

Aus der Klinik für Dermatologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Zillikens

---

**Die Rolle des G-Protein gekoppelten Rezeptors GPR15 in der  
Pathogenese von Antikörper-vermittelter Hautentzündung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

**Lina Jegodzinski**

aus Henstedt-Ulzburg

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sadik

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. physiol. Martin Tegtmeier

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.03.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-



*Science, for me, gives a partial explanation for life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment.*

*Rosalind Franklin*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Erstbeschreibung des G-Protein gekoppelten Rezeptors GPR15	1
1.2	Die Rolle von GPR15 in chronischer Entzündung & Autoimmunität	2
1.3	Die Suche nach dem Liganden für GPR15	5
1.4	Die Rolle von GPR15 in der Haut	8
1.5	Blasenbildende Autoimmundermatosen	9
1.6	Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)	11
1.7	Forschungsmodelle der EBA	13
1.8	Aktueller Wissensstand zur Ätiologie und Pathogenese der EBA	14
1.9	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Mäuse und Genotypisierung	19
2.2	Passives Mausmodell der BP-ähnlichen EBA	20
2.3	Histopathologie und direkte Immunfluoreszenz (DIF)	22
2.4	Immunhistochemische Färbung (IHC)	23
2.5	Alcianblau-Färbung	25
2.6	RNA Isolation und quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	26
2.7	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.8	Durchflusszytometrie	30
2.9	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
2.10	Präparation und IHC-Färbung der Epidermis	33
2.11	Statistische Auswertung	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	Krankheitsaktivität der <i>Gpr15</i> <sup>-/-</sup> Mäuse im passiven EBA-Tiermodell	34
3.2	Klassifikation des dermalen Infiltrates	35
3.3	Expression von GPR15 und seinem Liganden in muriner Haut	40
3.4	Systemische Expression von GPR15	43
3.5	Klassifikation der epidermalen T-Zellpopulation im naiven Status	49
3.6	Expression von GPR15 in der Haut von BP-Patienten	53

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Anhänge</b>	<b>76</b>
7.1	Materialien	76
7.2	Tabellenverzeichnis	82
7.3	Abbildungsverzeichnis	83
7.4	Genehmigung der Tierversuche und Ethikvota	87
<b>8</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>98</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

(c)DNA.....	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
(m)RNA .....	(messenger) Ribonukleinsäure
(q)PCR .....	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
AAK .....	Autoantikörper
ABSA.....	Affected body surface area
Adgre1.....	Adhesion G Protein-coupled receptor E1
Ahr.....	Aryl hydrocarbon Rezeptor
AIPD .....	Aldara <sup>®</sup> -induced psoriasiform dermatitis
AK.....	Antikörper
ANOVA.....	Analysis of variance
AP-57 .....	Antimikrobielles Peptid 57
Arg1 .....	Arginase 1
AS.....	Aminosäure
BLT1 .....	LTB4-Rezeptor
bp .....	Basenpaare
BP.....	Bullöse Pemphigoid
bpm .....	beats per minute
BSA .....	Rinder-Serumalbumin
C5/3.....	Komplementfaktor 5/3
C5ar.....	C5a-anaphylatoxin-chemotactic-receptor
CCR.....	C-C-Motiv Chemokin Rezeptor
CD .....	Cluster of Differentiation
CED .....	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
COL7 .....	Kollagen TypVII
CSBF .....	Tumorsuppressor Colon-derived SUSD2 binding factor
CU .....	Colitis Ulcerosa
CXCL.....	C-X-C Chemokin Ligand
DAPI .....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEJ.....	dermo-epidermale Junctionszone
DEPC .....	Diethylpyrocarbonat
DES .....	dermale-epidermale Separation
DETC.....	Dendritische epidermale $\gamma\delta$ T-Zelle

