörper aus den Seren von mid und c-term mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen durch Inkubation mit dem mid mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragment neutralisiert (und umgekehrt, nicht gezeigt). Sollte eine Sequenzhomologie ursächlich für die Kreuzreaktivität der Autoantikörper sein, wäre zu erwarten, dass die jeweiligen Autoantikörper-Reaktivitäten durch Präadsorption mit dem jeweils anderen Antigen, neutralisiert werden. Beide eingesetzten Seren verloren ihre Reaktivität gegen das mid mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragment durch den Neutralisationsvorgang mit dem mid mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragment (Abbildung 48 A, Streifen 5 und 9). Seren von sowohl c-term, als auch mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mäusen behielten allerdings ihre Reaktivität gegen c-term mLAM $\alpha$ 3, auch nachdem die Antikörper gegen mid mLAM $\alpha$ 3 neutralisiert wurden (Abbildung 48 B, Streifen 6 und 10). Somit wird eine Kreuzreaktivität aufgrund von Sequenzhomologie der beiden Proteine als unwahrscheinlich erachtet. Die zugehörigen Kontrollen blieben wie erwartet negativ (Abbildung 48 A, Streifen 9-11 und B Streifen 10-12). Dieser Versuch wurde insgesamt mit 5 verschiedenen Seren je Mauslinie und auch mit Neutralisation des c-term mLAM $\alpha$ 3 Fragmentes, mit korrespondierendem Ergebnis, durchgeführt.

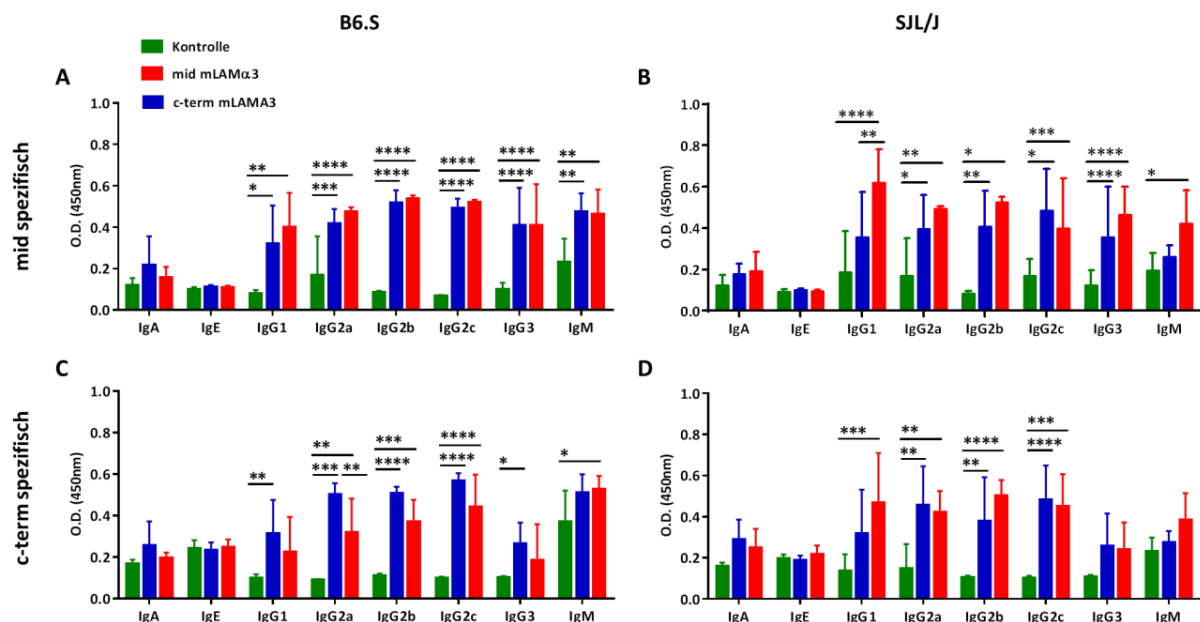


**Abbildung 48: Western-Blot von c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Mausseren mit und ohne Neutralisation des mid mLAM $\alpha$ 3 Proteins.** Seren einer mid [A, 1-5 und B 1-6] und einer c-term mLAM $\alpha$ 3 immunisierten Maus [A, 6-9 und B 7-9], sowie das Serum einer Maus, die lediglich mit dem Adjuvanz immunisiert wurde [A, 10 und B 11], wurden im Western-Blot auf Reaktivität gegen das injizierte und das nicht-injizierte mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragment getestet. Zusätzlich wurden die Seren mit dem mid Protein adsorbiert und erneut getestet (rote Markierungen). Seren von Mäusen beider Immunisierungsgruppen verloren durch den Neutralisationsvorgang mit dem mid mLAM $\alpha$ 3 Protein ihre Reaktivität gegen das mid mLAM $\alpha$ 3 Protein [A, 5 und 9], nicht aber gegen das c-term mLAM $\alpha$ 3 Protein [B, 6 und 10].

### 3.5.6 Immunglobulin Isotypen und IgG-Subklassen der Autoantikörper

Die Isotypen der Autoantikörper von erkrankten SHP Mäusen wurden mittels ELISA bestimmt. Hierzu wurden Platten mit c-term und mid mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragmenten beschichtet, mit den Mausseren inkubiert und mittels spezifischer Zweitantikörper die Isotypen und IgG-Subklassen der Autoantikörper detektiert. Im Einklang mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.5.5 konnte auch mittels ELISA für alle Seren von c-term immunisierten Mäusen eine Reaktivität mit dem mid mLAM $\alpha$ 3 Protein detektiert werden und *vice versa* (Abbildung 49). Es konnte keine Präferenz der Autoantikörper für das Protein, welches zur Immunisierung der getesteten Gruppe genutzt wurde, nachgewiesen werden. Auch konnten innerhalb der mid mLAM $\alpha$ 3 spezifischen Autoantikörper des

IgG-Isotypen keine vorherrschende IgG Subklasse identifiziert werden (Abbildung 49 A-B). Im Vergleich dazu waren Autoantikörper, welche spezifisch das c-term mLAM $\alpha$ 3 Protein erkannten und von SJL/J Mäusen gebildet wurden, nicht (Abbildung 49 D), oder im Vergleich zu den anderen IgG Subklassen vermindert (Abbildung 49 C), von der IgG3 Subklasse. IgM-Autoantikörper konnten in den Seren nur bei SJL/J Mäusen nicht spezifisch für c-term mLAM $\alpha$ 3 nachgewiesen werden (Abbildung 49 D). Für mid mLAM $\alpha$ 3 immunisierte SJL/J und für B6.S Mäuse unabhängige vom verwendeten Proteinfragment zeigte sich IgM als statistisch signifikant erhöht in den getesteten Seren, im Vergleich zu den Seren der mit dem Adjuvant immunisierten Mäuse. Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgA und IgE konnten gegen kein Fragment unabhängig vom Mausstamm nachgewiesen werden (Abbildung 49 A-D).



**Abbildung 49: Bestimmung der Autoantikörper Isotypen und IgG-Subklassen im aktiven SHP-Mausmodell mittels ELISA.** Seren von mid- (rote Balken) und c-term (blaue Balken) mLAM $\alpha$ 3-immunisierten Mäusen, sowie Seren von Mäusen, die lediglich mit dem Adjuvant immunisiert wurden (grüne Balken), wurden im ELISA auf Reaktivität ihrer Autoantikörper mLAM $\alpha$ 3 Fragment Tsotypen und IgG-Subklassen gegen das mid [A, B] und das c-term mLAM $\alpha$ 3 [C, D] Proteinfragment getestet (n=6 pro Gruppe). Die Seren der Mäuse des aktiven SHP-Mausmodells reagierten sowohl mit dem mLAM $\alpha$ 3 Fragment mit dem immunisiert wurde als auch mit dem Fragment mit dem nicht immunisiert wurde. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. \*\*\*\*p<0,0001.

## 4. Diskussion

Das SHP ist eine Autoimmundermatose mit ausgeprägter Morbidität und erhöhter Mortalität (Holtsche *et al.*, 2018). Aufgrund der schlechten Probenlage und der Notwendigkeit SHP Patienten sofort zu behandeln, bilden Mausmodelle die Grundlage zur Erforschung neuer Therapieoptionen und zur Entschlüsselung der Pathogenese. Hierzu wurde erstmals 2017 von Heppe *et al.* ein Mausmodell in adulten Mäusen publiziert, welches die Hauptmerkmale der Erkrankung widerspiegelt (Heppe *et al.*, 2017). Mit Hilfe dieses passiven Mausmodells hat die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen adressiert:

- 1) Entwicklung eines klinischen Scoring-Systems für das neu etablierte passive Mausmodell des SHP
- 2) Testung des passiven SHP-Mausmodells mit einer etablierten Therapie, welche auch bei SHP Patienten angewandt wird, sowie die Testung innovativer Therapien mit vergleichbar weniger schweren Nebenwirkungen
- 3) Entwicklung eines aktiven Mausmodells. Dieses Modell hat den Vorteil gegenüber dem passiven Modell, das die Mäuse murine Antikörper gegen Laminin 332 entwickeln und über einen längeren Zeitraum ohne weitere Interventionen erkrankt bleiben. Dieses Modell eignet sich daher sehr gut, um neue Therapieoptionen für das SHP zu evaluieren.

### 4.1 Bewertungsverfahren für das Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell

SHP Patienten zeigen klinisch ein heterogenes Bild. Etwa 85% der SHP Patienten weisen Läsionen innerhalb des Mundes auf, gefolgt von 65%, bei denen die Konjunktiva beteiligt ist. Die Haut ist mit 25-30%, die Nasenhöhle mit etwa 20%, Pharynx und Anogenitalregion mit je 20% und Larynx und Ösophagus mit etwa 10% bei SHP Patienten betroffen (Holtsche *et al.*, 2018). Die wesentlichen klinischen und immunpathologischen Charakteristika von SHP Patienten können in dem neu etabliertem passivem Transfermodell des Anti-Laminin 332 SHP in adulten Mäusen abgebildet werden (Heppe *et al.*, 2017). Bei Patienten kann die Schwere des Krankheitsverlaufes mit dem *Mucous Membrane Pemphigoid Disease Activity Index* (MMPDAI) eingestuft werden (Murrell *et al.*, 2015). Gewertet werden beim MMPDAI neben Hautläsionen der verschiedenen Körperpartien, auch die Kopfhaut, sowie die Augen und alle anderen Schleimhäute nach ihrer jeweiligen Anzahl an Erosionen/Läsionen und möglichen Schädigungen wie Narbenbildung, Erytheme oder Hyperpigmentation.

Eine direkte Anwendung des MMPDAI auf das passive SHP-Mausmodell war aufgrund der anatomischen Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen nicht möglich. Daher wurde im ersten

Teil dieser Arbeit ein Bewertungssystem entwickelt, um den klinischen Befall der erkrankten Mäuse zu quantifizieren. Die betroffene Körperoberfläche, die oralen Läsionen und die konjunktivale Spaltbildung, sowie der Verlust an Körpergewicht, wurden hierzu als Hauptbeteiligungen definiert. Das prozentuale Bewerten der betroffenen Körperoberfläche wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Mausmodellen eingesetzt (Bieber *et al.*, 2017), und bietet somit die Möglichkeit die Schwere der Hautläsionen mit anderen passiven Mausmodellen blasenbildender Autoimmunerkrankungen wie der EBA (Chiriac *et al.*, 2007) oder dem BP (Schulze *et al.*, 2014) vergleichen zu können. Wie auch bei SHP Patienten sind beim Mausmodell die häufigsten betroffenen Körperpartien der Kopf, Nacken und der obere Körperrumpf (Williams *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu menschlichen Patienten sind beim passiven SHP-Mausmodell dabei dominant die Ohren der Mäuse von Krusten und Läsionen befallen. Laut einer Studie von Amber *et al.* aus 2016 entspricht der Anteil an Anti-Laminin 332 SHP Patienten, welcher pharyngeale Läsionen zeigen etwa 93% (Amber *et al.*, 2016). Orale Läsionen konnten bei 100% der Mäuse mittels endoskopischer Untersuchungen des Mundinnenraumes nachgewiesen werden (Heppe *et al.*, 2017). Der hier, als beste Möglichkeit zur Quantifizierung, etablierte klinische Score durch Zählen von betroffenen Mundvierteln im Mausmodell hat den Vorteil, dass er leicht praktikabel ist. Der Nachteil besteht darin, dass er keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Schwere der oralen Läsionen zulässt, da er die Anzahl der Veränderungen und deren relative Größe nicht berücksichtigt. Dennoch haben das Validierungsexperiment, sowie die folgenden Versuche mit dem Mausmodell gezeigt, dass sich diese Quantifizierungsmethode eignet, um Heilungseffekte aufzudecken.

Bei SHP Patienten sind zur Einschätzung der Schwere der okulären Beteiligung verschiedenste Verfahren publiziert (Lee *et al.*, 2018). Beim MMPDAI wird die 2013 von Munyangango *et al.* veröffentlichte Methodik angewandt (Munyangango *et al.*, 2013). Hierbei wird das Auge in vier Abschnitte eingeteilt und Erythemen auf einer Skala von 1-4 pro Augenviertel gescort. Mittels dieser Methode kann das Ausmaß der Entzündung am Auge auch von Nicht-Ophthalmologen quantifiziert werden. Zuletzt etablierten Tepelus *et al.* in 2017 die *in-vivo*-Konfokalmikroskopie beim okulären SHP Patienten und konnten mit ihrer Methodik herausfinden, dass bei Patienten eine erhöhte Dichte epithelialer dendritischer Zellen in der Konjunktiva von Patienten zu finden ist (Tepelus *et al.*, 2017). Aufgrund der anatomischen Unterschiede zwischen menschlichen Augen und Mausaugen hätte sich nur die letzte Methodik als anwendbar für das Mausmodell erwiesen, da Rötungen und Erytheme bei den Mäusen nicht ohne weiteres nachgewiesen werden können. Des Weiteren ist die Konjunktiva bei Mäusen im Gegensatz zum Menschen anders lokalisiert. Ihr bulbärer Anteil bis zum Limbus ist bei geöffnetem Auge der Maus nur an den äußersten Grenzen des Auges auszumachen (Ramos *et al.*, 2013). Eine *in-vivo*-Konfokalmikroskopie war in unserem Fall jedoch logistisch nicht ausführbar. Daher wurden Histologien der Konjunktiven H&E gefärbt und die Schwere der „okulären Beteiligung“

über die Länge der Spaltbildung definiert. Das hier etablierte Bewertungsverfahren wurde 2017 in der Publikation von Heppe und Tofern *et al.* angewandt (Heppe *et al.*, 2017). Hier konnte gezeigt werden, dass im passiven SHP-Mausmodell der Gewichtsverlust mit dem Score der oralen Läsionen korreliert. In früheren Experimenten mit dem Mausmodell von Eva Nina Heppe, einer Doktorandin in der Abteilung Translation des LIED, mussten aufgrund des Gewichtsverlustes immer wieder Mäuse aus den Versuchen genommen werden, da diese mehr als 20% ihres Gewichtes im Vergleich zum Ausgangsgewicht verloren hatten. Dies ist aus Tierschutzgründen als definitives Abbruchkriterium bei den Experimenten definiert. Der Gewichtsverlust resultierte der Datenlage nach aus den oralen und höchstwahrscheinlich auch aus den ösophagealen Läsionen. In den sterilen Käfigen der Tierhaltung zu Lübeck wird den Mäusen das Futter von oben über Gitter dargeboten. Die Mäuse müssen sich zum Fressen strecken und den Kopf in den Nacken legen. Es ist einfach sich vorzustellen, dass dies bei oro-pharyngealen und eventuell auch ösophagealen Beeinträchtigungen schmerzhaft für die Maus ist. Daher wurden den Mäusen in allen folgenden Experimenten, zur leichteren Nahrungsaufnahme, (eingeweichte) Futterpellets in den Käfig gelegt. Diese Maßnahme führte dazu, dass es zu keinem wesentlichen Gewichtsverlust bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen kam. Um zuletzt, wie bei dem MMPDAI, eine Aussage über die Gesamtkrankheitsaktivität machen zu können, wurden alle Charakteristika mittels eines Multiplikators individuell auf die betroffene Körperoberfläche angepasst und zu einem Gesamtscore addiert. So konnte das angestrebte Ziel erreicht werden, alle entwickelten Teilscores mit jeweils der gleichen Gewichtung in einen Gesamtscore zusammenzufassen und einen Gewichtsverlust von mehr als 20% bei den Mäusen zu vermeiden. Das Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig entwickelt, da nach eingehender Literaturrecherche keine anderen Mausmodelle mit oralen Läsionen identifiziert werden konnten.

