

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

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ralf Ludwig

**Evaluierung von murinen monoklonalen anti-Typ-
VII-Kollagen-Antikörpern im Antikörper-Transfer-
induzierten Modell der Epidermolysis bullosa
acquisita**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Sektion Medizin-

Vorgelegt von

Tim Harden

aus Zwiesel

Lübeck 2025

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Ludwig

Kobetreuer: Prof. Dr. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: PD Dr. med. David Juhl

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2025

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 15.05.2025

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 AUTOIMMUNERKRANKUNGEN.....	1
1.2 BULLÖSE AUTOIMMUNDERMATOSEN	1
1.3 AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT	1
1.4 EPIDERMOLYSIS BULLOSA ACQUISITA (EBA)	4
1.4.1 <i>Epidemiologie</i>	4
1.4.2 <i>Typ-VII Kollagen (COL7)</i>	4
1.4.3 <i>Pathogenese</i>	6
1.4.4 <i>Klinik und Diagnostik</i>	8
1.4.5 <i>Therapie</i>	9
1.5 EXISTIERENDE MODELLE DER EBA.....	10
1.5.1 <i>Antikörper-(AK)-Transfer-induziertes Modell</i>	11
1.5.2 <i>Immunisierungs-induziertes Modell</i>	12
1.6 HYBRIDOM-ZELLKULTUR	13
1.7 ZIEL DER ARBEIT	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 MATERIAL	16
2.1.1 <i>Antikörper, Antigene und Hybridom-Zellkulturreihen</i>	16
2.1.2 <i>Chemikalien</i>	17
2.1.3 <i>Medien und Puffer</i>	19
2.1.4 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	20
2.1.5 <i>Laborgeräte</i>	21
2.1.6 <i>Versuchstiere und Kryo-Schnitte</i>	23
2.2 KULTIVIERUNG VON HYBRIDOM-ZELLKULTUREN.....	23
2.2.1 <i>Auftauen und Anlegen der Hybridom-Zellkultur</i>	23
2.2.2 <i>Nachweis von murinem IgG im Zellkulturüberstand</i>	27
2.3 IGG-ISOLIERUNG MITTELS PROTEIN-G-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	27
2.4 KONZENTRIERUNG DER ELUIERTEN MURINEN ANTI-COL7-IGG.....	28
2.4.1 <i>IgG-Konzentrierung mittels PEG</i>	28
2.4.2 <i>IgG-Aufkonzentrierung mittels Filtertubes</i>	28
2.4.3 <i>Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop-Photometer</i>	29
2.4.4 <i>Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay</i>	29
2.4.5 <i>Nachweis von murinen IgG mittels SDS-Gelelektrophorese</i>	30
2.5 MARKIERUNG MURINER ANTI-COL7-IGG MIT DYLIGHT-594-NHS	32

2.6	<i>IN VITRO</i> TESTUNG DER MURINEN ANTI-COL7-IGG	33
2.6.1	<i>Bestimmung freigesetzter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)</i>	33
2.6.2	<i>Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)</i>	35
2.7	<i>IN VIVO</i> TESTUNG DER MURINEN ANTI-COL7-IGG	36
2.7.1	<i>Lokales AK-Transfer-induziertes Modell der EBA</i>	36
2.7.2	<i>Nachweis des Bindungsverhaltens der murinen anti-COL7-IgG im Multiphotonen-Mikroskop</i>	37
2.8	HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN.....	39
2.8.1	<i>Anfertigung der Kryo-Schnitte</i>	39
2.8.2	<i>Direkte Immunfluoreszenzfärbung (DIF) – IgG und Komplementfaktor C3</i>	39
2.8.3	<i>Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung</i>	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	PRODUKTION MURINER ANTI-COL7-IGG IN HYBRIDOM-ZELLKULTUREN	41
3.2	<i>IN VITRO</i> TESTUNG DER MURINEN MONOKLONALEN ANTI-COL7-IGG	43
3.2.1	<i>Bindung muriner monoklonaler anti-COL7-IgG an die DEJ</i>	43
3.2.2	<i>ROS-Ausschüttung nach Stimulation von murinen PMN mit murinen monoklonalen anti-COL7-IgG-Immunkomplexen</i>	44
3.3	<i>IN VIVO</i> TESTUNG DER MONOKLONALEN MURINEN ANTI-COL7-IGG.....	46
3.3.1	<i>Ergebnisse des lokalen AK-Transfer-induzierten Modells</i>	46
4	DISKUSSION	59
4.1	EPITOP-SPEZIFISCHE INDUKTION DER EBA NACH BINDUNG MONOKLONALER MURINER IGG....	60
4.2	BINDUNGSSTÄRKE UND BINDUNGSDAUER VON ANTI-COL7-IGG	62
4.2.1	<i>Bindungsstärke muriner monoklonaler anti-COL7-IgG</i>	62
4.2.2	<i>Bindungsdauer muriner monoklonaler anti-COL7-IgG des Klon 1</i>	63
4.3	FAB-VERMITTELTE EFFEKTE DER EBA.....	64
4.4	FC-VERMITTELTE EFFEKTE DER EBA.....	65
4.4.1	<i>Glykosylierung des Fc-Fragments</i>	65
4.4.2	<i>IgG-Subklassen</i>	66
4.4.3	<i>ROS-Ausschüttung durch murine monoklonale anti-COL7-IgG</i>	68
4.4.4	<i>Aktivierung des Komplementsystems</i>	69
4.5	FCγ-REZEPTOREN ALS ESSENZIELLE MEDIATOREN DER EBA INDUKTION.....	69
4.6	SYSTEMISCHE FEHLER BEI DER KULTIVIERUNG, ISOLATION UND APPLIKATION MURINER MONOKLONALER ANTI-COL7-IGG-KLONE.....	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	LITERATURVERZEICHNIS	I
7	ANHANG	XIV

7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIV
7.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	XV
7.3	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	XVI
7.4	LEBENS LAUF.....	XVII
7.5	ANTRÄGE, BESCHEINIGUNGEN, ZERTIFIKATE.....	XVIII
7.6	DANKSAGUNG.....	XX

Abkürzungsverzeichnis

AK	–	Antikörper
APS	–	Ammoniumperoxodisulfat
AUC	–	area under the curve
BSA	–	Rinderserumalbumin
°C	–	Grad Celsius
COL7	–	Typ VII Kollagen
CMP	–	Cartilage-matrix-protein
Da	–	Dalton
DAPI		Diamidin-2-Phenylindol
DEJ	–	dermal-epidermale Junctionszone
DIF	–	direkte Immunfluoreszenzmikroskopie
DMSO	–	Dimethylsulfoxid
EBA	–	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	–	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	–	Enhanced-green-fluorescent-protein
EHK	–	Erhaltungskultur
ELISA	–	enzymgebundener Immunadsorptions-Assay
FCS	–	Fetales Kälberserum
FITS	–	Fluorescein-Isothiocyanat-conjugated
FNIII	–	sixth-ninth-fibronectin-3
h	–	Stunde (hour)
HBSS	–	Hanks Balanced Salt Solution
HE	–	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	–	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HGPRT	–	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HLA II	–	Humanes Leukozyten Antigen Klasse II
i.c.	–	intrakutan
IgG	–	Immunglobulin G
IIF	–	indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie
i.p.	–	intraperitoneal
i.v.	–	intravenös
IVIG	–	hochdosiertes intravenöses Immunglobulin
kDa	–	Kilodalton
KLH	–	Keyhole Limpet Hemocyanin
LM1	–	lokales Antikörper-Transfer-induziertes Modell 1
LM2	–	lokales Antikörper-Transfer-induziertes Modell 2
MACS	–	Magnetic Activated Cell Sorting
mg	–	Milligramm
MHC	–	Major-Histocompatibility-Complex
min	–	Minuten
mL	–	Milliliter
NADPH	–	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NC-	–	nicht-kollagen
ng	–	Nanogramm
PBS	–	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	–	Polyethylenglykol
PMA	–	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	–	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
ROS	–	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	–	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	–	Roswell Park Memorial Institute Medium

VI

RT	–	Raumtemperatur
s.c.	–	subkutan
SDS	–	10 % Sodiumdodecylsulfat
TRIS	–	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
vWFA2	–	von Willebrand Faktor Typ A
µl	–	Mikroliter
µm	–	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Autoimmunerkrankungen

Die Aufgabe des Immunsystems höherer Lebewesen besteht darin, Gewebeschädigungen durch Krankheitserreger (z. B. Viren, Bakterien, Pilze) abzuwenden. Beim Immunsystem wird zwischen einem angeborenen sowie erworbenen Anteil unterschieden. Das erworbene Immunsystem „lernt“ bei Kontakt mit neuen Erregern diese zu detektieren und abzuwehren. Autoimmunerkrankungen entstehen, wenn bei diesem Prozess körpereigene Strukturen (Autoantigene) das erworbene Immunsystem aktivieren (1). Bei Autoimmundermatosen fungieren Proteinabschnitte verschiedener Strukturmoleküle der Dermis und Epidermis als Autoantigene (2).

1.2 Bullöse Autoimmundermatosen

Bullöse Autoimmundermatosen sind eine heterogene Gruppe von Autoimmunerkrankungen bei denen Auto-Antikörper (Auto-AK) gegen Verbindungsproteine der Haut und/oder der Schleimhäute gebildet werden. Die Klinik ist typischerweise durch Blasenbildung sowie intra- bzw. subepidermale Erosionen und Krusten gekennzeichnet, die zu schweren und langanhaltenden Krankheitsverläufen mit hohem Leidensdruck bei den betroffenen Patienten führen (3). Autoimmundermatosen werden entweder nach ihrem Auto-Antikörper oder nach ihrem klinischen Bild eingeteilt. Der durch Auto-AK gegen Desmoglein 1 und 3 ausgelöste Pemphigus vulgaris führt zu einer intraepidermalen Separation und Blasenbildung. Bei der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) kommt es hingegen durch die Bildung von Auto-AK gegen Typ-VII-Kollagen (COL7), das die Dermis mit den Hemidesmosomen der Basalmembran verbindet, zu einer subepidermalen Blasenbildung (4)

1.3 Aufbau und Funktion der Haut

Als größtes Organ des Körpers übernimmt die Haut vielfältige Funktionen. Neben der Sinneswahrnehmung, der Temperaturregulation, endokrinen Funktionen (z. B. Bildung von Vitamin D) und der Regulation des Wasserhaushaltes bildet sie die erste Barriere gegenüber mechanischem Stress, Noxen (Strahlung, chemisch

toxische Einflüsse) und Krankheitserregern. In der Haut präsentieren dendritische Zellen und Langerhans-Zellen dem Immunsystem (T-Lymphozyten) Antigene (5). Makroskopisch lässt sich die Haut in Epidermis, Dermis und Subkutis unterteilen. Die oberflächliche Epidermis besteht aus mehrschichtig verhorntem Plattenepithel, das sich hauptsächlich aus über Desmosomen miteinander verknüpfte Keratinozyten zusammensetzt. Weitere Zellen der Epidermis sind Melanozyten, Merkel- und Langerhans-Zellen. Die Epidermis lässt sich in vier Schichten unterteilen. Von der Hautoberfläche beginnend sind diese das Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. Unterhalb des Stratum basale befindet sich die Basalmembran (s. Abbildung 1).

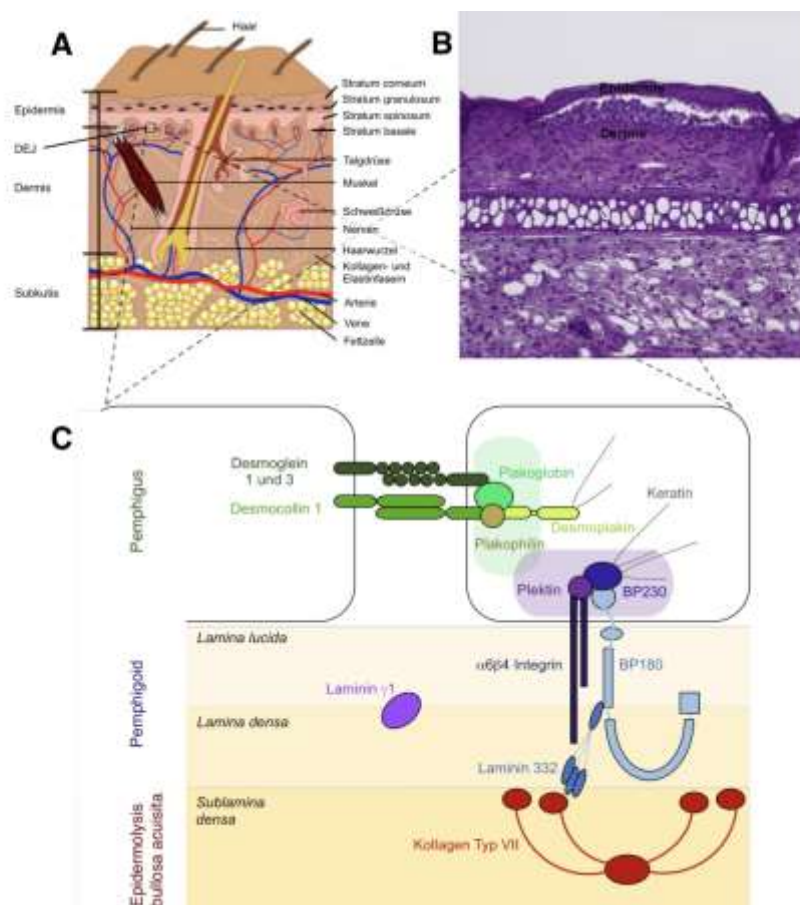


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut und ihrer Strukturproteine – Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen (Ref. (6)): **A)** Schichten der Haut – **Epidermis** (Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinale Stratum basale), **Dermis** (Stratum papillare, Stratum reticulare= **Subkutis** mit Fettgewebe). **B)** Histologischer Schnitt durch die Haut mit Epidermolysis bullosa acquisita-(EBA)-typischer subepidermaler Blasenbildung **C)** Basalmembran mit Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa sowie Zielantigene bullöser Autoimmundermatosen. Hemidesmosomen sind Zell-Matrix-Kontakte zwischen den basalen Keratinozyten der Epidermis (BP230/Plectin) und den Verankerungsfibrillen der Dermis. Auto-Antikörper (Auto-AK) gegen hemidesmosomale Proteine führen zu Pemphigoid-Erkrankungen mit subepidermaler Blasenbildung. Das für die EBA pathognomonische Protein Typ-VII-Kollagen (COL7) zieht von Laminin 332 in der Basalmembran bis zu Ankerplaques in der papillären Dermis. Auto-AK gegen COL7 lagern sich subepidermal in der Sublamina densa an.

Das Stratum corneum ist eine aus toten Keratinozyten bestehende Hornschicht, deren Dicke je nach Lokalisation und Funktion stark variiert. Das Stratum granulosum besteht aus körnigen Keratinozyten mit basophilen Granula, die weiter zur Oberfläche hin abgeflacht erscheinen. Sie geben Lipide und saure Hydrolasen in den Interzellularspalt ab und bilden somit eine hydrophobe Barriere. Das Stratum spinosum beinhaltet voluminöse, polygonale Keratinozyten mit stacheligen Fortsätzen. Das Stratum basale ist aus kubischen oder prismatischen Keratinozyten aufgebaut, die mittels Hemidesmosomen mit der darunterliegenden Basalmembran verbunden sind. Darüber hinaus enthält es mitotisch aktive Stammzellen, die neue Keratinozyten produzieren und für die Erneuerung der Epidermis verantwortlich sind. Die Basalmembran ist eine 50–150 nm dünne Schicht, über die Epithelzellen mit dem subepithelialen Bindegewebe verbunden sind. Diese als dermal-epidermale Junctionszone (DEJ) bezeichnete Übergangszone ist essenziell für die Verbindung zwischen Dermis und Epidermis. Die Basalmembran lässt sich weiter unterteilen in die obere Lamina lucida, die Laminin, extrazelluläre Anteile von Hemidesmosomen der Keratinozyten, Ankerfibrillen und Adhäsionsmoleküle enthält, und die darunter liegende Lamina densa. Die Lamina densa besteht aus einem Geflecht von Typ-IV-Kollagen, Laminin, Fibronectin und Proteoglykanen, das Verbindungen mit der Dermis ermöglicht (5). Die Dermis enthält Schweißdrüsen, Haare, Haarfollikel, Muskeln, sensorische Neuronen und Blutgefäße. Sie verleiht der Haut ihre mechanische Elastizität sowie Festigkeit und speichert Wasser. Die Dermis besteht aus zwei ineinander übergehenden Schichten. Direkt an der Basalmembran befindet sich das Stratum papillare aus lockerem Bindegewebe, Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen und tiefer das Stratum reticulare mit kollagenen Fasern (Typ-I-Kollagen, COL7) und Elastin-Fasern. Die feste Verbindung zwischen Dermis und Epidermis erfolgt durch kollagene Fasern aus dem Stratum reticulare. Diese ziehen durch das Stratum papillare und verbinden sich mit den Hemidesmosomen der Basalmembran. Die Verbindung von Epidermis und Dermis ist maßgeblich von Adhäsionsmolekülen abhängig. Eine tragende Rolle spielen hierbei Desmosomen, Hemidesmosomen, Kollagenfasern aus der Dermis sowie die Basalmembran als Bindungsmediator. Autoantikörper der Autoimmundermatosen richten sich gegen Epitope dieser Verbindungsmoleküle und führen so zu einem Verlust der Adhäsion der verschiedenen Hautschichten(4).

1.4 Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)

Die EBA ist eine seltene Autoimmundermatose, die durch den Toleranzbruch und die Bildung von Auto-AK gegen das subepidermal lokalisierte COL7 charakterisiert ist. Klinisch zeigen sich Blasenbildung, Vesikel und Erosionen auf der Haut sowie an den Schleimhäuten. Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes wird ein mechanobullöser und inflammatorischer Typ unterschieden (7).

1.4.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der blasenbildenden Autoimmundermatosen hat, obwohl sie grundlegend als gering eingeschätzt wird, in den vergangenen Jahren zugenommen. Laut Schätzungen, beträgt die EBA-Inzidenz < 0,5 Fälle pro eine Million Einwohner (8). Im Vergleich zu der häufigsten autoimmunen Blasenerkrankung, dem bullösen Pemphigoid (BP) mit einer geschätzten Inzidenz von 2,4–21,7 pro eine Million Einwohner (3,9) ist sie somit deutlich seltener. Obwohl genaue epidemiologische Daten bisher fehlen, scheint es regionale Unterschiede zu geben. So wurde in Deutschland zuletzt eine EBA-Prävalenz von 2,8 pro eine Million Einwohner festgestellt (10). In Südkorea wird die Inzidenz und Prävalenz ebenfalls höher eingeschätzt (11). Die Gründe dieser Unterschiede sind nicht im Detail bekannt, können aber mit der Assoziation der EBA mit dem humanen Leukozyten Antigen Klasse II (HLAII) zusammenhängen (12,13). Grundsätzlich kann die EBA in jedem Alter auftreten und ist unter den Geschlechtern gleich verteilt. Sie bricht jedoch häufiger im zweiten und ab dem sechsten Lebensjahrzehnt aus (10).

1.4.2 Typ-VII Kollagen (COL7)

COL7 ist das Autoantigen der EBA. Das Protein wird von dem auf Chromosom 3 lokalisierten *COL7A1*-Gen kodiert (14). COL7 ist aus drei identischen Alpha-Ketten aufgebaut, die jeweils aus einer N-terminalen nicht-kollagenen (NC)-1-Domäne (145 kDa), einer großen zentralen kollagenen Domäne und einer kleineren C-terminalen NC-2-Domäne (34 kDa) bestehen (s. Abbildung 2) (15,16). Aus diesen Kollagenmolekülen bilden sich antiparallele Dimere, die sich im Bereich der NC2-Domänen über Disulfidbrückenbindungen verbinden (17). Durch laterale Kondensation formen die Dimere elektronenmikroskopisch bogenförmig unterhalb der Basalmembran sichtbare Ankerfibrillen (18). Die Proteine sind mit ihrer NC-1-

Domäne in der Basalmembran (Sublamina densa) bzw. einem Ankerplaque in der papillaren Dermis verbunden (16). COL7 bindet in der Basalmembran an die Strukturproteine Typ-I-, Typ-III- und Typ-IV-Kollagen sowie Laminin 332 und Fibronektin (19–23). Die Verankerungsplaques innerhalb der Dermis sind Basalmembran-ähnliche Inseln, die ebenfalls diese Strukturproteine beinhalten. Daher ist COL7 für die Bildung eines stabilen Geflechtes zwischen Epidermis und Dermis verantwortlich, welches die Adhäsion und Integrität des Gewebes sicherstellt. Die COL7-Synthese findet hauptsächlich in Fibroblasten und Epithelzellen statt (24). COL7 ist in allen Epithelien der Haut, der Schleimhaut, den Kanälen der Prostata und der Brust sowie in der Trachea, den Bronchien, dem Oesophagus und der Cornea lokalisiert. Im Gastrointestinaltrakt, in den Endothelien von Blutgefäßen, in Muskeln und in Nervenfasern ist es jedoch nicht nachweisbar (25). Für die EBA konnte gezeigt werden, dass meisten AK aus EBA-Patientenseren gegen die NC-1-Domäne und insbesondere gegen die von-Willebrand-Faktor-2-ähnlichen-(vWFA2)-Subdomäne gerichtet sind (14,26).

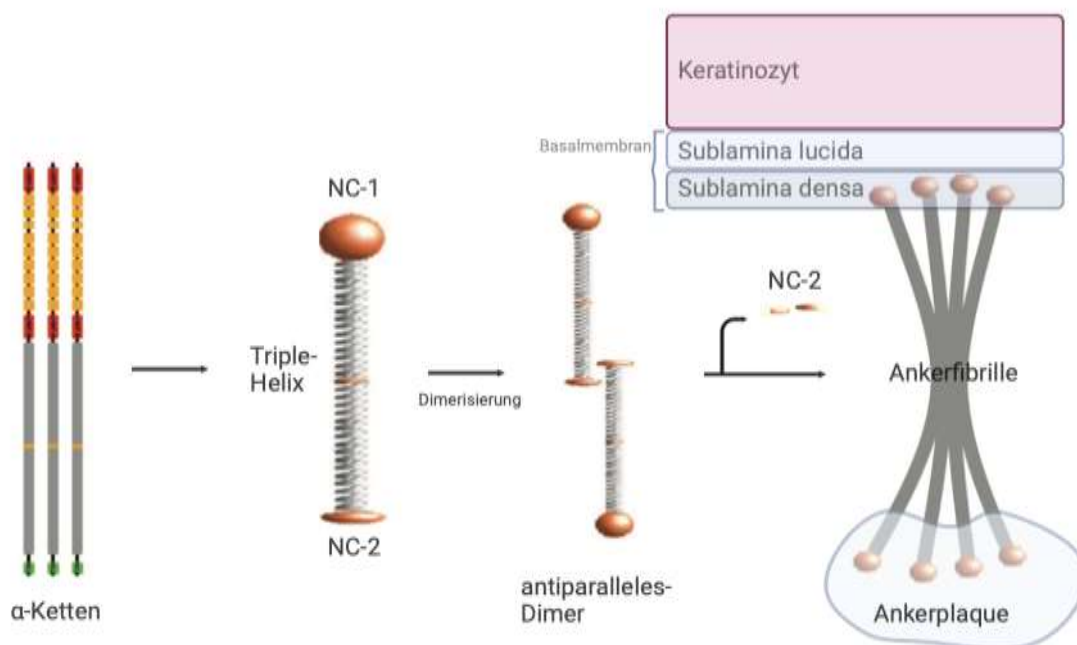


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ-VII-Kollagen (COL7) (Modifiziert Ref. (27)): Drei identische α -Ketten bilden eine COL7-Helix mit jeweils einer nicht kollagenen (NC)-2 und NC-1 Domäne sowie einer mittigen kollagenen Domäne. COL7-Proteine bilden antiparallele Dimere, die im Bereich der NC-2-Domäne über Disulfidbrücken verbunden sind. Aus diesen Dimeren formen sich Ankerfibrillen, die die Dermis (Ankerplaque) mit der Basalmembran (Sublamina densa) verbinden und somit zur Strukturintegrität zwischen Dermis und Epidermis beitragen.

1.4.3 Pathogenese

Die ursächlichen Mechanismen der Störung der Immuntoleranz sowie der Bildung von Auto-AK sind nicht vollständig verstanden (6,28). Am Anfang der EBA-Pathogenese kommt es zu einem Toleranzverlust gegenüber COL7. Klinische Beobachtungen und die Genotypisierung von Patienten weisen auf eine genetische Komponente der Erkrankung hin. Beispielsweise tritt bei EBA-Patienten gehäuft das Major-Histocompatibility-Complex-(MHC)-Klasse II Molekül HLA-DR2 auf (12,29). Weiter sind CD4+-T-Zellen für die Auto-AK-Produktion essentiell; T-Zell-defiziente Mäuse bilden nach Immunisierung mit COL7 keine Auto-AK (30). Außerdem lassen sich in EBA-Patienten Antigen-reaktive T-Zellen nachweisen (31). Diese T-Zellen detektieren das COL7, das durch Antigen-präsentierende Zellen über HLA-DR2-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Die so aktivierten T-Zellen fördern in den sekundären lymphatischen Organen die Produktion von Auto-AK gegen COL7 durch B-Zellen (32). Im Serum zirkulierende, anti-COL7-Auto-AK sind essenziell für die EBA-Pathogenese. Durch den AK-Transfer aus Seren von EBA-Patienten konnte im Mausmodell eine EBA induziert werden (33). Für die EBA-Pathogenese spielen die durch die Komplexe aus Auto-AK und COL7 ausgelösten Prozesse und die Aktivierung von Molekülen (Komplementfaktoren, Zytokinfreisetzung, Migration von neutrophilen Granulozyten an die DEJ, Fcγ-Rezeptoren (FcγRs), Metalloproteinasen) eine wichtige Rolle. Die von den Auto-AK erkannten Epitope verteilen sich über das gesamte COL7-Molekül. Die meisten Auto-AK von EBA-Patienten binden an Epitope der vWFA2-Subdomäne der NC-1-Region (14,26,34). Jedoch gibt es ebenfalls Seren, die Antikörper beinhalten, welche an der NC2 vom Typ VII Kollagen binden oder bei wenigen EBA-Patienten an der kollagenen Region oder der Gelenkregion binden (35). Zwischen der Auto-AK-Spezifität und dem EBA-Phänotyp ist keine Korrelation nachweisbar (26). Die zirkulierenden AK sind bei der Mehrzahl der Patienten vom Immunglobulin G Typ (IgG), jedoch kommen auch IgA, IgE und IgM AK vor (36). Die Auto-AK von EBA-Patienten gehören hauptsächlich den IgG1- und IgG4-Subklassen an (37–40). Laut aktueller Datenlage ist der Pathomechanismus der Induktion der Separation an der DEJ bei der klassischen inflammatorischen und der mechanobullösen Form der EBA verschieden. Da für die mechanobullöse Form aktuell ein valides Tiermodell fehlt, ist die klassische inflammatorische EBA besser verstanden. Bei der mechanobullösen Form der EBA wird angenommen, dass die Bindung von Auto-

AK an COL7 die Dimerisierung oder laterale Anordnung zu Ankerfibrillen stört bzw. die Verbindung der NC-1-Domäne mit Matrixproteinen (z. B. Typ-IV-Kollagen, IV, Fibronectin) beeinträchtigt. Die geschwächte Bindung der Kollagenfibrillen führt bei mechanischer Beanspruchung zu einer Blasenbildung (41). Bei der inflammatorischen EBA scheinen dagegen entzündliche Prozesse für die Separation der Dermis von der Epidermis verantwortlich zu sein. Laut aktuellem Kenntnisstand der EBA-Pathogenese läuft die Auto-AK-induzierte Gewebsschädigung wie folgt ab: Die Auto-AK binden über ihren Fab-Teil an ihr Epitop am COL7 und aktivieren über ihr Fc-Fragment das Komplementsystem über den alternativen Aktivierungsweg (42). Hierdurch kommt es zur Spaltung der Komplementfaktoren C3 und C5 in C3a/C3b bzw. C5a/C5b. Die freigesetzten Anaphylatoxine C3a und insbesondere C5a rekrutieren neutrophile Granulozyten durch Chemotaxis, induzieren die Histamin-Freisetzung und steigern die Kapillarpermeabilität (43,44). Die Faktoren C3b und C5b können im Bereich der DEJ zur Opsonierung und Destabilisierung der Membranintegrität führen. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen ist essenziell für die Induktion der inflammatorischen EBA (44–46). Die in das Gewebe eingewanderten neutrophilen Granulozyten binden über aktivierende-Fc γ -Rezeptoren an die Fc-Fragmente der Auto-AK und werden dadurch aktiviert. Mäuse, die über keine entsprechenden Fc γ -Rezeptoren auf den Granulozyten verfügen oder bei denen diese blockiert wurden, entwickeln keine EBA (47). Der Komplementfaktor C5a verstärkt die Inflammation, indem er die Expression des aktivierenden Fc γ RIIIA-Rezeptors auf neutrophilen Granulozyten verstärkt und gleichzeitig die Expression des inhibierenden Fc γ RIIb-Rezeptors reduziert (48,49). Weiter scheinen posttranslationale Modifikationen am Fc-Fragment der Auto-AK die EBA-Ausprägung zu modulieren. Eine starke Sialysierung des Fc-Fragments schwächt die EBA-Ausprägung ab, wohingegen ein nicht-galaktosyliertes Fc-Fragment durch eine verstärkte Bindung an den Fc γ -Rezeptor die EBA-Ausprägung verstärkt (50,51). Durch die Fc-vermittelte Aktivierung setzen neutrophilen Granulozyten reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie Proteasen (Matrix-Metalloproteasen, Elastasen, Gelatinasen) frei, die durch Proteolyse das umliegende Gewebe zerstören und zu der EBA-typischen subepidermalen Separation führen (52,53).

1.4.4 Klinik und Diagnostik

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde der Begriff EBA als deskriptive Diagnose für Patienten mit Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter verwendet. Die beschriebenen Merkmale ähnelten denen der hereditären dystrophischen Epidermolysis bullosa (54). Fast 70 Jahre später wurde die EBA anhand klinischer und histologischer Charakteristika von anderen bullösen Erkrankungen abgegrenzt. Die ersten diagnostischen Kriterien von Henry H. Roenigk (55) beinhalteten einen Ausbruch der Erkrankung im Erwachsenenalter, das Fehlen einer familiären Vorgeschichte für bullöse Erkrankungen, eine traumatisch-induzierte oder spontane Blasenbildung, die der dystrophischen Epidermolysis bullosa ähneln, und den Ausschluss anderer bullöser Erkrankungen. Die kutanen Manifestationen bei EBA-Patienten sind heterogen. Typisch ist eine fragile Haut, die sich bereits bei leichter Beanspruchung löst, sowie daraus resultierende pralle subepidermale Blasen, die sich häufig spontan eröffnen, im Verlauf verkrusten und unter Narbenbildung abheilen. Das klinische Bild der mechanobullösen und inflammatorischen EBA kann sich im Verlauf der Erkrankung ändern; beide Formen können simultan beim selben Patienten auftreten. Die bei 1/3 der Patienten beobachtete mechanobullöse EBA ist gekennzeichnet durch Hautbrüchigkeit, gespannte Blasen, Narben und Milienbildung. Die Prädilektionsstellen sind mechanisch belastete Areale (z. B. Handrücken, Ellenbogen Knie) (56,57). In einigen Fällen treten Nageldystrophien oder Hyper- oder Hypopigmentierungen auf. Bei dieser EBA-Form kann auch die Mundschleimhaut betroffen sein. Die inflammatorische Variante der EBA (ca. 2/3 der Fälle) gleicht klinisch anderen bullösen Autoimmundermatosen (z. B. bullöses Pemphigoid, Schleimhaut-Pemphigoid, lineare IgA-Erkrankung). Klinisch zeigen sich ausgedehnte vesikulobullöse Eruptionen, die typischerweise den Rumpf, die Extremitäten und die Hautfalten betreffen.