DIF.....	Direkte Immunfluoreszenz
DSS.....	Dextran Sulfate Sodium
EBA.....	Epidermolysis bullosa aquisita
EC.....	Endothelzelle
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F4/80.....	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
FACS.....	Fluorescence-activated cell sorting
FcRn.....	neonataler Fc-Rezeptor
Fgf.....	Fibroblast growth factor
FITC.....	Fluorescein Isothiocyanat Kanal
Fizz1.....	Found in Inflammatory Zone 1
Flii.....	Flightless I
FOXP3.....	Forkhead-Box-Protein 3
FSC(-A).....	Forward Scatter(-Area)
GAG.....	Glycosaminoglykane
GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP.....	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR.....	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPR15.....	G-Protein gekoppelter Rezeptor 15
GPR15L.....	GPR15-Ligand
GTH.....	Gemeinsame Tierhaltung
H&E.....	Hämatoxylin und Eosin
HIV.....	Humanes Immundefizienz-Virus
HPF.....	High power field
HRP.....	Horseradish peroxidase
i.p.....	intraperitoneal
Ig.....	Immunglobulin
Igf.....	Insulin like growth factor
IHC.....	Immunhistochemie
IIF.....	Indirekte Immunfluoreszenz
IL.....	Interleukin
IL-1ra.....	IL-1 Rezeptor-Antagonist
Ki-67.....	Marker of proliferation Kiel-67

KO	Knockout
LTB4	Leukotrien B4
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
MC	Morbus Crohn
MHC	Major Histocompatibility Complexes
MS	Multiple Sklerose
NC-1	nicht-kollagenartige Domäne 1 des COL7
Ngp	Neutrophilic granule protein
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	Reaktiven Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCFA	Short-Chain Fatty Acids
SEM	Standard error of the mean
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SSC(-A)	Side Scatter(-Area)
Tgfb1	Transforming growth factor beta 1
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TME5	Fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	T-Regulatorzelle
vWF	von Willebrand Faktor
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Erstbeschreibung des G-Protein gekoppelten Rezeptors GPR15

Das menschliche Gen für GPR15 wurde erstmals 1996 durch Heiber et al. beschrieben. Auf der Suche nach neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) untersuchten sie 100 verschiedene Gen-Sequenzen. Die Nummer 15 stimmte am besten mit denen von GPCRs überein, sodass das codierte Protein den Namen GPR15 erhielt<sup>1</sup>.

Ein Jahr später wurden die beiden Rezeptoren Bonzo und BOB (brother of Bonzo), alias GPR15, als Zielproteine des Humanen (HIV) und Simianen (SIV) Immundefizienz-Virus entdeckt<sup>2</sup>. Die Viren binden über ihre Oberflächenproteine an den Cluster of Differentiation (CD)4-Rezeptor verschiedener Immunzellen. Für die effiziente Fusion mit den Wirtszellen sind jedoch Korezeptoren nötig<sup>3</sup>. Das SIV, welches für Affen pathogen ist, besitzt dabei eine besonders hohe Affinität zu GPR15. Allerdings wurde in vivo an Rhesusmakaken gezeigt, dass GPR15 keinen Effekt auf die Replikation der Viren hat, aber ihre Verbreitung in unterschiedliche Organe beeinflussen könnte<sup>4,5</sup>. In menschlichen Geweben wurde der Rezeptor insbesondere im Dick- und Dünndarm, der Leber sowie in Lymphknoten, Hoden und Prostata detektiert (Abbildung 1)<sup>6</sup>. Außerdem wurde GPR15 durch die Infektion mit HIV vermehrt auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, insbesondere auf zentralen Gedächtniszellen im Blut gefunden<sup>7</sup>. Das Vorkommen vieler HIV-Korezeptoren wird vom angeborenen Immunsystem über Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche die Virusproteine erkennen, reguliert. Gleichermäßen wurde GPR15 nach Aktivierung von TLR-3 zur Zelloberfläche transportiert, wobei ein vermehrtes Auftreten auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen festgestellt wurde<sup>5</sup>. Rhesusmakaken exprimierten GPR15 wiederum in Granulozyten<sup>8</sup>.