Die finale Validierung dieser Quantifizierungsmethodik, welche signifikante Unterschiede der einzelnen Hauptcharakteristika über die Zeit bestätigte, bildete die Grundlage für die folgenden Experimente und die Möglichkeit Therapieoptionen im passiven SHP-Mausmodell testen und verifizieren zu können.

#### **4.2 Therapieoptionen im Antikörpertransfer Schleimhautpemphigoid-Mausmodell**

Um das Modell nach der Entwicklung des Scoring Systems weiter zu charakterisieren, sollte überprüft werden, ob das Bewertungsverfahren klinische Effekte aufdecken und somit neue Therapieoptionen auf einen möglichen Behandlungserfolg eruieren kann. Für die Behandlung von SHP Patienten gibt es verschiedene Therapieoptionen. Neben Kortikosteroiden ist Dapson das am häufigsten angewandte Medikament bei milder und moderater Erkrankungen (Hegarty *et al.*, 2010; Holtsche *et al.*, 2018). Als *proof-of-concept* Versuch sollte daher Dapson im passiven SHP-Mausmodell eingesetzt werden. Die

Gabe von Dapson konnte im Mausmodell sowohl die oralen Läsionen als auch die Hautläsionen signifikant reduzieren, womit die konzeptionelle Eignung des Modelles zur Testung neuer Therapieoptionen erwiesen wurde. Anders als auf die oralen und die Hautläsionen wirkte Dapson nicht auf die okulären Läsionen. Bei der humanen Erkrankung wird bei milden okulären Läsionen durchaus Dapson eingesetzt, jedoch in aller Regel in Kombination mit systemischen Kortikosteroiden (Chan *et al.*, 2002; Dart, 2017; Georgoudis *et al.*, 2019). Daher ist der Rückschluss eines positiven Behandlungseffektes von Dapson auf okuläre Läsionen bei Patienten mit SHP schwer zu erbringen.

Dapson (4,4'-Diaminodiphenylsulfon) ist ein Anilinderivat, das zur Gruppe der synthetischen Sulfone gehört und wurde erstmals 1908 von E. Fromm in Deutschland synthetisiert. 1937, kurz nach der Entdeckung von Sulfonamiden als Antibiotika konnte eine entzündungshemmende Wirkung von Dapson bei experimentell induzierten Infektionen in Mäusen nachgewiesen werden (Pradhan *et al.*, 2016). Die duale Funktion von Dapson als antibiotischer/antiprotozoaler und antientzündlicher Wirkstoff findet seine Anwendung sowohl bei Infektionskrankheiten wie Malaria und Lepra, als auch bei dermatologischen Erkrankungen wie den blasenbildenden Autoimmundermatosen, der Linearen IgA-Dermatose oder der *Dermatitis herpetiformis Duhring* (Wozel und Blasum, 2014). Letzteren ist jedoch in aller Regel gemein, dass die Gewebeentzündungen hauptsächlich durch die Rekrutierung von Neutrophilen und Eosinophilen vermittelt werden (Wozel und Blasum, 2014). Als antientzündliches Mittel wirkt Dapson zum Beispiel über die Hemmung der Myeloperoxidase. Neutrophile Granulozyten können durch den sogenannten *respiratory burst* Bakterien abtöten, indem sie Wasserstoffperoxid in Hypochlorsäure mittels des Enzyms Myeloperoxidase umwandeln. Dapson hemmt dieses Enzym reversibel und verhindert die Anreicherung von Hypochlorsäure, wodurch Gewebeschäden während einer Entzündungsreaktion reduziert werden können (Bozeman *et al.*, 1992). Des Weiteren übt Dapson die Hemmung der Neutrophilenfunktion über die Freisetzung von Leukotrienen B<sub>4</sub> und C<sub>4</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub> und Thromboxan B<sub>2</sub>, sowie die Chemotaxis von Neutrophilen, aus. Samaveda *et al.* konnten 2013 zeigen, dass Neutrophile die wichtigsten Effektorzellen für die kutanen Läsionen im Antikörpertransfer und im immunisierungsinduziertem Mausmodell der EBA sind (Samavedam *et al.*, 2013). Ebenso besteht das dermale entzündliche Infiltrat beim SHP-Mausmodell vorwiegend aus Ly6G-positiven Neutrophilen, neben Makrophagen/Monozyten und CD3-positiven T-Zellen (Heppe *et al.*, 2017).

Weitere publizierte Wirkmechanismen von Dapson beinhalten eine verminderte IL-8 Sekretion von Keratinozyten, welche mit BP-IgG inkubiert wurden (Schmidt *et al.*, 2001), eine reduzierte Chemotaxis für Leukozyten unter der Verwendung bestimmter Stimuli und u.a. induziert durch reduzierte IL-8 Level, sowie eine verminderte Produktion von Peroxidase und reaktiven Sauerstoffspezies von Eosinophilen (Smith und Cox, 2008).

Der positive Behandlungseffekt von Dapson auf die kutanen und oralen Läsionen im passiven SHP-Mausmodell, könnte neben der Hemmung der Myeloperoxidase in Neutrophilen auch im Zusammenhang mit der von Schmidt *et al.* publizierten inhibierten Sekretion von IL-8 aus Keratinozyten stehen. In Zellkulturexperimenten der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte CXCL2 Sekretionen von murinen Keratinozyten, welche mit Anti-LAM $\alpha$ 3 IgG behandelt wurden festgestellt werden. CXCL2 ist ein murines Funktionshomolog zum humanen IL-8, da Mäuse kein IL-8 exprimieren. Die Freisetzung des CXCL2 war zudem in den durchgeführten Versuchen abhängig von der Konzentration des eingesetzten Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG. Auch konnte bei kutanen und bukkalen Läsionen im Mausmodell ein mildes bis starkes entzündliches Infiltrat festgestellt werden, welches sich im kutanen periläsionalen Bereich hauptsächlich aus Neutrophilen und Makrophagen zusammensetzt (Heppe *et al.*, 2017). Zusammengenommen wäre es demnach denkbar, dass eine reduzierte Sekretion von CXCL2 der Keratinozyten im passiven SHP-Mausmodell zu einer reduzierten Infiltration des Gewebes mit Neutrophilen führte und somit der antientzündliche Effekt von Dapson zu erklären wäre. Im direkten Zusammenhang damit müsste in weiteren Experimenten geklärt werden wie sich die Entzündungsreaktion der Konjunktiva von denen der oralen Schleimhaut und der Haut unterscheiden, da für diesen betroffenen Bereich der Augen kein positiver Effekt durch die Behandlung mit Dapson zu verzeichnen war. Es wäre auch möglich und ebenfalls in weiteren Studien zu überprüfen, dass beispielsweise die Therapiedauer nicht ausreichend war, um den antientzündlichen Effekt von Dapson auf die Konjunktiva im Mausmodell zu bewirken, oder ob es in Unterschieden des Immunsystems im Auge von Menschen und Maus begründet liegen könnte.

Nachdem Dapson im Mausmodell die Gesamtkrankheitsaktivität signifikant reduzieren konnte, sollten im Folgenden neue Therapieoptionen zur Behandlung des SHP geprüft werden. Ahadome *et al.* haben 2016 einen Ansatz mittels Inhibierung der Aldehyddehydrogenase (ALDH) durch Disulfiram zur Behandlung von konjunktivaler Fibrose in SHP Patienten veröffentlicht (Ahadome *et al.*, 2016). Der zugrundeliegende Wirkmechanismus von Disulfiram liegt in der kompetitiven und irreversiblen Hemmung der ALDH1. Zuerst 1949 unter dem Handelsnamen Antabuse<sup>®</sup> für alkoholabhängige Patienten zugelassen (Bell und Smith, 1949), führt die Einnahme des Medikamentes dazu, dass in der Leber resorbierter Alkohol mittels Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd oxidiert wird, aber nicht mehr zu Essigsäure umgewandelt werden kann, da die ALDH1 gehemmt wird. Die hierdurch initiierte Anreicherung von Acetaldehyden führt im Folgenden zu weitreichenden Symptomen bei den Patienten wie Übelkeitsgefühlen, Hautrötungen, absinkendem Blutdruck bis hin zu Herzrasen. Der therapeutische Gedanke war, dass die Einnahme selbst geringer Mengen an Alkohol in Kombination mit Antabuse<sup>®</sup> bei Suchtpatienten zu einem Unwohlsein führt, welcher das weitere konsumieren von Alkohol verhindern sollte (Koppaka *et al.*, 2012). ALDH1 ist des Weiteren bei der Oxidation von Retinal zu Retinsäure beteiligt und gehört ebenfalls zur Gruppe der Hornhautkristalline, die zur

Aufrechterhaltung der Transparenz der Hornhaut beitragen (Jester *et al.*, 1999). Publikationen zeigen zudem einen möglichen Einsatz von Disulfiram bei HIV-Patienten und in der Krebstherapie (Askgaard *et al.*, 2014; Spillier *et al.*, 2019).

Mit dem Ziel neue Therapieoptionen für die okuläre Beteiligung des SHP zu identifizieren, konnten Ahadome *et al.* beobachten, dass ALDH1 in der Konjunktiva und in Fibroblasten von okulären SHP Patienten hochreguliert ist. Des Weiteren konnten sie belegen, dass ALDH in der Konjunktiva von Mäusen aus dem Modell der AED (*allergic eye disease*) ebenfalls hochreguliert ist und sich *in vivo* durch die Behandlung mit dem ALDH-Inhibitor Disulfiram mittels Augentropfen senken lässt. Fibroblasten, welche von SHP Patienten mit okulärer Beteiligung und von AED Mäusen isoliert wurden, verloren nach der Behandlung mit Disulfiram ihren pro-fibrotischen Phänotypen. Im Umkehrschluss konnten sie bei normalen Kontrollfibroblasten durch die Anwendung des ALDH Metaboliten Retinsäure *in vitro* bewirken, dass ein erkrankter Phänotyp induziert werden konnte (Ahadome *et al.*, 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde Disulfiram sowohl systemisch als auch topisch im passiven SHP-Mausmodell angewandt, um die publizierten Therapieerfolge zu validieren. Die prophylaktische Behandlung mit Disulfiram zeigte bezüglich der Hautläsionen im SHP-Mausmodell eine Tendenz zur Heilung, welche allerdings statistisch nicht signifikant war. Für die Schleimhäute konnte jedoch keine Wirkung festgestellt werden. Auch die topische Anwendung von Disulfiram mittels Augentropfen zeigte keine Befundbesserung. Da die eingesetzten Konzentrationen, das Lösungsmittel, die Darreichungsformen der Augentropfen und auch der verwendete Mausstamm den publizierten Angaben entsprachen, bleiben als mögliche Erklärungen für die Ergebnisse die Unterschiede in den verwendeten Modellen und Unterschiede in den darauf initiierten Immunreaktionen. Das AED Mausmodell ist ein aktives Mausmodell. Durch die Immunisierung mit Ovalbuminen (OVA) i.p. in Kombination mit den Adjuvanzen Aluminiumhydroxid und Pertussis Toxin und eine 7-tägige Reizung der Augen mit OVA-Augentropfen zwei Wochen nach der Immunisierung kann eine experimentelle Konjunktivitis in den Mäusen induziert werden. Hierbei handelt es sich um eine IgE-abhängige Immunantwort der Mäuse (Reyes *et al.*, 2018), welche für den Vergleich mit Patienten, die an allergischen Augenreizungen leiden, entwickelt worden ist (Lee *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2013). Bei SHP Patienten sind nur wenige Fälle publiziert, in denen zirkulierende IgE-Antikörper nachgewiesen werden konnten (Corti *et al.*, 2018; Natsuga *et al.*, 2010). Die meisten Berichte von IgE-Autoantikörpern bei Pemphigoid-Erkrankungen beziehen sich auf die N-terminale Ektodomäne von BP180 (Dopp *et al.*, 2000; van Beek *et al.*, 2017) oder auf BP230 (Hashimoto *et al.*, 2017) bei Patienten mit bullösen Pemphigoid. IgE-Antikörper gegen Laminin 332 konnten auch bei SHP Patienten nachgewiesen werden, wenn auch nicht im Zusammenhang mit Konjunktivitis (Georgoudis

*et al.*, 2019). Daher ist es vorstellbar, dass das angewandte AED Mausmodell nur begrenzt zur Überprüfung der Therapieoption Disulfiram für die aktive Beteiligung des SHP geeignet ist. Im selben Atemzug würde dies auch eine mögliche Erklärung liefern, warum Disulfiram bei topischer Anwendung keinen Effekt im durch passiven Transfer von IgG-Antikörpern induzierten SHP-Mausmodell zeigte. Auf der anderen Seite wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expression von ALDH1 in okulären Fibroblasten oder der Konjunktiva von SHP induzierten Mäusen nicht geprüft. Ein fehlender therapeutischer Erfolg mittels Disulfiram kann daher auch in einer fehlenden erhöhten Expression von ALDH1 im passiven SHP-Mausmodell begründet sein.