Bei klinischem Verdacht auf eine bullöse Autoimmundermatose wie die EBA ist meist eine Kombination aus verschiedenen Verfahren für eine eindeutige Diagnose erforderlich. Die histologische oder klinische Beurteilung der Hautläsionen reicht nicht aus, um die EBA von anderen subepidermalen Autoimmundermatosen zu unterscheiden. Bei der EBA zeigen sich histologisch anfänglich papilläre Ödeme sowie vakuoläre Veränderungen entlang der DEJ. Später kommt es zu einer subepidermalen oder subepithelialen Spaltung sowie zur Ausbreitung von entzündlichen Infiltraten mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN).

Bei älteren Läsionen sind Milienzysten und Fibroseherde in der Histologie sichtbar. Die Ausprägung dieser Merkmale ist variabel und lässt keine eindeutige Zuordnung zu (8). Die Histologie kann folglich nur zwischen intra- und subepidermalen Autoimmundermatosen unterscheiden. Als Goldstandard der Diagnostik gilt die Immungoldmikroskopie, die EBA-spezifische Auto-AK direkt in der Sublamina densa visualisiert (58). Diese Technik ist jedoch nur in wenigen Laboren verfügbar. Zudem erfordert die Diagnose frische Hautproben, was die Verfügbarkeit der Methode weiter einschränkt. Als essenzielles Kriterium für die EBA-Diagnose gilt der Nachweis linearer Immunglobulin, meist IgG- bzw. Komplement-C3-Ablagerungen entlang der DEJ in einer periläsionalen Hautbiopsie des Patienten. Der Nachweis erfolgt mithilfe der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie (DIF). Bei der charakteristischen IgG- bzw. Komplement-C3-Ablagerung unterhalb der Basalmembran (59) kann eine DIF-Musteranalyse wegweisend sein, die EBA-spezifische, lineare u-gezackte Immunablagerungen an der DEJ zeigt (60). Weiter lässt sich die Bindungsstelle der AK in der Sublamina densa mittels Immunelektronenmikroskopie bestimmen (61). Die EBA-Diagnose kann auch serologisch mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) gestellt werden. Hierbei binden anti-COL7-AK aus dem Patientenserum an mit Natriumchlorid (NaCl) gespaltener Haut (SSS). Mit einem fluoreszierenden Sekundär-AK können diese Patienten-Auto-AK an ihrem Bindungsort am COL7 an der DEJ detektiert werden. Weiter existieren für die serologische Diagnostik zwei enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Ein ELISA verwendet die NC-1- und NC-2-Domänen von COL7, der andere basiert allein auf der NC-1-Domäne (62,63). Der COL7-ELISA und die SSS erreichen zusammen eine Sensitivität von ca. 50 %. Daher schließt ein negativer serologischer Befund eine EBA nicht aus (64). Jedoch korrelieren die Serumspiegel der anti-COL7-IgG mit der Krankheitsaktivität.

1.4.5 Therapie

Aufgrund der geringen Prävalenz fehlen bis heute kontrollierte klinische Studien zur Behandlung der EBA. Aktuelle Therapieempfehlungen basieren daher ausschließlich auf Expertenmeinungen (41,65). Bei der Therapiewahl sind der klinische Phänotyp, die Schwere der Erkrankung und die Wünsche der Patienten zu berücksichtigen. Neben einer symptomatischen Therapie gelten systemische Glukokortikoide als erste Wahl bei der EBA-Behandlung, obwohl diese Therapie

häufig mit zahlreichen Nebenwirkungen einhergeht (66). Die Anfangsdosen betragen 0,5–2,0 mg/kg/Tag (4). Zur Reduktion der Nebenwirkungen der Glukokortikoide und zur Identifikation von alternativen Monotherapien für leichte Formen wurde die therapeutische Wirkung verschiedener immunsuppressiver Medikamente diskutiert. Methotrexat und Azathioprin werden häufig zusätzlich eingesetzt, um Glukokortikoide zu sparen (8). Auch Dapson zeigt in einer Kombinationstherapie eine Glukokortikoid-sparende Wirkung. Aufgrund der guten Therapieerfolge empfehlen einige Experten bei milderen Formen der EBA Kolchizin als Monotherapeutikum (67–70). Bei schweren Fällen der EBA zeigte die Gabe von hochdosiertem intravenösen (i.v.) Immunglobulin (IVIG) wie bei anderen Autoimmunerkrankungen (z. B. Guillain-Barré-Syndrom, Multiple Sklerose, Kawasaki Syndrom, Myasthenia gravis, Pemphigus-Erkrankungen) gute Therapieerfolge (71–74). Alternativ kann bei therapieresistenten Fällen der monoklonale anti-CD20-IgG-AK Rituximab eingesetzt werden (75–78). Insgesamt ist jedoch die Therapie der EBA oft frustrierend; eine komplette Remission wird selten erreicht. Mit dem zunehmenden Verständnis der Pathomechanismen der EBA können neue Therapiestrategien entwickelt werden. Dabei spielen Tiermodelle, die die Erkrankung möglichst exakt replizieren, eine bedeutende Rolle.

1.5 Existierende Modelle der EBA

Zur Analyse der Autoimmundermatose EBA haben sich verschiedene *ex vivo* und *in vivo* Modelle etabliert. Da die Immunkomplex-induzierte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten einen wichtigen Schritt in der EBA-Pathogenese darstellt (53), wurde ein entsprechendes *in vitro* Modell entwickelt. In diesem Modell werden immobilisierte Immunkomplexe aus Antigen (COL7) und COL7-AK aus Seren von EBA-Patienten bzw. Kaninchen anti-COL7-IgG verwendet. Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch diese Immunkomplexe wird anhand der ROS-Freisetzung (Chemilumineszenz), der Freisetzung proteolytischer Enzyme (ELISA) oder anhand der Morphologie bzw. Ausbreitung der Granulozyten beurteilt (28). Zur Untersuchung des Separationsprozesses von Dermis und Epidermis hat sich als *ex vivo* Modell der Kryo-Schnitt-Assay etabliert. Dabei werden 6 mm dicke Kryo-Schnitte menschlicher oder muriner Haut mit Patientenserum (79), rekombinanten anti-COL7-AK (38) oder Kaninchen-anti-COL7-IgG inkubiert, was zur Bildung von Immunkomplexen an der DEJ führt. Anschließend werden die gewebsgebundenen

Immunkomplexe mit Granulozyten inkubiert und die Gewebeschädigung durch die Mediatoren der aktivierten Granulozyten bestimmt. Durch die Anfärbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) können die Schäden anhand des Ausmaßes der Trennung von Epidermis und Dermis in Prozent bestimmt werden. Der Kryo-Schnitt-Assay erlaubt keine Aussagen zur Chemotaxis bzw. Leukozyten-Extravasation (28). Zur Analyse weiterer Mechanismen der EBA-Pathogenese wurden *in vivo* Modelle entwickelt. Die seit 2005 etablierten Mausmodelle werden in AK-Transfer-Modelle, bei denen ein Spezies-fremder AK gegen COL7 injiziert wird, und in Immunisierungs-induzierte Modelle, bei denen die Maus nach Immunisierung mit dem Antigen und einem Adjuvans selbst Auto-AK gegen COL7 bildet, unterteilt.

1.5.1 Antikörper-(AK)-Transfer-induziertes Modell

Bei der Reproduktion von Autoimmunerkrankungen im Tiermodell ist die Auslösung klinischer Symptome durch die Injektion eines Auto-AK gegen ein für die Erkrankung verantwortliches Antigen beweisend für die Pathogenität des AK (80). Dieser Zusammenhang wurde bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (z. B. Pemphigus, bullöses Pemphigoid) nachgewiesen. Analog wurden ab 2005 AK-Transfer-induzierte Mausmodelle der EBA entwickelt, die auf der lokalen subkutanen (s.c.), intrakutanen (i.c.) oder systemischen Injektion (i.v. oder intraperitoneal (i.p.)) eines anti-COL7-IgG basieren (33,45,81,82). Zunächst wurden verschiedenen Mausstämmen humane anti-COL7-AK lokal s.c. oder i.c. appliziert (83,84). Dabei banden einige AK nicht oder nur mit geringer Avidität am Mausepithel. Zur Verbesserung des Modells und zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit wurde aufgrund der unterschiedlichen Kreuzreaktivität der humanen AK mit der Maushaut ein Kaninchen-anti-Maus-COL7-AK entwickelt. Hierzu wurden New Zealand White Kaninchen mit drei rekombinanten Proteinen der NC-1-Domäne des murinen COL7 und Freundeschem Adjuvans immunisiert. Die erzeugten Kaninchen-anti-Maus-COL7-IgG wurden mithilfe einer Protein-G-Säule aus dem Kaninchenserum isoliert und in das AK-Transfer-induzierte Modell eingesetzt (45). Hier kam es schlussendlich zu einem klinischen Phänotyp in den Mäusen, die wesentliche Aspekte der humanen Erkrankung widerspiegelt. Bei den Gesamt-Kaninchen-IgG-Isolaten trat eine nicht zu vernachlässigende Chargen-Variabilität auf. Daher muss die zur Krankheitsinduktion benötigte AK-Menge

individuell bestimmt werden. Nach systemischer und lokaler Injektion kommt es zur Anlagerung der Kaninchen-anti-Maus-COL7-IgG an das COL7 in der DEJ. Als Folge entwickeln sich EBA-typische Läsionen an den Ohren beginnend, wobei der Schweregrad mit der applizierten IgG-Dosis korreliert. Histologisch zeigt sich ein an neutrophilen Granulozyten (PMN) reiches Infiltrat sowie die EBA-typische subepidermale Blasenbildung. In der DIF lassen sich EBA-typische IgG sowie Komplement-C3-Ablagerungen an der DEJ nachweisen. Die Krankheitsinduktion und EBA-Ausprägung unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Mausstamm. C57BL/6J-Mäuse zählen zu den empfindlichsten Mausstämmen, Balb/c-Mäuse zeigen eine mittlere Empfindlichkeit und MRL/MpJ-Mäuse scheinen fast vollständig resistent zu sein. Ebenfalls konnte weiter spezifiziert werden, dass Antikörper gegen die Cartilage-matrix-protein-(CMP)-Subdomäne, die sixth-ninth-fibronectin-3 (FNIII)-like Subdomäne sowie die vWFA2-Subdomäne der NC-1-Region des COL7 in der Maus eine EBA induzieren (26,81,85).

1.5.2 Immunisierungs-induziertes Modell

AK-Transfer-induzierte Modelle der EBA eignen sich gut zur Analyse der Pathomechanismen der AK-induzierten Gewebeerstörung und haben maßgeblich zum Verständnis dieser Mechanismen beigetragen (86). Zur Untersuchung des Toleranzabbruches sind diese AK-Transfer Modelle jedoch nicht geeignet, da sie nur die Effekte der Auto-AK an ihrem Zielantigen abbilden. Um den Toleranzabbruch gegenüber COL7 und die Modulation der Immunantwort bis zur AK-Produktion zu analysieren, sind andere *in vivo* Modelle erforderlich. Beim Immunisierungs-induzierten Modell der EBA werden verschiedene Mausstämme (SJL/J-, C57BL/6J-, Balb/c-, SKH1- und Fc γ -RIIB-defiziente Mäuse mit B16-Hintergrund) mit einem murinen rekombinanten, immundominanten Antigen aus der NC-1-Domäne des COL7 und dem Adjuvans TiterMax immunisiert und nach 3, 6 und 9 Wochen erneut mit 40 mg Antigen und TiterMax geboostert. Schon ein Monat nach der initialen Immunisierung sind im Serum zirkulierende anti-COL7-IgG nachweisbar, die an der DEJ des Mausepithels binden. Die indirekte Immunelektronenmikroskopie verifiziert die Bindung dieser Auto-AK EBA-typisch in der Sublamina densa. Klinisch differiert die Symptomausprägung zwischen den Mausstämmen. Subepidermale Blasen sowie Krusten und Erosionen treten bei 82 % der SJL/J-Mäuse, 56 % der BALB/c-Mäuse und 45 % der Fc γ -RIIb-defizienten

Tiere auf, nicht aber bei SKH-1 Mäusen. In der DIF zeigen die erkrankten Mäuse eine Anlagerung von IgG1 und IgG2 sowie des Komplementfaktors C3 an der DEJ. Bei den nicht erkrankten Mäusen binden überwiegend IgG1-AK und die Komplementaktivierung ist sehr schwach oder fehlt (87). Die Suszeptibilität der Mausstämmen für das Immunisierungs-induzierte Modell scheint von Faktoren wie der Bildung verschiedener IgG-Subklassen, der Glykosylierung dieser IgG und der Fc γ -Rezeptor-Expression auf Effektorzellen abzuhängen. Die EBA lässt sich in diesem Modell auch durch Einfachimmunisierung mit höheren Antigen-Konzentrationen induzieren (88,89).

1.6 Hybridom-Zellkultur

Hybridomzellkulturen stellen seit Jahren eine Methode dar, um murine monoklonale Antikörper zu produzieren (90). Im AK-Transfer-induzierten Modell der EBA werden der Maus polyklonale IgG, die aus dem Serum immunisierter Kaninchen gewonnen wurden, injiziert. Dagegen sind monoklonale AK aus Hybridom-Zellkulturen nur gegen ein Epitop eines Antigens gerichtet. Bei einer humoralen Immunantwort provoziert durch die Immunisierung der Maus mit COL7 bilden aktivierte B-Zellen Auto-AK. Hierbei produziert jede B-Zelle einen spezifischen Auto-AK, der sich jeweils gegen einen Proteinabschnitt des COL7 richtet. Die meisten monoklonalen AK binden an dreidimensionale Struktur des Proteins, jedoch gibt es auch AK, die lineare Aminosäureabschnitte des Proteins erkennen. Weiter unterscheiden sich AK der B-Zelle in der Glykosylierung und in der IgG-Subklasse. Verschiedene B-Zellen produzieren damit in der immunisierten Maus eine polyklonale Immunantwort. Bei der Erstellung monoklonaler muriner AK werden einzelne B-Zellen kultiviert, die einen monoklonalen AK produzieren und in das Zellkulturmedium abgeben. Da murine B-Zellen nach der Isolation aus Milz oder Lymphknoten nur wenige Tage überleben, müssen die Zellen so verändert werden, dass sie kultivierbar werden. Das gelingt mittels viraler Transformation (z. B. mit dem Epstein-Barr Virus) oder durch Generierung von Hybridom-Zellen (91). Für die Erstellung der Hybridom-Zellkulturen für die vorliegende Arbeit wurden Mäuse mittels des Immunisierungs-induzierten Modells der EBA mit der vWFA2-Subdomäne des COL7 und einem Adjuvans immunisiert und geboostert. Die polyklonale AK-Bildung der Maus wurde via AK-Titer im Blut überwacht. Bei Tieren mit einem hohen EBA-Score wurden die B-Zellen aus der Milz oder den Lymphknoten extrahiert. Die isolierten B-Zellen

wurden mit histokompatiblen Myelomzellen (z. B. Sp2/0, NS1, NSO) hybridisiert. Für Myelomzellen sind vier Eigenschaften essenziell: Sie synthetisieren keine eigenen AK, sie besitzen einen Enzymdefekt, über den sie nach der Fusionierung eliminiert werden können, sie haben gute Fusionseigenschaften und sie induzieren im Hybridom eine hohe AK-Syntheserate. Nach der Fusion, bei dem die B-Zellen mit Myelomzellen und einem Fusionsmittel wie Polyethylenglykol (PEG) inkubiert werden, liegen vier Zellpopulationen vor: nicht fusionierte Myelomzellen, nicht fusionierte B-Zellen, falsche Hybridome (Fusionen z. B. aus zwei B-Zellen und einer Myelomzelle) und richtige Hybridome. Die nicht fusionierten B-Zellen und falschen Hybridome sind nur wenige Tage überlebensfähig. Die richtigen Hybridom-Zellen sind das Ziel der Fusionierung und beginnen zu proliferieren. Die sich ebenfalls teilenden nicht fusionierten Myelomzellen müssen entfernt werden. Diese Zellen besitzen keine funktionelle Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT). Die Nukleinsäure-Synthese in der Zelle ist über den salvage pathway und dem *de novo* pathway möglich. Für den salvage pathway ist HGPRT erforderlich. Bei einer Kultivierung in HAT-Medium, das Aminopterin zur Blockade des *de novo* pathways sowie Hypoxanthin und Thymidin als Vorstufen des salvage pathways enthält, überleben die Hybridomzellen, da sie über den salvage pathway eine Nukleinsäure-Synthese betreiben können. Die Myelomzellen, die nur über den *de novo pathway* verfügen, sterben ab (90). Anschließend werden Hybridom-Zellkulturen angelegt, Zellreihen kryokonserviert und die Zellkulturüberstände auf AK-Produktion überprüft. Als Vorarbeit zu diesem Projekt wurden Hybridomzellen zur Produktion von monoklonalen, murinen anti-COL7-AK erstellt. Hierzu wurden 12 Tiere mit 120 µg der Willebrand factor type A like (vWFA2) Subdomäne des COL7 immunisiert (Firma Eurogentec). Zehn Hybridom-Zelllinien wurden anhand ihrer Bindung an murinen Hautschnitten sowie der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zur Freisetzung von ROS vorselektiert. Von den Hybridom-Zelllinien 1–5 lagen zu Beginn der Arbeit isolierte AK in ausreichender Konzentration vor. Die Hybridom-Zelllinien 4–6 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kultiviert.

1.7 Ziel der Arbeit

Die EBA ist eine schwer verlaufende Autoimmunerkrankung. Trotz zunehmender Erkenntnisse über ihre Pathogenese sind aktuelle Therapieverfahren nur unzureichend wirksam und weisen zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen auf. Zur Exploration der EBA-Pathogenese und Entwicklung neuer Therapieansätze *in vivo* werden Tiermodelle benötigt, die die humane Erkrankung bestmöglich abbilden. Das etablierte AK-Transfer-induzierte Modell der EBA nutzt polyklonale Kaninchen anti-COL7-IgG, da zur Induktion einer EBA in diesem Modell große AK-Mengen benötigt werden, die in diesem Umfang in keinem ethisch vertretbaren Rahmen in der Maus generiert werden können. Die Applikation der Kaninchen-IgG induziert eine murine Immunreaktion mit Bildung von Maus-anti-Kaninchen IgG-AK, die bereits wenige Tage nach der ersten AK-Gabe nachweisbar sind und den Phänotyp der EBA verstärken können. Für eine erfolgreiche Krankheitsausprägung müssen die injizierten Kaninchen-AK mit Teilen des murinen Immunsystems (Komplementsystem, neutrophile Granulozyten) interagieren. Dabei beeinflussen Speziesunterschiede (z. B. fünf IgG-Subklassen bei Mäusen, eine IgG-Klasse bei Kaninchen (92)) potenziell den Pathomechanismus. Die Nutzung von Hybridom-Zellkulturen zur Produktion monoklonaler muriner COL7-spezifischer AK verringert die Zahl der Tierversuche und verhindert mögliche Spezieseffekte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zehn murine monoklonale anti-COL7-IgG Klone bezüglich ihrer Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* zu evaluieren und auf ihre Eignung für das AK-Transfer-induzierte Mausmodell der EBA zu überprüfen. Konkrete Fragestellungen sind: Binden die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG *in vivo* und *in vitro* im Bereich der DEJ an das COL7 und führen sie zu einer Komplementaktivierung? Kann die Bindung der murinen Auto-AK eine typische EBA mit subepidermaler Separation, Krusten und Blasenbildung sowie Einwanderung von Granulozyten induzieren? Reicht die Bindung der monoklonalen AK an ihr Zielantigen (COL7) aus, um eine EBA zu induzieren? In einem zweiten Schritt sollen die murinen AK-Klone, die eine EBA im lokalen AK-Transfer-induzierten Modell auslösen, in einem systemischen AK-Transfer-induzierten Modell getestet werden und die Menge, die zur EBA-Induktion nach i.p. Injektion notwendigen IgG eruiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper, Antigene und Hybridom-Zellkulturreihen

Die verwendeten AK und Antigene sind in Tabelle 1 gelistet. Die verwendeten Hybridomzellkulturen inklusive ihrer produzierten AK-Klone sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antigene und Antikörper

Antikörper /Antigen	Hersteller
Spezifisches anti-vWFA2-IgG	<i>Isoliert aus Kaninchenseren Melanie Hegenbarth, steril</i>
vWFA2, 2 mg/mL ROS	<i>Melanie Hegenbarth, steril</i>
AlexaFluor 594-conjugated donkey anti goat IgG	<i>Jackson Immuno Research Laboratories Inc. 705-585-147</i>
Anti CD3-Phycoerythrin-(PE)	<i>Miltenyi, REF 130-102-600</i>
Anti CD19-PE	<i>Miltenyi, REF 130-102-598</i>
Anti-PE Microbeads	<i>Miltenyi, REF 130-048-801</i>
Dotblot Anti-Maus IgG	<i>Jackson Research/Dianova REF 115-055-062</i>
Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-conjugated AffiniPure Donkey anti-rabbit IgG (H+L)	<i>Jackson ImmunoResearch REF 711-095-152</i>
FITC-conjugated AffiniPure Donkey anti-mouse IgG (H+L)	<i>Jackson ImmunoResearch REF 715-096-150</i>
Goat IgG fraction to mouse C3	<i>MP Bio Nr. 0855463</i>
Rabbit anti-mouse-vWFA2-IgG	<i>Jackson ImmunoResearch REF 315-055-003</i>
Normal Rabbit IgG	<i>Melanie Hegenbarth, steril</i>

Tabelle 2: Liste der Hybridomzellkulturen sowie dem produzierten Antikörper-Klon

Hybridom-Zellkulturreihe/ Antikörper-Klon	Hersteller
1. Klon C1: Zellkultur C9D8C1	<u>Eurogentec - 5 Rue Bois Saint-Jean, 4102 Seraing, Belgium</u>
2. Klon D3: Zellkultur 9D8D3	
3. Klon H6: Zellkultur 9D8 H6	
4. Klon H10: Zellkultur 16A1H10	
5. Klon H7: Zellkultur 16A1H7	
6. Klon F3: Zellkultur 9D8F3	
7. Klon H4: Zellkultur 9D8H4	
8. Klon C7: Zellkultur 16A1C7	
9. Klon C8: Zellkultur 16A1C8	
10. Klon H11: Zellkultur 16A1H11	

2.1.2 Chemikalien

In Tabelle 3 sind die verwendeten Chemikalien gelistet.

Tabelle 3: Lister der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aqua dest.	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Apotheke UKSH, Campus Lübeck
Coomassie Blue G	Thermo Fischer Scientific
30 % Acrylamid	Thermo Fischer Scientific 15404549
Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich D9542
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fischer Scientific
DyLight-594-N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Ester 5 x 65 µg	Thermo Scientific Product No. 46413
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Hamburg, E8008
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eosin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Eukitt Eindeckmedium	Sigma- Aldrich, Hamburg, 03989
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Hamburg F6765

Flüssiger Stickstoff (N)	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Formaldehyd-Lösung 5 %	<i>Merck KgaA, Darmstadt</i>
Formalin	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Hämatoxylin	<i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i>
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	<i>SAFC 137075</i>
Isopropanol	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Ketamin	<i>SIGMA-Aldrich, Steinheim</i>
Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	<i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i>
Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione free acid)	<i>Sigma-Aldrich, Hamburg</i>
Methanol	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Movex Benchmark Protein Ladder	<i>Thermo Fischer 10747-012</i>
Na-Azid 0,0045 %	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
0,9 % Natriumchlorid-(NaCl)-Lösung	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) / 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) Substrat	<i>Thermo Fischer</i>
Paraffin	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Phosphorsäure (H₃PO₄)	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	<i>Sigma-Aldrich, Hamburg P8139</i>
Polyethylenglykol (PEG) 20000	<i>Sigma-Aldrich, Hamburg 807486</i>
Protein-G-Resin-Säule	<i>GenScript L00209 5 mL</i>
Xylazin	<i>SIGMA-Aldrich, Steinheim</i>
Spectra Multicolor broad range protein ladder	<i>Thermo Fischer 26634</i>
10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)	<i>Fischer Scientific, Product 10265153</i>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Thermo Fischer 15524010</i>
1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) pH 9,8	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Trypan-Blau	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 15250061</i>
Trypsin/EDTA	<i>45 mL EDTA, 5 mL 10 x Trypsin PaN Biotech REF P10 024100</i>

2.1.3 Medien und Puffer

In Tabelle 4 sind die verwendeten Medien und Puffer gelistet.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH 8,0
Blockingpuffer	1 % Biotin-freies BSA, gelöst in PBS-T
Boratpuffer	15,45 g Boratsäure in 5 L A. dest, pH auf 8,5 mit NaOH titriert
Carbonatpuffer (adsorption buffer)	5,3 g Na ₂ CO ₃ , 4,2 g NaHCO ₃ gelöst in 1 L A. dest pH auf 9,6 mit 1 N HCl titriert
CL-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 o. Phenolrot mit L-Glu (Genaxxon, REF C4116.0500) 241,25 mL, 25 mM HEPES (1 M) 6,25 mL, 1 % FCS 2,5 mL</i>
Dotblot Waschpuffer	<i>EUROIMMUN, Lübeck</i>
Dotblot Waschpuffer plus	<i>EUROIMMUN, Lübeck</i>
Einbettungsmedium Tissue-Tek	<i>Sakura Finetek Europe B.V., Zoulerwoude, Niederlande</i>
Einfriermedium Zellkultur	90 % FCS, 10 % DMSO
Glycinpuffer IgG-Isolierung	0,2 M Glycin, pH 2,8
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	<i>Hank's BSS (Gibco, REF 14025-050)</i>
HBSS prep	HBSS + 0,5 % FCS + 20 mM HEPES
Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)-Puffer	PBS + 2 mM EDTA + 0,5 % FCS
MAK-Medium	500 mL 1 x RPMI 1640, GlutaMAX (Sigma, REF 10104522) 50 mL 10 % FCS; 5 mL 1 % Penicillin/Streptomycin
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich 81381
Neutralisationspuffer IgG-Isolierung	1 M Tris-HCl, pH 9,0
PBS (phosphate buffered saline)	8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/l Na ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ in A. dest, pH auf 7,2 mit Phosphatsäure titriert
PBS-T	0,05 mL Tween 20 in 1 L PBS
62 % Percoll	2,8 mL Percoll (GE Healthcare; REF; 17-0891-01) + 1,9 mL HBSS + 310 µL 10 x PBS
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	1 mg/mL in PBS
ROS-Blockpuffer	1 % Biotin-freies BSA/PBS-T

ROS-Waschpuffer	<i>PBS + 0,05 % Tween</i>
Roti Immunoblock/ PBS	Carl Roth T144.1

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 5 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien gelistet.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Alufolie	<i>Carl Roth</i>
Dako PAP Pen hydrophober Stift	<i>Millipore 402176-M</i>
Deckgläser 24 x 60 mm	<i>G. Menzel, Glasbearbeitungswerk, Braunschweig</i>
Dialyseschlauchmembran	<i>Carl Roth 1780.1</i>
Dreivegehahn Discifix 3	<i>Braun, Melsungen</i>
Falcon-Röhrchen 15 mL, 50 mL	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Filtertube (Amicon Ultra 100.000 Da)	<i>Millipore UFC 903008</i>
Injektionsspritzen (Injekt-F 1 mL)	<i>B Braun, Melsungen, Deutschland</i>
Messküvette Photometer	<i>Brand, BR759150</i>
Minisart Sterilfilter (0,20 µm)	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Nitrozellulose-Membran	<i>BioRad Laboratories</i>
Objektträger SuperFrost /Plus	<i>G. Menzel, Glasbearbeitungswerk, Braunschweig</i>
Papierfilter	<i>IDL GmbH & Co. KG</i>
Pasteur-Plastikpipetten 1 mL	<i>BioSigma, Co</i>
Pipetten Research: 0,5–10 µl; 2–20 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl	<i>Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland</i>
Pipettenspitzen: 10 µl; 100 µl; 1000 µl	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
Pipetus-Pipettierhilfe	<i>Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland</i>
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Reaktionsgefäß schwarz 0,5 mL	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Reaktionsgefäß 15 mL, 50 mL	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
SafeSeal Gefäße 1,5 mL, 2,0 mL	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
Serologische Pipetten 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	<i>Sarstedt AG & Co. Nümbrecht</i>

96 Deep-Well Platte (ROS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Skalpell	<i>Braun Cutfix 11</i>
Zellulosefilter 25 mm	<i>Sigma-Aldrich</i>
Zellstoff	<i>Carl Roth</i>
Zellsieb 70 μm	<i>Corning 352350</i>

2.1.5 Laborgeräte

In Tabelle 6 sind die verwendeten Laborgeräte gelistet.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Analytical Plus	<i>Ohaus Corporation, New Jersey, USA</i>
Bio Vortex V1	<i>lab4you GmbH, Berlin</i>
Dunkle Feuchtigkeitskammer	<i>Werner Hassa GmbH, Lübeck</i>
Elektrische Feinwaage PT 150	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Eppendorf Research Pipetten	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Gefriertruhe C660 (-80 °C)	<i>New Brunswick Scientific, England</i>
Hoods:	
LamininAir HB 2448	<i>Heraeus, Hanau, Deutschland</i>
Biowizard	<i>Biowizard Kojair, Vilppula, Finnland</i>
Hyperflask M Zellkulturgefäß	<i>Corning 10034</i>
Inkubationsschrank Zellkultur	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>
Kamm Gelelektrophorese 10 Kammern	<i>Thermo Scientific</i>
Kühlschrank (4 °C) / Gefrierschrank (-20 °C)	<i>Liebherr International AG, Bulle, Switzerland</i>
Kühlkammer	<i>Viessmann GmbH & Co. KG, Allendorf</i>
Kryostat Leica CM 3040 S	<i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i>
Kryo-Röhrchen	<i>Thermo Scientific</i>
Laborabzug Captair chem	<i>Erlab Laboreinrichtungen, Wangen</i>
Laborheizplatte	<i>Allpax Art Nr. 10013970;0</i>
Luminometer Wallac Victor2 1420	<i>Perkin Elmer</i>
Mikrometer	<i>Holox 73099439</i>
Mikrowelle 1000 W	<i>neoLAB 3-2306</i>

Neubauer Zählkammer Improved, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm²	<i>Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland</i>
Netzteil Elektrophorese PEQPOWER 250	<i>PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland</i>
Fluoreszenzmikroskop BZ9000 (Biorevo)	<i>Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland</i>
MACS-Kit Quatro Macs starting Kit	<i>Miltenyi Biotec, 130-091-051</i>
Magnetrührer IKA ® RH basic 2	<i>IKA Werke GmbH, Staufen</i>
Mikroskop Olympus BX40	<i>Olympus Deutschland, Hamburg</i>
Mikroskop Wilovert S	<i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar</i>
Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	<i>ThermoFischer</i>
Neubauer Zählkammer	<i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i>
pH-Meter pH 526	<i>MultiCal WTW, Weilheim</i>
Photometer	<i>Dr. Lange LASA100</i>
Multiphotonen-Mikroskop TriM Scope II mit XLUMPLFL 20 × W/0,95 objective	<i>LaVision BioTec GmbH, Bielefeld, Germany; Olympus, Hamburg, Germany</i>
Pipettierhilfe, Pipetus®-akku	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt</i>
Schütteltisch Duomax 1030	<i>Heidolph Instruments, Nürnberg</i>
Sterilbank, Biowizard Kojair	<i>W. H. Mahl, Reinraumtechnik GmbH, Magdeburg</i>
Thermo Scientific Mr. Frosty Gefrierbehälter	<i>Thermo Scientific 5100-0001</i>
Vortex Genie 2	<i>Scientific Industries, Bohemia, New York, USA</i>
Verschlussklemme WeLoc	<i>Weland</i>
Wasserstrahlpumpe	<i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
Zellkulturflasche 175 cm²	<i>Corning 431328</i>
Zentrifuge 5804	<i>Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland</i>
Centrifuge Varifuge 3.0 R	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>
Centrifuge Biofuge pico	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>
Zentrifugenröhrchen 500 mL	<i>Corning 1001-8910</i>

2.1.6 Versuchstiere und Kryo-Schnitte

In Tabelle 7 sind die verwendeten Versuchstiere und Kryo-Schnitte gelistet.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Versuchstiere und Kryo-Schnitte

Versuchstier/Kryo-Schnitt	Hersteller
C57 BL/6J Maus	<i>Eigene Züchtung Tierstall Lübeck Haus 10</i>
Enhanced-green-fluorescent-protein-(EGFP)-Lys Maus	<i>Eigene Züchtung Tierstall Lübeck Haus 10</i>
Kryo-Schnitte muriner Haut C57 BL/6J (Schwanz)	<i>Katja Bieber, Tierstall Lübeck Haus 10</i>

2.2 Kultivierung von Hybridom-Zellkulturen

Fünf der getesteten murinen monoklonalen anti-COL7-AK lagen zu Beginn des Projektes in ausreichender Konzentration zur Testung *in vivo* vor. Fünf weitere AK der Hybridom-Zelllinien 6–10 wurden mittels Hybridom-Zellkultur im Rahmen dieser Arbeit produziert. Die Hybridom-Zellen lagen als gefrorene Aliquots in flüssigem Stickstoff vor. Alle Zellkultur-Experimente wurden unter dem Abzug durchgeführt. Die Zellmedien wurden vor Verwendung auf 37 °C vorgewärmt. Die Hybridom-Zellkulturen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert.