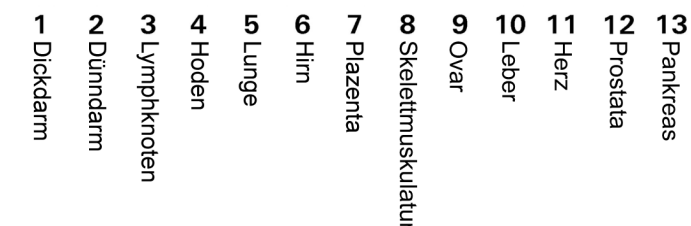


Abbildung 1: **GPR15-Expression** in verschiedenen Geweben im Western Blot (Clayton et al., 2001).

Das Vorkommen auf verschiedenen Immunzellen, die Hochregulierung durch das angeborene Immunsystem und die hohen Expressionslevel im Darm legen eine Teilhabe GPR15s an entzündlichen Prozessen in diesem Bereich nahe.

## 1.2 Die Rolle von GPR15 in chronischer Entzündung & Autoimmunität

Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) äußern sich klinisch durch Bauchschmerzen, Verdauungsstörungen und eine mangelnde Resorption von Nährstoffen. Um diese Symptome durch eine zielgerichtete Therapie lindern zu können, wurden verschiedene Tiermodelle zur Erforschung der Pathogenese der CED entwickelt. In diesem Kontext wurde GPR15 erstmals als Homing-Rezeptor, der die Zielsuche verschiedener CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die Dickdarmschleimhaut lenkt, beschrieben.

*Gpr15*<sup>-/-</sup> (*Gpr15*-KO (Knockout)) Mäuse entwickelten nach Infektion mit dem Bakterium *Citrobacter rodentium* eine signifikant stärker ausgeprägte Kolitis als Wildtyp (WT) Mäuse. Dieser protektive Effekt des Rezeptors zeigte sich ebenfalls im Mausmodell der nicht-infektiösen, durch anti-CD40 Antikörper (AK) induzierten Kolitis. Die AK aktivieren Antigenpräsentierende Zellen des Darmes unabhängig von einer Infektion und bedingen dadurch eine Entzündungsreaktion. In der Darmschleimhaut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden im Vergleich zu WT Mäusen weniger Forkhead-Box-Protein 3 (FOXP3)<sup>+</sup> T-Regulatorzellen (T<sub>regs</sub>) detektiert. Da T<sub>regs</sub> in beiden Modellen eine protektive Funktion ausführen, könnte ihr Fehlen die beobachteten Ergebnisse erklären. Das T<sub>reg</sub>-typische Zytokin, Transforming growth factor beta 1 (Tgfb1), konnte zudem als Schlüsselmolekül zur Induktion von GPR15 identifiziert werden<sup>9</sup>.

Auf der anderen Seite wurde *in vitro* gezeigt, dass GPR15 nicht nur zur Akkumulation von T<sub>regs</sub> sondern auch von T-Gedächtniszellen sowie *ex vivo* polarisierten T-Helfer (Th)17 Zellen in der Darmschleimhaut führt. Um die Relevanz dieser Daten *in vivo* zu charakterisieren, wurde ein weiteres Mausmodell genutzt. In diesem werden pathogene (CD45RB<sup>high</sup>) CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Mäuse, die keine B- und T-Zellen besitzen, transferiert und dadurch eine Kolitis induziert. Der Transfer pathogener CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in denen *Gpr15* ausgeschaltet wurde, rief jedoch keine Kolitis hervor. In dem Gewebe dieser Mäuse waren nur wenig T-Effektorzellen aufzufinden. Dies lässt vermuten, dass GPR15 auch als Homing-Rezeptor für entzündliche T-Zellen dient<sup>10</sup>.



Im menschlichen Blut wurde GPR15 sowohl auf T<sub>regs</sub> als auch auf T-Effektorzellen, die insbesondere Interleukin (IL)-17 produzierten, gefunden. Die Expression von GPR15 auf T<sub>regs</sub> zeigte sich im Blut von CU-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. Allerdings wurde GPR15 in der entzündeten Darmschleimhaut der Patienten, in der die meisten T<sub>regs</sub> vorhanden waren, in geringerer Menge als im nicht-entzündeten Bereich detektiert<sup>11</sup>. Entweder GPR15 wurde nach der Ankunft der T<sub>regs</sub> im Darm herunterreguliert oder er ist im Menschen nicht für das Homing der selbigen zuständig.