Als weitere neue Therapieoption wurde die Inhibierung der Phosphodiesterase-4 (PDE4) evaluiert. Diese Behandlungsstrategie hat in verschiedenen *in vivo* Experimenten und Studien bereits solide Ergebnisse erzielt. Sowohl im passiven als auch im aktiven EBA Mausmodell konnte ein Therapieeffekt durch die Gabe von Roflumilast gezeigt werden (Koga *et al.*, 2016) und klinische Studien zur Wirkung und Sicherheit bei Patienten mit Psoriasis und Morbus Behcet mit Apremilast, einen anderem PDE4 Inhibitor konnte eine signifikante klinische Wirkung zeigen und führten zur Zulassung bei diesem Medikament durch die EMA (Abdulrahim *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018). Roflumilast ist in der EU seit 2010 zur Behandlung der Chronischen obstruktiven Lungenerkrankung und des allergischen bronchialen Asthma zugelassen (Calverley *et al.*, 2009). Sowohl die prophylaktische als auch die quasi-therapeutische Behandlung von SHP Mäusen konnte die Schleimhautläsionen signifikant reduzieren. Die erfolgreiche Behandlung wurde auf Proteinebene durch den Anstieg von cAMP in der Haut und Schleimhaut von behandelten Mäusen bestätigt. Diese Überprüfung war ebenso essenziell, wie die direkte Immunfluoreszenz der Gewebe, um zu zeigen, dass die injizierten Antikörper gleichermaßen in Behandlungs- und Kontrollgruppen gebunden hatten. Somit ist der gezeigte Behandlungserfolg auf Ebene der Entzündung zu suchen und nicht, wie beispielsweise für die IVIG Behandlung bereits publiziert, in einer Reduktion der zirkulierenden oder gewebsgebundenen Autoantikörper begründet (Sasaoka *et al.*, 2018). Histologien der betroffenen Gewebe konnte die Reduktion des entzündlichen Zellinfiltrates zeigen. Bei der prophylaktischen Gabe führte die Behandlung mit Roflumilast zu einer Zunahme der Hautläsionen. Dies konnte im therapeutischen Ansatz nicht beobachtet werden. Daher liegt der Schluss nahe, dass dieser Effekt mit den initialen Reaktionen der Antikörperbindung im Zusammenhang steht. Um genauere Aussage darüber machen zu können müsste zunächst die Ursache genauer eingegrenzt werden. So könnte man beispielsweise anstelle von Roflumilast spezifisch das cAMP mittels Forskolin aktivieren und zunächst überprüfen, ob dieser Effekt der Erhöhung des cAMP Gehaltes vor Bindung der Antikörper geschuldet ist. Es bliebe auch zu prüfen, welche Signalwege durch die initiale Bindung angeschaltet werden und welche Immunfaktoren hochreguliert sind, als dass die Entzündung bei der prophylaktischen Gabe schwerwiegender in der Haut ist. Ungeachtet der Entstehung der

Autoantikörper sind die Reaktionen nach ihrer Bindung an ihre Zielstrukturen daher von besonderem Interesse, vor allem im Hinblick auf die Entwicklung spezifischerer Therapieoptionen.

In der vorliegenden Arbeit konnten IL-6 und CXCL2 identifiziert werden, welche nach der Bindung von Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG an Keratinozyten ins Zellkulturmedium abgegeben wurden. Die Sekretion dieser Zytokine war von der Konzentration des zur Behandlung eingesetzten Anti-mLAM $\alpha$ 3 IgG abhängig und durch Roflumilast reversibel. Systemisch reduzierte die Therapie mit Roflumilast die IL-6 Konzentration in den Seren der Mäuse jedoch nicht. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um einen lokalen Prozess in der Haut handelt. Erhöhte IL-6 Konzentrationen konnten auch in SHP und EBA Patienten in der Haut festgestellt werden. IL-6 wurde zudem als protektiv im passiven EBA Mausmodell publiziert. So zeigten IL6-defiziente Mäuse schwerere Hautläsionen als die Wildtypen (Samavedam *et al.*, 2013). Hier könnte auch eine mögliche Erklärung bezüglich der festgestellten schwereren Hautläsionen bei prophylaktischer Gabe von Roflumilast im passiven SHP-Mausmodell zu finden sein. Eine durch die Therapie mit Roflumilast verminderte IL-6 Sekretion der Keratinozyten könnte zu einer schnelleren bzw. schwereren Bildung von Hautläsionen geführt haben. Hierbei müsste es sich zudem um einen lokalen Effekt handeln, da der IL-6 Serumspiegel von behandelten Mäusen im Vergleich zu Mäusen, die nur das Vehikel erhielten, nicht erhöht war. Des Weiteren führt eine reduzierte IL-6 Ausschüttung in aller Regel auch zu einer verminderten Einwanderung von Entzündungszellen wie beispielsweise Neutrophilen (Kaplanski *et al.*, 2003). Es läge die Vermutung daher nahe, dass an diesem Prozess mehrere Faktoren zu den schwereren Hautläsionen der Behandlungsgruppe geführt haben müssen.

Im weiteren Vergleich zu Mäusen denen nicht-pathogenes IgG injiziert wurde zeigte sich eine signifikante Erhöhung von IL-6 im Serum der Mäuse durch die Induktion des SHP, welche nicht durch Roflumilast reduziert wurde. Die hier vorliegenden Daten zu den IL-6 Serumspiegeln sind dabei abweichend von den in der Literatur publizierten Daten. In verschiedenen Mausmodellen für beispielsweise Sepsis (Feng *et al.*, 2017) und Morbus Alzheimer (Feng *et al.*, 2019) führte die Behandlung mit Roflumilast zu einer Reduktion der IL-6 Zytokinpiegel im Serum der Mäuse.

### **4.3 Aktives Schleimhautpemphigoid-Mausmodell**

Das passive, Antikörpertransfer Mausmodell bildet die Effektorphase der Erkrankung von SHP Patienten ab und eignet sich daher nur eingeschränkt zur Evaluierung neuer Therapieoptionen. Niebuhr *et al.* haben zuvor gezeigt, dass eine Immunantwort der Mäuse auf das artfremde Kaninchen IgG erst nach maximal 12 Tagen nachzuweisen ist (Niebuhr *et al.*, 2017). Die Krankheitsaktivität kann daher mindestens 12 Tage verfolgt und in dieser Zeit Therapieoptionen ohne den opsonisierenden Effekt von Anti-Kaninchen IgG getestet werden. Limitierend im passiven Modell sind allerdings das Fehlen sowohl der Initiationsphase als auch der Prüfung neuer Medikationen auf ihre

Langzeitwirkung hin. Ein primäres Ziel dieser Dissertation war deswegen die Entwicklung eines aktiven Mausmodelles, um sowohl die Entstehung als auch Langzeittherapien in einem Modell des SHP untersuchen zu können. Dies gelang schließlich durch die viermalige Immunisierung mit rekombinanten Proteinfragmenten der  $\alpha 3$  Kette des Laminin 332 in B6.S und SJL/J Mäusen unter Verwendung von TiterMax<sup>TM</sup> und Pertussis Toxin als Adjuvantien. Dieser Erfolg unterstreicht die Theorie für das Laminin 332, dass ein Überschuß an Basalmembranzzone Proteinfragmenten in Kombination mit einer Entzündungsreaktion (durch das Adjuvanz simuliert) zur Entstehung von autoreaktiven Antikörpern führen kann. Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass der Bruch der Toleranz gegen die  $\alpha 3$  Kette von Laminin 332 in diesem Modell mit Hilfe der beiden Adjuvantien induziert wurde und daher in keiner Weise die bisher unbekanntenen Agentien, durch die der Toleranzbruch bei der humanen Erkrankung induziert wird, widerspiegelt.

Wie auch im passiven Mausmodell zeigten aktiv immunisierte Mäuse orale und konjunktivale Läsionen, welche sich histologisch zunächst nicht von denen im passiven Modell unterschieden. Hier bedarf es weiterer Analysen, wie beispielsweise die Detektion von Zytokinen und Immunzellen, um eventuelle Abweichung bezüglich der Immunantworten zu eruieren. Unterschiede zum passiven Modell zeigten sich jedoch durch die Anfärbung kornealer Läsionen mittels Fluorescein. Während die Gewebeentzündung im passiven Mausmodell räumlich auf die Konjunktiva beschränkt ist, so zeigten Mäuse im aktiven Modell auch einen starken Befall der Kornea. Im Vergleich zu der humanen Erkrankung, bei der eine Konjunktivitis sich zuerst an der palpebralen Konjunktiva und anschließend vernarbend über die Fornix, den bulbären Bereich der Konjunktiva und letztlich über die Kornea ausbreitet (Dart, 2017), zeigt das aktive SHP-Mausmodell die größere Übereinstimmung. Abzuklären wäre in weiteren Experimenten inwieweit bzw. ob auch eine Narbenbildung durch die Autoantikörper der Mäuse am Auge entstehen kann. Anders als im passiven Modell waren Hautläsionen in nur 20% der Mäuse zu sehen. Dies entspricht den in der Literatur publizierten Anteil an SHP Patienten, bei denen eine kutane Beeinträchtigung festgestellt werden konnte (Holtsche *et al.*, 2018; Schmidt und Zillikens, 2013).

Bislang konnte das aktive Mausmodell nur in H2s-Haplotyp Mausstämmen induziert werden. Bei der aktiven EBA und auch dem aktiven BP Mausmodell zeigen sich die suszeptilen Mausstämme ebenfalls mit dem H2s Haplotyp assoziiert, wohingegen bei Wildtyp Mäusen die Immuntoleranz weitestgehend ungebrochen ist (Hirose *et al.*, 2011; Ludwig *et al.*, 2011). Interessant wäre es daher in weiteren Studien zu untersuchen, ob dieselbe genetische Disposition auch für die Induktion eines aktiven SHP notwendig ist. Sollten Wildtyp Mäuse nicht empfänglich für die Generierung von Autoantikörpern gegen Laminin 332 sein, so würde dies zum Ersten eine starke Beteiligung des MHC II bei der Entstehung der Autoimmundermatosen in Mäusen bedeuten, und zum Zweiten eine weitere

Parallele zu der humanen Erkrankung bedeuten. Eine genetische Disposition wurde bereits für die meisten blasenbildenden Autoimmundermatosen nachgewiesen, insbesondere im Hinblick auf das HLA Gen (Olbrich *et al.*, 2019; Zakka *et al.*, 2011). Beim SHP im Speziellen konnten als Suszeptibilitätsgen *GALC* identifiziert werden (Sadik *et al.*, 2017) und eine Prädisposition für das HLA-DQB1\*0301 beim Menschen mit der Bildung von IgG Autoantikörpern gegen Strukturproteine der Basalmembranzzone assoziiert werden (Olbrich *et al.*, 2019). Eine bestätigte genetische Suszeptibilität mit dem H2s Haplotyp im aktiven SHP-Mausmodell könnte daher auch die publizierten Zusammenhänge bezüglich einer genetischen Beteiligung am Verlust der Toleranz bei SHP Patienten untermauern.

Zur Immunisierung wurden zwei verschiedene Fragmente der  $\alpha 3$  Kette von Laminin 332 eingesetzt. Eine Kombination der beiden Fragmente mit derselben Dosis wie bei der separaten Injektion konnte die Immunbarriere in den Mäusen jedoch nicht brechen. Als wahrscheinlichste Erklärung ist hierbei ein Dosiseffekt, so dass eine gewisse Konzentration an einem Protein vonnöten ist, um die Produktion von pathogenen Autoantikörpern herbeizuführen. Eine feinere Untersuchung dahingehend wieviel Protein und wie oft tatsächlich immunisiert werden muss, würde weiteren Aufschluss über die Entstehung des SHP liefern. Vor allem dahingehend, ob es in Patienten ausreichend ist, einmalig einer hohen Menge an  $\alpha 3$  Protein ausgesetzt zu sein, oder ob diese Disposition über die Zeit erfolgen muss. Im Einklang mit der letzten Theorie steht die Publikation von Ahmed *et al.* aus dem Jahr 2019. Hier wurde postuliert, dass insbesondere die Bildung von Anti-Laminin 332 Autoantikörpern in Patienten eine Folge von Tumoren sei, welche unphysiologisch hohe Konzentrationen an Proteinen der Basalmembranzzone mit sich ziehen und worauf der Körper letztlich mit der Bildung von Autoantikörpern reagiere. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass bei einem Patienten mit Anti-Laminin 332 SHP nach Entfernung des Tumors auch das SHP abheilte (La Placa *et al.*, 2019). Kürzlich konnten Goletz *et al.* eine frühere Publikation bestätigen (Egan *et al.*, 2001), dass etwa 25% der Anti-Laminin 332 Patienten mit malignen Erkrankungen assoziiert sind (Goletz *et al.*, 2019). Das aktive Laminin 332 Mausmodell bietet die Möglichkeit in weiteren Studien den Zusammenhang zwischen Tumoren und SHP näher zu untersuchen. So sind drei Szenarien vorstellbar: 1) am wahrscheinlichsten ist nach jetziger Datenlage, dass ein Tumor die Entstehung des Anti-Laminin 332 SHP triggert 2) das Anti-Laminin 332 SHP induziert einen Tumor 3) es existieren beide Möglichkeiten bzw. es handelt sich um zwei unterschiedliche Prozesse die denselben Ausgang in der Bildung von Anti-Laminin 332 Autoantikörpern nehmen. Der genaue Mechanismus, durch welchen ein Tumor zum Verlust der Toleranz bei SHP Patienten beitragen könnte, ist bislang nicht aufgeklärt worden. Es ist jedoch gut vorstellbar, dass die erhöhte Laminin 332 Expression in der näheren Tumorumgebung (Chung *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011), in Kombination mit einer dort herrschenden Entzündungsreaktion, ebenso zur Bildung von

Autoantikörpern führen kann, wie dies in der hier vorliegenden Doktorarbeit im Mausmodell bewiesen werden konnte.