2.2.1 Auftauen und Anlegen der Hybridom-Zellkultur

Es wurde pro Hybridom-Zellklon ein Aliquot (1 x 10⁶ Zellen) aus dem flüssigen Stickstoff verwendet. Mit der 1 mL Pipette wurden die z. T. noch gefrorenen Zellen mit MAK-Medium unter Auf- und Abpipettieren vollständig aufgetaut und umgehend in ein vorbereitete Falcon-Gefäß mit 10 mL MAK-Medium überführt. Durch diesen Schritt wurde das im Gefriermedium enthaltene, zytotoxische DMSO verdünnt. Nach einer Zentrifugation (1250 rounds per minute (rpm), 20 °C, 5 min) wurden der Überstand abgenommen sowie die Zellen in 10 mL MAK-Medium resuspendiert und anschließend in einer 175 cm² Zellkulturflasche mit 30 mL MAK-Medium für 3–4 Tage kultiviert. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das restliche DMSO des Gefriermediums auszuwaschen.

Anlage der Hybridom-Zellkultur

Die Zellkulturflasche wurde im Abstand von vier Tagen unter dem Mikroskop begutachtet. Je nach Zelldichte und Bedarf wurde über das weitere Verfahren entschieden:

1. Weitere Inkubation ohne Änderungen
2. Mediumwechsel
3. Ablösen und Zählung der Zellen:
 - a) zur Anlage von Kryo-Aliquots in flüssigem Stickstoff
 - b) zur Aufteilung der Zellen auf mehrere Flaschen
 - c) zur Kulturexpansion mittels Hyperflasks
 - d) zur Beendigung der Zellkultur und Aufreinigung der AK aus dem Medium
4. Anlage einer Erhaltungskultur (EHK)

Zu 2: Mediumwechsel

Der Zellkulturüberstand wurde aus den Zellkulturflaschen in ein 50 mL Falcon überführt, mit 200 μ L Na-Azid versetzt und bei -20°C gelagert, um ein mikrobielles Wachstum zu verhindern. Die Zellen wurden mit 40 mL frischem MAK-Medium weiter im Brutschank inkubiert.

Zu 3: Ablösung und Zählen der Zellen

Das Medium aus den Zellkulturflaschen wurde analog zum Mediumwechsel behandelt. Die Zellen wurden mit 5 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die NaCl-Lösung wurde nicht direkt auf die Zellen, sondern an den Rand der Zellkulturflasche pipettiert. Nach dem Schwenken der Flaschen wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde die Zellen zum Ablösen vom Flaschenboden mit 5 mL Trypsin/EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch seitliches Klopfen mit der Handfläche gegen die Zellkulturflasche wurden die Zellen abgelöst und für weitere 3 min im Zellkulturschrank inkubiert. Nach insgesamt 8 min wurde die Ablösungsreaktion mit 10 mL MAK-Medium gestoppt und die Zellen in ein 50 mL Falcon-Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (1250 rpm, 5 min, 20 °C) wurde der Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt und die Zellen in 10 mL frischem MAK-Medium suspendiert. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer

Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde eine 1:10 Verdünnung (90 μL MAK-Medium + 10 μL Zellsuspension) vorbereitet und in die Zählkammer gegeben. Es wurden alle vier Quadranten ausgezählt.

Zu 3a) Anlage von Kryo-Aliquots in flüssigem Stickstoff

Zur Aufbewahrung der Zellen wurden neue Aliquots in flüssigem Stickstoff angelegt. Dafür wurden ein Mr. Frosty Kryo-Behälter mit zehn beschrifteten Kryo-Röhrchen vorbereitet. Für 1×10^6 Zellen pro Aliquot wurden 10×10^6 Zellen in ein neues 50 mL Falcon-Gefäß gegeben und zentrifugiert (1250 rpm, 5 min 20 °C). Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 10 mL Einfriermedium aufgenommen, sodass sich eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL ergab. In jedes Kryo-Röhrchen wurde 1 mL der Zellsuspension gegeben. Alle Röhrchen sowie der Kryo-Behälter wurden verschlossen. Der Kryo-Behälter wurde 1 h bei -20 °C gelagert, gefolgt von 2–4 Tagen bei -80 °C und schließlich in flüssigem Stickstoff. Nach einem Tag im Stickstoff wurde ein Aliquot aufgetaut und in Kultur genommen, um die Qualität, die Kultivierbarkeit und die AK-Produktivität der Zellen zu testen.

Zu 3b) Expansion der Zellkultur

Beim Erreichen einer Zellzahl von 4×10^5 Zellen/mL wurden die Zellen auf mehrere Flaschen aufgeteilt, um die Zellkultur zu expandieren. In eine neue 175 cm² Zellkulturflasche wurden 8×10^6 Zellen gegeben. Bei gutem Wachstum waren auch 4×10^6 Zellen möglich. Die Zellsuspension wurde mit neuem MAK-Medium auf ein Volumen von 40 mL aufgefüllt und in die Zellkulturflasche gegeben. Die Flaschen wurden wiederum für 3–4 Tage im Brutschrank inkubiert.

Zu 3c) Kulturexpansion mittels Hyperflask

Zur Erhöhung des Maßstabs bei der AK-Produktion wurden große Zellkulturflaschen mit mehreren Böden (Hyperflasks) verwendet. In diese Hyperflasks wurden 2×10^5 Zellen/mL (112×10^6 Zellen/Hyperflask) in 515 mL MAK-Medium gegeben. Die Hyperflasks wurden zur Verhinderung einer Blasenbildung beim Befüllen schräg gehalten. Die Medium-Zellmischung wurde vorsichtig

hineingegossen. Das restliche in der Kulturflasche verbleibende Volumen wurde mit der 25 mL Pipette überführt. Eine Schaumbildung war hierbei zu vermeiden; ggf. entstehender Schaum wurde abgesaugt. Die Hyperflasks wurden für 3–4 Tage im Brutschrank inkubiert.

Zu 3d) Beendigung der Hybridom-Zellkultur und Entnahme des Mediums zur AK-Aufreinigung

Nach der Kultivierung der Hyperflask und dem Nachweis ausreichender AK-Mengen in den Überständen im Immunoblot wurde die Zellkultur beendet. Der Zellkulturüberstand wurde zur Aufreinigung der AK in eine gereinigte und beschriftete Mediumflasche gegeben. Für die Weiterverwendung der Hybridom-Zellen wurden die Hyperflasks nach Zugabe von 500 mL 0,9 % NaCl sowie 45 mL Trypsin/EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abklopfen der Zellen von der Hyperflask-Wand wurde die Zellsuspension in ein 500 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und zentrifugiert (3000 rpm, 20 °C, 5 min). Nach der Resuspension der Zellen in 10 mL MAK-Medium und Zählung (1:100 Verdünnung: 990 μ L MAK-Medium + 10 μ L Zellsuspension) wurde entschieden, ob eine EHK angelegt, die Zellkultur beendet, Kryo-Aliquots erstellt oder die Zellen erneut in Hyperflasks kultiviert wurden.

Zu 4. Anlage der Erhaltungskultur (EHK)

Falls keine weitere AK-Produktion angestrebt war, wurden die Zellen der Hyperflask in eine EHK überführt. Dazu wurden 8×10^6 Zellen in 40 mL MAK-Medium aufgenommen, in eine 175 cm² Zellkulturflasche gegeben und weitere 3–4 Tage im Brutschrank inkubiert. Wenn die neu angelegten Kryo-Aliquots sich nach dem Auftauen nicht gut kultivieren ließen, wurden bei Bedarf erneut Kryo-Aliquots erstellt. Zur Fortführung der EHK wurde bei gutem Wachstum die Zellzahlbestimmung weggelassen. Nach der Zentrifugation und der Suspension in 10 mL MAK-Medium wurde 1/5 der Zellsuspension in eine neue 175 cm² Flasche gegeben.

2.2.2 Nachweis von murinem IgG im Zellkulturüberstand

Zur Überprüfung der IgG-Produktion in den Zellkulturen wurde der Zellkulturüberstand mittels Dotblots auf murine AK untersucht. Dazu wurde auf einer Nitrozellulose-Membran mit einem Kugelschreiber und Lineal ein Raster aus 0,5 x 0,5 cm aufgetragen. Pro Überstand wurde eine Zeile genutzt. Die Spalten entsprachen der Verdünnung des Überstandes (unverdünnt, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 in PBS). Jeweils 1 μ L der Verdünnungsstufen wurden auf die Membran in das vorgesehene Kästchen pipettiert. Nach der Trocknung (10 min, Raumtemperatur (RT)) wurde die Membran auf einer mit A. dest befeuchteten Glasplatte mit dem Skalpell auf die passende Größe geschnitten. Anschließend wurden folgende Inkubationsschritte mit der Membran durchgeführt:

- Blockierung: 15 min mit Blot Waschpuffer plus
- Sekundär-AK-Inkubation: 30 min mit Rabbit anti-Maus-IgG (1:2000 in Blot-Waschpuffer plus)
- Waschschrte: 3 x 5 min mit Blot-Waschpuffer
- Färbeschritt: 10 min mit NBT/BCIP-Substrat
- Stopp der Reaktion: 3 x 5 min mit A. dest

Bei der Blot-Inkubation wurde das murine IgG durch den Sekundär-AK gebunden. Das an den Sekundär-AK konjugierte Enzym Alkalische Phosphatase setzte das NBT/BCIP-Substrat um, wodurch ein gefärbtes Produkt entstand. Die Nitrocellulose-Membran wurde bei RT getrocknet und laminiert.

2.3 IgG-Isolierung mittels Protein-G-Affinitätschromatografie

Zur Isolierung der AK aus dem Zellkulturmedium wurden zwei Protein-G-Resin Säulen von GenScript verwendet. An die Säulen wurde je ein 3-Wege-Hahn angeschlossen. Über den 3-Wege-Hahn wurden 10 mL Protein-G in 10 mL Bindungspuffer eingefüllt. Nachdem sich das Protein-G gesetzt hatte, wurde der Bindungspuffer abgelassen. Für alle weiteren Schritte wurde ein Trichter mit einem Papierfilter auf die Säule aufgesetzt. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen Bindungspuffer gewaschen. Nach dem Waschschrte wurde der 3-Wege-Hahn geschlossen. Die Zellkulturüberstände wurden auf die Säule gegeben. Das Volumen sollte mindestens 50–70 mL betragen. Falls nötig wurde das Volumen mit Bindungspuffer aufgefüllt. Die Säule wurde verschlossen und 1 h bei 4 °C auf einem

Schüttler inkubiert. Nach der Bindung der IgG-AK an das Protein-G wurde das Zellkulturmedium abgelassen und die Säule mit Bindungspuffer gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm (OD_{280}) im Photometer $< 0,1$ lag. Der gesamte Durchfluss wurde zur späteren Überprüfung bei 4 °C gelagert. In beschriftete 500 mL Flaschen wurden 2–5 mL Neutralisationspuffer gegeben. Die IgG wurden mit Glycin-Puffer von der Protein-G-Säule eluiert. Die IgG im Glycin-Puffer wurden in die vorbereitete Flasche abgelassen. In kleinen Intervallen wurde mit dem Photometer die Extinktion gemessen. Bei einem Absinken der $OD_{280} < 0,05$ wurde die Elution gestoppt und der pH-Wert des Eluats mittels Neutralisationspuffer auf 7,4 eingestellt. Die Säule wurde nach der IgG-Isolierung mit Glycin-Puffer gewaschen, bis die $OD_{280} < 0,01$ betrug. Anschließend wurde sie jeweils einmal mit NaCl und Bindungspuffer gespült. Zur Lagerung der Säule bei 4 °C wurde der Bindungspuffer bis kurz über dem Protein-G abgelassen.

2.4 Konzentrierung der eluierten murinen anti-COL7-IgG

Die Konzentrierung der isolierten AK erfolgte mechanisch (Filtertubes) oder osmotisch (PEG). Da bei der Konzentrierung der AK mittels Filtertubes große Verluste auftraten, wurde die Konzentration mittels PEG bevorzugt.

2.4.1 IgG-Konzentrierung mittels PEG

Das IgG-Eluat wurde in einen 15 min in A. dest. eingelegten Dialyseschlauch gegeben. Die Enden wurden zugeknotet sowie mit einer Klemme verschlossen. Der Dialyseschlauch wurde in PEG eingebettet und 2 h inkubiert. Dieser Vorgang wurde bis zu sechsmal wiederholt. Anschließend wurden die Dialyseschläuche mit A. dest abgespült. Über die Dialyse erfolgte ein Pufferaustausch, damit die IgG zur Injektion im Mausmodell in PBS vorlagen. Dazu wurden die Dialyseschläuche dreimal für jeweils 5 h in 5 L PBS bei 4 °C unter leichtem Rühren dialysiert. Anschließend wurden die AK unter dem Abzug mit einem Ministart-Plus (0,2 μ L) Filter sterilfiltriert. Die Konzentration wurde mittels Nanodrop-Photometer sowie zur Kontrolle mittels Bradford-Assay bestimmt.

2.4.2 IgG-Aufkonzentrierung mittels Filtertubes

Die Filtertubes (Amicon Ultra, Membran 100.000 Da) wurden zur Befeuchtung und Spülung jeweils einmal mit A. dest und mit PBS gewaschen und zentrifugiert

(400 rpm, 10 min, 4 °C). Nach jeder Zentrifugation wurde der Durchlauf verworfen. Zur Aufkonzentrierung der AK wurden die Eluate nach der Dialyse in die Filtertubes gegeben und zentrifugiert (4000 rpm, 15–20 min, 4°C) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis alles Eluat konzentriert war bzw. bis die am Nanodrop gemessene Konzentration zur Injektion ins Mausohr ausreichte. Der Filter wurde am Ende der Zentrifugation mit PBS mit einer Pasteurpipette gespült, damit auch die im Filter verbliebenen AK verwendet werden konnten. Nach der Aufkonzentrierung wurde der Filter einmal mit PBS 10 min bei 400 rpm bei 4°C gewaschen. Die aufkonzentrierten AK wurden unter dem Abzug mit einem Ministart-Plus (0,2 µL) Filter sterilfiltriert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Probe entnommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop-Photometer

Zur Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop 2000 UV-Vis-Spectrophotometer bei OD₂₈₀ wurden 4 µL der AK-Lösung in 196 µL PBS verdünnt. Nach Kalibrierung des Photometers wurde 1 µL auf das Messobjektiv gegeben. Nach der Messung wurde das Messobjektiv mit 1 µL A. dest und Zellstoff gereinigt.

2.4.4 Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay

Bei Bestimmung der AK-Konzentration mittels Nanodrop traten Ungenauigkeiten in der ersten Nachkommastelle auf, weshalb die Konzentration zusätzlich mittels Bradford-Assay bestimmt, um die Werte zu verifizieren. Bei diesem Assay wird die Bindung von Coomassie Brilliant Blue an ein Protein (AK) photometrisch gemessen. Die Bindung von Proteinen an den Farbstoff führt in saurem Medium zu einem Farbwechsel von Rot (Absorptionsmaximum 470 nm) zu Blau (Absorptionsmaximum 595 nm). Die unbekannte AK-Konzentration in der Probe wurde über einen Vergleich mit einer Proteinstandardreihe bestimmt.

Ansatz des Assay-Reagenz

50 mg Coomassie Blue G wurden in 25 mL Methanol gelöst und mit 50 mL 85 %-iger Phosphorsäure (H₃PO₄) sowie 25 mL A. dest gemischt. Der pH-Wert sollte -0,01 betragen. Das konzentrierte Assay-Reagenz konnte mehrere Wochen im Kühlschrank bewahrt werden. Vor dem Versuch wurde dieses Konzentrat 1:5 mit A. dest verdünnt.

Ansatz des Proteinstandards

Als Proteinstandard wurde eine AK-Lösung des Klons 9D8-C1 (Klon 1) mit bekannter Konzentration von 3,58 mg/mL verwendet. Die Konzentration wurde auf 2 mg/mL in PBS verdünnt. Die Verdünnungsreihe enthielt die Konzentrationen 2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL und 0 mg/mL.

Durchführung

Für die sieben Proteinstandard-Verdünnungen sowie für die zu messende AK-Lösung in PBS wurden beschriftete Küvetten mit 500 μ L Assay-Reagenz befüllt. Die AK-Lösungen wurden unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:10 gemessen. Nach Zugabe von 10 μ L Standardverdünnung / AK-Probe wurden die Küvetten auf dem Rüttler durchmischt und nach 2 min im Photometer mit dem Programm Bradford-Assay gemessen. Anhand der Extinktion der Proteinstandardreihe errechnet das Programm die AK-Konzentration in den Proben.

2.4.5 Nachweis von murinen IgG mittels SDS-Gelelektrophorese

Aufgrund von AK-Verlusten bei der Konzentrierung der murinen monoklonalen anti-COL7-AK aus den Hybridom-Zellkulturen und zur Kontrolle des Erfolgs der AK-Extraktion mittels der Protein-G-Säule wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit den extrahierten AK und mit dem Durchfluss der Protein-G-Säule durchgeführt.

Herstellung des SDS-Gels

Zur Herstellung des SDS-Gels wurde die Gussform bestehend aus Spacer und Glasplatte zusammengebaut und mit A. dest auf Dichtigkeit geprüft. Anschließend wurden in separaten Reagenzgefäßen ein Trenngel (10 %) und ein Sammelgel (4 %) angesetzt (s.Tabelle 8). Das Trenngel wurde in die Form gegossen und bis zur Polymerisation des Gels (ca. 15 min) mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Ausgießen und dem Absaugen des Isopropanols mit Zellstoff wurde das Trenngel

mit dem Sammelgel überschichtet. Für die Probenaschen wurde ein Kamm in das Gel eingesetzt. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurde das gesamte SDS-Gel in Alufolie bei 4 °C aufbewahrt oder sofort verwendet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Sodiumdodecylsulfat-(SDS)-Gels zum Nachweis muriner Immunglobulin G

	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
A. dest	4,08 mL	3 mL
1,5 M Tris pH 9,8	2,5 mL	1,25 mL
30% Acrylamid	3,3 mL	670 mL
10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)	100 mL	50 mL
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	12 mL	12 mL
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	50 mL	50 mL

Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese diente dem Nachweis der mittels Hybridom-Zellkultur produzierten und über Protein-G aufgereinigten IgG-AK. Die Elektrophorese wurde mit dem Durchfluss der Protein-G-Säule und mit den aufgereinigten AK in PBS durchgeführt. Die Proben wurden in reduzierendem oder nicht-reduzierendem Elektrophoresepuffer 1:5 verdünnt und für 5 min bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit 15 µL der Proben beladen (s.Tabelle 9). Zur Bestimmung der Größen der Banden wurden die Proteinmarker Movex Benchmark Protein Ladder und der Spectra Multicolor broad range Protein Ladder mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 25 mA für 20 min und bei 50 mA für 30 min. Danach wurde die Elektrophorese unter Kontrolle für 2 x 20 min bei 25 mA weitergeführt, bis die Lauffront das Gel vollständig durchwandert hatte. Nach der Entnahme des Gels aus der Form wurde das Sammelgel mittels einer Glasscheibe abgetrennt. Das Trenngel wurde dreimal mit A. dest in einer Plastikschaale in der Mikrowelle bei 1000 W aufgekocht und anschließend 1 h mit Coomassie sensitiv auf dem Schüttler bei RT gefärbt. Nach dem Färben wurde das Gel dreimal mit A. dest gespült und anschließend fotografiert.

Tabelle 9: Bestückung der Geltaschen zum Nachweis der murinen monoklonalen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG aus den Eluaten der Hybridom-Zellkulturen. Die Gelelektrophorese erfolgte unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Es wurden jeweils zwei Geltaschen mit dem Eluat (IgG) und mit dem Durchlauf der Protein-G-Säule bestückt. Als Größenmarker wurde die Movex Benchmark Protein Ladder und die Spectra Multicolor broad range Protein Ladder verwendet.

Geltasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Movex Benchmark Protein Ladder	IgG	Durchlauf	IgG	Durchlauf	Spectra Multicolor broad range Protein Ladder	IgG	Durchlauf	IgG	Durchlauf
Puffer	-	Nicht reduzierend				-	reduzierend			

2.5 Markierung muriner anti-COL7-IgG mit DyLight-594-NHS

Zum Nachweis der murinen monoklonalen anti-COL7-AK in den Geweben der Mäuse mittels Multiphotonen-Mikroskop wurden die AK mit dem fluoreszierenden Farbstoff DyLight-594-NHS markiert.

Durchführung

Zur Vermeidung einer Ausfällung des Proteins erfolgte die Verknüpfung zwischen dem Farbstoff und IgG-AK in einem Borat-Puffer (0,05 M, mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt). 2 mL der sterilfiltrierten AK in PBS (1–2,5 mg/mL) wurden in einen Dialyseschlauch (Durchmesser 15 cm) gegeben. Die Dialyseschläuche wurden mindestens 12 h im Borat-Puffer unter leichtem Rühren bei 4 °C inkubiert. Für die Verknüpfung von Farbstoff und AK wurden 500 µL der unverdünnten AK in Borat-Puffer mit je 65 µg DyLight-594-NHS in einer Viole ausgiebig geschwenkt und im Dunkeln bei RT für 1 h inkubiert. Da die Injektion der AK in die Mäuse in PBS erfolgten sollte und um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu den lokalen Modellen LM1 und LM2 (s. Kapitel 2.7.1) zu gewährleisten, erfolgte danach eine Re-Dialyse. Aliquots von je 500 µL wurden in lichtundurchlässigen schwarzen Eppendorf Gefäßen bei -4 °C für einen Monat bzw. bei -20 °C gelagert.

2.6 *In vitro* Testung der murinen anti-COL7-IgG

2.6.1 Bestimmung freigesetzter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Mit dem ROS-Release-Assay wurde die ROS-Ausschüttung durch murine neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit Immunkomplexen aus COL7 und anti-COL7-AK quantifiziert. Der ROS-Release-Assay basiert auf einer Chemilumineszenz-Reaktion mit Luminol. Die bei der Reaktion der ROS mit dem Luminol entstehende Lichtemission wird mittels Luminometer (Wallace Victor2 1420) bei einer Wellenlänge von 425 nm gemessen und in RLU (Relative Light Unit/mL) angegeben.

Isolation von PMN aus Knochenmark

Zur Gewinnung von murinen Granulozyten (PMN) wurden zwei C57BL/6J Mäusen beide Femora (Oberschenkelknochen) entnommen. Nach der Eröffnung der Epiphysen wurden die Knochen mit in einer Spritze (27 G ½ Nadel) aufgezogenem HBSS ausgespült. Das gewonnene Knochenmark wurde in einem 50 mL Falcon-Gefäß mit HBSS-prep auf 25 mL aufgefüllt und zentrifugiert (1400 rpm, 4 min, 4 °C). Nach Absaugen des Überstands wurden die Erythrozyten lysiert, indem das Zellpellet in 5 mL A. dest suspendiert wurde. Die Lyse wurde nach 30 sec mit 5 mL 2 x PBS gestoppt. Anschließend wurde das Zellpellet einmal mit HBSS prep gewaschen und in 4 mL HBSS-prep resuspendiert. Zur Entfernung vorhandener Gewebereste wurde das Pellet durch ein Zellsieb (70 µm) in ein separates 50 mL Falcon-Gefäß überführt. Das Sieb wurde einmal mit 1 mL HBSS prep gespült, um den Zellverlust zu minimieren. Zur Anreicherung der PMN mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurde die Zellsuspension auf einen Percoll-Gradienten (5 mL, 62 %) geschichtet und zentrifugiert (2000 rpm, 30 min, 4 °C). Der Überstand mit dem Zellring wurde abgesaugt. Das wolkige Pellet wurde in 1 mL HBSS-prep aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, in 20 mL MACS-Puffer gewaschen (1400 rpm, 4 min, 4°C) und in einer Konzentration von 10^7 Zellen in 100 mL MACS-Puffer aufgenommen. Die anschließende Negativselektion erfolgte mithilfe des Miltenyi MACS-Kits nach dem Herstellerprotokoll. Für die MACS wird die Zellsuspension mit Microbeads-gekoppelten-AK gegen ein spezifisches Oberflächenprotein (z.B. CD19) inkubiert und anschließend durch eine

magnetische Säule gegeben. Das Oberflächenprotein exprimierende Zellen werden dadurch aus der Zellsuspension entfernt. In der vorliegenden Studie wurden die Zellen mit anti-CD3-PE (spezifisch für T-Lymphozyten) und anti-CD-19-PE (spezifisch für B-Lymphozyten) und anschließend mit anti-PE Microbeads inkubiert. Nach der Äquilibration der MACS-Säule mit MACS-Puffer wurden die Zellen auf die Säule gegeben. Der Durchlauf mit den Granulozyten wurde aufgefangen und zentrifugiert (1400 rpm, 4 °C, 7 min). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet für die Zellzahlbestimmung in 1 mL CL-Medium suspendiert.

Durchführung des ROS-Release-Assays

Zur Analyse des Potenzials der murinen monoklonalen anti-COL7-AK hinsichtlich der Aktivierung von PMN wurden Immunkomplexe gebildet. Dazu wurde eine 96-Well-Platte mit der vWFA2-Domäne des COL7 (1 μ g vWFA2 in 100 μ L Carbonatpuffer) als Antigen für 1 h bei RT auf dem Schüttler beschichtet. Nach drei Waschschritten mit PBS-T wurden freie Bindungsstellen der Wellplatte mit ROS-Blocking-Puffer auf dem Schüttler bei 4 °C für 12 h blockiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde je 0,2 μ g des zu testenden AK der Hybridom-Zelllinien 1–10 (s.Tabelle 10: IC1–IC10) in 100 μ L ROS-Blocking-Puffer in jedes Well gegeben und für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit nur Medium, nur PMN, nur Antigen (vWFA2) und nur AK (Kaninchen anti-vWFA2-IgG). Als Positivkontrollen wurden Ansätze mit dem Granulozyten-Aktivator PMA (1 mg/ml 1:10000 in PBS) und mit Kaninchen anti-COL7-IgG mitgeführt.

Tabelle 10: Wellplatten-Belegung beim ROS-Release-Assay Zur Testung der murinen monoklonalen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG der Hybridom-Zelllinien *ex vivo* wurde analysiert, ob murine polymorphkernige mononukleäre Granulozyten (PMN) nach Stimulation durch Immunkomplexe aus Antigen und Antikörper reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausschütten. Hierzu wurden die Wells einer Multiwellplatte mit dem Antigen COL7 (Willebrand factor type A like Domäne, vWFA2) beschichtet. Zur Bildung der Immunkomplexe wurden die IgG der Hybridom-Zelllinien 1–10 (IC1–IC10) zugefügt. Als Positivkontrollen wurden mitgeführt: das aktuell verwendete Kaninchen anti-vWFA2-IgG und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Granulozyten-Aktivator; Als Negativkontrollen dienten nur Medium, nur PMN, nur Antigen (vWFA2) oder nur Kaninchen anti-vWFA2-IgG. Abschließend wurden alle Wells bis auf die Negativkontrolle nur Medium mit PMN inkubiert und die ROS Ausschüttung gemessen.

Well	1	2	3	4	5	6	7	8
	Medium	Granulozyten (PMN)	Antigen (vWFA2)	Antikörper (Anti-vWFA2)	PMA	IC Anti-Typ-VII Kollagen-IgG (Kaninchen)	IC1	IC2
Well	9	10	11	12	13	14	15	16
	IC3	IC4	IC5	IC6	IC7	IC8	IC9	IC10

Nach Inkubation mit den AK wurden die Ansätze zweimal mit PBS-T und einmal mit CL-Medium gewaschen und anschließend 100 μ L CL-Medium pro Well hinzugefügt (bei den Ansätze mit PMA wurden 80 μ L CL-Medium und 20 μ L PMA vorgelegt). Die PMN wurden mit CL-Medium auf 5×10^6 Zellen eingestellt. Pro 2 mL Zelllösung wurden 100 μ L Luminol (2 mg in 8 μ L NaOH gelöst und mit 1 mL A. dest verdünnt) zugefügt. Anschließend wurden 100 μ L der mit Luminol versetzten Zellsuspension zu jedem Ansatz gegeben und bei 37 °C im Caloric-Luminometer-Device Victor 1420 (Wallac) gemessen.

2.6.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Kryo-Schnitte von gesunder Maushaut (Schwanz) wurden mit den zu testenden murinen IgG inkubiert. Die im Gewebe gebundenen AK wurden in einem zweiten Schritt mit einem Fluorescein-markierten AK gegen Maus-IgG bzw. bei der Positivkontrolle mit Kaninchen-AK gegen Kaninchen-IgG markiert. Die Bindung der AK im Gewebe wurde mikroskopisch ausgewertet.

Dazu wurden Verdünnungsreihen (1:10, 1:40 und 1:160 in PBS) der zu testenden AK (Klone 1–10) vorbereitet. Als Positivkontrolle dienten Kaninchen-anti-COL7-IgG in den Verdünnungen 1:1000, 1:4000 und 1:16000. Pro AK-Klon und Kontrolle wurden ein Objektträger mit drei Kryo-Schnitten der Mausschwanzhaut in einer dunklen Feuchtkammer aufgetaut. Die drei Schnitte wurden mit einem hydrophoben DAKO PAP Pen voneinander getrennt und mit 50 μ L der verdünnten AK für 45 min bei RT in der dunklen Feuchtkammer inkubiert. Als Negativkontrolle dienten

Ansätze mit PBS. Für die Sekundär-AK-Kontrolle wurde das Gewebe nur mit FITC-konjugiertem anti-Kaninchen-IgG / anti-Maus-IgG inkubiert. Nach Inkubation mit dem Primär-AK wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Für die Inkubation mit dem Sekundär-AK wurden 50 μ L FITC-konjugierte Esel-anti-Kaninchen-IgG / FITC-konjugierte anti-Maus-IgG 1:100 in PBS verdünnt für 30 min auf die Schnitte gegeben. Nach drei Waschschritten mit PBS für je 5 min wurden die Objektträger durch Abklopfen auf Zellstoff getrocknet und in das Einbettmedium Mowiol eingebettet. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet sowie fotodokumentiert.

2.7 *In vivo* Testung der murinen anti-COL7-IgG

Die Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Umweltministeriums in Kiel begutachtet und unter dem Versuchsantrag (V242-7224.122-5 (55-4/15)) genehmigt.

2.7.1 Lokales AK-Transfer-induziertes Modell der EBA

Zur Überprüfung der Pathogenität der murinen monoklonalen anti-COL7-AK im AK-Transfer-induzierten Modell der EBA wurden lokal 250 μ g AK i.c. in die Ohrbasis der Maus injiziert. An den folgenden 6 Tagen wurde der EBA-Score erhoben. Dabei wurden beide Ohren auf EBA-typische Hautläsionen hin untersucht und der Anteil der befallenen Fläche in Prozent bestimmt. Zusätzlich wurden die Ohrdicke mit einem Mikrometer gemessen sowie Fotos der Ohren angefertigt. Nach Beendigung des Versuches wurde den Mäusen in Narkose Blut (zur Serumgewinnung) entnommen. Die Tiere wurden anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Zur Analyse der sekundären Endpunkte wurden die Ohren entnommen und je zur Hälfte in 4 % PFA für Paraffinschnitte fixiert und in Cryomolds für Gefrierschnitte eingefroren. Letztere wurden für den Nachweis gebundener IgG und einer Komplement-Ablagerung an der DEJ mittels DIF gefärbt. Die Paraffinschnitte wurden für den Nachweis der EBA-typischen Pathohistologie (subepidermale Blasenbildung mit Trennung von Epidermis und Dermis, Infiltration inflammatorischer Immunzellen) mit HE gefärbt.