Im humanisierten Mausmodell wurde auf der anderen Seite gezeigt, dass GPR15<sup>+</sup> T-Effektorzellen in das entzündete Darmgewebe einwandern. In diesem Experiment wurde mechanisch durch Dextransulfat-Natrium (DSS) eine Kolitis in Mäusen, denen T-, B-, und Natürliche Killerzellen fehlen, hervorgerufen. Anschließend wurden menschliche Zellen in die murine Arteria ileocolica transferiert und das Zellinfiltrat der Darmschleimhaut analysiert. Durch die Blockade von GPR15 mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz wurde bestätigt, dass anschließend keine GPR15<sup>+</sup> T-Effektorzellen mehr in das Gewebe einwandern. Außerdem konnte differenziert werden, dass es sich bei den GPR15<sup>+</sup> T-Effektorzellen im Fall von MC um Th1 und Th17 Zellen und bei CU um Th2 Zellen handelt<sup>12</sup>.

Der Transkriptionsfaktor für Th2 Zellen, GATA-3, regulierte durch Bindung an eine Verstärker-Region von *Gpr15* den Rezeptor in menschlichen Th2 Zellen hoch. In der Maus schien dieser Prozess dagegen nicht möglich zu sein. FOXP3 wiederum verminderte durch seine feste Adhärenz an diese Verstärker-Region die Expression des Rezeptors in humanen T<sub>regs</sub>. In murinen Zellen war diese Verbindung weniger stabil und ermöglichte somit eine Expression von GPR15 in T<sub>regs</sub><sup>10</sup>.

Darüber hinaus moduliert ein weiterer Transkriptionsfaktor, der Aryl hydrocarbon Rezeptor (Ahr), sowohl im Menschen als auch in der Maus die GPR15 Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>13,14</sup>. Er bindet ebenfalls direkt an freie Chromatin Regionen des *Gpr15* Locus und fördert dadurch dessen Expression. In diesem Fall konnte ein gleichsinniges Verhalten auch von FOXP3 über die direkte Interaktion der beiden Proteine detektiert werden, welches die GPR15 Expression auf T<sub>regs</sub> verstärkte. Nachfolgend wurde dadurch auch das Homing dieser Zellen in den Darm gefördert und die Kolitis im anti-CD40-AK induzierten Mausmodell supprimiert. In humanen T<sub>regs</sub>, die aus dem Darm von CU-Patienten isoliert wurden, konnte eine von Ahr abhängige GPR15 Expression ebenfalls bestätigt werden<sup>14</sup>.

Ahr arbeitet in Abhängigkeit von Liganden wie unter anderem Toxinen oder Metaboliten der Nahrung und des Mikrobioms. Da Antibiotika das Mikrobiom schädigen, könnte über diesen Mechanismus erklärt werden, warum deren Gabe das Vorkommen von GPR15 auf murinen  $T_{regs}$  verringerte<sup>9</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass kurzkettige Fettsäuren (SCFA), Produkte bakterieller Fermentation, die GPR15-Expression erhöhen<sup>15,16</sup>. Da SCFA im Stuhl von CU-Patienten nur in reduzierter Menge vorhanden sind, könnte dies die GPR15-Expression auf den  $T_{regs}$  reduzieren und somit die Symptome verstärken<sup>15,17</sup>. Es ist demzufolge sehr wahrscheinlich, dass GPR15 eine Rolle in der Pathogenese der CED spielt, auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten.