Bei der Etablierung des Mausmodelles stellte sich neben der einzusetzenden Menge und der Häufigkeit der Gabe des Antigens, welche zum Bruch der Immuntoleranz in Mäusen führen sollte, auch die Frage, ob bzw. welche Antigenabschnitte immundominant sein könnten. Das mid und das c-term mLAM $\alpha$ 3 Protein, die hier zum Einsatz kamen, sind die murinen Homologe von zwei bei Anti-Laminin 332 SHP Patienten als immunodominant identifizierten Regionen der humanen Laminin  $\alpha$ 3 Kette. Für verschiedene Autoimmundermatosen wurde über immunodominante Epitope und Epitope, welche zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen führen können, berichtet. Für das BP gilt die nicht-kollagene 16. Domäne des BP180 als solche. Ca. 80% der BP und 40% der SHP Patienten bilden Autoantikörper gegen diesen speziellen Bereich des Proteins (Zillikens 1996, Schmidt 2001, Sitaru 2007). Ein anderes Beispiel sind Autoantikörper gegen  $\beta$ 4 Integrin, die bei SHP Patienten mit einer okulären Beteiligung assoziiert sein sollen, wohingegen Autoantikörper gegen  $\alpha$ 6 Integrin zu einem primär oralen Befall führen sollen (Bhol *et al.*, 2000; Bhol *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten keine phänotypischen oder histologischen Unterschiede in Mäusen die mit dem mid oder dem c-term mLAM $\alpha$ 3 Fragmenten immunisiert wurden, festgestellt werden. So zeigte weder der Antikörpertransfer von spezifisch gegen das jeweilige Fragment gerichtete Antikörper einen Unterschied im klinischen Bild noch die Immunisierung mit den jeweiligen unterschiedlichen Proteinfragmenten. Es liegt die Vermutung nahe, dass Autoantikörper, welche gegen jegliche Abschnitte der LAM $\alpha$ 3 Kette gerichtet sind, pathogen sind. Untersuchungen von Dr. Stephanie Goletz, LIED, konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass bisher getestete Anti-Laminin 332 SHP Patienten Antikörper gegen mehrere Abschnitte der  $\alpha$ 3 Kette aufwiesen (Heppe *et al.*, 2017).

Bei Patienten, die an einer Autoimmundermatose leiden, konnte bei isolierten Autoantikörpern oft Reaktivitäten gegen verschiedene inter- und intramolekulare Epitope nachgewiesen werden (Didona und Di Zenzo, 2018). Im aktiven SHP-Mausmodell konnten Anhaltspunkte für ein intramolekulares *epitope spreading* in dieser Arbeit gefunden werden. So entwickelten mit c-term mLAM $\alpha$ 3 immunisierte Mäuse auch Antikörper gegen das mid mLAM $\alpha$ 3 Proteinfragment und *vice versa*. Dies konnte sowohl im Western-Blot als auch in einem spezifischen ELISA nachgewiesen werden. Eine Sequenzhomologie zwischen den beiden mLAM $\alpha$ 3 Fragmenten als Erklärung für die Reaktivität der Anti-mLAM $\alpha$ 3 Autoantikörper in den Mäusen des aktiven SHP-Mausmodelles konnte durch Neutralisationsversuche im Western-Blot weitestgehend ausgeschlossen werden. Offen bleibt jedoch die Überprüfung der zeitlichen Entwicklung der Autoantikörper im aktiven SHP-Mausmodell. Per Definition kommt es bei einem *epitope spreading* erst nach einer gewissen Zeit (Didona und Di Zenzo, 2018) zur Ausbreitung auf andere Epitope. Interessant ist hierbei auch die Frage, ob sich auch

Autoantikörpern gegen andere Strukturproteine der Basalmembranzzone nachweisen lassen. Im aktiven EBA Mausmodell wurden ebenfalls Autoantikörper gegen mehrere intramolekulare Epitope nach der Immunisierung mit dem Antigen mCOL7c nachgewiesen (Ludwig *et al.*, 2011). Ein intermolekulares *epitope spreading* konnte im aktiven EBA Mausmodell ausgeschlossen werden, da Seren von aktiven EBA Mäusen nach der Prä-Adsorption mit dem Zielantigen keine Bindungsreaktivität mehr gegen die Basalmembranzzone zeigten und somit pathologisch irrelevant zu sein scheinen. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bezüglich der Ausbreitung der Epitope innerhalb des Zielmoleküls um einen generellen vom Zielantigen und der darauffolgenden Immunantwort abhängigen Prozess bei Mausmodellen von Autoimundermatosen handeln könnte (Ujii *et al.*, 2019). Die Seren von immunisierten SHP Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht auf ihre Bindungsreaktivität gegen die Basalmembranzzone nach der Prä-Adsorption untersucht. Die Bindung gegen das jeweils nicht injizierte Proteinfragment im Western-Blot unter denaturierenden Bedingungen blieb jedoch nach der Prä-Adsorption erhalten.

Der Einfluss von Substanzen wie dem Pertussis Toxin an dem Bruch der Immunbarriere ist bislang nicht vollständig aufgeklärt worden. In zukünftigen Experimenten wäre es sinnvoll herauszufinden, ob sich ein aktives SHP auch ohne den Zusatz von Pertussis Toxin in Mäusen induzieren lässt. Hofstetter *et al.* zeigten, dass Pertussis Toxin essenziell ist, um das aktive *experimental autoimmune encephalomyelitis* Mausmodell mit schwerer Ausprägung zu induzieren (Hofstetter *et al.*, 2002). Dies geht soweit, als dass die Erkrankung auch generiert werden kann, wenn anstatt des *complete freunds adjuvant* nur das *incomplete freunds adjuvant* mit Pertussis Toxin verwendet wird. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant zu untersuchen, ob das hier verwendete Adjuvanz Titermax™ ebenso mit dem *complete freunds adjuvant* bzw. dem *incomplete freunds adjuvant* ausgetauscht werden kann. Die Wirkmechanismen des Pertussis Toxins und seine Beteiligung an der Entwicklung von Autoimmunität sind Gegenstand intensiver Forschung. Bereits bekannt ist, dass Pertussis Toxin über die Hemmung der inhibitorischen  $\alpha$ -Untereinheit G-Protein gekoppelter Rezeptoren zu einem Anstieg von zellulärem cAMP führen kann (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2018). Paradoxerweise konnte ein solcher Anstieg von cAMP durch die Gabe von Roflumilast in dieser Dissertation als neue Therapieoption beschrieben werden. Der zelluläre Anstieg des cAMP Gehaltes konnte im passiven SHP-Mausmodell die oralen Läsionen signifikant reduzieren. Dennoch waren im prophylaktischen Ansatz die Hautläsionen der Behandlungsgruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Vehikelgruppe. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Erhöhung des cAMP Gehaltes vor dem Binden der Autoantikörper zu einer schwereren Immunreaktion im passiven SHP-Mausmodell führt. Dies dann allerdings nur in bestimmten Geweben, wobei es naheliegend ist auf die höhere Anzahl an residualen Immunzellen in der Dermis der Haut im Vergleich zur Schleimhaut hinzuweisen. Insofern man umgekehrt davon ausgeht, dass der Einfluss von Pertussis Toxin auf die Bildung von

Autoantikörpern nicht in der Aktivität der Proteinkinase A durch den erhöhten cAMP Gehalt innerhalb der Zellen zurückzuführen ist, so bleiben noch die publizierten Eigenschaften von Pertussis Toxin bezüglich der Schwächung der Blut-Augen-Barriere und die Reduktion der Treg Populationen zur Diskussion übrig (Yadav *et al.*, 2010). Im direkten Vergleich des passiven und aktiven SHP-Mausmodelles besteht der größte Unterschied in den kornealen Läsionen, welche nur im aktiven Mausmodell festgestellt werden konnten. Eine mögliche Erklärung könnte der Effekt des Pertussis Toxin auf die Adhäsionsstrukturen der Keratinozyten, den *tight junctions*, der Blut-Augen-Barriere sein. Dies könnte dazu führen, dass der immunprivilegierte Bereich des Auges leichter für das Immunsystem zugänglich ist und zirkulierende Autoantikörper ungehindert in die Bereiche der Kornea gelangten. Experimentell wäre dieser Nachweis durch den Einsatz von Pertussis Toxin im passiven Mausmodell zu untersuchen. Sollte die zusätzliche Behandlung der passiven SHP Mäuse mit Pertussis Toxin dazu führen, dass diese auch Läsionen an der Kornea entwickeln, würde dies den Beweis für die Theorie der geschädigten Blut-Augen-Barriere untermauern. Umgekehrt würde das Fehlen der kornealen Läsionen im aktiven Mausmodell ohne Pertussis Toxin dasselbe tun.

Bereits 1981 konnten Anhalt *et al.* feststellen, dass von BP Patienten isolierte Antikörper zu kornealen Läsionen in Kaninchen führen, wenn diese intrakorneal appliziert werden (Anhalt *et al.*, 1981). Bei der Injektion dieser Antikörper in die Ohren der Kaninchen konnten keine Veränderungen induziert werden. In der Kornea konnten histologisch IgG und C3 Depositionen, sowie Spaltbildung und entzündliches Infiltrat nachgewiesen werden. Die publizierten Histologien weisen diesbezüglich Übereinstimmungen mit den H&E Färbungen der Augen der aktiv immunisierten SHP Mäuse auf. Die Autoren postulierten, dass die Schwere der Entzündung der Augen mit der Menge an IgG, die injiziert wurde korreliert, wobei das Auge durch seine Avaskularität im Vergleich zur gut durchbluteten Haut die IgG nur langsam über Diffusion abbauen konnte. Dieser Theorie folgend müsste die Bindung der Autoantikörper an die Basalmembranzzone des kornealen Epitheliums in dem hier entwickelten aktiven Mausmodell, insofern diese konzentrationsabhängig ist, entweder über die Translokation der Autoantikörper über das lymphatische System oder über die lokale Ausschüttung von residuellen B-Zellen erfolgen. Für ersteren Ansatz müsste in der Theorie die Blut-Augenschranke geschädigt und das Einwandern der Autoantikörper somit erleichtert sein. Für die zweite Erklärung müssten gewebständige B-Zellen inklusive ihrer Entstehung nachgewiesen werden. Laminin 332 ist ein zentraler Bestandteil der extrazellulären Matrix der Blut-Augen- und der Blut-Hirn-Schranke (Baeten und Akassoglou, 2011; Gautam *et al.*, 2020). Da die Barrierefunktion zum Auge hin funktionell mit der Blut-Hirn-Barriere übereinstimmt, wäre es interessant, eine eventuelle Beeinträchtigung der Blut-Augen- und der Blut-Hirn-Barriere durch die Autoantikörper des aktiven SHP-Mausmodell zu untersuchen, obschon eine Assoziation mit neurodegenerativen Erkrankungen hauptsächlich für BP Patienten publiziert wurde (Forsti *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019).

Die Isotypen/IgG-Subklassen der zirkulierenden Autoantikörper, welche spezifisch gegen das zur Immunisierung genutzte Proteinfragment (mid bzw. c-term mLAM $\alpha$ 3) im Serum der Mäuse nachgewiesen werden konnten, waren IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3 und IgM. In aktiven EBA Mäusen konnten hauptsächlich IgG1, IgG2a und IgG2c aber kein IgA im Serum nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2006). IgA konnte, wie auch C3 und IgG, lokal in der direkten Immunfluoreszenz entlang der Basalmembranzone nachgewiesen werden, aber nicht erhöht im Serum von immunisierten Mäusen. IgA ist spezialisiert für die Immunabwehr von Schleimhäuten. Per Definition eines SHP müssen IgG und/oder IgA und/oder C3 Ablagerungen entlang der Basalmembranzone bei Patienten zu finden sein. Diese Voraussetzungen, sowie auch das weitere Kriterium von dominant betroffenen Schleimhäuten sind in dem aktiven Mausmodell erfüllt. Zum ersten Mal existiert somit ein aktives SHP-Mausmodell, welches wichtige klinische und immunopathologische Charakteristika von SHP Patienten widerspiegelt.

Die vorliegende Arbeit legt wichtige Grundsteine zur Validierung neuer Therapieoptionen für Patienten mit SHP, sowie auch zur Aufklärung der Pathogenese des SHP. Bei seltenen Erkrankungen wie dem SHP bilden Mausmodelle oft die einzige Möglichkeit, spezifischere Behandlungen für Patienten zu validieren und mögliche Prädispositionen, welche zur Entstehung der Erkrankung führen, aufzudecken. Wie entscheidend solche Modelle hierzu beitragen konnte u.a. an dem *experimental autoimmune encephalomyelitis* Mausmodell über die letzten Dekaden wissenschaftlich bewiesen werden. Die Entwicklung des aktiven Mausmodelles liefert die wissenschaftlichen Werkzeuge, um SHP Patienten eine spezifischere Behandlung mit weniger schweren Nebenwirkungen zu ermöglichen. Eine mögliche neue Behandlungsoption konnte in der vorliegenden Arbeit in der Hemmung der PDE4 identifiziert werden. Der spezifische PDE4 Hemmer Roflumilast konnte die Schleimhautläsionen im passiven SHP-Mausmodell signifikant reduzieren und weist im Gegensatz zu dem am häufigsten bei SHP Patienten angewandten Medikament Dapson deutlich geringere Nebenwirkungen auf, so dass eine zukünftige klinische Anwendung von PDE4 Inhibitoren für SHP Patienten mit starker oraler Beteiligung im Sinne eines individuellen Heilversuches geplant ist.

## 5. Literaturverzeichnis

Abdulrahim, H, Thistleton, S, Adebajo, AO, Shaw, T, Edwards, C, and Wells, A (2015). Apremilast: a PDE4 inhibitor for the treatment of psoriatic arthritis. *Expert opinion on pharmacotherapy* 16, 1099-1108.

Ahadome, SD, Abraham, DJ, Rayapureddi, S, Saw, VP, Saban, DR, Calder, VL, Norman, JT, Ponticos, M, Daniels, JT, and Dart, JK (2016). Aldehyde dehydrogenase inhibition blocks mucosal fibrosis in human and mouse ocular scarring. *JCI insight* 1, e87001.

Ahmed, AA, Giddens, J, Pincetic, A, Lomino, JV, Ravetch, JV, Wang, LX, and Bjorkman, PJ (2014). Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *Journal of molecular biology* 426, 3166-3179.

Akhtar, F, and Bokhari, SRA (2020). Apoptosis. In *StatPearls* (Treasure Island (FL)).

Amber, KT, Bloom, R, and Hertl, M (2016). 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. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 30, 72-77.

Amber, KT, Murrell, DF, Schmidt, E, Joly, P, and Borradori, L (2018). Autoimmune Subepidermal Bullous Diseases of the Skin and Mucosae: Clinical Features, Diagnosis, and Management. *Clinical reviews in allergy & immunology* 54, 26-51.

Anhalt, GJ, Bahn, CF, Labib, RS, Voorhees, JJ, Sugar, A, and Diaz, LA (1981). Pathogenic effects of bullous pemphigoid autoantibodies on rabbit corneal epithelium. *The Journal of clinical investigation* 68, 1097-1101.

Ansari, AA, and Byrareddy, SN (2016). The Role of Integrin Expressing Cells in Modulating Disease Susceptibility and Progression (January 2016). *Int Trends Immun* 4, 11-27.

Askgaard, G, Friis, S, Hallas, J, Thygesen, LC, and Pottegard, A (2014). Use of disulfiram and risk of cancer: a population-based case-control study. *Eur J Cancer Prev* 23, 225-232.