Im **LM1** der EBA wurden die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG der Hybridom-Zelllinien 1–5 (Klone 1–5) intradermal in beide Ohren von vier Mäusen injiziert. Als Positivkontrolle erhielten zwei Mäuse das für das AK-Transfer-induzierte Modell

verwendete polyklonale Kaninchen anti-COL7-IgG. Als Negativkontrolle wurde irrelevantes Kaninchen IgG appliziert. Insgesamt wurden 23 C57BL/6J Mäuse für diesen Versuch verwendet.

Im **LM2** wurde pro Gruppe fünf Mäusen eine Kombination aus den fünf AK der Hybridom-Zelllinien 1–5 (Klone 1–5) injiziert. Jeweils fünf Mäuse erhielten AK des Klons 1, des Klons 2 und der Klone 1+2 in erhöhter Dosis. Zur Steigerung der Menge der injizierten AK wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 250 µg AK intradermal in jedes Mausohr injiziert. Insgesamt wurden 20 C57BL/6J Mäuse für diesen Versuch verwendet.

Im **LM3** wurden die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG der Hybridom-Zelllinien 6–9 (Klone 6–9) jeweils vier Mäusen intradermal in die Ohrbasis injiziert. Als Positivkontrolle erhielten zwei Mäuse den für das AK-Transfer-induzierte Modell existierenden Kaninchen anti-COL7-IgG. Als Negativkontrolle wurde irrelevantes Kaninchen IgG appliziert. Insgesamt wurden 20 C57BL/6J Mäuse für diesen Versuch verwendet.

2.7.2 Nachweis des Bindungsverhaltens der murinen anti-COL7-IgG im Multiphotonen-Mikroskop

Zur Analyse des Verhaltens der murinen AK direkt nach der Injektion sowie an den folgenden Tagen im Gewebe wurden fünf Mäuse mit DyLight-594-NHS markierten anti-COL7-IgG des Klons 1 injiziert. Die Bindung der injizierten AK wurde unter dem Multiphotonen-Mikroskop TriM Scope II (LaVision BioTec GmbH, Bielefeld, Germany) mit einem XLUMPLFL 20x W/0.95 Objektiv (Olympus, Hamburg, Germany) an verschiedenen Tagen beobachtet. Insgesamt wurden drei C57BL/6J- und zwei EGFP-Lys-Mäuse verwendet. Die EGFP-Lys-Mäuse besitzen ein in das Lysozym-Gen von neutrophilen Granulozyten integriertes EGFP. Daher können die Granulozyten im Multiphotonen-Mikroskop bei einer Wellenlänge von 520–560 nm als grünes Signal detektiert werden. Auf diese Weise lässt sich die Migration der Granulozyten beobachten. Die Mäuse erhielten die AK i.c. in die Ohrbasis, i.v. über die Schwanzvene oder i.p. injiziert (s. Tabelle 11). Die Mäuse wurden zur Injektion sowie zur Messung im Multiphotonen-Mikroskop mittels einer i.p. Narkose sediert (50 µL Fentanyl, 400 µL Midazolam, 200 µL Dormitor und 3,5 mL Ringelösung). Die Ohren wurden zur AK-Applikation mit Haarentfernungscreme (GlaxoSmithKline, Bühl, Germany) enthaart. Die Maus wurde auf eine Wärmeplatte und ihr Ohr auf

einem kleinen Metallblock gebettet. Mit einem Deckgläschen und Kontaktgel wurde das Ohr auf dem Metallblock fixiert (s. Abbildung 2). Die Anregungswellenlänge für die Visualisierung der markierten murinen IgG betrug 740 nm. Das EGFP (Neutrophile und Makrophagen) und das Signal zur Erzeugung der Frequenzverdopplung für Typ-I-Kollagen wurden mit 940 nm angeregt. Emittiertes Licht wurde durch drei von der Wellenlänge getrennte Photoelektronen-Vervielfacher (435–495 nm, 495–560 nm und > 560 nm) detektiert.

Tabelle 11: Versuchstiere, Applikationswege und Nachweistage am Multiphotonen-Mikroskop: Drei C57BL/6J- und zwei Enhanced-green-fluorescent-protein-(EGFP)-Lys-Mäusen wurde der DyLight-594-N-Hydroxysuccinimid-(NHS) markierte murine monoklonale anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG (Klon 1) entweder intrakutan in die Ohrbasis (i.c.) oder intravenös in die Schwanzvene (i.v.) appliziert. Messungen am Multiphotonen-Mikroskop erfolgten an verschiedenen Tagen nach Injektion

Maus	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5
	C57BL/6J	C57BL/6J	C57BL/6J	EGFP-Lys	EGFP-Lys
Applikation	i.c. Ohr	i.c. Ohr	i.v.	i.c. Ohr	i.v.
Tag der Mikroskopie	Tag 0 Tag 3	Tag 1 Tag 2	Tag 3	Tag 0 Tag 2 Tag 6	Tag 0 Tag 2

Das Bindungsverhalten der AK sowie die Migration von neutrophilen Granulozyten bei den EGFP-Lys-Mäusen wurde an verschiedenen Tagen (Tag 0–6) nach der ersten IgG-Injektion detektiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden für jede Maus verschiedene Z-Stacks aufgenommen. Z-Stacks entsprechen 3D-Renderings, die erzeugt werden, indem die Probe in einem definierten Gewebeausschnitt in der x- und y-Achse gescannt wird. Dieser Prozess wird wiederholt, wobei der Z-Achsen-Fokus geändert wird. Damit ändert sich die Tiefe der Aufnahmen des Mikroskops. Ein Z-Stack besteht aus mehreren horizontalen 2D-Gewebesaufnahmen. Jedes Stack hatte eine Größe von 250 x 250 x 90 µm. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Imaris Software (Bitplane, Zürich, Schweiz). Als Negativkontrolle wurde einer B6-Maus mit DyLight-594-NHS markiertes Kaninchen Gesamt-IgG in die Ohrbasis injiziert. Das Ohr wurde an Tag 0 bis Tag 4 täglich unter dem Mikroskop bewertet. Zudem wurden Z-Stacks aufgenommen. Die Positivkontrolle erfolgte mittels markierter Kaninchen anti-COL7-IgG.



Abbildung 2: Versuchsaufbau für die *in vivo* Beobachtung des Bindungsverhaltens muriner monoklonaler anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG im Multiphotonen-Mikroskop: Maus in Sedierung nach intrakutaner Injektion der mit DyLight-594-markierten murinen monoklonalen anti-COL7-IgG (Klon 1). Die Maus wurde auf einer Wärmeplatte gebettet. Das Ohr wurde mittels Metallquader, Kontaktgel und Deckglas unter dem Objektiv des Multi-Photonenmikroskops platziert.

2.8 Histologische und immunhistochemische Verfahren

2.8.1 Anfertigung der Kryo-Schnitte

Zur Herstellung der Kryo-Schnitte für die DIF wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Mausohren aus den LM1–LM3 in beschrifteten und mit dem Medium TissueTek befüllten Einbettschälchen (Cryomolds) möglichst senkrecht und ohne Lufteinschlüsse platziert. Die Einbettschälchen wurden bis das Medium fest war bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kryo-Mikrotom und danach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Mit dem Kryo-Mikrotom wurde $6\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte angefertigt und je drei davon auf einem Objektträger platziert

2.8.2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung (DIF) – IgG und Komplementfaktor C3

Mit dieser Methode wurden im Probengewebe vorhandene Auto-AK (anti-COL7-IgG) und der aktivierte abgelagerte Komplementfaktor C3 mittels

Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die DIF erfolgte an Kryo-Schnitten der Mausohren. Alle Inkubationsschritte fanden in einer dunklen Feuchtkammer statt. Die Kryo-Schnitte wurden bei 20 °C (RT) aufgetaut. Die drei Schnitte auf dem Objektträger wurden mit einem Dako PAP Fettstift voneinander getrennt. Zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung wurden die Objektträger für 30 min bei RT mit 1 x Roti-Immunoblock-Lösung blockiert. Zum Nachweis des Komplementfaktors C3 wurden die Schnitte mit einem Ziege-anti-Maus C3-AK (1 mg/mL) für 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 7 min erfolgte eine simultane Inkubation mit zwei Sekundär-AK (AlexaFluor 594-konjugiertes Esel anti-Ziege-IgG (2 mg/mL), FITC-konjugiertes anti-Maus-IgG (5 µg/mL)) für 30 min bei RT im Dunkeln. Als Medium für alle AK diente eine mit PBS 1:10 verdünnte 1 x Roti-Immunoblock Lösung (Roti Immunoblock/PBS), mit der die Primär- und Sekundär-AK je 1:100 verdünnt wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Schnitte für 10 min mit DAPI (1:1000 in A. dest) inkubiert, erneut gewaschen und in Mowiol eingebettet. Die gefärbten Schnitte wurden vor und nach der mikroskopischen Auswertung bei -20 °C gelagert.

2.8.3 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die in 4 % PFA fixierten Gewebeproben der Mausohren wurden über Nacht in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten entwässert. Dazu wurden die Proben in Ethanol-Lösungen mit zunehmender Konzentration inkubiert. Danach wurde das Ethanol durch ein mit Paraffin mischbares Zwischenlösungsmittel (Xylol) ersetzt. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom in 4,5 µm dünne Schnitte geschnitten. Pro Objektträger wurden drei Schnitte platziert und 20 min im Trockenschrank getrocknet. Dann wurden die Schnitte 20 min in Formalin inkubiert, in eine absteigende Alkohol-Reihe (100 %, 90 %, 80 %, 70 %, A. dest) gegeben und solange geschwenkt, bis keine Schlieren mehr auftraten. Danach wurden sie je 5 min in Hämatoxylin und fließendem Wasser gebläut. Je nach Frische wurden die Schnitte 20–60 s in Eosin und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 2x Formalin) inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit Eukit und Deckglas im Einbettautomaten eingedeckt. Die HE-Schnitte der Mausohren wurden von Rebecca Cames angefertigt.

3 Ergebnisse

Zu Beginn des Projektes lagen zehn Hybridom-Zelllinien (Klon 1–10) vor, die murine monoklonale anti-COL7-IgG produzierten. Die AK der Klone 1–5 waren in Konzentrationen von 1,25–3,58 mg/mL bereits aus den Zellkulturmedien isoliert worden und konnten direkt *in vitro* und *in vivo* getestet werden. Zur Testung der AK der Klone 6–10 mussten die Hybridom-Zelllinien zunächst in Kultur genommen werden, um die so produzierten anti-COL7-IgG aus den Zellkulturmedien zu isolieren. Alle AK wurden initial *in vitro* hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an der DEJ (IIF) sowie hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Induktion der ROS-Ausschüttung in Granulozyten getestet. Nach einer positiven *in vitro*-Evaluierung der anti-COL7-IgG wurden die AK im lokalen AK-Transfer-induzierten Modell *in vivo* getestet.

3.1 Produktion muriner anti-COL7-IgG in Hybridom-Zellkulturen

Für die Produktion der anti-COL7-IgG wurden die entsprechenden Hybridom-Zelllinien (Klone 6–10) in Kultur genommen, wobei alle Zelllinien ein gutes Wachstum zeigten. Die AK-Produktion wurde wöchentlich in den Zellkulturüberständen mittels Dotblots überprüft. Ab der 4. Woche nach Anlage der Kultur war eine adäquate Produktion von IgG in den Zellkulturüberständen (bis zu einer Verdünnung von 1:256) nachweisbar (s. Abbildung 3). Bei einer suffizienten IgG-Produktion wurden die AK aus den Zellkulturüberständen mittels Protein-G-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Der Erfolg der AK-Isolation wurde mittels SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen überprüft. In den Eluaten der Protein-G-Affinitätschromatografie-Säule waren unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Bande bei 150 kDa und unter reduzierenden Bedingungen zwei Banden bei 25 kDa und 50 kDa erkennbar, während die Durchläufe unter beiden Bedingungen Banden verschiedener Größe aufwiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Größe der Banden im Eluat entsprachen der Größe eines monoklonalen murinen IgG (93) bzw. unter reduzierenden Bedingungen (Spaltung der Disulfidbrücken der AK) den beiden schweren (je 50 kDa) und leichten Ketten (je 25 kDa). Der Nachweis reiner IgG im Eluat in der SDS-Gelelektrophorese sprach für die erfolgreiche Isolation der AK mittels Protein-G.

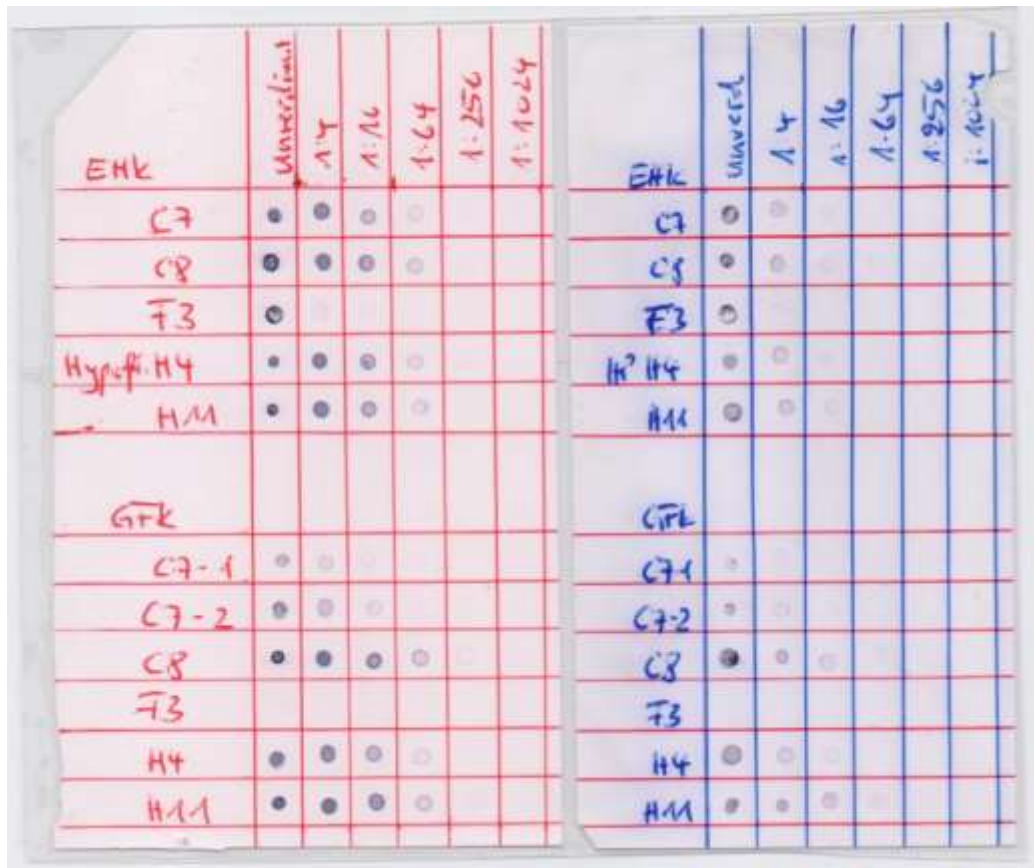


Abbildung 3: Nachweis von Immunglobulin G (IgG) in den Zellkulturüberständen der Hybridom-Zellkulturen 6–10 mittels Dotblot: Abgebildet ist die Zellulosemembran mit den Bezeichnungen der Zellkulturüberständen (Klon 6 (F3), Klon 7 (H4), Klon 8 (C7), Klon 9 (C8), Klon 10 (H11)); EHK = Erhaltungskultur, GFK = Gefrierkultur). Die Proben wurden unverdünnt und in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet. Hierbei korreliert die Intensität der Färbung mit der aufgetragenen Konzentration. Bis zu einer Verdünnung von 1:256 wurde in allen Zellkulturüberständen IgG nachgewiesen. Nur Klon 6 (F3) zeigte eine geringere IgG-Produktion.

Bei der Injektion der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG im lokalen AK-Transfer-induzierten Modell können pro Ohr maximal 150 μ L gespritzt werden. Da eine Dosis von 250 μ g/Ohr angestrebt wurde, sollte die AK-Konzentration möglichst hoch sein. Bei der AK-Konzentrierung aus den Eluaten mittels Filtertubes gingen bei dem Versuch, Konzentrationen von > 2 mg/mL zu erreichen, in den letzten Zentrifugationsschritten IgG verloren. Daher wurde die osmotische Konzentration mittels PEG bevorzugt. Nach der Aufkonzentrierung lagen die AK der Klone 7–10 (H4, H11, C7 und C8) in Konzentrationen von 0,97–2,01 mg/mL vor und konnten für die *in vitro* und *in vivo* Experimente verwendet werden. Der Klon 6 (F3) produzierte bei der Kultivierung geringere AK-Mengen (s. Abbildung 3) und nach dessen Aufkonzentrierung mittels Filtertubes betrug die Konzentration 0,018 mg/mL bei einer Gesamtmenge von 0,16 mg. Aufgrund der geringen AK-Menge bzw. -Konzentration war eine weitere Testung dieses AK nicht möglich. Da bei der

Konzentrationsbestimmung am Nanodrop-Photometer die erste Nachkommastelle schwankte, wurde die AK-Konzentration am Ende (nach Dialyse in PBS und Sterilfiltration) mit dem Bradford-Assay bestimmt (s. Tabelle 12). Dabei ergaben sich für die AK-Konzentrationen der Klone 7–10 reproduzierbare Werte. Da die AK-Konzentrationen der Klone 8 (C7) und 9 (C8) nur etwa 1 mg/mL betragen, wurde die Gesamtdosis von 250 µg/Ohr in zwei Injektionen verabreicht.

Tabelle 12: Konzentrationen der isolierten murinen monoklonalen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG der Hybridom-Zellkulturen 7–10: Nach der Isolierung aus den Zellkulturüberständen der Hybridom-Zellkulturen wurden anti-COL7-IgG mittels Zentrifugation in Filtertubes (Netzgröße 100 kDa) und osmotisch mittels PEG (Polyethylenglykol) konzentriert und sterilfiltriert. Die Konzentrationen wurden mittels Bradford-Assay bestimmt. Die IgG-Menge des Hybridom-Zellklons 6 (F3) reichte für eine *in vivo* Testung nicht aus.

	Klon 7 (H4)	Klon 8 (C7)	Klon 9 (C8)	Klon 10 (H11)
Konzentration (mg /mL)	1,69	1,021	0,97	2,01
Menge (mg)	17,1	8,1	6,75	13,3
Aufkonzentrierung	Filtertube/PEG	Filtertube/PEG	Filtertube/PEG	Filtertube/PEG

3.2 *In vitro* Testung der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG

3.2.1 Bindung muriner monoklonaler anti-COL7-IgG an die DEJ

Die Bindung von anti-COL7-AK an COL7 in der DEJ ist für die Pathogenese der EBA essentiell (41,86). Daher wurden die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG vor ihrer Verwendung *in vivo* auf ihre Fähigkeit, an das Zielprotein COL7 zu binden, getestet. In der IIF zeigten die IgG der Hybridom-Zellkulturen 1–5 (s. Abbildung 4) und 6–10 (Daten nicht gezeigt) nach Applikation auf gesunder Maushaut eine schwache Bindung an COL7 in Form einer fluoreszierenden Bande an der DEJ. Wie erwartet, wurde bei der Positivkontrolle (polyklonale Kaninchen-anti-COL7-IgG) ein deutliches und bei der Negativkontrolle (nur Puffer) kein Signal detektiert. Im Vergleich zum aktuell verwendeten polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG wiesen die AK-Klone ein höheres IIF-Hintergrundsignal im Gewebe (Dermis) auf. Dennoch war eine deutliche Bindung der IgG an der DEJ erkennbar (s. Abbildung 4; weiße Pfeile). Die Signalintensitäten in den Ansätzen mit den murinen monoklonalen anti-COL7-IgG unterschieden sich leicht, waren aber im Vergleich zur Positivkontrolle alle schwächer.

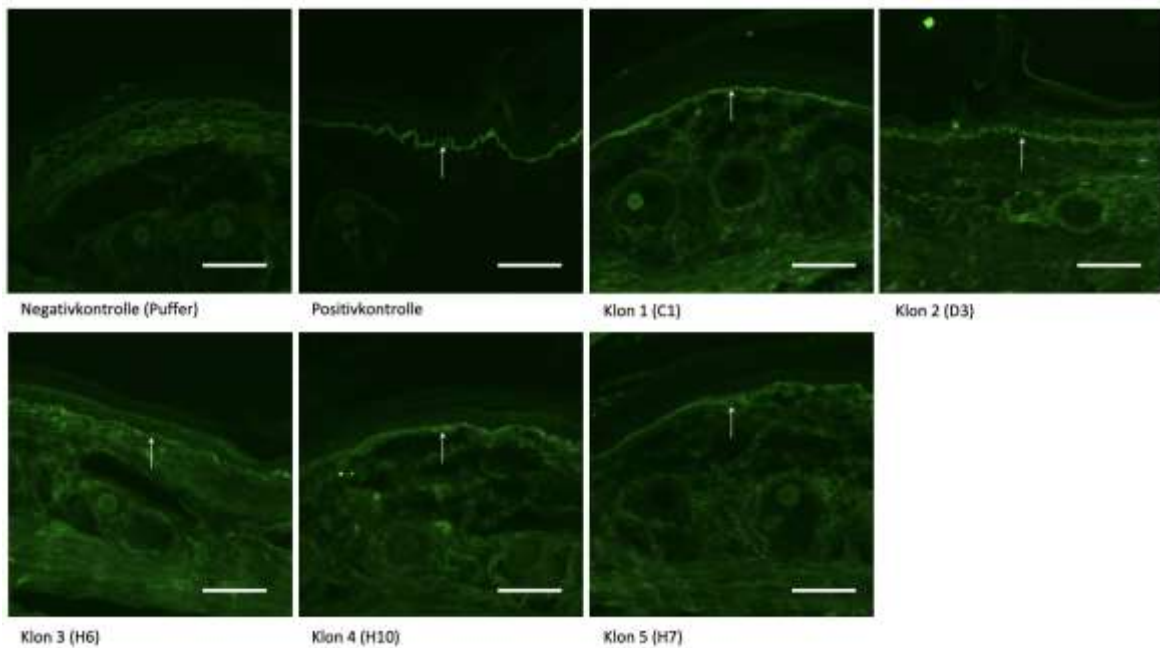


Abbildung 4: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF) der murinen monoklonalen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG der Hybridom-Zellklone 1–5: Nach Inkubation der Kryo-Schnitte muriner Haut mit den murinen monoklonalen anti-COL7-IgG der Hybridom-Zellklone 1–5 (C1, D3, H6, H10, H7) erfolgte die Fluoreszenz-Markierung mit einem Sekundär-Antikörper (Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-konjugiertes anti-Maus-IgG). Alle murinen monoklonalen anti-COL7-IgG banden an COL7 (fluoreszierenden Bande an die dermal-epidermale Junktionszone (DEJ), weiße Pfeile). Zum Vergleich wurde eine Negativkontrolle (nur Puffer) und eine Positivkontrolle (polyklonale Kaninchen anti-COL7) mitgeführt. Dargestellt sind representative DIF von insgesamt 5 Repliken/Klon. (Maßstab 50 µm)

3.2.2 ROS-Ausschüttung nach Stimulation von murinen PMN mit murinen monoklonalen anti-COL7-IgG-Immunkomplexen

Neben der Bindung von Auto-AK und der Aktivierung des Komplementsystems mit Ablagerung des Komplementfaktors C3 an der DEJ ist die Induktion der ROS-Ausschüttung durch COL7/anti-COL7-AK-Immunkomplexe in PMN ein essentieller Mechanismus der inflammatorischen EBA (86). Daher wurden die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG vor ihrem *in vivo* Einsatz in einem ROS-Release-Assay getestet. Als Positivkontrolle wurde ein Immunkomplex aus COL7 und dem im AK-Transfer-induzierten Modell der EBA etablierten polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG verwendet. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mit Medium, mit Antigen (vWFA2) oder PMN mitgeführt. Wie das polyklonale Kaninchen anti-COL7-IgG induzierten auch alle monoklonalen murinen AK-Klone nach Bindung an COL7 (Klon 1–10) in murinen PMN eine deutliche ROS-Ausschüttung. Dabei zeigte sich der gleiche zeitliche Verlauf (schneller Anstieg der ROS-Freisetzung in den ersten 6 min danach langsamer Abfall (s. Abbildung 5) wie bei dem polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG (Positivkontrolle).

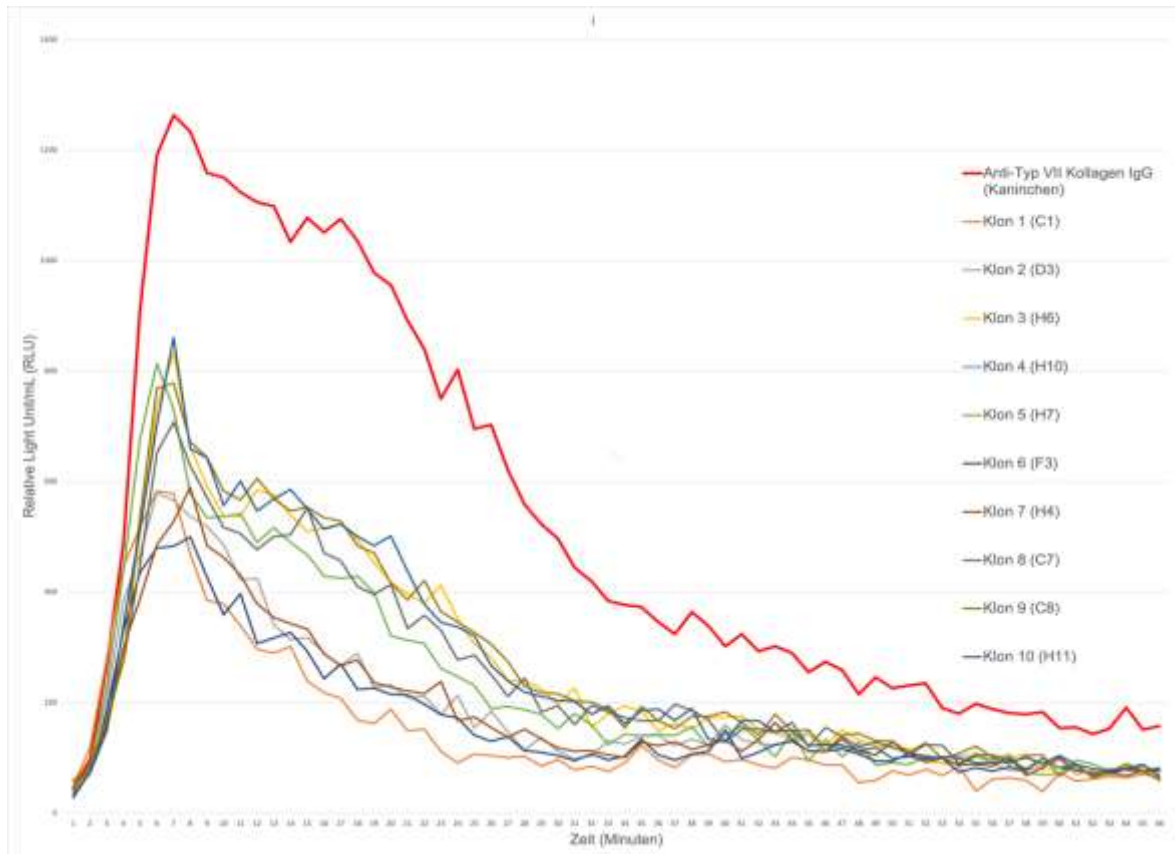


Abbildung 5: Reaktive-Sauerstoffspezies-(ROS)-Release-Assay mit murinem monoklonalem anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG (Klon 1–10): Murine Granulozyten wurden mit Antigen-Antikörper-(AK)-Komplexen aus anti-COL7-IgG und COL7 inkubiert. Die ROS-Ausschüttung wurde über eine Chemilumineszenz-Reaktion mit Luminol im Luminometer Wallace Victor2 über 60 min gemessen und in Relative Light Unit/mL (y-Achse) über der Zeit (x-Achse) dargestellt. Als Positivkontrolle wurden Antigen-AK-Komplexe aus COL7 und dem polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG (etablierte AK für das aktuelle AK-Transfer-induzierten Modell der EBA) verwendet (rote Kurve). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt 4 Versuchen.

Zur Quantifizierung der induzierten ROS-Ausschüttung wurde das Integral über die Zeit berechnet und als Area under the curve (AUC) dargestellt (s. Abbildung 6). Die Ansätze mit den AK der Klone 3, 4, 8, 9 und 10 zeigten hierbei im Vergleich die höchste ROS-Ausschüttung, erreichten jedoch nicht die Werte der Ansätze mit dem polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG. In den Negativkontrollen war kaum eine ROS-Ausschüttung aus den PMN nachweisbar. Die jeweils in vier Mäusen reproduzierten Ergebnisse belegen, dass Komplexe aus murinen monoklonalen anti-COL7-IgG (Klone 1–10) mit COL7 in PMN eine ROS-Ausschüttung hervorrufen.

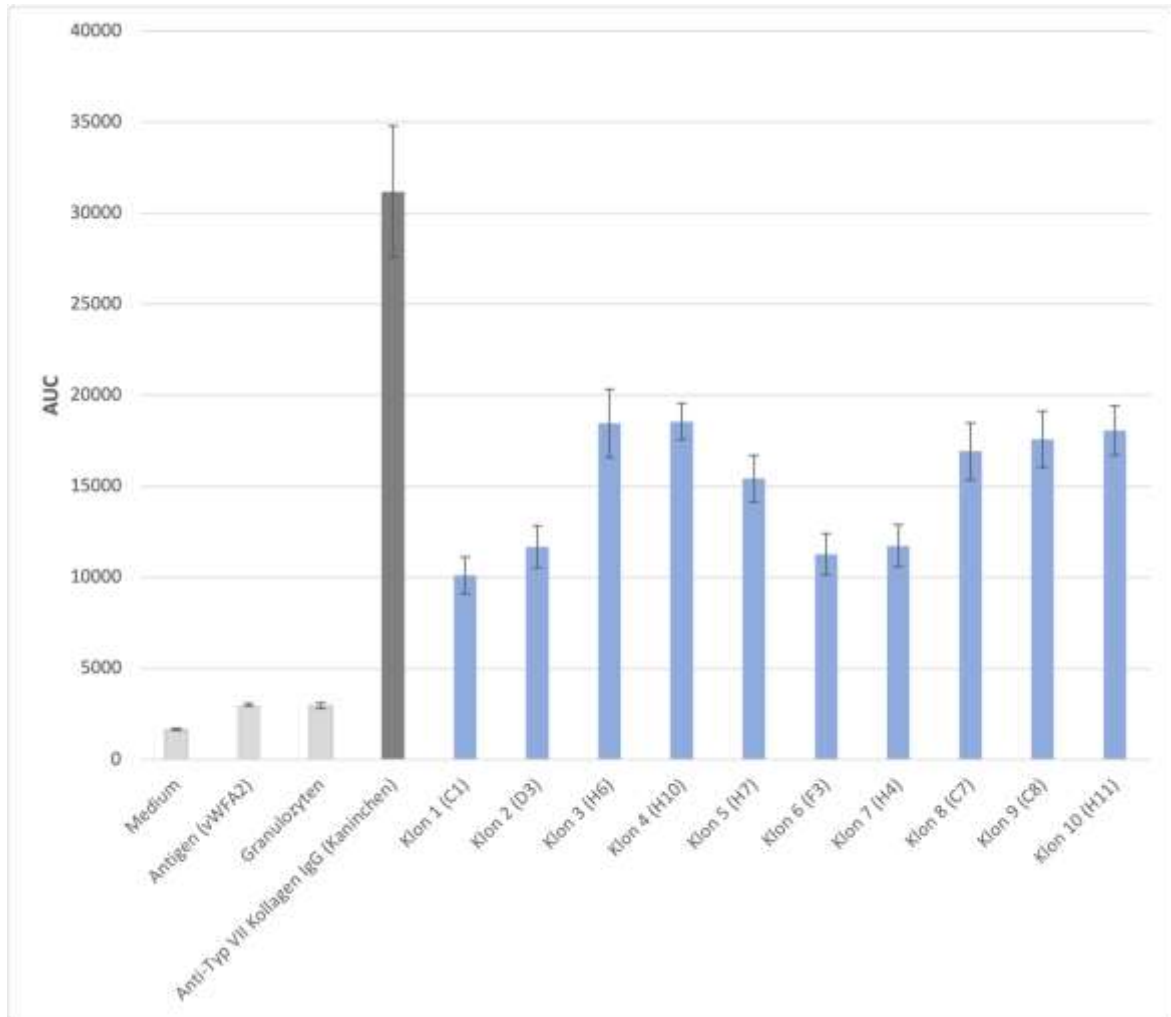


Abbildung 6: Area-under-the-curve-(AUC)-Werte des Reaktive-Sauerstoffspezies-(ROS)-Release-Assays: AUC-Werte im ROS-Release-Assay nach Stimulation von murinen Granulozyten mit Immunkomplexen aus murinem monoklonalem anti-COL7-IgG (Klon 1-10) bzw. polyklonalem Kaninchen anti-COL7-IgG (Positivkontrolle) und COL7. Die ROS-Ausschüttung wurde über eine Chemilumineszenz-Reaktion mit Luminol im Luminometer Wallace Victor2 bei einer Wellenlänge von 425 nm gemessen sowie in RLU (Relative Light Unit/mL) angegeben. Als Negativkontrolle wurden nur Medium, nur Antigen (vWFA2) sowie nur neutrophile Granulozyten mitgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der AUC mit ihrem jeweiligen Standardfehler. Bei $n=4$ Versuchsreihen wurde das Ergebnis rein deskriptiv ausgewertet.