Ursächlich für chronisch entzündliche und autoimmune Erkrankungen sind häufig Kombinationen aus Genveränderungen und Umweltfaktoren. Insbesondere hat sich Rauchen als Risikofaktor für beispielsweise Morbus Crohn (MC), Multiple Sklerose (MS), oder Rheumatoide Arthritis (RA) erwiesen<sup>18-20</sup>. Auf welche Weise der Tabakkonsum zur erhöhten Bereitschaft für Entzündungsreaktionen führt, ist nicht vollständig verstanden. Die Methylierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnitten verschiedener Gene, darunter auch *Gpr15*, könnte eine mögliche Erklärung bieten. In verschiedenen Studienkohorten aus Europa und den USA konnte in Abhängigkeit vom Rauchverhalten eine Regulierung der GPR15 Expression beobachtet werden<sup>21-24</sup>. Im Blut von Rauchern wurde unabhängig von Alter und Geschlecht signifikant mehr GPR15 detektiert als bei gesunden Probanden. Gleichzeitig war bei Rauchern die Hypomethylierung bestimmter Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Sequenzen des *Gpr15* Gens signifikant erhöht. Dies suggeriert eine Korrelation zwischen Rauchen, CpG-Hypomethylierung und vermehrter GPR15 Expression. Eine detaillierte Analyse der Blutzellen zeigte, dass insbesondere  $CD4^+$  T-Zellen vermehrt GPR15 aufwiesen. Innerhalb der untersuchten Subtypen (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22) dominierten erneut Th17 Zellen. Die meisten GPR15<sup>+</sup> Zellen bildeten dabei zentrale Gedächtniszellen, was mit den ursprünglichen Analysen bei HIV-Patienten übereinstimmt<sup>7,24</sup>.

Auf welche Weise Rauchen den Krankheitsverlauf der MS negativ beeinflusst, ist ebenfalls nicht vollständig erklärt. Tabakkonsum erhöhte auch im Blut von Patienten mit MS den Anteil von GPR15<sup>+</sup> $CD4^+$  T-Zellen, die das typische Zytokinmilieu von Th17 Zellen ausschütteten. Diese Zellen zeigten zudem eine erhöhte Proliferation

nach Stimulation mit einem MS charakteristischen Autoantigen, dem Myelin-Basischen Protein. Da GPR15 prozentual auf mehr T-Zellen im Liquor als im Blut vorkam, wurde vermutet, dass GPR15 ebenfalls als Liquor-Homing Rezeptor fungieren könnte<sup>25</sup>.

Schmerzen und Schwellungen der Gelenke, Morgensteifigkeit und ein allgemeines Abgeschlagenheitsgefühl sind typischen Symptome von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA). Auch die RA ist durch eine chronische Entzündungsreaktion gekennzeichnet, bei der neben Lymphozyten, vor allem Neutrophile und Monozyten in die Gelenkschleimhäute einwandern. GPR15 wurde im Blut von RA-Patienten im erhöhten Maße auf Granulozyten detektiert und von Neutrophilen und Makrophagen in den arthritischen Gelenken exprimiert<sup>26,27</sup>. Ob GPR15 diese Zellen zum Gelenkknorpel gelenkt hat oder lokal durch Aktivierung der Zellen im Entzündungsprozess hochreguliert wurde, ist nicht untersucht worden. Obwohl IL-17 ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der RA spielt, wurde bisher nicht analysiert, ob eine erhöhte Anzahl GPR15<sup>+</sup> Th17 Zellen, insbesondere im Blut von Rauchern, den Krankheitsverlauf moduliert<sup>28</sup>.

Der Einfluss von GPR15 auf verschiedene entzündliche Prozesse wurde analysiert. Dabei stellte sich die Frage, welcher Ligand den Rezeptor bindet und aktiviert.

### **1.3 Die Suche nach dem Liganden für GPR15**

Zahlreiche Liganden von GPCRs werden erfolgreich in der Klinik als Arzneimittel eingesetzt. Wird dies auch mit dem Liganden für GPR15 möglich sein?

In Abwesenheit seines Liganden wird GPR15 fortlaufend endozytiert. Die dauerhafte Phosphorylierung des Serins an Stelle 357 des 360 Aminosäuren (AS) langen Proteins durch verschiedene Proteinkinasen führt zur Internalisierung<sup>29</sup>. Die Regulierung der Rezeptormenge wurde bereits auf DNA-Ebene durch Bindung der Transkriptionsfaktoren GATA-3, FOXP3 und Ahr an Verstärker-Regionen sowie epigenetisch über die durch Rauchen verursachte Hypomethylierung von vier verschiedenen CpG-Sequenzen beschrieben<sup>10,14,30</sup>. Ebenfalls führte die Stimulation von TLR-3 zum Anstieg der GPR15-Menge<sup>5</sup>. Stoffwechselprodukte des Mikrobioms wie SCFAs sollen ebenso wie verschiedene Zytokine, unter anderem TGF $\beta$ 1, IL1 $\beta$  oder Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  über bisher noch unbekannte Mechanismen zur Expression des Rezeptors führen<sup>9,17,31</sup>.