Askgaard, G, Hallas, J, Fink-Jensen, A, Molander, AC, Madsen, KG, and Pottegard, A (2016a). Phenobarbital compared to benzodiazepines in alcohol withdrawal treatment: A register-based cohort study of subsequent benzodiazepine use, alcohol recidivism and mortality. *Drug and alcohol dependence* 161, 258-264.

Askgaard, G, Kjaer, MS, and Tolstrup, JS (2019a). Opportunities to Prevent Alcoholic Liver Cirrhosis in High-Risk Populations: A Systematic Review With Meta-Analysis. *The American journal of gastroenterology* 114, 221-232.

Askgaard, G, Leon, DA, Deleuran, T, and Tolstrup, JS (2019b). Hospital admissions and mortality in the 15 years after a first-time hospital contact with an alcohol problem: a prospective cohort study using the entire Danish population. *International journal of epidemiology*.

Askgaard, G, Tolstrup, JS, Gerds, TA, Hamberg, O, Zierau, L, and Kjaer, MS (2016b). Predictors of heavy drinking after liver transplantation for alcoholic liver disease in Denmark (1990-2013): a nationwide study with competing risks analyses. *Scandinavian journal of gastroenterology* 51, 225-235.

Azari, AA, and Barney, NP (2013). Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *Jama* 310, 1721-1729.

Baeten, KM, and Akassoglou, K (2011). Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Developmental neurobiology* 71, 1018-1039.

Bakema, JE, and van Egmond, M (2011). The human immunoglobulin A Fc receptor Fc $\alpha$ RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 4, 612-624.

Behrens, DT, Villone, D, Koch, M, Brunner, G, Sorokin, L, Robenek, H, Bruckner-Tuderman, L, Bruckner, P, and Hansen, U (2012). The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *The Journal of biological chemistry* 287, 18700-18709.

Bell, RG, and Smith, HW (1949). Preliminary report on clinical trials of antabuse. *Canadian Medical Association journal* 60, 286-288.

Berry, R, Watson, GM, Jonjic, S, Degli-Esposti, MA, and Rossjohn, J (2020). Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nature reviews Immunology* 20, 113-127.

Bertram, F, Brocker, EB, Zillikens, D, and Schmidt, E (2009). Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 7, 434-440.

Bhol, KC, Dans, MJ, Simmons, RK, Foster, CS, Giancotti, FG, and Ahmed, AR (2000). The autoantibodies to alpha 6 beta 4 integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmic domain of human beta 4. *J Immunol* 165, 2824-2829.

Bhol, KC, Goss, L, Kumari, S, Colon, JE, and Ahmed, AR (2001). Autoantibodies to human alpha6 integrin in patients with oral pemphigoid. *Journal of dental research* 80, 1711-1715.

Bieber, K, Koga, H, and Nishie, W (2017). In vitro and in vivo models to investigate the pathomechanisms and novel treatments for pemphigoid diseases. *Experimental dermatology* 26, 1163-1170.

Borradori, L, and Sonnenberg, A (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *The Journal of investigative dermatology* 112, 411-418.

Bozeman, PM, Learn, DB, and Thomas, EL (1992). Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. *Biochemical pharmacology* 44, 553-563.

Bray, N (2014). Sensory transduction: Merkel cells bring a delicate touch. *Nature reviews Neuroscience* 15, 348-349.

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

Calverley, PM, Rabe, KF, Goehring, UM, Kristiansen, S, Fabbri, LM, and Martinez, FJ (2009). Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet* 374, 685-694.

Carroll, MC, and Isenman, DE (2012). Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 37, 199-207.

Cerutti, A, Chen, K, and Chorny, A (2011). Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annual review of immunology* 29, 273-293.

Chan, LS, Ahmed, AR, Anhalt, GJ, Bernauer, W, Cooper, KD, Elder, MJ, Fine, JD, Foster, CS, Ghohestani, R, Hashimoto, T, *et al.* (2002). The first international consensus on mucous membrane pemphigoid: definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Archives of dermatology* 138, 370-379.

Chan, LS, Vanderlugt, CJ, Hashimoto, T, Nishikawa, T, Zone, JJ, Black, MM, Wojnarowska, F, Stevens, SR, Chen, M, Fairley, JA, *et al.* (1998). Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *The Journal of investigative dermatology* 110, 103-109.

Chang, C, and Gershwin, ME (2010). Drugs and autoimmunity--a contemporary review and mechanistic approach. *Journal of autoimmunity* 34, J266-275.

Chen, L, Peterson, JD, Zheng, WY, Lin, SX, and Chan, LS (2006). Autoimmunity to type VII collagen in SKH1 mice is independent of regulatory T cells. *Clinical and experimental immunology* 145, 322-331.

Chen, M, Doostan, A, Bandyopadhyay, P, Remington, J, Wang, X, Hou, Y, Liu, Z, and Woodley, DT (2007). The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita. *The American journal of pathology* 170, 2009-2018.

Cheng, M, and Anderson, MS (2018). Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. *Nature immunology* 19, 659-664.

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

Chiu, ML, Goulet, DR, Teplyakov, A, and Gilliland, GL (2019). *Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics*. *Antibodies (Basel)* 8.

Christie, P (2005). Roflumilast: a selective phosphodiesterase 4 inhibitor. *Drugs Today (Barc)* 41, 667-675.

Chung, H, Suh, EK, Han, IO, and Oh, ES (2011). Keratinocyte-derived laminin-332 promotes adhesion and migration in melanocytes and melanoma. *The Journal of biological chemistry* 286, 13438-13447.

Cooper, MD (2015). The early history of B cells. *Nature reviews Immunology* 15, 191-197.

Corti, L, Fanoni, D, Venegoni, L, Muratori, S, Recalcati, S, and Berti, E (2018). Detection of IgE autoantibodies in mucous membrane pemphigoid and their association with disease severity. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*.

Csorba, K, Chiriac, MT, Florea, F, Ghinia, MG, Licarete, E, Rados, A, Sas, A, Vuta, V, and Sitaru, C (2014). Blister-inducing antibodies target multiple epitopes on collagen VII in mice. *Journal of cellular and molecular medicine* 18, 1727-1739.

Dart, JK (2017). The 2016 Bowman Lecture Conjunctival curses: scarring conjunctivitis 30 years on. *Eye (Lond)* 31, 301-332.

Del Bino, S, Duval, C, and Bernerd, F (2018). Clinical and Biological Characterization of Skin Pigmentation Diversity and Its Consequences on UV Impact. *International journal of molecular sciences* 19.

Delgado, JC, Turbay, D, Yunis, EJ, Yunis, JJ, Morton, ED, Bhol, K, Norman, R, Alper, CA, Good, RA, and Ahmed, R (1996). A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1\* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8569-8571.

Didona, D, and Di Zenzo, G (2018). Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Frontiers in immunology* 9, 779.

Dopp, R, Schmidt, E, Chimanovitch, I, Leverkus, M, Brocker, EB, and Zillikens, D (2000). IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity. *Journal of the American Academy of Dermatology* 42, 577-583.

Dunkelberger, JR, and Song, WC (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research* 20, 34-50.

Egan, CA, Lazarova, Z, Darling, TN, Yee, C, Cote, T, and Yancey, KB (2001). Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid and relative risk for cancer. *Lancet* 357, 1850-1851.

Ekert, PG, and Vaux, DL (1997). Apoptosis and the immune system. *British medical bulletin* 53, 591-603.

Feng, H, Chen, J, Wang, H, Cheng, Y, Zou, Z, Zhong, Q, and Xu, J (2017). Roflumilast reverses polymicrobial sepsis-induced liver damage by inhibiting inflammation in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 97, 1008-1019.

Feng, H, Wang, C, He, W, Wu, X, Li, S, Zeng, Z, Wei, M, and He, B (2019). Roflumilast ameliorates cognitive impairment in APP/PS1 mice via cAMP/CREB/BDNF signaling and anti-neuroinflammatory effects. *Metabolic brain disease* 34, 583-591.

Fine, JD, Bruckner-Tuderman, L, Eady, RA, Bauer, EA, Bauer, JW, Has, C, Heagerty, A, Hintner, H, Hovnanian, A, Jonkman, MF, *et al.* (2014). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *Journal of the American Academy of Dermatology* 70, 1103-1126.

Forsti, AK, Huilaja, L, Schmidt, E, and Tasanen, K (2017). Neurological and psychiatric associations in bullous pemphigoid-more than skin deep? *Experimental dermatology* 26, 1228-1234.

Galletti, JG, Guzman, M, and Giordano, MN (2017). Mucosal immune tolerance at the ocular surface in health and disease. *Immunology* 150, 397-407.

Gautam, J, Cao, Y, and Yao, Y (2020). Pericytic Laminin Maintains Blood-Brain Barrier Integrity in an Age-Dependent Manner. *Translational stroke research* 11, 228-242.

Georgoudis, P, Sabatino, F, Szentmary, N, Palioura, S, Fodor, E, Hamada, S, Scholl, HPN, and Gatzoufas, Z (2019). Ocular Mucous Membrane Pemphigoid: Current State of Pathophysiology, Diagnostics and Treatment. *Ophthalmology and therapy* 8, 5-17.

Goletz, S, Probst, C, Komorowski, L, Schlumberger, W, Fechner, K, van Beek, N, Holtsche, MM, Recke, A, Yancey, KB, Hashimoto, T, *et al.* (2018). A sensitive and specific assay for the serological diagnosis of antilaminin 332 mucous membrane pemphigoid. *The British journal of dermatology*.

Goletz, S, Probst, C, Komorowski, L, Schlumberger, W, Fechner, K, van Beek, N, Holtsche, MM, Recke, A, Yancey, KB, Hashimoto, T, *et al.* (2019). A sensitive and specific assay for the serological diagnosis of antilaminin 332 mucous membrane pemphigoid. *The British journal of dermatology* *180*, 149-156.

Gonzalez-Mariscal, L, Raya-Sandino, A, Gonzalez-Gonzalez, L, and Hernandez-Guzman, C (2018). Relationship between G proteins coupled receptors and tight junctions. *Tissue barriers* *6*, e1414015.

Gonzalez, S, Gonzalez-Rodriguez, AP, Suarez-Alvarez, B, Lopez-Soto, A, Huergo-Zapico, L, and Lopez-Larrea, C (2011). Conceptual aspects of self and nonself discrimination. *Self Nonself* *2*, 19-25.

Groth, S, Recke, A, Vafia, K, Ludwig, RJ, Hashimoto, T, Zillikens, D, and Schmidt, E (2011). Development of a simple enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid. *The British journal of dermatology* *164*, 76-82.

Gurcan, HM, and Ahmed, AR (2009). Efficacy of dapsone in the treatment of pemphigus and pemphigoid: analysis of current data. *American journal of clinical dermatology* *10*, 383-396.

Hajishengallis, G, Reis, ES, Mastellos, DC, Ricklin, D, and Lambris, JD (2017). Novel mechanisms and functions of complement. *Nature immunology* *18*, 1288-1298.

Halenius, A, Gerke, C, and Hengel, H (2015). Classical and non-classical MHC I molecule manipulation by human cytomegalovirus: so many targets-but how many arrows in the quiver? *Cellular & molecular immunology* *12*, 139-153.

Hall, LR, Lass, JH, Diaconu, E, Strine, ER, and Pearlman, E (1999). An essential role for antibody in neutrophil and eosinophil recruitment to the cornea: B cell-deficient (microMT) mice fail to develop Th2-dependent, helminth-mediated keratitis. *J Immunol* *163*, 4970-4975.

Hashimoto, T (2017). Induced autoimmune bullous diseases. *The British journal of dermatology* *176*, 304-305.

Hashimoto, T, Ohzono, A, Teye, K, Numata, S, Hiroyasu, S, Tsuruta, D, Hachiya, T, Kuroda, K, Hashiguchi, M, Kawakami, T, *et al.* (2017). Detection of IgE autoantibodies to BP180 and BP230 and their relationship to clinical features in bullous pemphigoid. *The British journal of dermatology* *177*, 141-151.

Hayter, SM, and Cook, MC (2012). Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews* *11*, 754-765.

Heath, WR, and Carbone, FR (2013). The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature immunology* *14*, 978-985.

Hegarty, AM, Ormond, M, Sweeney, M, and Hodgson, T (2010). Dapsone efficacy and adverse events in the management of mucous membrane pemphigoid. *European journal of dermatology : EJD* *20*, 223-224.

Hein, WR (1999). Organization of mucosal lymphoid tissue. *Current topics in microbiology and immunology* *236*, 1-15.

Hepe, EN, Tofern, S, Schulze, FS, Ishiko, A, Shimizu, A, Sina, C, Zillikens, D, Kohl, J, Goletz, S, and Schmidt, E (2017). Experimental Laminin 332 Mucous Membrane Pemphigoid Critically Involves C5aR1 and Reflects Clinical and Immunopathological Characteristics of the Human Disease. *The Journal of investigative dermatology* 137, 1709-1718.

Hirose, M, Recke, A, Beckmann, T, Shimizu, A, Ishiko, A, Bieber, K, Westermann, J, Zillikens, D, Schmidt, E, and Ludwig, RJ (2011). Repetitive immunization breaks tolerance to type XVII collagen and leads to bullous pemphigoid in mice. *J Immunol* 187, 1176-1183.

Hofstetter, HH, Shive, CL, and Forsthuber, TG (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 169, 117-125.

Hohenester, E (2019). Structural biology of laminins. *Essays Biochem* 63, 285-295.

Holtsche, MM, Zillikens, D, and Schmidt, E (2018). [Mucous membrane pemphigoid]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 69, 67-83.

Isung, J, Isomura, K, Almqvist, C, Lichtenstein, P, Larsson, H, Wester, T, Ruck, C, Fernandez de la Cruz, L, Sidorchuk, A, and Mataix-Cols, D (2019). Association of chronic and acute inflammation of the mucosa-associated lymphoid tissue with psychiatric disorders and suicidal behavior. *Translational psychiatry* 9, 227.

Iwata, H, Bieber, K, Hirose, M, and Ludwig, RJ (2015). Animal models to investigate pathomechanisms and evaluate novel treatments for autoimmune bullous dermatoses. *Current pharmaceutical design* 21, 2422-2439.

Iwata, H, Bieber, K, Tiburzy, B, Chrobok, N, Kalies, K, Shimizu, A, Leineweber, S, Ishiko, A, Vorobyev, A, Zillikens, D, *et al.* (2013). B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* 191, 2978-2988.

Jain, A, and Pasare, C (2017). Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *J Immunol* 198, 3791-3800.

Jayadev, R, and Sherwood, DR (2017). Basement membranes. *Curr Biol* 27, R207-R211.

Jester, JV, Moller-Pedersen, T, Huang, J, Sax, CM, Kays, WT, Cavangh, HD, Petroll, WM, and Piatigorsky, J (1999). The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *Journal of cell science* 112 ( Pt 5), 613-622.