3.3 *In vivo* Testung der monoklonalen murinen anti-COL7-IgG

3.3.1 Ergebnisse des lokalen AK-Transfer-induzierten Modells

Nach dem Nachweis der Bindung der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG *in vitro* an COL7 in der DEJ und des Effektes der Immunkomplexe auf murine Granulozyten (ROS-Release-Assay) wurden die AK von neun der zehn Hybridom-Zellkulturen im lokalen AK-Transfer-induzierten Mausmodell der EBA getestet. Bei dem Klon 6 (F3) war die AK-Konzentration für eine *in vivo* Testung zu gering (s. Kapitel 3.1).

3.3.1.1 Lokale Injektion der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG der Hybridom-Zelllinie 1–5

Zur Induktion einer lokalen EBA im Ohr wurden die AK der Klone 1–5 in einer Dosis von 250 μg /Ohr im lokalen Modell 1 (LM1) injiziert. Als Negativkontrolle dienten irrelevante Kaninchen-IgG und als Positivkontrolle das im AK-Transfer-induzierten Modell verwendete polyklonale Kaninchen anti-COL7-IgG. Die Versuchstiere, die eines der fünf murinen monoklonalen anti-COL7-IgG injiziert bekamen, zeigten an keinem der sechs Versuchstage EBA-typische Hautveränderungen. In Abbildung 7 ist exemplarisch das Ergebnis nach Injektion des murinen anti-COL7-IgG Klon 2 (D3) dargestellt. Vom Injektionstag bis Tag 7 war klinisch keine Krusten- oder Blasenbildung zu beobachten. Auch die als Zeichen der Inflammation gemessene Ohrdicke zeigte mit der Negativkontrolle vergleichbare konstante Werte. Korrelierend dazu war in den Gewebeproben der Mausohren (HE-gefärbte Paraffinschnitte s. Abbildung 7 D) keine wesentliche Entzündung, Verdickung der Dermis oder charakteristische subepidermale Separation zu beobachten.

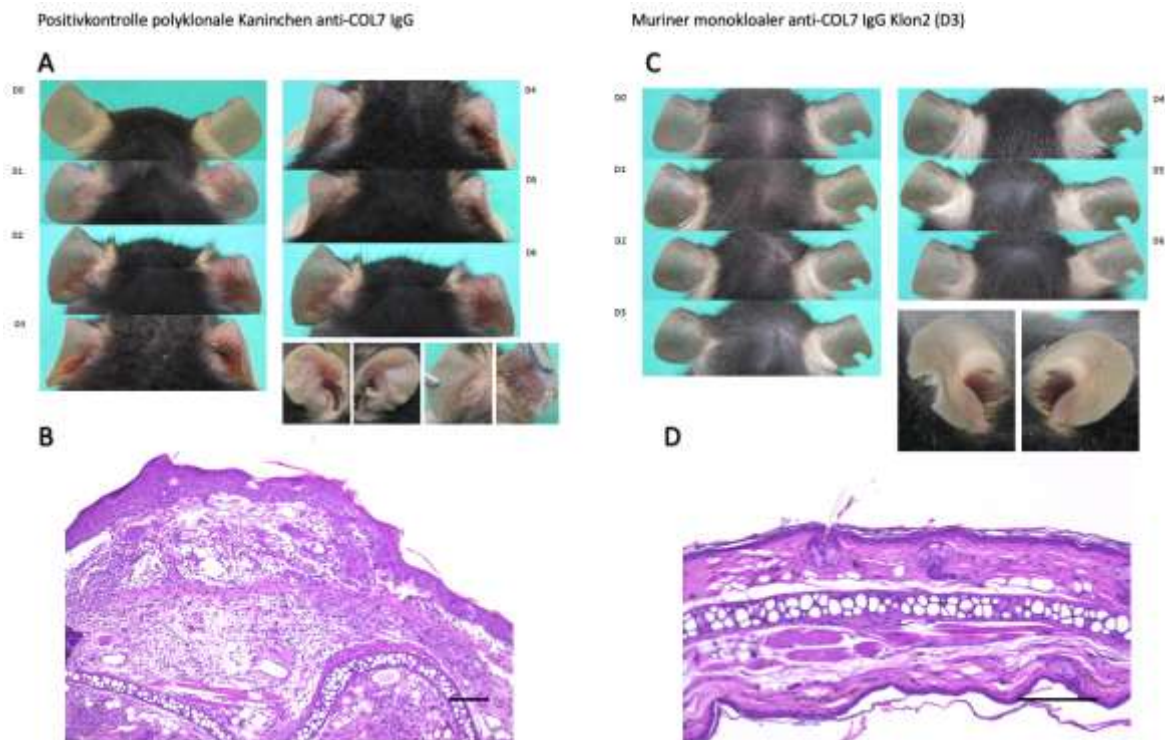


Abbildung 7: Klinischer und histologischer Befund des lokalen Antikörper-(AK)-Transfer-induzierten Modells LM1: C57BL/6J Mäuse erhielten (A/B) polyklonale Kaninchen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG bzw. (C/D) monoklonale murine anti-COL7-IgG des Klons 2 intradermal in die Ohrbasis injiziert und wurden über 6 Tage täglich klinisch beobachtet. (A/C) Klinisches EBA-Bild direkt vor Injektion des AK (d0) bzw. 1–6 Tage danach (d1–d6). (B/D) Nach 6 Tagen wurden die Mäuse für die Organentnahme getötet und die Paraffinschnitte der Mausohren mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbt. (B) Histologisches Bild der EBA nach Induktion mit Kaninchen anti-COL7-IgG mit typischer subepidermaler Blasenbildung. (D) Histologisches Bild nach Injektion mit murinen monoklonalen anti-COL7-IgG (Klon 2) ohne EBA-typische subepidermale Blasenbildung und Einwanderung von Entzündungszellen. (Maßstab 100 μm)

In den Gefrierschnitten der Mausohren (LM1/LM2) war mittels DIF eine Bindung der IgG und des Komplementfaktors C3 an der DEJ nachweisbar (Abbildung 8 C/D). Jedoch zeigten die murinen anti-COL7-IgG im Vergleich zu den Kaninchen anti-COL7-IgG (Positivkontrolle) eine vermehrte unspezifische Ablagerung in der Subkutis sowie ein schwächeres Fluoreszenzsignal an der DEJ. Das irrelevante Kaninchen-IgG (Negativkontrolle) zeigte keine Anlagerung von IgG oder Komplementfaktor C3 an der DEJ und induzierte keine makroskopische oder mikroskopische Blasenbildung. Der EBA-Score für das Ohr der nicht-erkrankten Mäuse betrug 0 %. Die Mäuse der Positivkontrolle zeigten nach wenigen Tagen eine deutliche Krustenbildung, sowie Erosionen und subepidermale Blasen (s. Abbildung 7 A). Der EBA-Score betrug 40–80 %. In der Histologie war eine für EBA charakteristische subepidermale Auflockerung mit Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten zu beobachten (s. Abbildung 7 B). In der DIF der Positivkontrolle war eine Ablagerung von Komplement C3 und eine Bindung des Kaninchen anti-COL7-IgG an der DEJ ein deutlich nachweisbar (s. Abbildung 8 A/B)

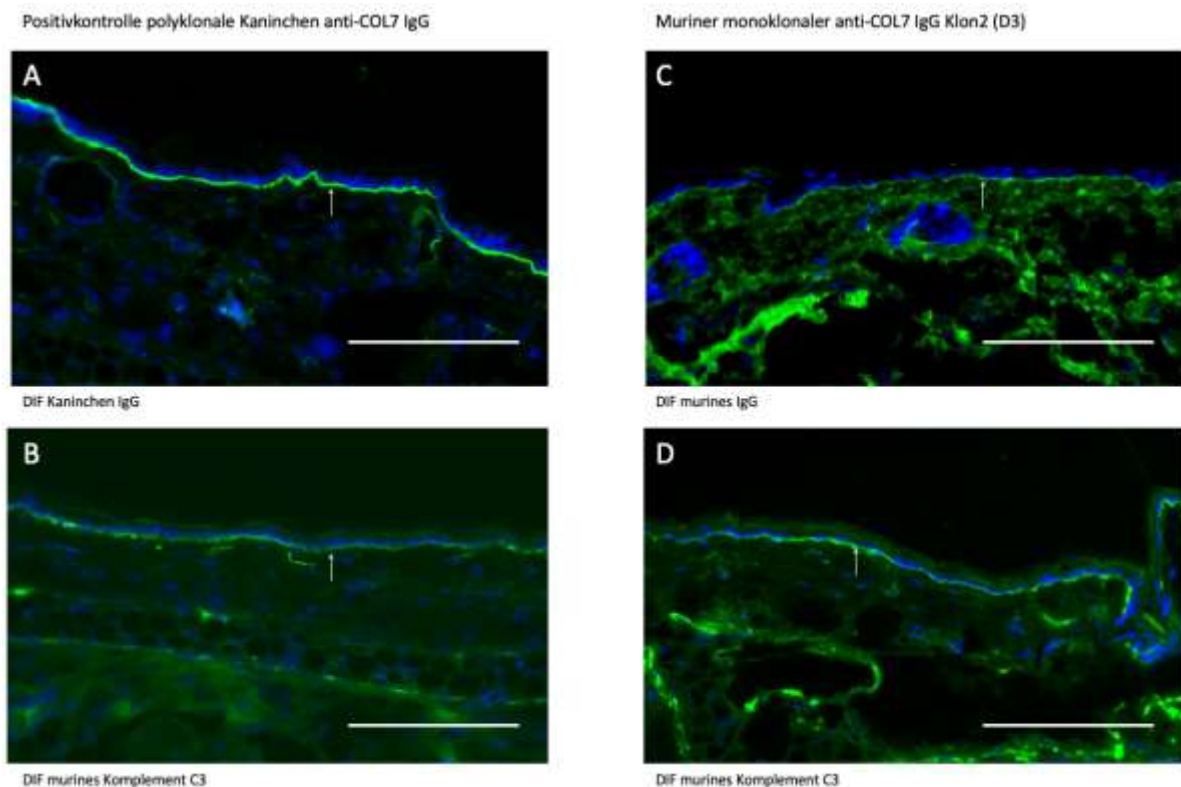


Abbildung 8: Direkte Immunfluoreszenz (DIF) des lokalen Antikörper-(AK)-Transfer-induzierten Modells LM1: Nach Injektion von (A/B) polyklonalen Kaninchen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG bzw. (C/D) monoklonalem murinem anti-COL7-IgG (Klon 2) intradermal in die Ohrbasis wurden die Mäuse nach 6 Tagen getötet. In den Kryo-Schnitten der Mausohren wurde das im Gewebe gebundene (A) Kaninchen- bzw. (C) Maus-IgG mittels DIF detektiert. Für beide AK war eine EBA-typische Bindung von IgG an der dermal-epidermalen Junctionszone (DEJ) nachweisbar. (B/D) Zusätzlich wurde mithilfe der DIF in beiden Proben eine deutliche Ablagerung von murinem Komplementfaktor C3 an der DEJ nachgewiesen. (Maßstab 100 µm)

Da die murinen monoklonalen IgG in diesem Modell an die DEJ banden und den Komplementfaktor C3 aktivierten, stellte sich die Frage, warum dies nicht zu einer EBA-typischen subepidermalen Blasenbildung führte. Mögliche Gründe sind eine unzureichende Dosierung (hier 250 μ g IgG) oder die Notwendigkeit der Bindung verschiedener AK an mehrere Epitope (Polyklonalität) zur Auslösung einer Pathologie. Um diese Punkte zu adressieren, wurde im lokalen Modell 2 (LM2):

1. mit einer zweiten Injektion die Dosis der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG verdoppelt
2. eine Kombination der AK der Klone 1–5, sowie eine Kombination der AK Klone 1 und 2 (gute Bindung an die DEJ) in erhöhter Dosis injiziert.

In beiden Ansätzen ließ sich keine EBA-typische Pathologie auslösen (s. Abbildung 9). Der EBA-Score der Mausohren betrug jeweils 0 %. Die DIF zeigte analog zum LM1 eine Anlagerung der murinen anti-COL7-IgG an die DEJ und eine Aktivierung des Komplementsystems (Ablagerung von Komplementfaktor C3 an der DEJ). Histologisch (HE-gefärbte Paraffin-Schnitte) war ebenfalls keine subepidermale Blasenbildung sowie keine Infiltration von neutrophilen Granulozyten in den Ohren nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Die Positiv- und Negativkontrollen verhielten sich wie im LM1.

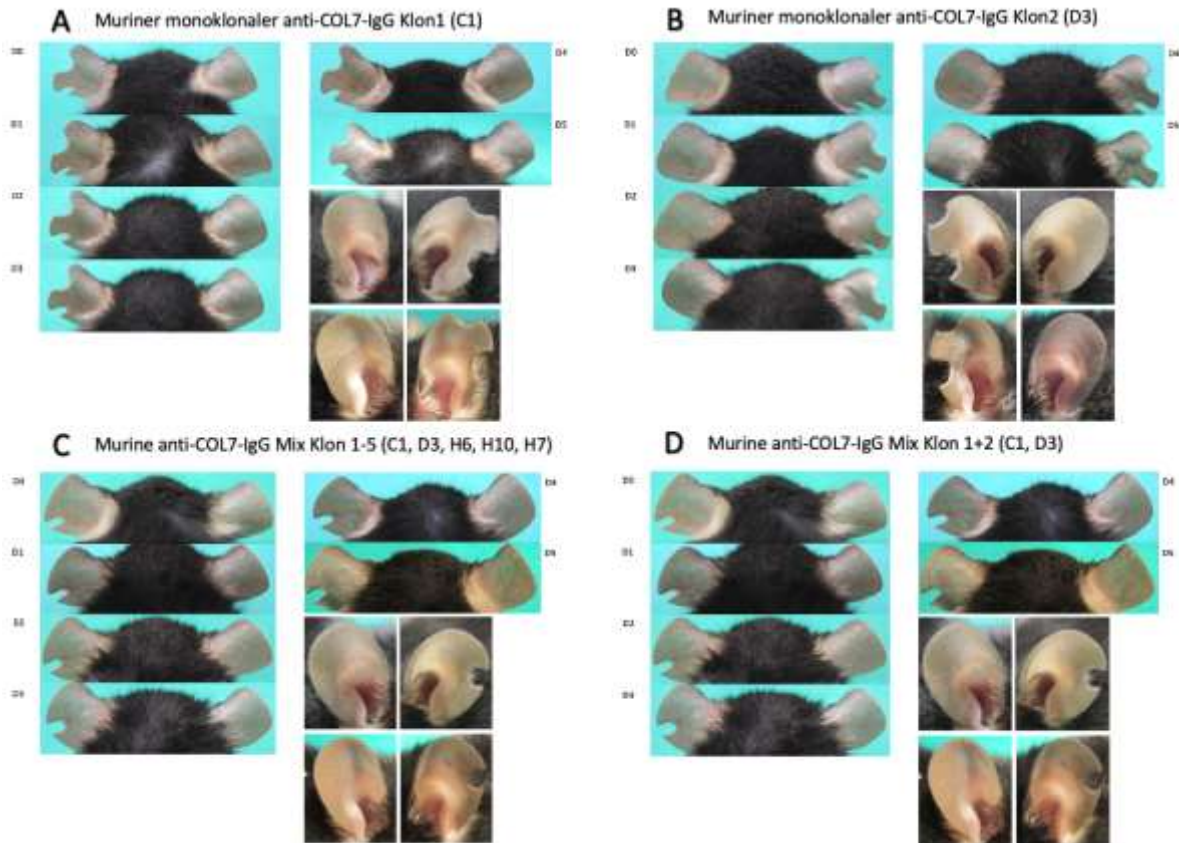


Abbildung 9: **Klinischer Befund des lokalen Antikörper-(AK)-Transfer-induzierten Modells LM2:** C57BL/6J-Mäuse erhielten (A/B) murine monoklonale anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG der Hybridom-Zelllinien 1 (C1) und 2 (D3) in erhöhter Konzentration, (C) eine Mischung der AK der Klone 1–5 (C1, D3, H6, H10, H7) bzw. (D) eine Mischung der Klone 1 und 2 (C1, D3) intradermal in die Ohrbasis injiziert und wurden über 6 Tage täglich klinisch beobachtet.

3.3.1.2 Lokale Injektion der murinen anti-COL7-IgG der Hybridom-Zelllinien 7–10

Die in Zellkultur produzierten und anschließend gereinigten monoklonalen anti-COL7-IgG (Klone 7–10), wurden im lokalen AK-Transfer-induzierten Modell 3 (LM3) intradermal in die Ohrbasis injiziert ($250 \mu\text{g}/\text{Ohr}$). Bei Versuchstieren aller vier Klone war ab dem ersten Tag eine Verdickung des Ohres sowie eine EBA-typische Blasenbildung nachweisbar. Bei einigen Versuchstieren entstand am ersten Tag eine seröse Blase, die im weiteren Verlauf mit Erosionen und Erythemen einherging. Im Vergleich zur Positivkontrolle war die Reaktion etwas schwächer ausgeprägt. Nach Injektion von AK des Klons 8 (C7) bzw. des Klons 7 (H4) erkrankten je zwei von vier Mäusen und nach Injektion von AK des Klons 9 (C8) drei von vier Mäusen. Nach Injektion von AK des Klons 10 (H11) entwickelte eine von vier Mäusen einen EBA-typischen Phänotyp (s. Abbildung 10).

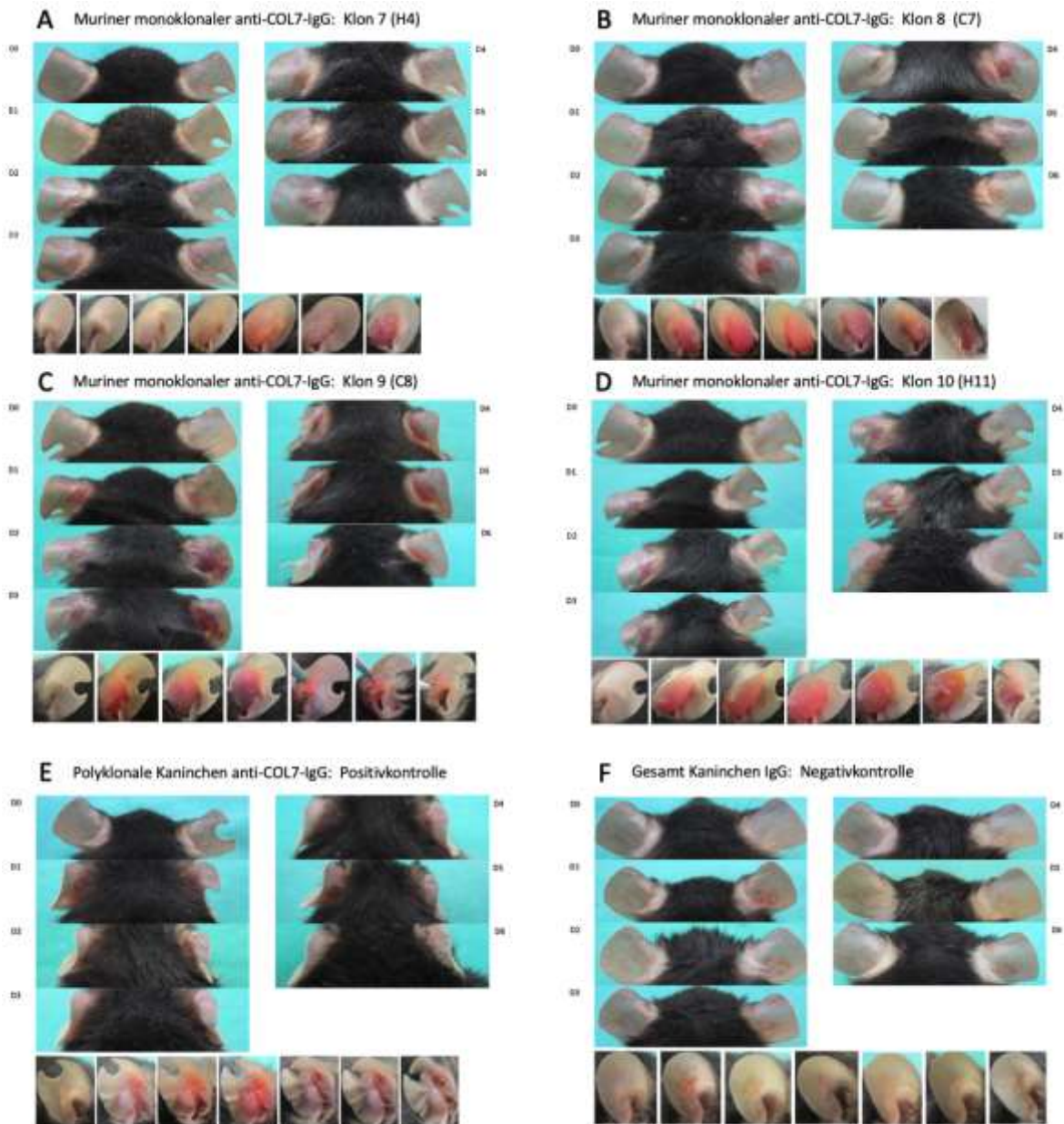


Abbildung 10: Klinischer Befund des lokalen Antikörper-(AK)-Transfer-induzierten Modells LM3: C57BL/6J-Mäuse erhielten murine monoklonale anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG (A) des Hybridom-Zellklons 7 (H4) (B) des Hybridom-Zellklons 8 (C7) (C) des Hybridom-Zellklons 9 (C8) bzw. (D) des Hybridom-Zellklons 10 (H11) intradermal in die Ohrbasis injiziert und wurden über 6 Tage täglich klinisch (Bestimmung des EBA-Scores (Prozentualer Anteil der läSIONalen Haut des Ohres)) beurteilt. Nach 6 Tagen wurden die Mäuse für die Organentnahme getötet. (E) Als Positivkontrolle erhielt eine C57BL/6J-Maus den für das aktuelle AK-Transfer-induzierte Modell der EBA etablierte polyklonale Kaninchen anti-COL7-IgG intradermal in die Ohrbasis injiziert. (F) Als Negativkontrolle wurde einer Maus Kaninchen Gesamt-IgG injiziert. Deutlich ist die EBA-typische Klinik nach Injektion der murinen monoklonalen COL7-IgG zu erkennen, vergleichbar mit der Positivkontrolle.

Die DIF zeigte für die AK aller vier Klone (Klon 7–10) eine Bindung von murinem IgG an der DEJ in den Mausohren. Weiter wurde die Ablagerung von murinem Komplementfaktor C3 an der DEJ nachgewiesen (s. Abbildung 11). An der DIF-Dreifachfärbung (grün = murines IgG; rot = murines Komplement C3; blau = Zellkerne) wird deutlich, dass IgG und Komplement C3 an derselben Stelle an der

DEJ banden. Im Vergleich zur Positivkontrolle waren die Fluoreszenzsignale deutlich schwächer. Die Negativkontrolle (Kaninchen Gesamt-IgG) zeigte keine Bindung von IgG und dem Komplementfaktor C3; nur das blaue DAPI-Signal der Zellkerne der Keratinozyten war erkennbar. In den H/E-gefärbten Paraffin-Schnitten der Mausohren, die makroskopisch eine Blasenbildung nach AK-Injektion aufwiesen, war eine EBA-typische inflammatorische Verdickung der Epidermis und teilweise Separation von Epidermis und Dermis mit Einwanderung von inflammatorischen Zellen beobachtbar. Die Negativkontrolle zeigte histologisch einen Normalbefund. Die makro- und mikroskopisch sichtbare subepidermale Blasenbildung, induziert durch die Injektion der murinen anti-COL7-IgG (Klone 7–10), war vergleichbar mit der Positivkontrolle, auch wenn einige HE-Präparate eine geringere Ausprägung aufwiesen (s. Abbildung 12). Zusammengefasst banden die monoklonalen AK der murinen Zelllinien C7, C8, H4 und H11 nach intrakutaner Injektion im Mausohr an die DEJ, induzierten eine Komplement-Aktivierung und lösten eine subepidermale Blasenbildung mit Erosionen und Erythem sowie entzündlichen Infiltraten aus.

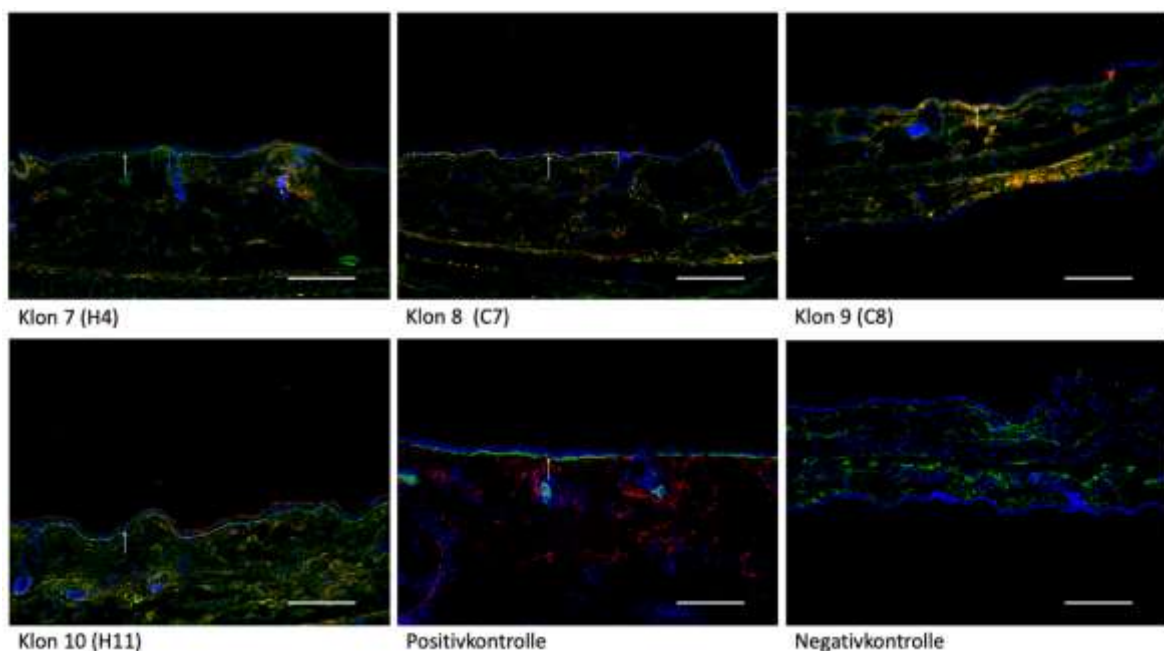


Abbildung 11: Direkte Immunfluoreszenz (DIF) des lokalen Antikörper-(AK)-Transfer-induzierten Modells LM3: Nach intradermaler Injektion von murinen monoklonalen anti-Typ-VI-Kollagen-(COL7)-IgG der Hybridom-Zellklone 7–10 in die Ohrbasis von C57BL/6J-Mäusen erfolgte nach Beendigung des Versuches eine direkte Immunfluoreszenz-Färbung (DIF) läsionaler Haut zum Nachweis von murinem IgG und murinem Komplement C3. Die Färbung erfolgte mit einem grün fluoreszierenden anti-Maus-IgG-AK, einem rot fluoreszierenden anti-Komplement-C3-AK sowie dem blau fluoreszierenden Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) zur Markierung der Zellkerne der Keratinozyten, sodass die dermal-epidermale Junctionszone (DEJ) sichtbar wird. Die IgG-Klone C7, C8, H4 und H11 und der Komplementfaktor C3 zeigten lineare Ablagerungen an der DEJ (weiße Pfeile), die bei der Negativkontrolle (Injektion von irrelevantem Kaninchen Gesamt-IgG) nicht und bei der Positivkontrolle (Injektion von polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG) verstärkt nachweisbar waren. (Maßstab 100 µm)

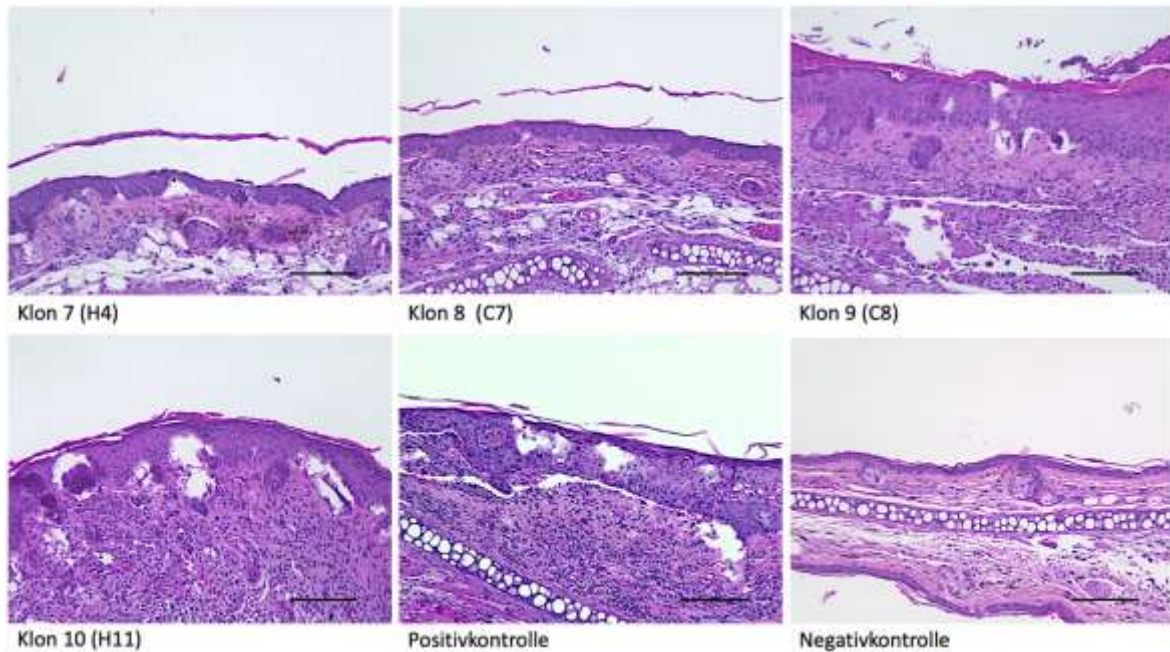


Abbildung 12: Histologische Ergebnisse des Antikörper-(AK)-Transfer-induzierten Modells LM3: Dargestellt sind die Hämatoxylin/Eosin-(H/E) gefärbten histologischen Schnitte der Mausohren nach intrakutaner Injektion der murinen monoklonalen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG der Hybridom-Zellklone 7–10 (Klone C7, C8, H4 und H11). Erkennbar ist für alle vier AK-Klone eine EBA-typische Separation von Dermis und Epidermis mit Verdickung der Epidermis und Einwanderung entzündlicher Infiltrate. Das histologische Bild war vergleichbar mit der Positivkontrolle (Injektion von polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG). In der Negativkontrolle (Injektion von Kaninchen Gesamt-IgG) zeigte sich ein Normalbefund ohne Trennung von Epidermis und Dermis. (Maßstab 100 µm)

3.3.1.3 Zeitlicher Verlauf der Anlagerung von murinen anti-COL7-IgG und neutrophiler Granulozyten an die DEJ

Die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG der Hybridom-Zelllinien 1–5 (Klon 1–5) banden in den *in vitro* und *in vivo* Experimenten an die DEJ und aktivierten das Komplementsystem, ohne jedoch eine EBA-typische Blasenbildung zu induzieren. Auch die Steigerung der AK-Menge oder die Injektion einer Kombination der AK-Klone 1-5 löste keine EBA im AK-Transfer-induzierten Modell aus. In den Immunfluoreszenz-Färbungen fiel auf, dass die Bindung der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG an der DEJ im Vergleich zu dem polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG schwächer erschien. Diese Beobachtung kann verschiedene Ursachen haben, darunter eine kürzere Bindungsdauer der AK. Zur Analyse des Verhaltens der murinen AK nach der Injektion bzw. der Dauer der Bindung an die DEJ wurde der murine AK des Klons 1 (C1) mit dem Fluoreszenzfarbstoff DyLight-594-NHS markiert und unter dem Multiphotonen-Mikroskop in der lebenden Maus untersucht. Hierzu wurden C57BL/6J-Mäusen mit DyLight-594-NHS-markierte, murine monoklonale anti-COL7-IgG des Hybridom-Zellklons 1 (C1) intrakutan in die

Ohrbasis sowie i.p. oder i.v. über die Schwanzvene injiziert. Die Verteilung (Bindungsort / Bindungsdauer) der AK wurde an mindestens vier aufeinander folgenden Tagen unter dem Multiphotonen-Mikroskop beobachtet. Zur Analyse des Verhaltens der für die EBA-Induktion essenziellen neutrophilen Granulozyten wurde außerdem zwei EGFP-Lys-Mäusen der markierte anti-COL7-IgG-AK des Klons 1 injiziert. Bei diesem Mausstamm enthalten neutrophile Granulozyten ein im Lysozym (Lys) Gen integriertes enhanced green fluorescent protein (EGFP), das bei einer Wellenlänge von 520–560 nm als grünes Signal detektiert werden kann. Als Positivkontrolle diente eine EGFP-Lys-Maus, der ein DyLight-594-NHS-markierter Kaninchen anti-COL7-IgG injiziert wurde, um zu beobachten, wie sich die AK aus dem existierenden lokalen AK-Transfer-induzierten Modell der EBA verhalten. Aus in verschiedener Tiefe der Maushaut aufgenommenen 2D-Bildern wurden Stacks erstellt. Die resultierende 3D-Abbildung zeigt den Bindungsort der AK *in vivo*. Die Bindungsdauer wurde über die Erstellung dieser Stacks an verschiedenen Tagen untersucht.