GPR15 wird demzufolge im stabilen Zustand endozytiert und unter entzündlichen Bedingungen zur Zelloberfläche transportiert, um anschließend durch Bindung eines Liganden aktiviert zu werden. Als mögliche Liganden wurden zwei verschiedene Moleküle diskutiert: Thrombomodulin und der GPR15-Ligand.

**Thrombomodulin** wird von Endothelzellen (ECs) exprimiert und wirkt als Gerinnungshemmer. GPR15 wies in einer Mixtur aus Membranproteinen von Humanen Nabelvenen-Endothelzellen mit der fünften Region der epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne von Thrombomodulin (TME5) eine gemeinsame Immunpräzipitation auf. Dies charakterisierte den Rezeptor als möglichen Bindungspartner für TME5<sup>32</sup>. Pan et al. suggerierten, dass GPR15 eine Rolle in der Protektion der ECs und der Förderung der Gefäßneubildung durch TME5 spielt und beschrieben erstmals die Expression von GPR15 in murinen ECs. Die antientzündlichen Effekte von TME5 wurden in Mausmodellen zur allogenen Stammzelltransplantation und zur Sepsis nur in Anwesenheit von GPR15 vermittelt<sup>33,34</sup>. TME5 agierte somit in Abhängigkeit von GPR15, wobei allerdings keine direkte Interaktion im Sinne einer Ligandenbindung von TME5 an GPR15 bewiesen werden konnte.

Der **GPR15-Ligand** wurde dagegen als spezifischer Bindungspartner für GPR15 identifiziert. Für dieses Vorhaben wurden verschiedene Gewebsextrakte auf Eierstockzellen chinesischer Hamster, die GPR15 exprimierten, gegeben und dessen Aktivierung evaluiert. Durch den Extrakt aus dem Darm von Schweinen konnte eine Stimulation des Rezeptors beobachtet werden. Die Sequenzierung der genauen AS-Kette des dafür nötigen Bestandteils war identisch mit der des Genproduktes des *C10orf99* Gens im Menschen beziehungsweise *2610528A11Rik* in der Maus. Da das gefundene Molekül keine weiteren bisher bekannten GPCRs aktivieren konnte und kein anderes getestetes Protein an GPR15 gebunden hat, wurde eine spezifische Interaktion vermutet und das Peptid somit GPR15-Ligand (GPR15L) genannt. Außer einem typischen CC-Motiv, zwei über Disulfidbrücken verbundene benachbarte Cysteine, weist der GPR15L allerdings kaum molekulare Ähnlichkeiten zu anderen chemotaktischen Zytokinen auf<sup>35,36</sup>.

Der GPR15L wurde bereits als Tumorsuppressor Colon-derived SUSP2 binding factor (CSBF) im Kontext mit der Entstehung von Kolonkarzinomen beschrieben. Im gesunden Darmgewebe führte CSBF zum Zellarrest der Enterozyten, ließ sich aber im proliferativen Tumorgewebe kaum mehr nachweisen<sup>37</sup>.

Außerdem wurde er als Antimikrobielles Peptid mit 57 Aminosäuren (AP-57) mit Wirkung auf verschiedene Organismen, unter anderem *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces*, *Aspergillus niger*, Mycoplasmen und Lentiviren charakterisiert<sup>38</sup>. Die Lokalisation des GPR15L ist für eine effiziente Bindung an GPR15 von Bedeutung. In der Maus wurde GPR15L-messenger (m)RNA in Hoden, Dickdarm, Zunge und Auge sowie in menschlichen Proben insbesondere im Gebärmutterhals und im Dickdarm nachgewiesen (Abbildung 2)<sup>35</sup>. Das Vorkommen ähnelt somit dem von GPR15. Zudem modulierte der Konsum von Tabak auch die Methylierung von *C10orf99*<sup>39</sup>. Die Expression des Liganden im Darm wurde allerdings weder durch Veränderungen im Mikrobiom noch durch Entzündungsreaktionen im Tiermodell oder in CU-Patienten beeinflusst<sup>36</sup>. Auf der anderen Seite migrierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen sowie FOXP3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>, die aus den Darm-drainierenden Lymphknoten von durch DSS an Kolitis erkrankten Mäusen isoliert wurden, in Abhängigkeit von GPR15 zum GPR15-Liganden<sup>36</sup>. Es ist demzufolge durchaus wahrscheinlich, dass die GPR15/GPR15L Achse zur Rekrutierung von T-Zellen in den Darm beiträgt.