Kang, SG, Ha, YR, Ko, YH, Kang, SH, Joo, KJ, Cho, HY, Park, HS, Kim, CH, Kwon, SY, Kim, JJ, *et al.* (2013). Effect of laminin 332 on motility and invasion in bladder cancer. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 29, 422-429.

Kaplanski, G, Marin, V, Montero-Julian, F, Mantovani, A, and Farnarier, C (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology* 24, 25-29.

- Karsten, CM, Laumonnier, Y, and Kohl, J (2014). Functional analysis of C5a effector responses in vitro and in vivo. *Methods Mol Biol* 1100, 291-304.
- Kasperkiewicz, K, Eppa, L, Swierzko, AS, Bartlomiejczyk, MA, Zuber, ZM, Siniewicz-Luzencyk, K, Mezyk, E, Matsushita, M, Bak-Romaniszyn, L, Zeman, K, *et al.* (2017a). Lectin pathway factors in patients suffering from juvenile idiopathic arthritis. *Immunology and cell biology* 95, 666-675.
- Kasperkiewicz, M, Ellebrecht, CT, Takahashi, H, Yamagami, J, Zillikens, D, Payne, AS, and Amagai, M (2017b). Pemphigus. *Nature reviews Disease primers* 3, 17026.
- Kasperkiewicz, M, Kalies, K, Pagel, R, Bieber, K, Zillikens, D, and Ludwig, RJ (2017c). CCL3/MIP1alpha represents a biomarker but not a mandatory cytokine for disease development in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of dermatological science* 88, 248-250.
- Kasperkiewicz, M, Zillikens, D, and Schmidt, E (2012). Pemphigoid diseases: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Autoimmunity* 45, 55-70.
- Kasperkiewicz, P, Altman, Y, D'Angelo, M, Salvesen, GS, and Drag, M (2017d). Toolbox of Fluorescent Probes for Parallel Imaging Reveals Uneven Location of Serine Proteases in Neutrophils. *Journal of the American Chemical Society* 139, 10115-10125.
- Kawamatawong, T (2017). Roles of roflumilast, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, in airway diseases. *Journal of thoracic disease* 9, 1144-1154.
- Kemper, C, and Kohl, J (2018). Back to the future - non-canonical functions of complement. *Seminars in immunology* 37, 1-3.
- Kim, BG, An, HJ, Kang, S, Choi, YP, Gao, MQ, Park, H, and Cho, NH (2011). Laminin-332-rich tumor microenvironment for tumor invasion in the interface zone of breast cancer. *The American journal of pathology* 178, 373-381.
- Kim, BG, Gao, MQ, Choi, YP, Kang, S, Park, HR, Kang, KS, and Cho, NH (2012). Invasive breast cancer induces laminin-332 upregulation and integrin beta4 neoexpression in myofibroblasts to confer an anoikis-resistant phenotype during tissue remodeling. *Breast cancer research : BCR* 14, R88.
- Klos, A, Wende, E, Wareham, KJ, and Monk, PN (2013). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacol Rev* 65, 500-543.
- Knop, E, and Knop, N (2005). The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *Journal of anatomy* 206, 271-285.
- Koga, H, Recke, A, Vidarsson, G, Pas, HH, Jonkman, MF, Hashimoto, T, Kasprick, A, Ghorbanalipour, S, Tenor, H, Zillikens, D, *et al.* (2016). PDE4 Inhibition as Potential Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *The Journal of investigative dermatology* 136, 2211-2220.
- Koppaka, V, Thompson, DC, Chen, Y, Ellermann, M, Nicolaou, KC, Juvonen, RO, Petersen, D, Deitrich, RA, Hurley, TD, and Vasiliou, V (2012). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological reviews* 64, 520-539.

Koster, J, Geerts, D, Favre, B, Borradori, L, and Sonnenberg, A (2003). Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *Journal of cell science* 116, 387-399.

La Placa, M, Balestri, R, Tartari, F, Sechi, A, Ferrara, F, Loi, C, Patrizi, A, and Bardazzi, F (2019). Mucous Membrane Pemphigoid-Associated Malignancies: Case Series and a Brief Overview of the Literature. *Dermatology practical & conceptual* 9, 119-125.

Lammer, J, Hein, R, Roenneberg, S, Biedermann, T, and Volz, T (2019). Drug-induced Linear IgA Bullous Dermatitis: A Case Report and Review of the Literature. *Acta dermato-venereologica* 99, 508-515.

Lau, I, Goletz, S, Holtsche, MM, Zillikens, D, Fechner, K, and Schmidt, E (2019). Anti-p200 pemphigoid is the most common pemphigoid disease with serum antibodies against the dermal side by indirect immunofluorescence microscopy on human salt-split skin. *Journal of the American Academy of Dermatology* 81, 1195-1197.

Lazarova, Z, Hsu, R, Briggaman, RA, and Yancey, KB (2000a). Fab fragments directed against laminin 5 induce subepidermal blisters in neonatal mice. *Clin Immunol* 95, 26-32.

Lazarova, Z, Hsu, R, Yee, C, and Yancey, KB (2000b). Human anti-laminin 5 autoantibodies induce subepidermal blisters in an experimental human skin graft model. *The Journal of investigative dermatology* 114, 178-184.

Lazarova, Z, Yee, C, Darling, T, Briggaman, RA, and Yancey, KB (1996). Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *The Journal of clinical investigation* 98, 1509-1518.

LeBleu, VS, Macdonald, B, and Kalluri, R (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 1121-1129.

Lee, BWH, Tan, JCK, Radjenovic, M, Coroneo, MT, and Murrell, DF (2018). A review of scoring systems for ocular involvement in chronic cutaneous bullous diseases. *Orphanet journal of rare diseases* 13, 83.

Lee, HS, Hos, D, Blanco, T, Bock, F, Reyes, NJ, Mathew, R, Cursiefen, C, Dana, R, and Saban, DR (2015). Involvement of corneal lymphangiogenesis in a mouse model of allergic eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 56, 3140-3148.

Lee, HS, Schlereth, S, Khandelwal, P, and Saban, DR (2013). Ocular allergy modulation to hi-dose antigen sensitization is a Treg-dependent process. *PLoS one* 8, e75769.

Lee, J, Seiffert-Sinha, K, Attwood, K, and Sinha, AA (2019). A Retrospective Study of Patient-Reported Data of Bullous Pemphigoid and Mucous Membrane Pemphigoid From a US-Based Registry. *Frontiers in immunology* 10, 2219.

Lerner, A, Jeremias, P, and Matthias, T (2015). The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease* 3, 151-155.

Li, H, Zuo, J, and Tang, W (2018). Phosphodiesterase-4 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Frontiers in pharmacology* 9, 1048.

Liang, CC, Park, AY, and Guan, JL (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2, 329-333.

Ludwig, RJ, Recke, A, Bieber, K, Muller, S, Marques Ade, C, Banczyk, D, Hirose, M, Kasperkiewicz, M, Ishii, N, Schmidt, E, *et al.* (2011). Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of investigative dermatology* 131, 167-176.

Ludwig, RJ, Vanhoorelbeke, K, Leypoldt, F, Kaya, Z, Bieber, K, McLachlan, SM, Komorowski, L, Luo, J, Cabral-Marques, O, Hammers, CM, *et al.* (2017). Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Frontiers in immunology* 8, 603.

Ludwig, RJ, Zollner, TM, Santoso, S, Hardt, K, Gille, J, Baatz, H, Johann, PS, Pfeffer, J, Radeke, HH, Schon, MP, *et al.* (2005). Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *The Journal of investigative dermatology* 125, 969-976.

Manso, JA, Gomez-Hernandez, M, Carabias, A, Alonso-Garcia, N, Garcia-Rubio, I, Kreft, M, Sonnenberg, A, and de Pereda, JM (2019). Integrin alpha6beta4 Recognition of a Linear Motif of Bullous Pemphigoid Antigen BP230 Controls Its Recruitment to Hemidesmosomes. *Structure* 27, 952-964 e956.

McGonagle, D, and McDermott, MF (2006). A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS medicine* 3, e297.

Mojumdar, EH, Pham, QD, Topgaard, D, and Sparr, E (2017). Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Scientific reports* 7, 15712.  
Moritz, B, and Stracke, JO (2017). Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies. *Electrophoresis* 38, 769-785.

Mueller, DL (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature immunology* 11, 21-27.  
Munyangango, EM, Le Roux-Villet, C, Doan, S, Pascal, F, Soued, I, Alexandre, M, Heller, M, Lievre, N, Aucouturier, F, Caux, F, *et al.* (2013). Oral cyclophosphamide without corticosteroids to treat mucous membrane pemphigoid. *The British journal of dermatology* 168, 381-390.

Murphy, K, Travers, P, Walport, M, and Janeway, C (2012). *Janeway's immunobiology*, 8th edn (New York: Garland Science).

Murrell, DF, Marinovic, B, Caux, F, Prost, C, Ahmed, R, Wozniak, K, Amagai, M, Bauer, J, Beissert, S, Borradori, L, *et al.* (2015). Definitions and outcome measures for mucous membrane pemphigoid: recommendations of an international panel of experts. *Journal of the American Academy of Dermatology* 72, 168-174.

Natsuga, K, Nishie, W, Shinkuma, S, Moriuchi, R, Shibata, M, Nishimura, M, Hashimoto, T, and Shimizu, H (2010). Circulating IgA and IgE autoantibodies in antilaminin-332 mucous membrane pemphigoid. *The British journal of dermatology* 162, 513-517.

Navaratnam, J, Utheim, TP, Rajasekhar, VK, and Shahdadfar, A (2015). Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. *Journal of functional biomaterials* 6, 917-945.

Netea, MG, Schlitzer, A, Placek, K, Joosten, LAB, and Schultze, JL (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* 25, 13-26.

Nguyen, AV, and Soulika, AM (2019). The Dynamics of the Skin's Immune System. *International journal of molecular sciences* 20.

Niebuhr, M, Kasperkiewicz, M, Maass, S, Hauenschild, E, Bieber, K, Ludwig, RJ, Westermann, J, and Kalies, K (2017). Evidence for a contributory role of a xenogeneic immune response in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Experimental dermatology* 26, 1207-1213.

Nimmerjahn, F, and Ravetch, JV (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96, 179-204.

Olbrich, M, Kunstner, A, Witte, M, Busch, H, and Fahrnich, A (2019). Genetics and Omics Analysis of Autoimmune Skin Blistering Diseases. *Frontiers in immunology* 10, 2327.

Onuora, S (2015). Genetics. Meta-analysis reveals novel overlap in genetic aetiologies of paediatric autoimmune disorders. *Nat Rev Rheumatol* 11, 561.

Pincetic, A, Bournazos, S, DiLillo, DJ, Maamary, J, Wang, TT, Dahan, R, Fiebiger, BM, and Ravetch, JV (2014). Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature immunology* 15, 707-716.

Poletaev, AB, Churilov, LP, Stroev, YI, and Agapov, MM (2012). Immunophysiology versus immunopathology: Natural autoimmunity in human health and disease. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology* 19, 221-231.

Poreba, M, Szalek, A, Rut, W, Kasperkiewicz, P, Rutkowska-Wlodarczyk, I, Snipas, SJ, Itoh, Y, Turk, D, Turk, B, Overall, CM, *et al.* (2017). Highly sensitive and adaptable fluorescence-quenched pair discloses the substrate specificity profiles in diverse protease families. *Scientific reports* 7, 43135.

Pradhan, S, Madke, B, Kabra, P, and Singh, AL (2016). Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of Antibiotics and Their Use in Dermatology. *Indian journal of dermatology* 61, 469-481.

Prasad, SV, Fiedoruk, K, Daniluk, T, Piktel, E, and Bucki, R (2019). Expression and Function of Host Defense Peptides at Inflammation Sites. *International journal of molecular sciences* 21.

Pyzik, M, Sand, KMK, Hubbard, JJ, Andersen, JT, Sandlie, I, and Blumberg, RS (2019). The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Frontiers in immunology* 10, 1540.

Ramos, D, Carretero, A, Navarro, M, Mendes-Jorge, L, Nacher, V, Rodriguez-Baeza, A, and Ruberte, J (2013). Mimicking microvascular alterations of human diabetic retinopathy: a challenge for the mouse models. *Current medicinal chemistry* 20, 3200-3217.

Randall, TD, and Mebius, RE (2014). The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms. *Mucosal Immunol* 7, 455-466.

Raphael, I, Nalawade, S, Eagar, TN, and Forsthuber, TG (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74, 5-17.

- Reis, ES, Mastellos, DC, Hajishengallis, G, and Lambris, JD (2019). New insights into the immune functions of complement. *Nature reviews Immunology* 19, 503-516.
- Reyes, NJ, Mathew, R, and Saban, DR (2018). Induction and Characterization of the Allergic Eye Disease Mouse Model. *Methods Mol Biol* 1799, 49-57.
- Rieder, F, Siegmund, B, Bundschuh, DS, Lehr, HA, Endres, S, and Eigler, A (2013). The selective phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast and phosphodiesterase 3/4 inhibitor pumafentrine reduce clinical score and TNF expression in experimental colitis in mice. *PLoS one* 8, e56867.
- Riera Romo, M, Perez-Martinez, D, and Castillo Ferrer, C (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* 148, 125-139.
- Rock, KL, Reits, E, and Neefjes, J (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol* 37, 724-737.
- Rosenblum, MD, Remedios, KA, and Abbas, AK (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* 125, 2228-2233.
- Sadik, CD, Bischof, J, van Beek, N, Dieterich, A, Benoit, S, Sardy, M, Worm, M, Meller, S, Glaser, R, Zillikens, D, *et al.* (2017). Genomewide association study identifies GALC as susceptibility gene for mucous membrane pemphigoid. *Experimental dermatology* 26, 1214-1220.
- Samavedam, UK, Kalies, K, Scheller, J, Sadeghi, H, Gupta, Y, Jonkman, MF, Schmidt, E, Westermann, J, Zillikens, D, Rose-John, S, *et al.* (2013). Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction. *Journal of autoimmunity* 40, 74-85.
- Sasaoka, T, Ujiie, H, Nishie, W, Iwata, H, Ishikawa, M, Higashino, H, Natsuga, K, Shinkuma, S, and Shimizu, H (2018). Intravenous IgG Reduces Pathogenic Autoantibodies, Serum IL-6 Levels, and Disease Severity in Experimental Bullous Pemphigoid Models. *The Journal of investigative dermatology* 138, 1260-1267.
- Saw, VP, Schmidt, E, Offiah, I, Galatowicz, G, Zillikens, D, Dart, JK, Calder, VL, and Daniels, JT (2011). Profibrotic phenotype of conjunctival fibroblasts from mucous membrane pemphigoid. *The American journal of pathology* 178, 187-197.
- Schmidt, E, Kasperkiewicz, M, and Joly, P (2019). Pemphigus. *Lancet* 394, 882-894.
- Schmidt, E, Reimer, S, Kruse, N, Brocker, EB, and Zillikens, D (2001). The IL-8 release from cultured human keratinocytes, mediated by antibodies to bullous pemphigoid autoantigen 180, is inhibited by dapson. *Clinical and experimental immunology* 124, 157-162.
- Schmidt, E, Reimer, S, Kruse, N, Jainta, S, Brocker, EB, Marinkovich, MP, Giudice, GJ, and Zillikens, D (2000). Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 115, 842-848.
- Schmidt, E, and Zillikens, D (2011). The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Dtsch Arztebl Int* 108, 399-405, I-III.
- Schmidt, E, and Zillikens, D (2013). Pemphigoid diseases. *Lancet* 381, 320-332.