Abbildung 13 zeigt die Stacks einer C57BL/6J-Maus, der der murine AK-Klon 1 intrakutan injiziert wurde, über einen zeitlichen Verlauf von 4 Tagen. Die injizierten murinen anti-COL7-IgG sind rot markiert, während das Typ-IV Kollagen in der Subkutis blau erscheint. Die Bindung des anti-COL7-IgG an der DEJ ist direkt nach der Injektion sichtbar, nimmt aber schon an Tag 2 deutlich ab und ist an Tag 4 kaum noch vorhanden. Die seitliche Ansicht des Stacks (s. Abbildung 14) zeigt, dass die AK sich oberhalb der Subkutis an der Grenze zwischen Dermis und Epidermis an die DEJ anlagern. An der gleichen Stelle ist eine Anlagerung der neutrophilen Granulozyten (grün) beobachtbar (s. Abbildung 14, Abbildung 15).

Der hier beobachtete Bindungsort des Klon 1, in Höhe der DEJ, ist vergleichbar mit der Bindung des Kaninchen anti-COL7-IgG, wie In einem Ausschnitt aus dem Stack an Tag 6 der Positivkontrolle gut erkennbar ist (Abbildung 16C). Jedoch binden die polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG (Nachweis 6 Tage nach der Injektion) deutlich länger als die murinen anti-COL7-IgG des Klons 1 an der DEJ (Nachweis <2d nach Injektion). Die mit der Anlagerung des Kaninchen anti-COL7-IgG vergleichbare Anlagerung der monoklonalen murinen anti-COL7-IgG an die DEJ direkt nach der Injektion war unabhängig von der Applikationsform (i.v./i.p./i.c.). Auch bei einer systemischen Applikation (i.v. und i.p.) wanderten die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG des Klon 1 ins Gewebe und lagerten sich an die DEJ

an. Im Unterschied zur systemischen Applikation fielen bei der i.c. Injektion AK-Depots (deutlich fluoreszierende Stacks) in der Subkutis auf, die sich durch die Applikationsform erklären lassen.

Insgesamt zeigten die Multiphotonen-Mikroskop-Versuche, dass sich die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG (Klon1) unabhängig von der Applikation an der DEJ anlagerten und die Extravasation von neutrophilen Granulozyten bewirkten. Die im Vergleich zu den im AK-Transfer-induzierten Modell etablierten polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG deutlich kürzere Anlagerung des murinen monoklonalen anti-COL7 IgG (Klon1) könnte als mögliche Ursache für das Fehlen einer klinischen EBA-Induktion *in vivo* interpretiert werden.

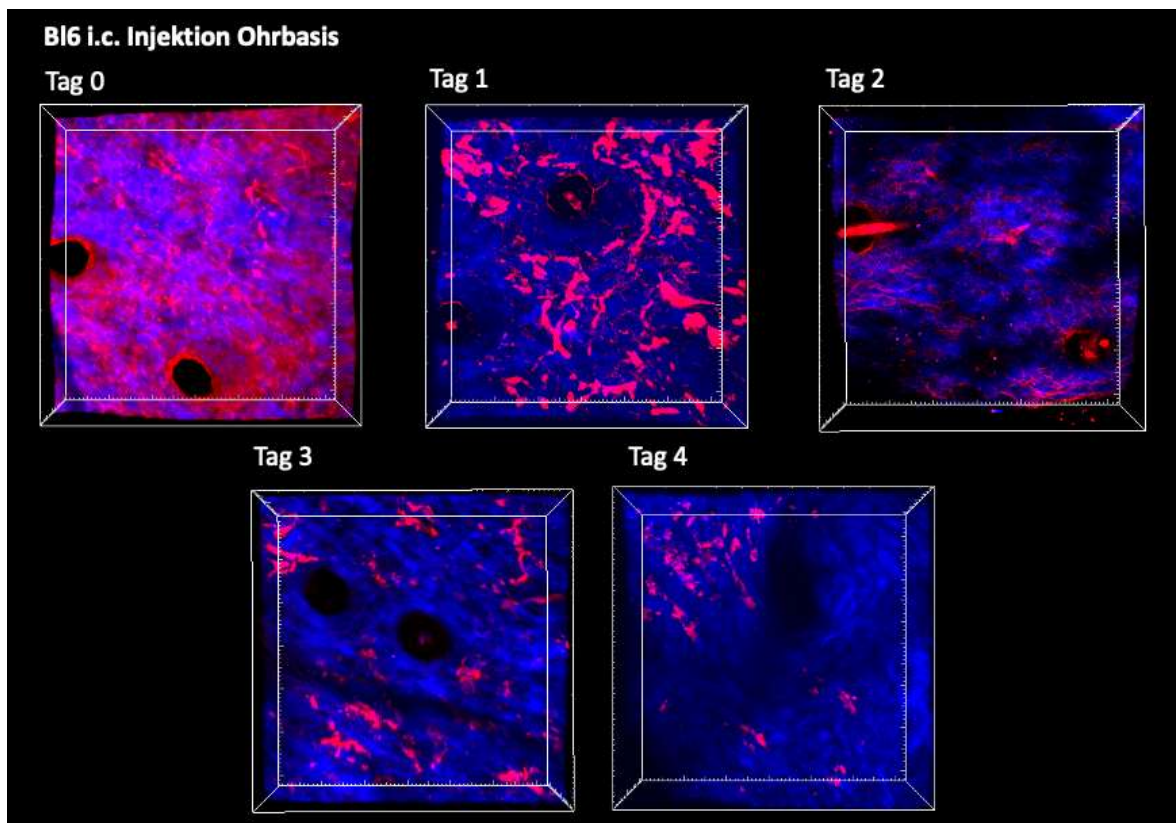


Abbildung 13: Ergebnisse der Multiphotonen-Mikroskop-Experimente nach intrakutaner (i.c.) Injektion muriner monoklonaler anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG des Hybridomzell-Klons 1: In dem Versuch wurde das Bindungsverhalten der murinen Antikörper (DyLight-594-N-Hydroxysuccinimid-(NHS) markierte murine monoklonale anti-COL7-IgG (Klon 1)) nach i.c. Injektion in die lebende Maus (C57BL/6J) im Multiphotonen-Mikroskop beobachtet. Dargestellt ist die Draufsicht der aufgenommenen Stacks (dreidimensionale Aufnahmen eines Mausohrs in verschiedener Tiefe) nach der i.c. Injektion über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die murinen Antikörper (rotes Signal) banden oberhalb des Typ IV Kollagens der Subkutis (blaues Signal) an die DEJ. Aufgrund der Applikation bildeten sich subkutane AK-Depots. Ab Tag 1 reduzierte sich das AK-Signal an der DEJ und war am Tag 4 kaum noch nachweisbar.

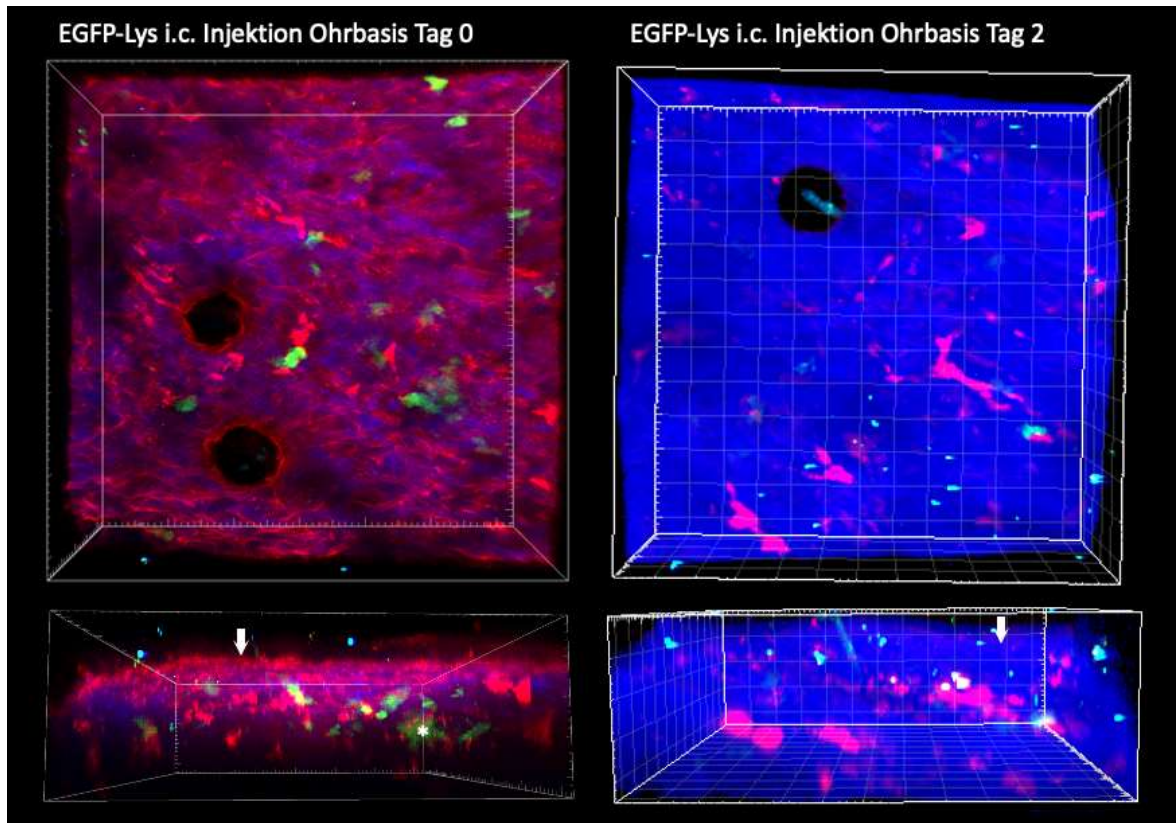


Abbildung 14: Ergebnisse der Multiphotonen-Mikroskop-Experimente nach intrakutaner (i.c.) Injektion muriner monoklonaler anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG des Hybridom-Zellklons 1 in eine EGFP-Lys-Maus: In dem Versuch wurde das Bindungsverhalten der Antikörper (AK, DyLight-594-N-Hydroxysuccinimid-(NHS) markierte murine monoklonale anti-COL7-IgG (Klon 1)) nach i.c. Injektion in die lebende Maus (Enhanced-green-fluorescent-protein-(EGFP)-Lys-Maus mit markierten Granulozyten) im Multiphotonen-Mikroskop beobachtet. Dargestellt sind die Draufsicht sowie seitliche Ansicht dreidimensionaler Aufnahmen (Stacks) eines Mausohrs am Tag der i.c. Injektion (links) und zwei Tage nach der i.c. Injektion (rechts). In der seitlichen Ansicht ist deutlich die Bindung der murinen AK am Tag der Injektion an der dermal-epidermale Junctionszone (DEJ) zu erkennen (Weißer Pfeil). Auch die Granulozyten (grünes Signal) lagerten sich an der DEJ an. Nach zwei Tagen waren kaum noch AK in der DEJ nachweisbar.

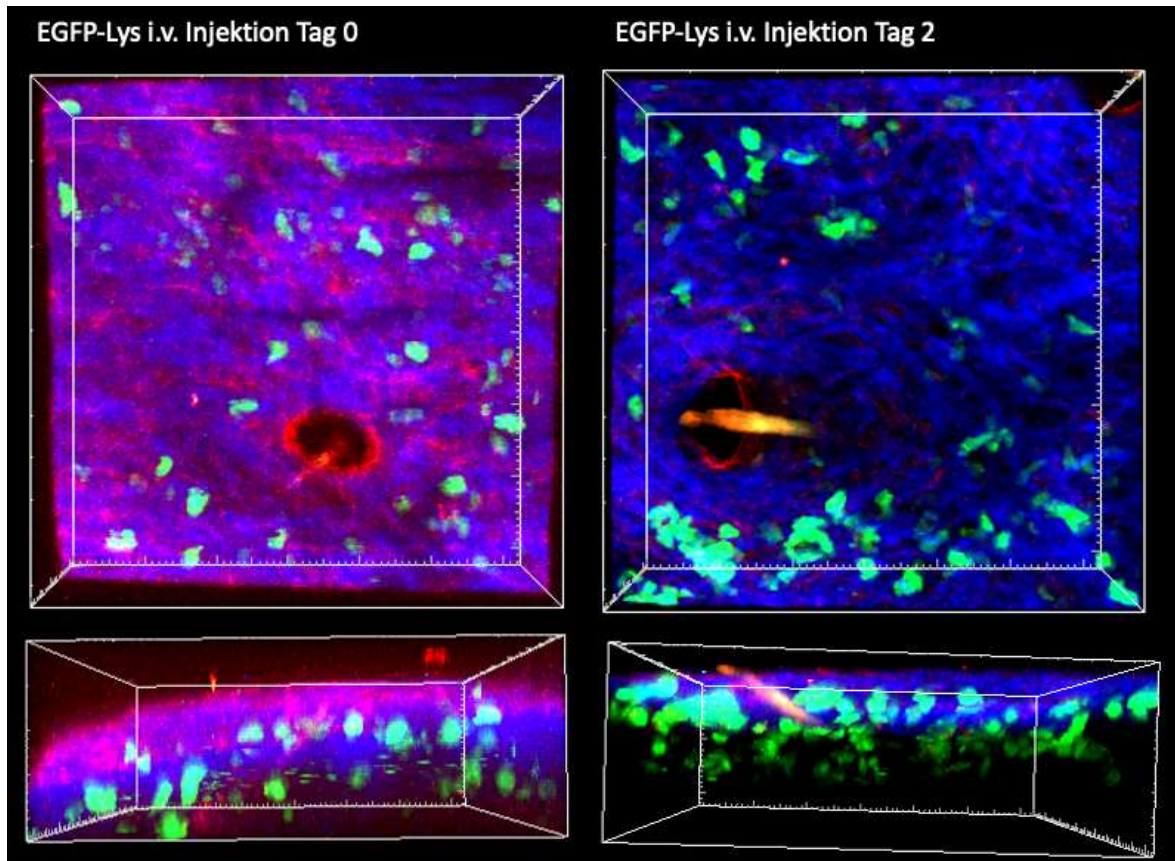


Abbildung 15: Ergebnisse der Multiphotonen-Mikroskop-Experimente nach intravenöser (i.v.) Injektion muriner monoklonaler anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG des Hybridom-Zellklons 1 in eine EGFP-Lys-Maus: In dem Versuch wurde das Bindungsverhalten der Antikörper (AK, DyLight-594-N-Hydroxysuccinimid-(NHS) markierte murine monoklonale anti-COL7-IgG (Klon 1)) nach i.v. Injektion über die Schwanzvene in die lebende Maus (Enhanced-green-fluorescent-protein-(EGFP)-Lys-Maus mit markierten Granulozyten) im Multiphotonen-Mikroskop beobachtet. Abgebildet ist die Draufsicht (obere Reihe) sowie seitliche Ansicht (untere Reihe) dreidimensionaler Aufnahmen (Stacks) eines Mausohrs am Tag der i.v. Injektion (links) und zwei Tage nach der i.v. Injektion (rechts). Deutlich ist die Anlagerung der AK an die dermal-epidermale Junctionszone (DEJ) (rotes Signal) sowie die Migration von neutrophilen Granulozyten (grünes Signal) in die DEJ zu erkennen. Die Anlagerung war am Tag der Injektion vergleichbar mit der Anlagerung von murinem AK nach intrakutaner (i.c.) Injektion in Abbildung 14. Die bei der i.c. Injektion beobachteten AK-Depots in der Dermis waren bei der i.v. Applikation nicht zu beobachten. Zwei Tage nach der Injektion waren kaum noch AK in der DEJ nachweisbar.

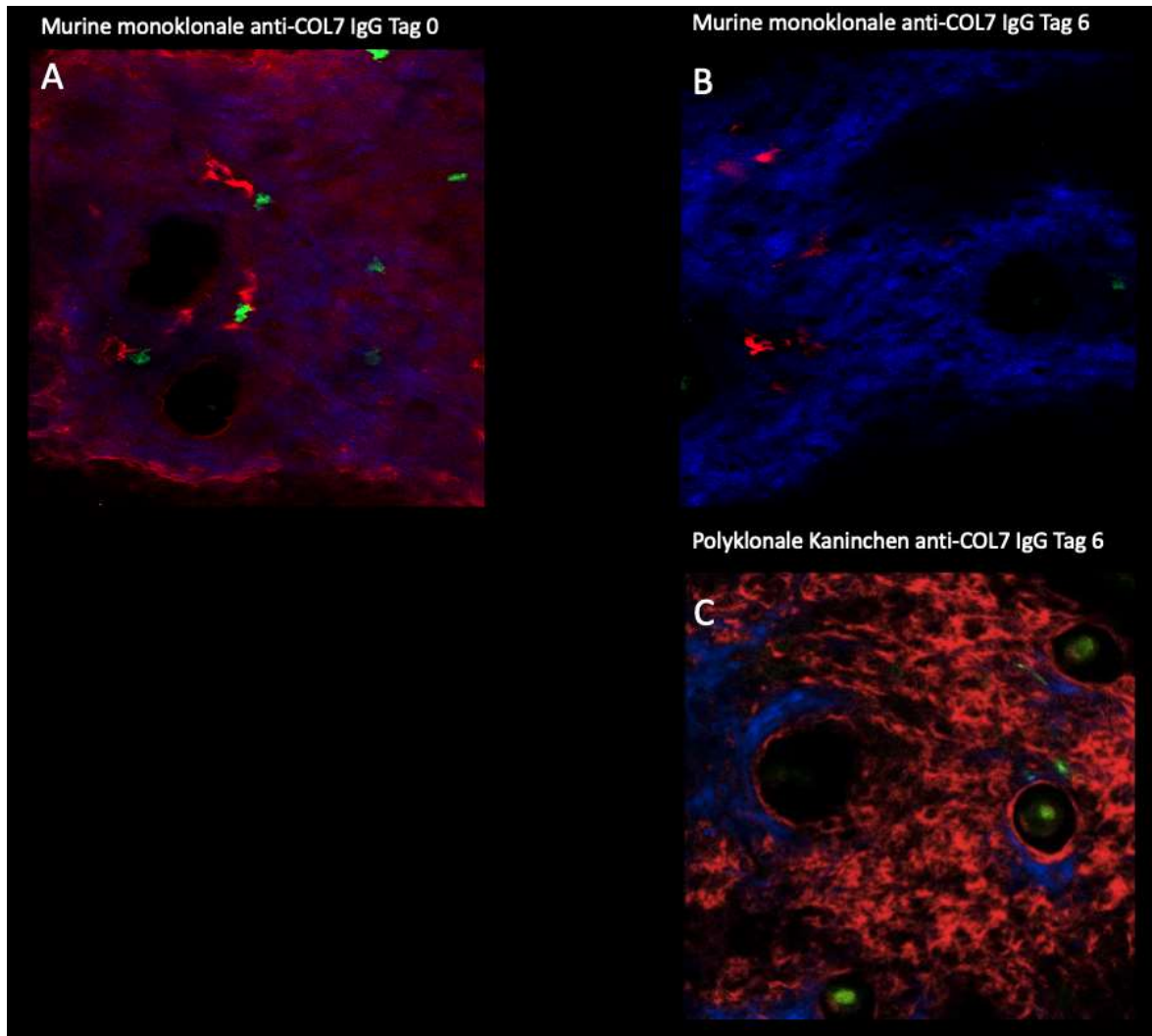


Abbildung 16: Vergleich der Ergebnisse der Multiphotonen-Mikroskop-Experimente nach intrakutaner (i.c.) Injektion des polyklonalen Kaninchen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG (Positivkontrolle) bzw. des murinen monoklonalen anti-Typ-VII-Kollagen-(COL7)-IgG des Hybridom-Zellklons 1 in eine EGFP-Lys-Maus: In dem Versuch wurde das Bindungsverhalten der Antikörper (AK, DyLight-594-N-Hydroxysuccinimid-(NHS) markierte murine monoklonale anti-COL7-IgG (Klon 1) bzw. Fluoreszenz-markiertes, polyklonales Kaninchen anti-COL7-IgG) nach i.c. in die Ohrbasis der lebenden Maus (Enhanced-green-fluorescent-protein-(EGFP)-Lys-Maus mit markierten Granulozyten) im Multiphotonen-Mikroskop beobachtet. Dargestellt ist der Querschnitt des Mausgewebes auf Höhe der dermal-epidermalen Junctionszone (DEJ) nach (A) i.c. Injektion des monoklonalen murinen anti-COL7-IgG (Klon 1) am Tag der Injektion (Tag 0) und (B) an Tag 6 nach der Injektion und (C) nach i.c. Injektion des Kaninchen-IgG an Tag 6 nach der Injektion. Deutlich ist die Anlagerung der Kaninchen anti-COL7-AK zu beobachten. Anders als beim murinen monoklonalen anti-COL7-IgG des Klons 1 zeigte sich auch an Tag 6 eine deutlich nachweisbare Anlagerung an der DEJ.

4 Diskussion

Die Hybridom-Zellkultur ist ein etabliertes Verfahren zur Produktion von monoklonalen AK (90). Gegenstand dieser Arbeit war die Aufreinigung von zehn murinen monoklonalen anti-COL7-IgG-AK nach Kultivierung der Hybridom-Zelllinien zur *in vitro* und *in vivo* Testung in murinen Modellen der EBA. Ziel war es, durch einen murinen monoklonalen anti-COL7-AK die EBA *in vivo* zu reproduzieren, damit das Kaninchen-IgG-basierte Antikörper-Transfer-induzierte Modell der EBA zu verbessern und neue Erkenntnisse bezüglich der IgG induzierten Inflammation in der EBA zu gewinnen. Die Verwendung eines monoklonalen AK zur Induktion einer EBA schien vielversprechend, da in Modellen anderer Autoimmundermatosen (z. B. Pemphigus vulgaris / foliaceus) monoklonale IgG eine Pathologie induzieren (94).

Die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG wurden zunächst *in vitro* evaluiert. Alle getesteten murinen AK-Klone banden an ihr Zielantigen (COL7) in der murinen Haut (EBA-typische lineare subepidermale Anlagerung an der DEJ) und induzierten in neutrophilen Granulozyten (Haupteffektorzellen der EBA) eine ROS-Freisetzung. Darüber hinaus banden alle neun *in vivo* getesteten Klone im AK-Transfer-induzierten Modell der EBA an die DEJ und aktivierten das Komplementsystem, jedoch induzierten nur vier der neun AK-Klone eine EBA typische Blasenbildung.

Diese Ergebnisse sind vielversprechend, in Zukunft für das lokale AK-Transfer-induzierte Modell der EBA einen murinen monoklonalen AK zu nutzen und somit die EBA ganzheitlich im murinen System zu replizieren. Zur Erklärung, dass nicht alle getesteten murinen monoklonalen anti-COL7-IgG *in vivo* eine EBA auslösten, ist ein Verständnis der Mechanismen der IgG-induzierten Inflammation nach Bindung am Zielantigen essenziell. Für die EBA-Induktion wurden in der Literatur zelluläre und molekulare Voraussetzungen identifiziert. Dazu zählen neutrophile Granulozyten, Fc-Rezeptoren, eine Komplement-Aktivierung und Zytokine. Während der Beitrag jeder dieser Faktoren gut dokumentiert ist, ist die genaue Abfolge der Ereignisse bei der EBA-Induktion nicht bekannt. Nach dem aktuellen Stand kann die EBA-Pathogenese jedoch grob in die folgenden Schritte unterteilt werden. 1) Bindung der Auto-AK an das Zielantigen, 2) Fab- und Fc-abhängige Funktionen, 3) Extravasation von neutrophilen Granulozyten in die Haut und 4) Aktivierung der neutrophilen

Granulozyten mit Freisetzung von ROS (95). Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet werden.

4.1 Epitop-spezifische Induktion der EBA nach Bindung monoklonaler muriner IgG

Die Bindung von anti-COL7-IgG an COL7 im Bereich der DEJ ist nach der Bildung der Auto-AK der erste Schritt zur Induktion einer Blasenbildung sowohl bei EBA-Patienten als auch in *in vivo* und *ex vivo* Modellen zur Abbildung der Effektorphase der EBA. Die Notwendigkeit dieser Bindung wurde zunächst *ex vivo* im Kryosection-Assay gezeigt, bei dem nach der Inkubation von Gefrierschnitten menschlicher Haut mit IgG aus EBA-Patientenseren und neutrophilen Granulozyten eine subepidermale Blasenbildung beobachtet wurde (79). Im Tiermodell wurde die Notwendigkeit der IgG-Bindung durch zwei Arbeitsgruppen simultan bestätigt, indem Mäuse mit anti-COL7-IgG aus dem Kaninchen injiziert wurden. Sitaru et al. erzeugten 2005 durch Immunisierung von Kaninchen mit rekombinanten Proteinen der NC-1-Domäne des COL7 Kaninchen anti-COL7-IgG, die nach der Injektion in Mäuse am COL7 an der DEJ banden und eine EBA induzierten (45). Woodley et al. stellten ebenfalls 2005 einen Kaninchen-anti-Mensch-COL7-IgG her, der nach Injektion in Mäuse die gleichen Effekte zeigte (82).

Auch die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG-AK der vorliegenden Arbeit banden in *ex vivo* Experimenten (IIF der murinen Haut) an der DEJ. *In vivo* konnte nach lokaler Injektion dieser anti-COL7-IgG-AK mittels DIF eine Bindung an COL7 an der DEJ für neun der zehn AK-Klone gezeigt werden. Diese Bindung ließ sich in Echtzeit im Multiphotonen-Mikroskop exemplarisch für den Klon 1 reproduzieren. Dennoch induzierten nur vier der neun *in vivo* getesteten murinen AK eine EBA.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, welche Proteinabschnitte nach Bindung des Auto-AK an COL7 für eine Inflammationsinduktion verantwortlich sind sowie ob ggf. mehrere Epitope gebunden werden müssen oder ob ein Epitop ausreicht, um eine EBA zu induzieren. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass pathogene Auto-AK vorwiegend an die NC-1-Domäne des COL7 binden. Dabei induzieren vor Allem AK gegen die Cartilage-matrix-protein-(CMP)-Subdomäne, die sixth-ninth-fibronectin-3 (FNIII)-like Subdomäne sowie die vWFA2-Subdomäne der NC-1-

Region eine EBA im Tiermodell (81,95). Die in dieser Arbeit hergestellten AK binden die vWFA2- Domäne des COL7. Allerdings zeigte eine Epitop-Kartierung, dass die AK aus EBA-Patientenseren nicht nur einzelne Epitope der NC-1-Region binden, sondern ein Bindungsmuster an verschiedenen Subdomänen zeigen (26). Die CMP-, FNIII- und vWFA2-Subdomänen weisen zudem Homologien in ihrer Struktur auf (96). Experimente belegen, dass Subdomänen-spezifische IgG auch andere Domänen binden (26). Es bleibt unklar, ob die bei EBA-Patienten beobachtete breite Epitop-Erkennung ein Epiphänomen ist, das aus der intramolekularen Epitop-Ausbreitung resultiert, oder ob dieses breite Erkennungsmuster für die Blaseninduktion erforderlich ist (26). Basierend auf diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, ob ein monoklonaler AK gegen ein Peptidabschnitt der NC1-Domäne ausreicht oder ob für die EBA-Induktion eine polyklonale IgG-Stimulation erfolgen muss. Vorobjev et al. (26) stellten monoklonale Kaninchen-IgG gegen einzelne Epitope der NC1-Domäne her (anti-FNIII4–FNIII5 und anti-FNIII7–FNIII8), die *in vivo* eine EBA in COL7-humanisierten Mäusen induzierten. Dieser Befund bekräftigt die These, dass ein monoklonaler AK eine EBA induzieren kann. Denkbar ist, dass die apathogenen monoklonalen murinen anti-COL7-IgG-Klone in der vorliegenden Arbeit Epitope in der NC-1-Domäne erkennen, die bei Bindung eines AK alleine keine EBA induzieren können. Für die EBA-Induktion ist vielmehr eine AK-Bindung an pathogenen Epitopen oder Epitop-Kombinationen notwendig. Daher sollte mittels Epitop-Kartierung (Epitop-Mapping) evaluiert werden, ob sich die pathogenen und apathogenen murinen monoklonalen anti-COL7-IgG der vorliegenden Studie in Bezug auf ihre Bindungsstellen bzw. Bindungsmuster unterscheiden.

In der Literatur wurden für andere Autoimmunerkrankungen bereits eine monoklonale Krankheitsinduktion und pathogene Epitope beschrieben. Beim Pemphigus foliaceus wurden durch Phage-Display monoklonale Auto-AK gegen das bei dieser Autoimmundermatose charakteristische Autoantigen Desmoglein-1 identifiziert, die in der Lage waren in der Maus eine Pathologie zu induzieren (94). Beim Pemphigus vulgaris wurden mit einer ähnlichen Technik zwei Pathologie-induzierende monoklonale anti-Desmoglein-3-IgG gefunden (97). Auch wenn sich die Pathogenese beim Pemphigus vulgaris / foliaceus und EBA unterscheiden, stellt die systemische Identifikation pathogener Epitope mittels Phage-display einen

vielversprechenden Ansatz zur Identifikation EBA-pathogener Epitope in den Subdomänen des COL7 dar.

4.2 Bindungsstärke und Bindungsdauer von anti-COL7-IgG

Weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Fähigkeit von AK zur EBA-Induktion ist die Bindungsstärke und Bindungsdauer. Die murinen monoklonalen anti-COL7 IgG der vorliegenden Studie sind durch Immunisierung mit der vWFA2-Domäne des COL7 entstanden, sodass jeder monoklonale AK-Klon gegen einen Peptidabschnitt der vWFA2-Subdomäne der NC-1-Region des COL7 gerichtet ist. Die Bindung der AK an die DEJ konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Jedoch war das Signal in den Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis der IgG-Bindung an die DEJ stets schwächer im Vergleich zum bisher verwendeten polyklonalen Kaninchen-anti-vWFA2-IgG.

4.2.1 Bindungsstärke muriner monoklonaler anti-COL7-IgG

Mögliche Ursachen sind entweder eine schwächere Affinität (Bindungsstärke zwischen Antigen und AK) der murinen monoklonalen AK gegenüber ihrem Epitop oder eine schwächere Avidität (Bindungsstärke des Antigen-AK-Komplexes basierend auf der Anzahl und Affinität der Bindungsstellen). Ein schwächeres Signal bei der Verwendung eines monoklonalen AK lässt sich dadurch erklären, dass weniger Bindungsstellen am COL7 zur Verfügung stehen als für polyklonale IgG, sodass die Avidität sinkt. Eine alternative Erklärung für das schwächere Signal an der DEJ ist eine zu geringe Konzentration der injizierten AK. Da die ersten fünf getesteten monoklonalen murinen AK-Klone *in vivo* keine EBA induzierten, lag die Vermutung nahe, dass die eingesetzte AK-Menge zu gering war. Zudem gab es keine Daten bezüglich der zu injizierenden AK-Menge eines monoklonalen murinen IgG, sodass die Dosis der anti-COL7-IgG-AK für das AK-Transfer-induzierte Modell errechnet wurde. Folgend wurde die Dosis in einem zweiten Ansatz (LM2) verdoppelt. Trotz der gesteigerten AK-Dosis wurde in diesem zweiten Versuch kein EBA-typischer Phänotyp beobachtet. Auch zeigte sich kein Unterschied in der Signalstärke bei der DIF, was gegen eine zu geringe Menge an AK spricht, sondern eher auf eine geringere Affinität, Avidität und Bindungsdauer sowie auf weniger verfügbare Bindungsstellen für die monoklonalen murinen AK als Erklärung für die fehlende EBA-Induktion hindeutet. Bei der Interpretation des schwächeren Signals

ist zu berücksichtigen, dass das Kaninchen-anti-Maus-IgG und die monoklonalen murinen anti-COL7-IgG mit unterschiedlichen fluoreszierenden Sekundär-AK in der DIF nachgewiesen wurden, sodass eine unterschiedliche Signalstärke auch auf einer unterschiedlich starken Fluorochrom-Markierung des AK basieren kann. Daher bleibt es fraglich, inwieweit die Fluoreszenz-Intensitäten der DIF von der Positivkontrolle und den zu testenden murinen AK-Klonen direkt verglichen werden können.

4.2.2 Bindungsdauer muriner monoklonaler anti-COL7-IgG des Klon 1

Die murinen monoklonalen AK aus dem vorliegenden Projekt waren *in vivo* nach sechs Tagen im AK-Transfer-induzierten Modell mittels DIF noch nachweisbar; jedoch scheint die Menge der gebundenen Antikörper im Vergleich zum Kaninchen anti-COL7-IgG deutlich geringer zu sein. Der murine monoklonale anti-COL7-IgG-Klon 1 konnte im AK-Transfer-induzierten Modell der EBA auch bei erhöhter Konzentration keine Blasenbildung induzieren. Daher wurde mithilfe des Multiphotonen-Mikroskops untersucht, wie der AK-Klon 1 (C1), über einen Zeitraum von sechs Tagen an der DEJ bindet. Die Bindung war am Tag der Injektion innerhalb von Stunden an der DEJ nachweisbar, jedoch war der größte Teil der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG im Gegensatz zu den Kaninchen anti-COL7-IgG nach 24 bis 48 h kaum noch an der DEJ nachweisbar. Bezüglich der Bindungsdauer konnten Kasperkiewicz et al. In den Nachkommen von trächtigen Mäusen mit einer immunisierungs-induzierten EBA noch bis zu 8 Wochen später murine anti-COL7-IgG an der DEJ nachweisen (88). Somit stellt sich die Frage, warum der AK-Klon 1 nur kurz an die DEJ bindet und ob diese Eigenschaft für die fehlende Pathogenität verantwortlich ist.

Die beobachtete kurze Bindungsdauer des Klons 1 weist darauf hin, dass die Avidität des AK zu seinem Epitop für eine längere Bindung zu schwach ist bzw. dass das gebundene IgG schnell wieder umgesetzt wird. Es ist denkbar, dass diese kurze Bindung nicht ausreicht, um die elementaren Mechanismen der Gewebsdestruktion wie z.B. die Extravasation und Aktivierung von Granulozyten ausreichend zu induzieren und damit eine EBA auszulösen. Möglicherweise kommt es bei der Bindung der polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG an verschiedene Epitope zu einer gegenseitigen Stabilisierung der Bindung der IgG und somit zu einer verlängerten Bindungsdauer an der DEJ durch die Polyklonalität. Da nur Klon 1 mit

dem Multiphotonen-Mikroskop untersucht wurde, ist über die Bindungsdauer der übrigen neun Klonen keine Aussage möglich. Die Klone, die im Tiermodell eine Blasenbildung induzierten, waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung am Multiphotonen-Mikroskop noch nicht verfügbar, sodass deren Bindungsdauer nicht untersucht werden konnte. Ein möglicher Unterschied zwischen der Bindungsdauer der *in vivo* pathogenen monoklonalen murinen anti-COL7-IgG (Klon 7-10) und des *in vivo* apathogenen Klon 1 kann gute Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Bindungsdauer, Avidität und Inflammationsinduktion geben und sollte weiter untersucht werden.

4.3 Fab-vermittelte Effekte der EBA

Bei der EBA bindet eine Vielzahl von Auto-AK an Epitope meist im Bereich der NC1-Domäne von COL7. Eine Fab-vermittelte und Komplement unabhängige Blasenbildung wurde beim bullösen Pemphigoid, einer Autoimmundermatose mit Auto-AK gegen Typ-XVII-Kollagen, nachgewiesen (98). Bei der EBA konnten im lokalen Modell getestete Fab-Fragmente keine Blasenbildung induzieren (45). Da die NC1-Domäne mehrere Bindungsstellen zu anderen Proteinen der DEJ besitzt, erscheint es plausibel, dass eine Bindung von Autoantikörpern hier eine Inhibition der Bindungsstellen bewirkt und es so zu einer Fragilität der Haut kommt. Möglicherweise weist ein monoklonaler AK nicht genug Bindungsstellen an der DEJ auf, um die stabilisierenden Eigenschaften des COL7 zu schwächen und die subepidermale Stabilität zu stören. Es wird vermutet, dass diese Fab-vermittelte Störung der Bindungsstellen des COL7 für die mechanobullöse Form der EBA verantwortlich ist, für die es bis jetzt kein funktionierendes Tiermodell gibt. Da in dem vorliegenden Projekt ganze IgG mit jeweils zwei Fab- und einem Fc-Fragment untersucht wurden, ist eine Aussage zu den isolierten Effekten der Fab-Fragmente nicht möglich. Bezüglich der Tiermodelle der inflammatorischen EBA lässt sich jedoch postulieren, dass einzelne Fab Fragmente der IgG nicht ausreichen, um eine inflammatorische EBA zu induzieren und somit die Fc-Teil vermittelten Effekte der Autoantikörper essenziell zu sein scheinen, um eine inflammatorische EBA zu induzieren.

4.4 Fc-vermittelte Effekte der EBA

Das Fc-Fragment des IgG vermittelt seine Effekte über die Bindung an Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Immunzellen (z. B. Monozyten Makrophagen, Granulozyten, B-Lymphozyten, Mastzellen, natürliche Killer-Zellen). Bei der Induktion einer inflammatorischen EBA scheint der durch den Fc-Teil des Auto-AK vermittelte Effekt auf die Inflammationskaskade ein wichtiger Bestandteil zur Induktion einer subepidermalen Blasenbildung zu sein. Das Fehlen von Hautläsionen bei Mäusen, denen Hühner-Anti-Maus-COL7-IgY injiziert wurden, die nicht in der Lage waren murine Komplement- und Fc-Rezeptoren zu binden, bestätigt die Bedeutung der Fc/Fc-Rezeptor-Wechselwirkung für die Induktion einer EBA (99). Der Effekt-vermittelnde Fc-Teil von IgG hängt von der Subklasse (IgG1–4) und der Glykosylierung ab.

4.4.1 Glykosylierung des Fc-Fragments

Verschiedene Studien belegen, dass die Glykosylierung des Fc-Fragments des IgG bei der Inflammationsinduktion durch Fc/Fc-Rezeptor vermittelte Effekte eine wesentliche Rolle spielt. Eine Veränderung der Fc-Glykosylierung wurde bei mehreren chronischen Autoimmunerkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis) nachgewiesen (100). IgG-AK verfügen über eine konservierte N-Glykosylierungsstelle (Asparagin 297) in der konstanten Region der schweren Kette des Fc-Fragments. Die hier angehefteten Zuckermoleküle beeinflussen die Gesamtstruktur und die pro- oder antiinflammatorischen Effektorfunktionen von IgG-AK. An die Kernglykan-Struktur kann Fructose, Galaktose oder Sialinsäure angeheftet sein. Nicht-galaktosylierte (sogenannte G0) IgG sind entzündungsfördernd und sialysierte IgG entzündungshemmend (101). Die erhöhte Konzentration der G0-Form der IgG korrelierte bei Autoimmunerkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes) mit der Schwere der Erkrankung (102–108). Auch wurde in Studien gezeigt, dass der entzündungshemmende Effekt einer Therapie mit i.v. Immunglobulin (IVIg) hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass diese IgG am Fc-Fragment sialysiert sind und somit eine antiinflammatorische Wirkung vermitteln (109–111). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Modifikation der IgG-Glykosylierung präventive und/oder therapeutische Wirkungen hat (51,112–116). Das Enzym Endoglykosidase S spaltet das Fc-Glykan am Asparagin 297 ab, wobei ein sialysiertes apathogenes

IgG entsteht (112,117). Diese Hydrolyse führt zu einer drastisch reduzierten Bindung fast aller IgG-Subklassen an aktivierende Fc-Rezeptoren. Hirose et al. behandelten mit murinem COL7 immunisierte Mäuse, die eine EBA ausgebildet hatten, mit diesem Enzym, woraufhin sich eine schwächere EBA-Symptomatik zeigte (118).

In der vorliegenden Studie war die Fc-Glykosylierung möglicherweise dafür verantwortlich, dass einige AK zwar an die DEJ banden und in geringem Maße auch den Komplementfaktor C3 aktivierten, jedoch keine morphologische Blasenbildung induzierten. Potenziell unterscheiden sich von verschiedenen Hybridom-Zellklonen produzierte murine monoklonale anti-COL7-IgG-Klone in ihrer Glykosylierung am Fc-Fragment. Ein galaktosylierter G0-IgG-Klon könnte über eine stärkere proinflammatorische Wirkung (Aktivierung von Granulozyten, erhöhte ROS-Ausschüttung) eine EBA induzieren, wohingegen ein sialysierter muriner IgG keine solche Wirkung zeigt. Somit wäre eine Analyse der Glykosylierung der zehn monoklonalen murinen anti-COL7-IgG sinnvoll. Weiter ließen sich möglicherweise apathogene AK- Varianten über eine Veränderung der Glykosylierung in pathogene Varianten umwandeln.

4.4.2 IgG-Subklassen

Auch die IgG-Subklasse spielt bei der AK-induzierten Inflammation in der Pathogenese der EBA eine Rolle. Im Menschen existieren vier IgG-Subklassen (IgG1–IgG4) (119). Obwohl die IgG-Subklassen auf Aminosäureebene zu mehr als 90 % identisch sind, hat jede Unterklasse ein einzigartiges Profil in Bezug auf Antigenbindung, Immunkomplexbildung, Komplementaktivierung, Aktivierung von Effektorzellen sowie Halbwertszeit (120–122). Bei humanen Autoimmunerkrankungen lösen Antigene charakteristischerweise IgG1- und IgG3-Antworten aus. Diese Isotypen sind in der Lage, alle Arten von Fc-Rezeptoren sowie das Komplementsystem zu aktivieren (123). Im Gegensatz dazu zeigen IgG4 und IgG2 keine oder eine reduzierte Fähigkeit zur Aktivierung des Komplementsystems und reduzierte Fc-Rezeptor-vermittelte Effekte (120,124–126). Hieraus lässt sich ableiten, dass das von Autoantikörpern entfaltete pathogene Potential nicht nur durch ihre Spezifität und Vielfalt sowie ihrem Glykosylierungsstatus, sondern auch durch ihren Isotyp bestimmt wird. Recke et al. isolierten humane monoklonale rekombinante chimäre Anti-COL7-Auto-AK aller vier humaner IgG-Subklassen. Im

Kryo-Section-Assay induzierten jedoch nur die Subtypen IgG1 und IgG3 eine EBA, obwohl alle Subklassen an die DEJ banden (38). Diese subklassenspezifische Pathogenität ist eine mögliche Erklärung dafür, dass auch in der vorliegenden Arbeit nicht alle anti-COL7-IgG, die an die DEJ banden, eine EBA induzierten. Jedoch ist der Transfer der Befunde aus dem humanen System in das murine System nicht ohne Weiteres möglich.

Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus nur drei IgG-Subklassen (IgG1, IgG2 (a, b und c), IgG3) (119,127). Weiter scheinen sich die für die EBA pathogenen IgG-Subklassen in Mäusen und Menschen zu unterscheiden. Im Immunisierungs-induzierten Modell der EBA zeigten erkrankte und damit suszeptible Mausstämme höhere Titer an Komplement-aktivierendem IgG2a und IgG2b als resistente Mäuse (87). Interessanterweise lösen murine IgG1- und IgG3-Isotypen (Subklassen, die im humanen System essentiell für die Induktion einer EBA sind) im murinen System eine schwächere Inflammation über Fc γ -Rezeptoren aus (128). Im Kaninchen hingegen konnte nur eine IgG-Subklasse nachgewiesen werden(129,130).

Vor dem Hintergrund der Unterschiede zwischen den Immunsystemen des Menschen, der Maus und des Kaninchens bezüglich der Anzahl und Funktionen der IgG-Subklassen wird die Bedeutung der Entwicklung eines murinen AK für das murine AK-Transfer-induzierte Modell deutlich. Jedoch scheinen die Immunsysteme zumindest teilweise auch kompatibel. Humanes IgG1 und IgG3 aus EBA-Patientenseren lösen in der Maus eine EBA aus. Im aktuell existierenden AK-Transfer-induzierte Modell führen Kaninchen anti-COL7-IgG zu einer EBA im murinen System. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass humane oder Kaninchen IgG ähnliche Bindungsstellen zur Aktivierung von Komplementfaktoren und Granulozyten besitzen, wie die IgG der Subklasse 2 a/b im murinen System.

Die Subklasse der verwendeten monoklonalen murinen anti-COL7-IgG wurde im vorliegenden Projekt nicht bestimmt, jedoch gab die Firma Eurogentec die Subklasse IgG2c für die IgG aller Hybridom-Zellklone an. Da die Differenzierung zwischen IgG2a und IgG2c aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten schwierig ist (127,131), ist es denkbar, dass die Hybridomzellkulturen 6–9 (C7, C8, H4, H11) IgG der im murinen System pathogenen Subklasse 2a produzieren, die fälschlicherweise als IgG2c klassifiziert wurden. Daher sollte die Subklassen erneut

validiert werden. Eine weitere interessante Frage wäre, ob der Austausch des Fc-Fragments der apathogenen murinen monoklonalen anti-COL7-IgG durch das Fc-Fragment eines pathogenen Kaninchen anti-COL7-IgG dazu führt, dass der hybride AK eine EBA induziert. Hypothetisch lassen sich monoklonale apathogene anti-COL7-IgG, die zwar die Bindungsstellen am COL7 besetzen, aber aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu einer apathogenen IgG-Subklasse über ihre Fc-Fragmente keine EBA-typischen Signale weiterleiten auch therapeutisch einsetzen.

4.4.3 ROS-Ausschüttung durch murine monoklonale anti-COL7-IgG

Ein wichtiger Schritt der EBA-Pathogenese ist die Aktivierung von Effektorzellen nach Bindung der anti-COL7-IgG an COL7 in der DEJ. Neutrophile Granulozyten gelten als Haupteffektorzellen. Laut Chirac et al. schützt eine Granulozyten-Depletion vor Injektion der anti-COL7-IgG vor der Krankheitsinduktion (53). Auch die Inhibition der NADPH-Oxidase, die in Granulozyten an der ROS-Produktion beteiligt ist, bewirkt ein Ausbleiben einer Blasenbildung. Die Extravasation von neutrophilen Granulozyten hängt von CD11 und CD18 ab; CD18-defiziente Granulozyten wandern nicht in die Dermis aus (132). Die im vorliegenden Projekt getesteten monoklonalen murinen anti-COL7-IgG lösten im Komplex mit ihrem Antigen in murinen Granulozyten *in vitro* eine ROS-Ausschüttung aus, die vergleichbar war mit der Sekretion nach einer Stimulation mit polyklonalen Kaninchen anti-COL7-IgG. Damit waren diese monoklonalen murinen anti-COL7-IgG in der Lage neutrophile Granulozyten zu aktivieren. Granulozyten müssen *in vivo* aus dem Blutstrom ins Gewebe migrieren, um dort nach Kontakt mit dem Auto-AK-Antigen-Komplex ROS auszuschütten und damit ihren Teil an der Inflammationskaskade beizutragen. Die Extravasation der neutrophilen Granulozyten ins Gewebe wurde im vorliegenden Projekt nicht für alle Klone untersucht. Jedoch konnte exemplarisch mit dem Multiphotonen-Mikroskop nach Injektion von anti-COL7-IgG (Klon 1) in EGFP-Lys-Mäuse die Anlagerung von Granulozyten an der DEJ nachgewiesen werden. Bezüglich der fehlenden Pathogenität einiger monoklonaler AK (Klon1-5) ist denkbar, dass die nachgewiesenen Fc-Fragment-vermittelten Mechanismen zur Granulozyten-Extravasation und ROS-Ausschüttung zu schwach sind, um eine Inflammation mit Blasenbildung zu induzieren.

4.4.4 Aktivierung des Komplementsystems

Das Komplementsystem besteht als Teil des unspezifischen humoralen Immunsystems aus zirkulierenden Proteinen. Viele Komplementfaktoren sind Proteasen, die durch Proteolyse weitere Komplementfaktoren aktivieren. Ziel dieser Kaskade ist die Elimination des Pathogens. Die Aktivierung des Komplementsystems ist Bestandteil der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (133) oder dem bullösen Pemphigoid (134). Bei der EBA aktivieren die gebundenen Auto-AK über ihr Fc-Fragment das Komplementsystem. Die Anaphylatoxine C3a und C5a als Schlüsselfaktoren rekrutieren Leukozyten und Mastzellen, welche durch Ausschüttung von Proteasen und ROS zu einer Gewebsdestruktion führen. Ebenfalls vermitteln C3a und C5a in der Endstrecke eine direkte Zerstörung mittels eines Membran-Angriffkomplexes (87,135). Passend zu diesen Ergebnissen sind Komplement-C5-defiziente Mäuse resistent gegenüber der Induktion einer EBA im AK-Transfer-induzierten Modell (45). In der vorliegenden Studie kam es bei Bindung der murinen monoklonalen anti-COL7-IgG (Klone 1-9) *in vivo* an der DEJ zu einer deutlichen Ablagerung von Komplement C3 an dieser Stelle, was für die Aktivierung des Komplementsystems spricht. Auffällig war jedoch die geringere Komplementablagerung in Reaktion auf die murinen monoklonalen anti-COL7-IgG im Vergleich zur Reaktion auf das polyklonale Kaninchen anti-COL7-IgG. Somit ist für die apathogenen Klone dieser Arbeit denkbar, dass die Komplementaktivierung nach Anlagerung der IgG wie auch die ROS-Induktion zu schwach ist, um *in vivo* eine EBA zu induzieren.

4.5 Fc γ -Rezeptoren als essenzielle Mediatoren der EBA

Induktion

Fc γ -Rezeptoren wird eine essenzielle Rolle in der EBA-Pathogenese zugeschrieben. Nach Bindung der Auto-AK an das COL7 binden die Immunkomplexe über das Fc-Fragment des IgG an aktivierende und inhibierende Fc-Rezeptoren, die von Effektorzellen (z. B. basophile/neutrophile Granulozyten, Mast-Zellen, Monozyten/Makrophagen) exprimiert werden. Die Bindung von Immunkomplexen an Fc γ -Rezeptoren auf dendritischen Zellen führt zur Phagozytose und Präsentation von Antigenen an MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen. Antigen-spezifische zytotoxische CD8⁺-T-Zellen, CD4⁺-Helfer-T-Zellen

oder regulatorische T-Zellen (Treg), die diese Peptid-MHC-Komplexe erkennen, werden aktiviert und modulieren die Immunantwort (128). Neutrophile Granulozyten produzieren nach Bindung an den Fc-Teil des Auto-AK über an der Zelloberfläche exprimierte Fc γ -Rezeptoren (79) Elastase und Gelatinase (52). Die folgende Aktivierung von Metalloproteasen führt zur Destruktion der extrazellulären Matrix im Bereich der DEJ und fördert die subepidermale Blasenbildung (81). Daneben bewirkt diese Fc γ -Rezeptor-abhängige Aktivierung der neutrophilen Granulozyten eine ROS-Ausschüttung, die maßgeblich zur Zeldestruktion und zur Blasenbildung beiträgt. In der Effektorphase der EBA gelten neutrophile Granulozyten als Haupteffektorzellen. Eine Depletion dieser Zellen schützt vollständig vor der Induktion einer Blasenbildung (53). Die in dem vorliegenden Versuch getesteten murinen monoklonalen anti-COL7-AK induzierten in murinen Granulozyten eine ROS-Ausschüttung. Trotz des nachgewiesenen Potenzials zur Rezeptor-abhängigen Auslösung von Entzündungsreaktionen induzierten *in vivo* nur vier von neun Klonen eine EBA mit subepidermaler Blasenbildung. Die Fc-Rezeptor vermittelten Mechanismen der Inflammationsinduktion sind komplex. Daher ist es denkbar, dass einige murine IgG-Klone aufgrund ihrer Fc γ -Rezeptorbindungsfähigkeit bzw. ihrer Konfiguration nach Bindung am COL7 nicht in der Lage sind, Effektorzellen und somit die Inflammationskaskade ausreichend zu aktivieren, um eine Blasenbildung zu induzieren. Im murinen System gibt es vier Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI–Fc γ RIV) (128,136,137). Die Bindung von IgG bewirkt eine Quervernetzung von Fc γ -Rezeptor-Ketten auf Effektorzellen. Dadurch werden Phosphorylierungskaskaden aktiviert, die zu verschiedenen Immunantworten (z. B. Antigen-Präsentation, Sekretion von Entzündungsmediatoren) führen. Proinflammatorische Zytokine erhöhen die Expression aktivierender Fc γ -Rezeptoren und verringern die Expression des inhibitorischen Fc γ RIIB (128). Denkbar ist, dass ein muriner monoklonaler IgG-AK, der immer dieselbe Fc γ -Rezeptor-Bindungsstelle besitzt, alleine nicht in der Lage ist, eine Quervernetzung zu induzieren bzw. alle für eine Inflammationsinduktion notwendigen Effektorzellen aktiviert, um eine Blasenbildung zu induzieren. Die Quervernetzung beeinflusst möglicherweise auch die Stabilität und damit Bindungsdauer der Auto-AK an der DEJ. Zudem unterscheidet sich die Expression verschiedener Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Zellen des Immunsystems in verschiedenen Spezies (138). Auch in Bezug auf die Ausprägung der EBA-Klinik zeigen Mausstämme Unterschiede.

C57Bl/6J- und SJL/J-Mäuse weisen eine deutlich stärkere Blasenbildung und einen umfangreicheren Befall der Haut auf als Balb/c-Mäuse. MRL/MpJ- und SKH1-Mäuse sind sogar komplett gegenüber einer EBA-Induktion resistent (95) Die in dem vorliegenden Projekt getesteten monoklonalen murinen anti-COL7-IgG wurden in Zellen einer SJL-Maus erstellt, die in eine C57BL/6J Maus injiziert wurden. Denkbar ist, dass die Fc-Rezeptor abhängige Aktivierung des Immunsystems sich zwischen den Mausstämmen unterscheidet bzw. nur teilweise kompatibel ist. Stammspezifische Unterschiede könnten möglicherweise auch erklären, warum nicht alle murinen Klone im AK-Transfer-induzierten Modell der EBA eine Blasenbildung induzierten.

4.6 Systemische Fehler bei der Kultivierung, Isolation und Applikation muriner monoklonaler anti-COL7-IgG-Klone

Abschließend sollen systemische Fehler bei dem vorliegenden Versuch der Nutzung muriner monoklonaler anti-COL7-IgG zur Induktion einer EBA im AK-Transfer-induzierten Tiermodell diskutiert werden. Grundsätzlich zeigen die vorliegenden Befunde, dass murine monoklonale anti-COL7-IgG eine EBA im lokalen AK-Transfer-induzierten Tiermodell in der Maus mit Blasenbildung induzieren können. Alle getesteten AK-Klone banden an die DEJ und stimulierten in *in vitro* Experimenten murine Granulozyten zur ROS-Ausschüttung. Auch *in vivo* banden die injizierten AK-Klone an die DEJ und aktivierten den Komplementfaktor C3. Nur vier der neun *in vivo* getesteten Klone waren aber in der Lage eine subepidermale Blasen- und Krustenformation zu induzieren. Auffällig ist, dass auch bei diesen vier Klonen nicht alle Tiere eine deutliche Blasenbildung mit subepidermaler Separation und verdickter Epidermis sowie eine Einwanderung von Entzündungszellen aufwiesen. Neben den bereits diskutierten Gründen, die für diese Beobachtung verantwortlich sein können, sind auch systematische Fehler bei den Experimenten (Kultivierung, Aufreinigung, Applikation) als Ursachen möglich. Probleme gab es bei der Aufkonzentrierung der AK-Klone mittels Filtertubes. Aufgrund von auftretenden IgG-Verlusten im letzten Zentrifugationsschritt wurde als alternative Methode die mehrfache Konzentrierung mittels PEG favorisiert. Nach Sterilfiltration und Konzentrationsbestimmung konnten die Klone 6–9 im AK-Transfer-induzierten Modell *in vivo* verwendet werden. Für Klon 10 (F3) lag durch den Verlust in den Filtertubes nicht genug IgG vor, um eine *in vivo* Testung zu

realisieren. Alle vier Klone dieser Versuchsreihe induzierten in mindestens einem Tier eine EBA. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung auch durch eine unsaubere Arbeitsweise bei der Sterilfiltration oder Applikation erklären. Durch die multiplen Dialysevorgänge bei der Aufkonzentrierung mittels PEG könnten Verunreinigungen, die eine Inflammation provozieren, in die Proben (murine monoklonale IgG in PBS) gelangt sein. Dagegen spricht, dass murine IgG sowie der Komplementfaktor C3 an der DEJ nachgewiesen wurden und die makroskopischen / histologischen Befunde denen einer EBA glichen. Die IgG-Menge der Klone 6–9 reichte nicht aus, um den Versuch zu wiederholen bzw. weitere Testungen (IgG-Subklasse, Glykosylierung, Multiphotonen-Mikroskop etc.) durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Die Autoimmundermatose Epidermolysis bullosa acquisita (EBA) wird durch subepidermale Blasenbildung sowie durch zirkulierende Auto-Antikörper (Auto-AK) gegen Typ-VII-Kollagen (COL7) charakterisiert. Zur Evaluierung neuer Therapieansätze der EBA werden Tiermodelle benötigt, die die humane Erkrankung bestmöglich abbilden. Das derzeit für die *in vivo* Analyse der EBA genutzte AK-Transfer-induzierte Modell verwendet polyklonale Kaninchen anti-COL7-IgG, welche eine unspezifische Immunreaktion im murinen System auslösen.

Fragestellung: Ziel der Arbeit war es, die Pathogenität von zehn in Hybridom-Zelllinien gebildeten murinen monoklonalen anti-COL7-IgG zu evaluieren und damit das AK-Transfer-induzierte Modell zu verbessern. Weiterhin wird analysiert, ob monoklonale murine AK, die an einzelne Epitope der Willebrand-factor-type-A-like (vWFA2) Domäne des COL7 binden, eine inflammatorische EBA mit Blasenbildung induzieren. **Methoden:** *In vitro* wurde die Fähigkeit, der monoklonalen AK an COL7 zu binden (Indirekte Immunfluoreszenz) und in Granulozyten eine Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu induzieren (ROS-release-Assay), getestet. Nach subkutaner Applikation der AK in die Ohrbasis von Mäusen (lokales AK-Transfer-induziertes EBA-Modell) wurde die Bildung EBA-typischer Blasen *in vivo* beurteilt. In der Haut der Tiere wurde die Bindung von IgG und Komplementfaktor C3 (direkte Immunfluoreszenz) an die dermal-epidermalen Junktionszone (DEJ) und die subepidermale Blasenbildung (Hämatoxylin/Eosin-Färbung) untersucht.