Schroeder, HW, Jr., and Cavacini, L (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology* *125*, S41-52.

Schulze, FS, Beckmann, T, Nimmerjahn, F, Ishiko, A, Collin, M, Kohl, J, Goletz, S, Zillikens, D, Ludwig, R, and Schmidt, E (2014). Fcγ receptors III and IV mediate tissue destruction in a novel adult mouse model of bullous pemphigoid. *The American journal of pathology* *184*, 2185-2196.

Shih, HY, Sciume, G, Mikami, Y, Guo, L, Sun, HW, Brooks, SR, Urban, JF, Jr., Davis, FP, Kanno, Y, and O'Shea, JJ (2016). Developmental Acquisition of Regulomes Underlies Innate Lymphoid Cell Functionality. *Cell* *165*, 1120-1133.

Singh, SP (2016). Understanding autoimmune diseases: an updated review. *International Journal of Pharmaceutical Technology and Biotechnology* *Vol 3, Issue 3, July-Sept. 2016*.

Sitaru, C, Chiriac, MT, Mihai, S, Buning, J, Gebert, A, Ishiko, A, and Zillikens, D (2006). Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol* *177*, 3461-3468.

Sitaru, C, Goebeler, M, and Zillikens, D (2004). [Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis]. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* *2*, 123-128; quiz 139-140.

Sitaru, C, Mihai, S, Otto, C, Chiriac, MT, Hausser, I, Dotterweich, B, Saito, H, Rose, C, Ishiko, A, and Zillikens, D (2005). Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *The Journal of clinical investigation* *115*, 870-878.

Smith, LC, and Cox, NH (2008). Dapsone treatment for eosinophilic fasciitis. *Archives of dermatology* *144*, 845-847.

Spillier, Q, Vertommen, D, Ravez, S, Marteau, R, Themans, Q, Corbet, C, Feron, O, Wouters, J, and Frederick, R (2019). Anti-alcohol abuse drug disulfiram inhibits human PHGDH via disruption of its active tetrameric form through a specific cysteine oxidation. *Scientific reports* *9*, 4737.

Sprent, J (2017). T cell-B cell collaboration. *Nature reviews Immunology* *17*, 532.

Streilein, JW (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nature reviews Immunology* *3*, 879-889.

Sundqvist, E, Sundstrom, P, Linden, M, Hedstrom, AK, Aloisi, F, Hillert, J, Kockum, I, Alfredsson, L, and Olsson, T (2012). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes and immunity* *13*, 14-20.

Tepelus, TC, Huang, J, Sadda, SR, and Lee, OL (2017). Characterization of Corneal Involvement in Eyes With Mucous Membrane Pemphigoid by In Vivo Confocal Microscopy. *Cornea* *36*, 933-941.

Toricelli, AA, Singh, V, Santhiago, MR, and Wilson, SE (2013). The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease. *Investigative ophthalmology & visual science* *54*, 6390-6400.

Tukaj, S, Bieber, K, Witte, M, Ghorbanalipour, S, Schmidt, E, Zillikens, D, Ludwig, RJ, and Kasperkiewicz, M (2018). Calcitriol Treatment Ameliorates Inflammation and Blistering in Mouse Models of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *The Journal of investigative dermatology* 138, 301-309.

Turvey, SE, and Broide, DH (2010). Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S24-32.

Ujii, H, Yoshimoto, N, Natsuga, K, Muramatsu, K, Iwata, H, Nishie, W, and Shimizu, H (2019). Immune Reaction to Type XVII Collagen Induces Intramolecular and Intermolecular Epitope Spreading in Experimental Bullous Pemphigoid Models. *Frontiers in immunology* 10, 1410.

van Beek, N, Luttmann, N, Huebner, F, Recke, A, Karl, I, Schulze, FS, Zillikens, D, and Schmidt, E (2017). Correlation of Serum Levels of IgE Autoantibodies Against BP180 With Bullous Pemphigoid Disease Activity. *JAMA dermatology* 153, 30-38.

Vanderlugt, CL, and Miller, SD (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 2, 85-95.

Verschoor, A, Karsten, CM, Broadley, SP, Laumonnier, Y, and Kohl, J (2016). Old dogs-new tricks: immunoregulatory properties of C3 and C5 cleavage fragments. *Immunological reviews* 274, 112-126.

Vidarsson, G, Dekkers, G, and Rispens, T (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology* 5, 520.

Wang, L, Wang, FS, and Gershwin, ME (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* 278, 369-395.

Williams, GP, Radford, C, Nightingale, P, Dart, JK, and Rauz, S (2011). Evaluation of early and late presentation of patients with ocular mucous membrane pemphigoid to two major tertiary referral hospitals in the United Kingdom. *Eye (Lond)* 25, 1207-1218.

Woodley, DT (1987). Importance of the dermal-epidermal junction and recent advances. *Dermatologica* 174, 1-10.

Woodley, DT, Chang, C, Saadat, P, Ram, R, Liu, Z, and Chen, M (2005). Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *The Journal of investigative dermatology* 124, 958-964.

Woodley, DT, Ram, R, Doostan, A, Bandyopadhyay, P, Huang, Y, Remington, J, Hou, Y, Keene, DR, Liu, Z, and Chen, M (2006). Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *The Journal of investigative dermatology* 126, 1323-1330.

Wozel, G, and Blasum, C (2014). Dapsone in dermatology and beyond. *Archives of dermatological research* 306, 103-124.

Xiao, D, Ye, X, Zhang, N, Ou, M, Guo, C, Zhang, B, Liu, Y, Wang, M, Yang, G, and Jing, C (2015). A meta-analysis of interaction between Epstein-Barr virus and HLA-DRB1\*1501 on risk of multiple sclerosis. *Scientific reports* 5, 18083.

Yadav, R, Bhowmick, S, Gorecki, P, O'Rourke, J, and Cone, RE (2010). Paradoxical effect of pertussis toxin on the delayed hypersensitivity response to autoantigens in mice. *PloS one* 5, e11983.

Yasukochi, A, Teye, K, Ishii, N, and Hashimoto, T (2016). Clinical and Immunological Studies of 332 Japanese Patients Tentatively Diagnosed as Anti-BP180-type Mucous Membrane Pemphigoid: A Novel BP180 C-terminal Domain Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Acta dermato-venereologica* 96, 762-767.

Zakka, LR, Reche, P, and Ahmed, AR (2011). Role of MHC Class II genes in the pathogenesis of pemphigoid. *Autoimmunity reviews* 11, 40-47.

## 6. Zusammenfassung

Das Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoid ist eine seltene, subepidermal blasenbildende Autoimmundermatose mit Autoantikörpern gegen Laminin 332, einem heterotrimeren Strukturprotein der dermo-epidermalen Junktionszone bestehend aus einer  $\alpha_3$ -, einer  $\beta_3$ - und einer  $\gamma_2$ -Kette. Die Erkrankung wird über einen dominanten Befall der (Schleim-) Haut sowie IgG und/oder IgA und/oder C3 Ablagerungen entlang der Basalmembran definiert. Ein vernarbender, okulärer Befall kann zur Erblindung der Patienten führen, und ca. 25% der Fälle sind mit einem Malignom assoziiert. Die Behandlung erfolgt in aller Regel langfristig mit systemischen Immunsuppressiva. Aufgrund der relativen Seltenheit liegen nur wenige klinische und experimentelle Daten zu dieser Autoimmunerkrankung vor. Mausmodelle stellen somit eine alternativlose Grundlage dar, diese Krankheiten in einem immunologisch-komplexen System zu untersuchen. Durch den Transfer von Anti-murinen Laminin  $\alpha_3$  Antikörpern in Mäuse kann ein Phänotyp generiert werden, welcher die Patientensituation in der Effektorphase rekapituliert - inklusive oralen, konjunktivalen und kutanen Läsionen. Ein geeignetes Schema zu entwickeln, um die Ausprägungen der einzelnen Symptome zu quantifizieren, bildete den ersten Schritt der vorliegenden Arbeit. Im nächsten Schritt wurde Dapson, eine Standardtherapie für Patienten mit Schleimhautpemphigoid in diesem Mausmodell als *proof-of-principle* getestet. Die Krankheitsaktivität konnte durch die Behandlung mit Dapson im Vergleich zu Mäusen, die das Vehikel erhielten, signifikant reduziert werden, wodurch die Eignung dieses Modelles zur Evaluierung von zukünftigen spezifischeren Therapieoptionen validiert werden konnte. Anschließend wurden Medikationen getestet, welche geringere Nebenwirkungen als die Standardtherapie mit Dapson aufweisen und bereits klinisch für andere Erkrankungen zugelassen sind. Die Hemmung der Aldehyd-dehydrogenase mittels Disulfiram zeigte jedoch keinen klinischen Effekt in diesem Mausmodell. Die Hemmung der Phosphodiesterase-4 durch Roflumilast hingegen führte sowohl bei prophylaktischer, als auch bei therapeutischer Anwendung zu einer signifikanten Reduktion der oralen Läsionen. Der Erfolg der Behandlung konnte histologisch, sowie auch auf Protein- und Transkriptomebene verifiziert werden. Als Targetmoleküle der Wirkung von Roflumilast auf die induzierte Autoimmundermatose konnten IL-6 und CXCL-2 mittels Transkriptomanalyse und mittels *in vitro* Zellkulturexperimenten bestimmt werden. Roflumilast stellt somit eine mögliche neue Behandlungsalternative für Patienten mit Schleimhautpemphigoid dar.

Die Entwicklung eines neuen Mausmodells, welches in seinen Möglichkeiten nicht auf die Effektorphase der Erkrankung limitiert ist und die gesamte Pathogenese des Schleimhautpemphigoides abbildet, bildete den zweiten Teil der Arbeit. Eine Immunisierungsstrategie konnte für zwei verschiedene Fragmente der  $\alpha_3$  Kette (aa2756-3330 C-terminaler und aa1656-1985 mittlerer Abschnitt) des murinen Laminin 332 entwickelt werden mit

derer der Toleranzverlust, die Ausbildung von Anti-Laminin  $\alpha 3$ -spezifischen Autoantikörpern und letztlich ein klinischer Phänotyp in adulten Mäusen vom H2s-Haplotyp gelang. Der Bruch der Immunbarriere war hierbei abhängig von der Menge an injiziertem rekombinanten Laminin  $\alpha 3$ . Die Mäuse dieses „aktiven“ Mausmodelles entwickelten im Laufe von 14 Wochen überwiegend orale, konjunktivale und korneale Läsionen. Kutane Läsionen stellten eher die Ausnahme dar und sind wie bei Schleimhautpemphigoidpatienten auf den Körperrumpf begrenzt. Mittels direkter Immunfluoreszenz konnten IgG, IgA und C3 Ablagerungen entlang der Basalmembranzzone in den betroffenen Geweben detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich eine Kreuzreaktivität der Autoantikörper zwischen dem C-terminalen und dem mittleren mLAM $\alpha 3$ , obwohl nur eine geringe Sequenzhomologie zwischen den Proteinfragmenten besteht. Auch konnten keine Unterschiede im klinischen Bild der Mäuse festgestellt werden, weder im „aktiven“ noch im Antikörper-Transfer des Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoidmausmodell, in dem Antikörper gegen das C-terminale und das mittlere Laminin  $\alpha 3$  Fragment bzw. rekombinierte Formen der beiden Proteine eingesetzt wurden.

Die Entwicklungen und Ergebnisse die im Rahmen dieser Arbeit generiert werden konnten, bilden die Grundlage, um die Pathogenese des Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoids von der Entstehung über genetischen Prädispositionen bis hin zu spezifischeren Behandlungsoptionen weiter zu erforschen und neue, spezifischere Therapieoptionen und deren Wirkmechanismen zu validieren.

## **Abstract**

The anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid is a rare subepidermal blistering autoimmune disease with autoantibodies against laminin 332, a heterotrimeric structural protein of the dermal-epidermal junction consisting of a  $\alpha 3$ , a  $\beta 3$  and a  $\gamma 2$  chain. The disease is defined by predominant mucousal lesions and IgG and/or IgA and/or C3 deposits along the basal membrane zone. A scarring ocular affection can lead to blindness in patients with mucous membrane pemphigoid. In addition, approximately 25% of the cases are associated with a solid malignoma. Treatment is usually long-term with systemic immunosuppressive drugs. Due to the rarity, only few clinical and experimental data on this autoimmune disease are available. Therefore, mouse models are an alternative-free basis to study this disease in an immunologically complex system. Based on the transfer of anti-murine laminin  $\alpha 3$  antibodies into mice, a phenotype can be generated that recapitulates the patient situation in the effector phase - including oral, conjunctival, and cutaneous lesions. The first step of this thesis was to develop a suitable score to quantify the expression of the individual symptoms. In the next step, dapsone, a standard therapy for patients with mucous membrane pemphigoid, was applied in this mouse model as *proof-of-principle*. Disease activity was significantly reduced by treatment with dapsone compared to mice receiving the vehicle, thus validating the suitability of this

model for the evaluation of more specific therapy options. Subsequently, medications were tested which are known to have fewer side effects than the standard therapy with dapsone and are already approved for treatment of other diseases. However, the inhibition of aldehyde dehydrogenase with disulfiram did not show a clinical effect in this mouse model. In contrast, the inhibition of phosphodiesterase-4 by roflumilast led to a significant reduction of oral lesions in prophylactic and therapeutic approaches. The success of the treatment could be verified histologically as well as on the protein and transcriptome level. IL-6 and CXCL-2 could be identified as target molecules of roflumilast using transcriptome analysis and *in vitro* cell culture experiments. Roflumilast, thus represents a potential new treatment alternative for patients with mucous membrane pemphigoid.

The development of a new mouse model, which is not limited to the effector phase of the disease and maps the entire pathogenesis of the mucous membrane pemphigoid, formed the second part of this thesis. An immunization strategy could be developed for two different fragments of the  $\alpha 3$  chain (aa2756-3330 C-terminal and aa1656-1985 middle portion) of murine laminin 332. This strategy was successful in the loss of tolerance, the formation of anti-laminin  $\alpha 3$ -specific autoantibodies and finally, a clinical phenotype in adult mice of the H2s haplotype resembling the human disease. The loss of tolerance was dependent on the amount of injected recombinant laminin  $\alpha 3$ . The mice in this "active" mouse model developed predominantly oral, conjunctival, and corneal lesions within 14 weeks after immunization with recombinant laminin  $\alpha 3$ . Cutaneous lesions were only seen in a minority of mice and were limited to the trunk similar to patients with mucous membrane pemphigoid patients. Using direct immunofluorescence, IgG, IgA, and C3 deposits along the basal membrane zone could be detected in the affected tissues. Interestingly a cross reactivity of the autoantibodies between the C-terminal and the middle portion of mLAM $\alpha 3$  was seen despite a low sequence homology between the two protein fragments. Furthermore, no differences in the clinical picture of the mice were found, neither in the "active" nor in the anti-laminin 332 antibody transfer mouse model of mucous membrane pemphigoid, where antibodies against the C-terminal and the middle fragment of laminin  $\alpha 3$  or both forms of laminin  $\alpha 3$ , were used.

The developments and results of this thesis provide the basis for further research on the pathogenesis of anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid including genetic predispositions and the validation of new, more specific therapy options and their mechanisms of action.

## 7. Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Dr. Enno Schmidt, Leiter der Abteilung *Translation* im LIED, für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die Unterstützung und das großartige Arbeitsklima während meiner Doktorarbeit danken.

Prof. Dr. Detlef Zillikens, Sprecher des Graduiertenkollegs 1727 und Direktor der Klinik für Dermatologie und Allergologie, möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit als Stipendiatin des Graduiertenkollegs 1727 zu absolvieren.

Mein Dank geht außerdem an Prof. Dr. Werner Solbach, Universität zu Lübeck und Prof. Dr. Christian Sadik, Klinik für Dermatologie und Allergologie, die mir als meine Mentoren zu jeder Zeit mit wissenschaftlichem Enthusiasmus und konstruktiver Kritik zur Seite standen.

Darüberhinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Hauke Busch und Dr. Anke Fähnrich, LIED, für die Analyse der Transkriptomdaten und die Hilfe bei deren Verständnis dieser Daten, bedanken.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Ralf Ludwig und PD Dr. Katja Bieber, LIED, für die Zucht und Überlassung der SJL/J und B6.S Mäuse.

Frau Eva Nina Heppe, frühere PhD Studentin im LIED, bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Ihre hervorragende Einführung in das passive SHP-Mausmodell und ihre Bereitschaft, alle meine Fragen zu beantworten, haben mir den Einstieg in die Doktorarbeit wesentlich erleichtert.

Herrn Prof. Dr. Mahdy Ranjbar, Lübecker Institut für Experimentelle Ophthalmologie, danke ich für die fachliche Unterstützung bei der Analyse der kornealen Läsionen im aktiven SHP-Mausmodell.

Prof. Dr. Gabriela Riemekasten und ihrer PhD Studentin Laurence Johannson, Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie, danke ich für die Messung der Blutproben zur Erstellung des differentiellen Blutbildes.

Prof. Dr. Christian Sina, Dr. Stefanie Derer und ihrer PhD Studentin Annika Sünderhaud, Institut für Ernährungsmedizin, danke ich, dass ich deren exzellentes Endoskop zur Untersuchung der oralen Läsionen in den Mausmodellen jederzeit nutzen durfte.

Mein Dank geht auch an alle Mitdoktoranden des Graduiertenkollegs 1727, Kolleginnen und Kollegen aus dem LIED und vor allem die technischen Assistenten Vanessa Krull und Melina Gertz für die gute Zusammenarbeit, große Unterstützung und die hervorragende Arbeitsatmosphäre während meiner Doktorarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich Dr. Stephanie Goletz, LIED, danken, die mich immer daran erinnert hat, alles kritisch zu hinterfragen und die richtigen Kontrollen zu verwenden und die immer ein offenes Ohr für die kleinen und großen wissenschaftlichen Fragen hatte.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, ohne deren liebevolle Unterstützung ich es nicht bis hierhergeschafft hätte. Mein größter Dank gilt zuletzt meinem Ehemann dafür immer gleichzeitig Antrieb und Urlaubinsel zu sein.

## 8. Publikationsliste

### 8.1 Originalarbeiten

Murthy S, Schilf P, **Tofern S**, Thieme M, Becker M, Bremer T, Knebel L, Fagiani F, Ibrahim SM, Schmidt E, Zillikens D, Sadik CD. Dapsone suppresses neutrophil recruitment and disease in a preclinical model of epidermolysis bullosa acquisita, *J Invest Dermatol* 2020 (in Revision)

Karsten CM, Beckmann T, Holtsche MM, Tillmann J, **Tofern S**, Schulze F, Heppe EN, Ludwig R, 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. IF 4.7

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 reflects clinical and immunopathological characteristics of the human disease and critically involves C5aR1. *J Invest Dermatol* 2017, 137: 1709-18. IF 6.4 **\*geteilte Erstautorenschaft**

Knobloch JK, **Tofern S**, Kunz W, Schütze S, Riecke M, Solbach W, Wuske T. "Life-like" assessment of antimicrobial surfaces by a new touch transfer assay displays strong superiority of a copper alloy compared to silver containing surfaces. *PLoS One*. 2017 Nov 14;12(11):e0187442 IF 2.8

**Tofern S**. Streusalz kontra Umwelt – Einsatz von Auftaumitteln ökologisch bedenklich? *Junge Wissenschaft* 2001, 61:50-54.

**Tofern S**, Kössler W. Blauer Dunst – Gift für Grünes? *Junge Wissenschaft (Titelstory)* 2000, 57:14-18.

**Tofern S**, Pfeffer I, Kössler W. Blauer Engel - ein grauer Bengel? *Recyclingpapier – wirklich umweltfreundlich?* *Junge Wissenschaft* 1999, 48:34-36.

### 8.2 Kongressbeiträge

#### 8.2.1 Abstracts

Kamaguchi M, **Tofern S**, Freire P, Schmidt-Jimenez LF, Bieber K, Schmidt E, Ludwig RJ, Verschoor A, Izumi K. Pathogenic role of C3 independent complement activation pathway in pemphigoid diseases 15th Biennial Congress European Association of Oral medicine, 23.-25.09.2021, Porto, Portugal.

**Tofern S**, Fähnrich A, Künzel S, Ludwig RJ, Zillikens D, Busch H, Schmidt E. Inhibition of phosphodiesterase 4 significantly decreases oral mucosa lesions in experimental anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 49<sup>th</sup> Annual Meeting European Society for Dermatological Research, 18.-21.09.2019, Bordeaux, Frankreich.

**Tofern S**, Fähnrich A, Künzel S, Ludwig R, Zillikens D, Busch H, Schmidt E. Effect of phosphodiesterase-4 inhibition on skin and mucosal lesions in experimental anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 46. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 13.-16.03.2019, München, Deutschland, *Exp Dermatol* 2019; 28:e62.

**Tofern S**, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. Differential effect of phosphodiesterase 4 inhibition on skin and mucosal lesions in experimental anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 11<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, 16.-20.05.2018, Lissabon, Portugal.

**Tofern S**, Hepe EN, Zillikens D, Schulze FS, Schmidt E. Pathogenic relevance of different epitopes on  $\alpha$ 3 chain and pharmacological influence of skin and mucosal lesions. 7. *Winter School* der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 01.-03.02.2018, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

**Tofern S**, Goletz S, Schulze FS, Ludwig RJ, Zillikens D, Schmidt E. Anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid mouse model: pathogenic relevance of different epitopes on  $\alpha$ 3 chain and pharmacological influence of skin and mucosal lesions. International Pemphigus and Pemphigoid Foundation Scientific Conference, 21.-23.06.2017, Lübeck, Deutschland.

**Tofern S**, Hepe EN, Schulze FS, Ishiko A, Atsushi S, Sina C, Zillikens D, Köhl J, Goletz S, Schmidt E. Rekapitulation der klinischen und immunpathologischen Charakteristika des Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoides in einem neuen Mausmodell. 49. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 26.-29.04.2017, Berlin, Deutschland, *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2017; 15:110.

Hepe EN, **Tofern S**, Schulze FS, Ishiko A, Zillikens D, Goletz S, Schmidt E. A novel mouse model for anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 44. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 09.-11.03.2017, Göttingen, Deutschland, *Exp Dermatol* 2017; 26:e39.

**Tofern S**, Hepe EN, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. Evaluation of a clinical score for the newly established mouse model of anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. Round table der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung, 21.-22.10.2016, Bad Segeberg, Deutschland.

Hepe EN, Schulze FS, Ishiko A, **Tofern S**, Zillikens D, Goletz S, Schmidt E. A novel mouse model for anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. Pathogenesis of pemphigus and pemphigoid the open blister/mind meeting Satellite Symposium to the 46th Annual Meeting European Society for Dermatological Research, 05.-08.09.2016 München, Deutschland.

**Tofern S**, Hepe EN, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. Evaluation of a clinical score for the newly established mouse model of anti-laminin332 mucous membrane pemphigoid. Pathogenesis of pemphigus and pemphigoid the open blister/mind meeting Satellite Symposium to the 46th Annual Meeting European Society for Dermatological Research, 05.-08.09.2016 München, Deutschland.

**Tofern S**, Schuetze S, Kunz W, Wuske T, Solbach W, Knobloch JK. Silver containing surfaces lack antibacterial activity under dry conditions. 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 27.-30.09.2015 Münster, Deutschland, *International Journal of Medical Microbiology* 2015.

### **8.2.2 Vorträge**

**Tofern S**, Fähnrich A, Künzel S, Ludwig R, Zillikens D, Busch H, Schmidt E. Effect of phosphodiesterase-4 inhibition on skin and mucosal lesions in experimental anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 46. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 13.-16.03.2019, München, Deutschland, *Exp Dermatol* 2019; 28:e62.

**Tofern S**, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. Differential effect of phosphodiesterase 4 inhibition on skin and mucosal lesions in experimental anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 11<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, 16.-20.05.2018, Lissabon, Portugal.

Heppe EN, **Tofern S**, Schulze FS, Ishiko A, Zillikens D, Goletz S, Schmidt E. A novel mouse model for anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 44. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 09.-11.03.2017, Göttingen, Deutschland, Exp Dermatol 2017; 26:e39.

**Tofern S**, Heppe EN, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E. Evaluation of a clinical score for the newly established mouse model of anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. Round table der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung, 21.-22.10.2016, Bad Segeberg, Deutschland.

### **8.2.3 Auszeichnungen**

**Translational Research Preis Der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung: Tofern S**, Fähnrich A, Künzel S, Ludwig R, Zillikens D, Busch H, Schmidt E. Effect of phosphodiesterase-4 inhibition on skin and mucosal lesions in experimental anti-laminin 332 mucous membrane pemphigoid. 46. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 13.-16.03.2019, München, Deutschland, Exp Dermatol 2019; 28:e62.

**Best publication award des GRK 1727:** 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 reflects clinical and immunopathological characteristics of the human disease and critically involves C5aR1. J Invest Dermatol 2017, 137: 1709-18. 30.11.2017 - 01.12.2017, Bad Segeberg, Deutschland

**Posterpreis der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft: Tofern S**, Heppe EN, Schulze FS, Ishiko A, Atsushi S, Sina C, Zillikens D, Köhl J, Goletz S, Schmidt E. Rekapitulation der klinischen und immunpathologischen Charakteristika des Anti-Laminin 332 Schleimhautpemphigoides in einem neuen Mausmodell. 49. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 26.-29.04.2017, Berlin, Deutschland, Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 2017; 15:110.

**Bildungspreis für Jugend**, Sonderehrung durch den Bildungsminister für herausragende Leistungen in einem Schüler Wettbewerb: **Tofern S**, Juni 2003, Hamburg, Deutschland.

**3. Platz im Bundeswettbewerb Jugend Forscht**, Fachbereich Biologie: **Tofern S**. Streusalz kontra Umwelt – Streumittel ein ökologisches Risiko? Jugend Forscht, März 2001, Hamburg, Deutschland.

**1. Platz im Landeswettbewerb Schüler Experimentieren**, Fachbereich Biologie: **Tofern S**. Streusalz kontra Umwelt – Streumittel ein ökologisches Risiko? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, Februar 2000, Hamburg, Deutschland.

**Umwelt-Sonderpreis** der Zeitschrift Stern: **Tofern S**. Streusalz kontra Umwelt – Streumittel ein ökologisches Risiko? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, Februar 2000, Hamburg, Deutschland.

**Sonderpreis** der Hamburger Elektrizitäts Werke: **Tofern S**. Streusalz kontra Umwelt – Streumittel ein ökologisches Risiko? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, Februar 2000, Hamburg, Deutschland.

**1. Platz im Landeswettbewerb Schüler Experimentieren**, Fachbereich Biologie: **Tofern S**, Kössler W. Blauer Dunst – Gift für Grünes? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, März 1999, Hamburg, Deutschland.

**Sonderpreis Umwelttechnik** der Deutschen Bundesstiftung Umwelt: **Tofern S**, Kössler W. Blauer Dunst – Gift für Grünes? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, März 1999, Hamburg, Deutschland.

**1. Platz im Landeswettbewerb Schüler Experimentieren**, Fachbereich Biologie: **Tofern S**, Kössler W. Umwelt auf der Kippe? Rauchen ein ökologisches Risiko? März 1998, Hamburg, Deutschland.

**1. Platz im Landeswettbewerb Schüler Experimentieren**, Fachbereich Biologie: **Tofern S**, Raabe M, Kössler W. Sitzt die Kresse in der Tinte? Tinten – ein ökologisches Problem? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, Februar 1997, Hamburg, Deutschland.

**Sonderpreis Umwelttechnik** der Deutschen Bundesstiftung Umwelt: **Tofern S**, Raabe M, Kössler W. Sitzt die Kresse in der Tinte? Tinten – ein ökologisches Problem? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, Februar 1997, Hamburg, Deutschland.

**1. Platz im Landeswettbewerb Schüler Experimentieren**, Fachbereich Biologie: **Tofern S**, Pfeffer I, Kössler W. Blauer Engel - ein grauer Bengel? Recyclingpapier – wirklich umweltfreundlich? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, Februar 1996, Hamburg, Deutschland.

**Sonderpreis Umwelttechnik** der Deutschen Bundesstiftung Umwelt: **Tofern S**, Pfeffer I, Kössler W. Blauer Engel - ein grauer Bengel? Recyclingpapier – wirklich umweltfreundlich? Landeswettbewerb Schüler Experimentieren, Februar 1996, Hamburg, Deutschland.