Ergebnisse: In allen Experimenten banden COL7-AK subepidermal an COL7 und induzierten EBA-typische Inflammationsreaktionen (Aktivierung des Komplementsystems, ROS-Ausschüttung in Granulozyten). Dagegen lösten nur einige der getesteten Klone im lokalen AK-Transfer-induzierten Modell *in vivo* eine EBA-typische Symptomatik aus. **Diskussion:** Murine monoklonale anti-COL7-IgG können eine EBA im lokalen AK-Transfer-induzierten Modell prinzipiell auslösen. Warum nicht alle anti-COL7-IgG dazu in der Lage sind, sollte weiter exploriert werden. Potenzielle Faktoren sind die AK-Bindung an verschiedene Epitope des COL7, Unterschiede in den Affinitäten der AK, den IgG-Subklassen, der Glykosylierung des Fc-Fragments sowie bei der Interaktion des Fc-Fragments mit Effektorzellen des Immunsystems. Möglicherweise können anti-COL7-IgG, die für die EBA verantwortliche Epitope auf dem COL7 besetzen, aber keine Pathologie auslösen, im Sinne einer kompetitiven Blockierung therapeutisch genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Weaver C: Janeway Immunologie. 9. Aufl., Springer Spektrum, Heidelberg (2018)
2. Plewig G: Dermatologie, Venerologie und Allergologie. 7. Aufl., Springer, Heidelberg (2018)
3. Kridin K: Subepidermal autoimmune bullous diseases: overview, epidemiology, and associations. *Immunol Res* 66, 6–17 (2018)
4. Schmidt E, Zillikens D: Pemphigoid diseases. *Lancet* 381, 320–332 (2013)
5. Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 6. Aufl., Thieme, Stuttgart (2019)
6. Bieber K, Sun S, Ishii N, Kasperkiewicz M, Schmidt E, Hirose M, Westermann J, Yu X, Zillikens D, Ludwig RJ: Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp Dermatol* 19, 2–11 (2010)
7. Mehren CR, Gniadecki R: Epidermolysis bullosa acquisita: current diagnosis and therapy. *Dermatol Rep* 3, e38 (2011)
8. Koga H, Prost-Squarcioni C, Iwata H, Jonkman MF, Ludwig RJ, Bieber K: Epidermolysis bullosa acquisita: the 2019 update. *Front Med* 5, 362 (2019)
9. Kridin K, Ludwig RJ: The growing incidence of bullous pemphigoid: overview and potential explanations. *Front Med* 5, 220 (2018)
10. Hübner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E: Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases in Germany. *J Invest Dermatol* 136, 2495–2498 (2016)
11. Lee CW: Prevalences of subacute cutaneous lupus erythematosus and Epidermolysis bullosa acquisita among Korean/Oriental populations. *Dermatology* 197, 187 (1998)
12. Gammon WR, Heise ER, Burke WA, Fine JD, Woodley DT, Briggaman RA: Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated. *J Invest Dermatol* 91, 228–232 (1988)
13. Lee CW, Kim SC, Han H: Distribution of HLA class II alleles in Korean patients

with epidermolysis bullosa acquisita. *Dermatology* 193, 328–329 (1996)

14. Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, Uitto J: Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* 92, 1831–1839 (1993)

15. Burgeson RE, Lunstrum GP, Rokosova B, Rimberg CS, Rosenbaum LM, Keene DR: The structure and function of type VII collagen. *Ann N Y Acad Sci* 580, 32–43 (1990)

16. Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE: Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 104, 611–621 (1987)

17. Morris NP, Keene DR, Glanville RW, Bentz H, Burgeson RE: The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. *J Biol Chem* 261, 5638–5644 (1986)

18. Ghadially FN: *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*. 3. Aufl., Butterworth, London, (1988)

19. Villone D, Fritsch A, Koch M, Bruckner-Tuderman L, Hansen U, Bruckner P: Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J Biol Chem* 283, 24506–24513 (2008)

20. Chen M, Marinkovich MP, Jones JC, O'Toole EA, Li YY, Woodley DT: NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol* 112, 177–183 (1999)

21. Chen M, Marinkovich MP, Veis A, Cai X, Rao CN, O'Toole EA, Woodley DT: Interactions of the amino-terminal noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components. A potential role in epidermal-dermal adherence in human skin. *J Biol Chem* 272, 14516–14522 (1997)

22. Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, Champlaud MF, Rest M, Burgeson RE: Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol* 138, 719–728 (1997)

23. Brittingham R, Uitto J, Fertala A: High-affinity binding of the NC1 domain of collagen VII to laminin 5 and collagen IV. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 692–699 (2006)

24. Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE: Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 103, 1577–1586. (1986)

25. Wetzels RH, Robben HC, Leigh IM, Schaafsma HE, Vooijs GP, Ramaekers FC:

Distribution patterns of type VII collagen in normal and malignant human tissues. *Am J Pathol* 139, 451–459 (1991)

26. Vorobyev A, Ujiie H, Recke A, Buijsrogge JJA, Jonkman MF, Pas HH, Iwata HH, Iwata H, Hashimoto T, Kim SC, Kim JH, Groves R, Samavedam U, Gupta Y, Schmidt E, Zillikens D, Shimizu H, Ludwig RJ: Autoantibodies to Multiple Epitopes on the Non-Collagenous-1 Domain of Type VII Collagen Induce Blisters. *J Invest Dermatol* 135, 1565–1573 (2015)
27. Bruckner-Tuderman L: Can Type VII Collagen Injections Cure Dystrophic Epidermolysis Bullosa? *Mol Ther* 17, 6–7 (2009)
28. Ludwig RJ: Model systems duplicating epidermolysis bullosa acquisita: a methodological review. *Autoimmunity* 45, 102–110 (2012)
29. Zumelzu C, Le Roux-Villet C, Loiseau P, Busson M, Heller M, Aucouturier F, Pendaries V, Lièvre N, Pascal F, Brette MD, Doan S, Charron D, Caux F, Laroche L, Petit A, Prost-Squarcioni C: Black patients of African descent and HLA-DRB1*15:03 frequency overrepresented in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 131, 2386–2393 (2011)
30. Sitaru AG, Sesarman A, Mihai S, Chiriac MT, Zillikens D, Hultman P, Solbach W, Sitaru C: T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* 184, 1596–1603 (2010)
31. Müller R, Dahler C, Möbs C, Wenzel E, Eming R, Messer G, Niedermeier A, Hertl M: T and B cells target identical regions of the non-collagenous domain 1 of type VII collagen in epidermolysis bullosa acquisita. *Clin Immunol* 135, 99–107 (2010)
32. Kasperkiewicz M, Müller R, Manz R, Magens M, Hammers CM, Somlai C, Westermann J, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig RJ, Orosz A: Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets. *Blood* 117, 6135–6142 (2011)
33. Woodley DT, Ram R, Doostan A, Bandyopadhyay P, Huang Y, Remington J, Hou Y, Keene DR, Liz Z, Chen M: Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients. *J Invest Dermatol* 126, 1323–1330 (2006)
34. Gammon WR, Murrell DF, Jenison MW, Padilla KM, Prisayanh PS, Jones DA, Briggaman RA, Hunt SW 3rd: Autoantibodies to type VII collagen recognize epitopes in a fibronectin-like region of the noncollagenous (NC1) domain. *J Invest Dermatol* 100, 618–

622 (1993)

35. Hashimoto T, Ishii N, Ohata C, Furumura M: Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita, an autoimmune subepidermal bullous disease. *J Pathol* 228, 1–7 (2012)
36. Iwata H, Vorobyev A, Koga H, Recke A, Zillikens D, Prost-Squarcioni C, Ishii N, Hashimoto T, Ludwig RJ: Meta-analysis of the clinical and immunopathological characteristics and treatment outcomes in epidermolysis bullosa acquisita patients. *Orphanet J Rare Dis* 13, 153 (20138)
37. Gandhi K, Chen M, Aasi S, Lapiere JC, Woodley DT, Chan LS: Autoantibodies to type VII collagen have heterogeneous subclass and light chain compositions and their complement-activating capacities do not correlate with the inflammatory clinical phenotype. *J Clin Immunol* 20, 416–423 (2020)
38. Recke A, Sitaru C, Vidarsson G, Evensen M, Chiriac MT, Ludwig RJ, Zillikens D: Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: induction of dermal-epidermal separation. *J Autoimmun* 34, 435–444 (2010)
39. Cho HJ, Lee IJ, Kim SC: Complement-fixing abilities and IgG subclasses of autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *Yonsei Med J* 39, 339–344 (1998)
40. Bernard P, Prost C, Aucouturier P, Durepaire N, Denis F, Bonnetblanc JM: The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 97, 259–263 (1991)
41. Kim JH, Kim SC: Epidermolysis bullosa acquisita. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27, 1204–1213 (2013)
42. Mihai S, Chiriac MT, Takahashi K, Thurman JM, Holers VM, Zillikens D, Botto M, Sitaru C: The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* 178, 6514–6521 (2007)
43. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT: Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* 6, 257 (2015)
44. Guo RF, Ward PA: Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 23:821–852 (2005)
45. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT, Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D: Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest* 115, 870–878 (2005)

46. Woodley DT, Gammon WR, Briggaman RA: Epidermolysis Bullosa Acquisita. In: Lin AN, Carter DM (Hrsg.): Epidermolysis Bullosa: Basic and Clinical Aspects [Internet]. Springer, New York (1992) [zitiert 7. Mai 2021]. S. 75–86. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2914-8_6
47. Kasperkiewicz M, Nimmerjahn F, Wende S, Hirose M, Iwata H, Jonkman MF, Samavedam U, Gupta Y, Möller S, Rentz E, Hellberg L, Kalies K, Yu X, Schmidt E, Häslér R, Laskay T, Westermann J, Köhl J, Zillikens D, Ludwig RJ: Genetic identification and functional validation of Fc γ RIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J Pathol* 228, 8–19 (2012)
48. Kovacs B, Tillmann J, Freund LC, Nimmerjahn F, Sadik CD, Bieber K, Ludwig RJ, Karsten CM, Köhl J: Fc γ Receptor IIB Controls Skin Inflammation in an Active Model of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Front Immunol* 10, 3012 (2019)
49. Karsten CM, Köhl J: The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology* 217, 1067–1079 (2012)
50. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, McDonald JU, Orr SJ, Berger M, Petzold D, Blanchard V, Winkler A, Hess C, Reid DM, Majoul IV, Strait RT, Harris NL, Köhl G, Wex E, Ludwig R, Zillikens D, Nimmerjahn F, Finkelman FD, Brown GD, Ehlers M, Köhl J: Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc γ RIIB and dectin-1. *Nat Med* 18, 1401–1406 (2012)
51. Allhorn M, Olin AI, Nimmerjahn F, Collin M: Human IgG/Fc gamma R interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis. *PLoS One* 3, e1413 (2008)
52. Shimanovich I, Mihai S, Oostingh GJ, Ilenchuk TT, Bröcker EB, Opdenakker G, Zillikens D, Sitaru C: Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol* 204, 519–527 (2004)
53. Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C: NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol* 212, 56–65 (2007)
54. Elliott GT: Two cases of epidermolysis bullosa. 1895. (vol. 13, article 10).
55. Roenigk HH, Ryan JG, Bergfeld WF: Epidermolysis bullosa acquisita. Report of three cases and review of all published cases. *Arch Dermatol* 103, 1–10 (1971)

56. Lam C, Vleugels RA: Images in clinical medicine. Epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med* 368, e17 (2013)
57. Kim JH, Kim YH, Kim SC: Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases. *Acta Derm Venereol* 91, 307–312 (2011)
58. Nieboer C, Boorsma DM, Woerdeman MJ, Kalsbeek GL: Epidermolysis bullosa acquisita. Immunofluorescence, electron microscopic and immunoelectron microscopic studies in four patients. *Br J Dermatol* 102, 383–392 (1980)
59. Yaoita H, Briggaman RA, Lawley TJ, Provost TT, Katz SI: Epidermolysis bullosa acquisita: ultrastructural and immunological studies. *J Invest Dermatol* 176, 288–292 (1981)
60. Meijer JM, Atefi I, Diercks GFH, Vorobyev A, Zuiderveen J, Meijer HJ, Pas HH, Zillikens D, Schmidt E, Jonkman MF: Serration pattern analysis for differentiating epidermolysis bullosa acquisita from other pemphigoid diseases. *J Am Acad Dermatol* 78, 754–759.e6 (2018)
61. Fine JD, Tyring S, Gammon WR: The presence of intra-lamina lucida blister formation in epidermolysis bullosa acquisita: possible role of leukocytes. *J Invest Dermatol* 92, 27–32 (1989)
62. Marzano AV, Cozzani E, Fanoni D, De Pità O, Vassallo C, Berti E, Parodi A, Crosti C, Cugno M: Diagnosis and disease severity assessment of epidermolysis bullosa acquisita by ELISA for anti-type VII collagen autoantibodies: an Italian multicentre study. *Br J Dermatol* 168, 80–84 (2013)
63. Saleh MA, Ishii K, Kim YJ, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M: Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J Dermatol Sci* 62, 169–175 (2011)
64. Terra JB, Jonkman MF, Diercks GFH, Pas HH: Low sensitivity of type VII collagen enzyme-linked immunosorbent assay in epidermolysis bullosa acquisita: serration pattern analysis on skin biopsy is required for diagnosis. *Br J Dermatol* 169, 164–167 (2013)
65. Engineer L, Ahmed AR: Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 44, 818–828 (2001)
66. Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T: Epidermolysis bullosa acquisita: what's new? *J Dermatol* 37, 220–230 (2010)

67. Megahed M, Scharffetter-Kochanek K: Epidermolysis bullosa acquisita--successful treatment with colchicine. *Arch Dermatol Res* 286, 35–46 (1994)
68. Cunningham BB, Kirchmann TT, Woodley D: Colchicine for epidermolysis bullosa acquisita. *J Am Acad Dermatol* 34, 781–784 (1996)
69. Arora KP, Sachdeva B, Singh N, Bhattacharya SN: Remission of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita (EBA) with colchicine monotherapy. *J Dermatol* 32, 114–119 (2005)
70. Tanaka N, Dainichi T, Ohyama B, Yasumoto S, Oono T, Iwatsuki K, Elfert S, Fritsch A, Bruckner-Tuderman L, Hashimoto T: A case of epidermolysis bullosa acquisita with clinical features of Brunsting-Perry pemphigoid showing an excellent response to colchicine. *J Am Acad Dermatol* 61, 715–719 (2009)
71. Ishii N, Hashimoto T, Zillikens D, Ludwig RJ: High-dose intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in autoimmune skin blistering diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 38, 186–195 (2010)
72. Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S, Kaneko F, Izaki S, Tamaki K, Ikezawa Z, Takigawa M, Seishima M, Tanaka T, Miyachi Y, Katayama I, Horiguchi Y, Miyagawa S, Furukawa F, Iwatsuki K, Hide M, Tokura Y, Furue M, Hashimoto T, Ihn H, Fujiwara S, Nishikawa T, Ogawa H, Kitajima Y, Hashimoto K: A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 60, 595–603 (2009)
73. Kobayashi T, Saji T, Otani T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Fukazawa R, Ogawa C, Furuno K, Tokunaga H, Takatsuki S, Hara S, Morikawa A: Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease (RAISE study): a randomised, open-label, blinded-endpoints trial. *Lancet* 379, 1613–1620 (2012)
74. Yuki N: Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barré and Fisher syndromes. *Lancet Infect Dis* 1, 29–37 (2001)
75. Saha M, Cutler T, Bhogal B, Black MM, Groves RW: Refractory epidermolysis bullosa acquisita: successful treatment with rituximab. *Clin Exp Dermatol* 34, e979–e980 (2009)
76. McKinley SK, Huang JT, Tan J, Kroshinsky D, Gellis S: A case of recalcitrant

epidermolysis bullosa acquisita responsive to rituximab therapy. *Pediatr Dermatol* 31, 241–244 (2014)

77. Kim JH, Lee SE, Kim SC: Successful treatment of epidermolysis bullosa acquisita with rituximab therapy. *J Dermatol* 39, 477–479 (2012)

78. Schmidt E, Benoit S, Bröcker EB, Zillikens D, Goebeler M: Successful adjuvant treatment of recalcitrant epidermolysis bullosa acquisita with anti-CD20 antibody rituximab. *Arch Dermatol* 142, 147–150 (2006)

79. Sitaru C, Kromminga A, Hashimoto T, Bröcker EB, Zillikens D: Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc γ -dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am J Pathol* 161, 301–311 (2002)

80. Witebsky E: Concept of autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 135, 443–450 (1966)

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

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

83. Shigemoto T, Nashiro K, Tsuchida T, Seki Y, Tamaki K: Administration of IgG fraction of epidermolysis bullosa acquisita (EBA) serum into mice. *J Dermatol* 15, 123–127 (1988)

84. Borradori L, Caldwell JB, Briggaman RA, Burr CE, Gammon WR, James WD, Yancey KB: Passive transfer of autoantibodies from a patient with mutilating epidermolysis bullosa acquisita induces specific alterations in the skin of neonatal mice. *Arch Dermatol* 131, 590–595 (1995)

85. Iwata H, Leinweber S, Samavedam U: Antibodies to the von Willebrand Factor A domain of type VII collagen induce strain-dependent subepidermal blistering in mice. *Experimental Dermatology* vol21, article 31. (2012)

86. Ludwig RJ, Zillikens D: Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita. *Dermatol Clin* 29, 493–501 (2011)

87. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Büning J, Gebert A, Ishiko A, Zillikens D: Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol* 177, 3461–3468 (2006)
88. Kasperkiewicz M, Hirose M, Recke A, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig RJ: Clearance rates of circulating and tissue-bound autoantibodies to type VII collagen in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol* 162, 1064–1070 (2010)
89. Ludwig RJ, Recke A, Bieber K, Müller S, Marques A de C, Banczyk D, Hirose M, Kasperkiewicz M, Ishii N, Schmidt E, Westermann J, Zillikens D, Ibrahim SM: Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 131, 167–176 (2011)
90. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG: Monoclonal antibodies. *Mol Pathol* 53, 111–117 (2000)
91. Nelson PN, Fletcher SM, de Lange GG, van Leeuwen AM, Goodall M, Jefferis R: Evaluation of monoclonal antibodies with putative specificity for human IgG allotypes. *Vox Sang* 59, 190–197 (1990)
92. Johnson M: Mouse Antibody. *Methods* [Internet]. 3. Februar 2013 [zitiert 20. April 2015];3. Verfügbar unter: <http://www.labome.com/method/Mouse-Antibody.html>
93. Berg JM. 1958-, et al. *Stryer Biochemie*. 8 Auflage.
94. Ishii K, Lin C, Siegel DL, Stanley JR: Isolation of pathogenic monoclonal anti-desmoglein 1 human antibodies by phage display of pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Invest Dermatol* 128, 939–948 (2008)
95. Ludwig RJ: Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita. *ISRN Dermatol* 2013, 812029 (2013)
96. Parente MG, Chung LC, Rynnänen J, Woodley DT, Wynn KC, Bauer EA, Mattei MG, Chu ML, Uitto J: Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6931–6935 (1991)
97. Payne AS, Ishii K, Kacir S, Lin C, Li H, Hanakawa Y, Tsunoda K, Amagai M, Stanley JR, Siegel DL: Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *J Clin Invest* 115, 888–899 (2005)
98. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Ujiie H, Nishimura M, Sawamura D, Shimizu H:

Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent manner. *J Immunol* 88, 5792–5799 (2012)

99. Sesarman A, Mihai S, Chiriac MT, Olaru F, Sitaru AG, Thurman JM, Zillikens D, Sitaru C: Binding of avian IgY to type VII collagen does not activate complement and leucocytes and fails to induce subepidermal blistering in mice. *Br J Dermatol* 158, 463–471 (2008)

100. Ercan A, Barnes MG, Hazen M, Tory H, Henderson L, Dedeoglu F, Fuhlbrigge RC, Grom A, Holm IA, Kellogg M, Kim S, Adamczyk B, Rudd PM, Son MB, Sundel RP, Foell D, Glass DN, Thompson SD, Nigrovic PA: Multiple juvenile idiopathic arthritis subtypes demonstrate proinflammatory IgG glycosylation. *Arthritis Rheum* 64, 3025–3033 (2012)

101. Collin M, Ehlers M: The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. *Exp Dermatol* 22, 511–514 (2013)

102. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuda K, et al.: Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316, 452–457 (1985)

103. Pilkington C, Yeung E, Isenberg D, Lefvert AK, Rook GA: Agalactosyl IgG and antibody specificity in rheumatoid arthritis, tuberculosis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. *Autoimmunity* 22, 107–111 (1995)

104. van Zeben D, Rook GA, Hazes JM, Zwinderman AH, Zhang Y, Ghelani S, Rademacher TW, Breedveld FC: Early agalactosylation of IgG is associated with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis: results of a follow-up study. *Br J Rheumatol* 33, 36–43 (1994)

105. Sumar N, Colaço CB, Bodman KB, Parekh R, Williams P, Dwek R, Rademacher T, Isenberg DA, Soltys A, Hay FC, et al.: Abnormalities in the glycosylation of IgG in spouses of patients with rheumatoid arthritis. A family study. *J Autoimmun* 4, 907–914 (1991)

106. Bodman KB, Sumar N, Mackenzie LE, Isenberg DA, Hay FC, Roitt IM, Lydyard PM: Lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis produce agalactosylated IgG in vitro. *Clin Exp Immunol* 88, 420–423 (1992)

107. Tomana M, Schrohenloher RE, Reveille JD, Arnett FC, Koopman WJ: Abnormal galactosylation of serum IgG in patients with systemic lupus erythematosus and members of families with high frequency of autoimmune diseases. *Rheumatol Int* 12, 191–194 (1992)

108. Rademacher TW, Williams P, Dwek RA: Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6123–6127 (1994)
109. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV: Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670–673 (2006)
110. Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV: Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* 320, 373–376 (2008)
111. Nimmerjahn F, Ravetch JV: Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol* 26, 513–533 (2008)
112. Collin M, Olsén A: EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J* 20, 3046–3055 (2001)
113. Nandakumar KS, Collin M, Olsén A, Nimmerjahn F, Blom AM, Ravetch JV, Holmdahl R: Endoglycosidase treatment abrogates IgG arthritogenicity: importance of IgG glycosylation in arthritis. *Eur J Immunol* 37, 2973–2982 (2007)
114. Albert H, Collin M, Dudziak D, Ravetch JV, Nimmerjahn F: In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15005–15009 (2008)
115. van Timmeren MM, van der Veen BS, Stegeman CA, Petersen AH, Hellmark T, Collin M, Heeringa P: IgG glycan hydrolysis attenuates ANCA-mediated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 21, 1103–1114 (2010)
116. Yang R, Otten MA, Hellmark T, Collin M, Björck L, Zhao MH, Daha, MR, Segelmark M: Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol Dial Transplant* 25, 2479–2486 (2010)
117. Collin M, Olsén A: Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect Immun* 69, 7187–7189 (2001)
118. Hirose M, Vafia K, Kalies K, Groth S, Westermann J, Zillikens D, Ludwig RJ, Collin M, Schmidt E: Enzymatic autoantibody glycan hydrolysis alleviates autoimmunity against type VII collagen. *J Autoimmun* 39, 304–314 (2012)
119. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T: IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol* 5, 520 (2014)

120. van de Winkel JG, Capel PJ: Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 14, 215–221 (1993)
121. Tao MH, Smith RI, Morrison SL: Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J Exp Med* 178, 661–667 (1993)
122. Schur PH: IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr Allergy* 23, 1–11 (1988)
123. Sitaru C, Mihai S, Zillikens D: The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Arch Dermatol Res* 299, 1–8 (2007)
124. Jr CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Jr CAJ, Travers P, u. a. *Immunobiology*. 5th Aufl. Garland Science; (2001)
125. Ravetch JV, Bolland S: IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19, 275–290 (2001)
126. Woof JM, Burton DR: Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol* 4, 89–99 (2004)
127. Zhang Z, Goldschmidt T, Salter H: Possible allelic structure of IgG2a and IgG2c in mice. *Mol Immunol* 50, 169–171 (2012)
128. Nimmerjahn F, Ravetch JV: Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34–47 (2008)
129. Johnson M: Rabbit Antibody. *Mater Methods* [Internet]. 7. Oktober 2021 [zitiert 14. Februar 2022]; Verfügbar unter: <https://www.labome.com/method/Rabbit-Antibody.html> (2022)
130. Feng L, Wang X, Jin H. Rabbit monoclonal antibody: potential application in cancer therapy. *Am J Transl Res*. 3 (2011)
131. Morgado MG, Cam P, Gris-Liebe C, Cazenave PA, Jouvin-Marche E: Further evidence that BALB/c and C57BL/6 gamma 2a genes originate from two distinct isotypes. *EMBO J* 8, 3245–3251 (1989)
132. Mizgerd JP, Kubo H, Kutkoski GJ, Bhagwan SD, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Doerschuk CM: Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J Exp Med* 186, 1357–1364 (1997)
133. Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA: A role for complement

in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 164, 4340–4347 (2000)

134. Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, Diaz LA: The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 95, 1539–1544 (1995)

135. Hammers CM, Bieber K, Kalies K, Banczyk D, Ellebrecht CT, Ibrahim SM, Zillikens D, Ludwig RJ, Westermann J: Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. *J Immunol* 187, 5043–5050 (2011) ((doppelt))

136. Blank MC, Stefanescu RN, Masuda E, Marti F, King PD, Redecha PB, Wurzburger RJ, Peterson MG, Tanaka S, Pricop L: Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum Genet* 117, 220–227 (2005)

137. Yuasa T, Kubo S, Yoshino T, Ujike A, Matsumura K, Ono M, Ravetch JV, Takai T: Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 189, 187–194 (1999)

138. Nimmerjahn F, Ravetch JV: Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19–28 (2006)

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER AUFBAU DER HAUT UND IHRER STRUKTURPROTEINE - ZIELANTIGENE BULLÖSER AUTOIMMUNDERMATOSEN	2
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TYP VII KOLLAGEN	5
ABBILDUNG 3: VERSUCHSAUFBAU MULTIPHOTONEN-MIKROSKOP	39
ABBILDUNG 4: NACHWEIS VON IGG IN DEN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN DER HYBRIDOM- ZELLKULTUREN 6 - 10 MITTELS DOTBLOT	42
ABBILDUNG 5: INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ (IIF) DER MURINEN MONOKLONALEN ANTI-TYP VII KOLLAGEN IGG DER HYBRIDOM-ZELLKLONE 1 - 5	44
ABBILDUNG 6: ERGEBNISSE ROS-RELEASE ASSAY (KLON 1-10)	45
ABBILDUNG 7: AUC-WERTE DES ROS-RELEASE-ASSAY)	46
ABBILDUNG 8: KLINISCHER UND HISTOLOGISCHER BEFUND DES LOKALEN ANTIKÖRPER- TRANSFER-INDUZIERTEN MODELLS LM1	47
ABBILDUNG 9: DIREKTE IMMUNFLUORESCENZ (DIF) DES LOKALEN ANTIKÖRPER-(AK)- TRANSFER-INDUZIERTEN MODELLS LM1	48
ABBILDUNG 10: KLINISCHER BEFUND DES LOKALEN ANTIKÖRPER-(AK)-TRANSFER- INDUZIERTEN MODELLS LM2	50
ABBILDUNG 11: KLINISCHER BEFUND DES LOKALEN ANTIKÖRPER-TRANSFER- INDUZIERTEN MODELLS LM2:)	51
ABBILDUNG 12: DIREKTE IMMUNFLUORESCENZ (DIF) DES LOKALEN ANTIKÖRPER- TRANSFER-INDUZIERTEN MODELLS LM3	52
ABBILDUNG 13: HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE DES ANTIKÖRPER-TRANSFER- INDUZIERTEN MODELLS LM3	53
ABBILDUNG 14: ERGEBNISSE MULTIPHOTONEN-MIKROSKOP NACH I.C. INJEKTION MURINER MONOKLONALER ANTI-COL7-IGG DES HYBRIDOMZELLKLONE 1	55
ABBILDUNG 15: ERGEBNISSE DER MULTIPHOTONEN-MIKROSKOP-EXPERIMENTE NACH I.C. INJEKTION MURINER MONOKLONALER ANTI-COL7-IGG DES HYBRIDOM- ZELLKLONS 1 IN EINE EGFP-LYS-MAUS	56
ABBILDUNG 16: ERGEBNISSE DER MULTIPHOTONEN-MIKROSKOP-EXPERIMENTE NACH INTRAVENÖSER (I.V.) INJEKTION MURINER MONOKLONALER ANTI-COL7-IGG DES HYBRIDOM-ZELLKLONS 1 IN EINE EGFP-LYS MAUS	57
ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER MULTIPHOTONEN-MIKROSKOP- EXPERIMENTE NACH INTRAKUTANER (I.C.) INJEKTION DES POLYKLONALEN KANINCHEN ANTI-TYP-VII-KOLLAGEN-(COL7)-IGG (POSITIVKONTROLLE) BZW. DES MURINEN MONOKLONALEN ANTI-TYP-VII-KOLLAGEN-(COL7)-IGG DES HYBRIDOM- ZELLKLONS 1 IN EINE EGFP-LYS-MAUS	58

7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1:LISTE DER VERWENDETEN ANTIGENE UND ANTIKÖRPER	16
TABELLE 2: LISTE DER HYBRIDOMZELLKULTUREN SOWIE DEM PRODUZIERTEN ANTIKÖRPER-KLON	17
TABELLE 3: LISTE DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN	17
TABELLE 4: LISTE DER VERWENDETEN MEDIEN UNDPUFFER	19
TABELLE 5: LISTE DER VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN	20
TABELLE 6: LISTE DER VERWENDETEN LABORGERÄTE	21
TABELLE 7: LISTE DER VERWENDETEN VERSUCHSTIERE UND KRYO-SCHNITTE	23
TABELLE 8: ZUSAMMENSETZUNG DES SODIUMDODECYLSULFAT-(SDS)-GELS ZUM NACHWEIS MURINER IMMUNGLOBULIN G	31
TABELLE 10: ROS-RELEASE-ASSAY WELLPLATTEN-BELEGUNG.....	35
TABELLE 11: VERSUCHSTIERE, APPLIKATIONSWEGE UND TAGE DER UNTERSUCHUNGEN AM MULTIPHOTONEN-MIKROSKOP	38
TABELLE 12: KONZENTRATIONEN DER ISOLIERTEN MURINEN MONOKLONALEN ANTI-TYP- VII-KOLLAGEN-(COL7) -IGG DER HYBRIDOM-ZELLKULTUREN 7-10	43

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation

Ich versichere hiermit, dass ich die anliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, Dezember 2024

Tim Harden

7.4 Lebenslauf

7.5 Anträge, Bescheinigungen, Zertifikate

Schleswig-Holstein
Der echte Norden



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

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

Herrn
Prof. Dr. Ralf Ludwig
Lübecker Institut für Experimentelle
Dermatologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Zeichen:
Ihr Antrag vom: 26.04.2016
Mein Zeichen: V 242 - 35125/2016 (55-4/15)
Meine Nachricht vom: /

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

—
nachrichtlich:

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

11. Mai 2016

Ausnahmegenehmigung für die Durchführung von Tierversuchen

Sehr geehrter Herr Prof. Ludwig,

aufgrund Ihres o. a. Antrages erteile ich

Herrn Tim Harden

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

Die Genehmigung erstreckt sich auf Injektionen (i.p., s.c., i.m. und i. d), Antikörpertransfer-induzierte EBA, Narkosen mit Ketamin / Xylazin sowie die Tötung der Tiere.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Michaele Sekulla



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
GEMEINSAME TIERHALTUNG

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

Teilnahmebescheinigung

Herr Tim Harden,

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

„Einführung in die Versuchstierkunde“

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

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

Einführung in die Versuchstierkunde /Tierschutz und Tierversuche

Ersatz- und Ergänzungsmethoden

Biologie der wichtigsten Versuchstierarten

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

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

Pflege und Haltung

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

Hygiene in Versuchstierhaltungen

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

Ethische Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

Rechtliche Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

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

Durchführung und Planung von Tierversuchen

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

Lübeck, den 27.04.2016

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

IM FOCUS DAS LEBEN
WISSEN SCHÜTZT TIERE

7.6 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ludwig für das Angebot meine Dissertation im Forschungsfeld der Epidermolysis bullosa acquisita im Kreis seiner Arbeitsgruppe anzufertigen zu können und für die Überlassung der murinen monoklonalen anti-Typ VII Kollagen IgG. Prof. Ludwig unterstützte mich stets mit Anregungen, Motivation, kontroverser Diskussion und guten Ideen.

Weiter möchte ich meinen beiden Betreuerinnen Dr. rer. nat. Anika Kasprick und Dr. rer. physiol. Katja Bieber danken. Beide unterstützten mich bei der Einarbeitung in die verschiedenen Methoden sowie bei der Tierversuchskunde und halfen bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche dieses Projektes. Auch bei Problemen und Fragen waren beide für mich jederzeit verfügbar und berieten mich bestmöglich. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitenden in der Arbeitsgemeinschaft Ludwig für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Diana Scheppan und Rebecca Gembicki für die Unterstützung bei den Kryo-Schnitten bzw. die HE-Färbungen bedanken. Auch möchte ich Allegra Döring, Katsuko Matsumoto, Astrid Fischer und Stephanie Goletz für ihre Hilfsbereitschaft, ihren Teamgeist und ihre Motivation danken. Ebenfalls danke ich Lars Komorowski und Beatrice Witt von der Firma Euroimmun, die mir für die Kultivierung der Hybridom-Zellkulturen ihre Expertise zur Verfügung stellten.

Prof Dr. med. vet. Jennifer Hundt, Fred Reinholz, Norbert Koop sowie dem Team des Institutes für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck möchte ich für die Unterstützung am Multielektronenmikroskop danken. Darüber hinaus möchte ich Prof. Detlef Zillikens und der Research Training Group RTG 1727 Modulation of Autoimmunity für die strukturelle und finanzielle Unterstützung bei dieser Arbeit danken. Ein großer Dank gilt meiner Familie, die mich stets unterstützen, mich motivierten und mir den nötigen Ausgleich zum Studium, zur Arbeit und zur Promotion verschaffen. Als letztes möchte ich Dr. med. S.S. danken, die mich stets motivierte, diese Arbeit zu beenden. Ich danke Dir für Deine Geduld und Deine Sanftmut, liebe Sophie.