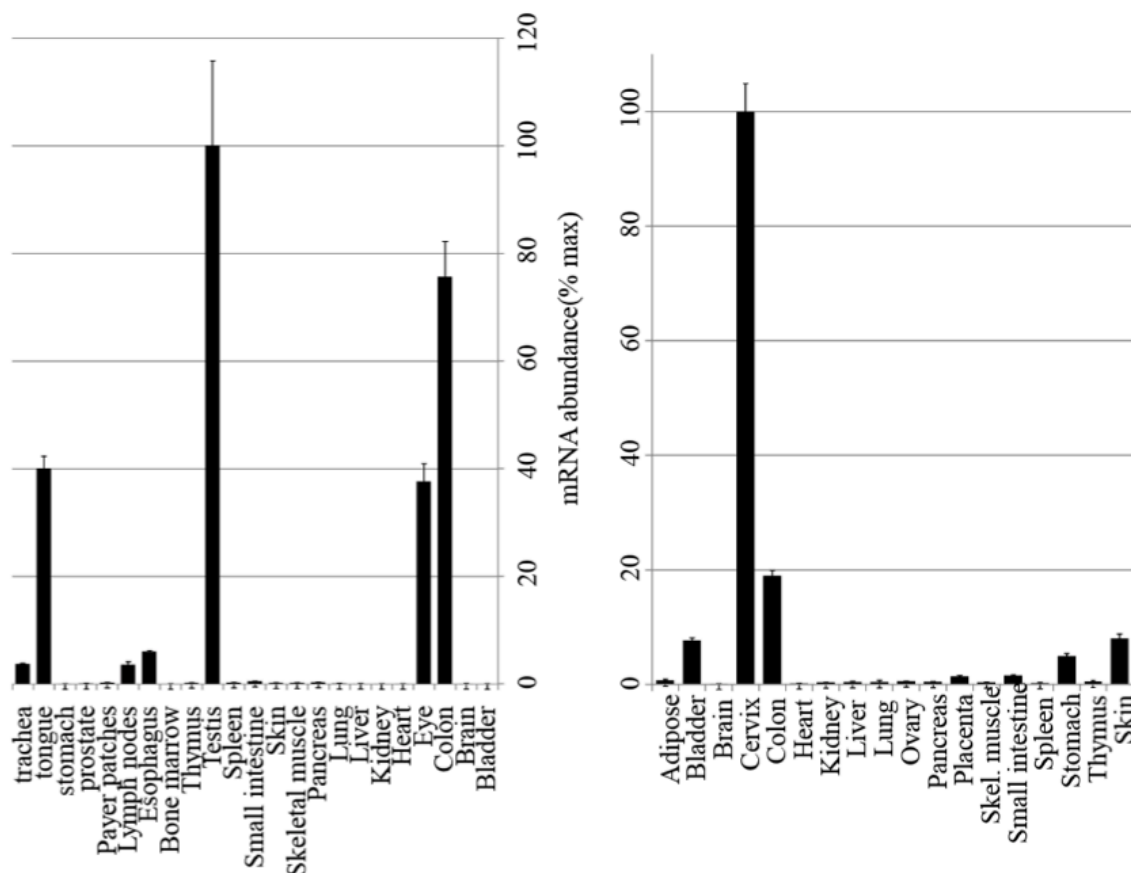


Abbildung 2: Gewebsverteilung von GPR15L messenger (m)RNA in der Maus (links) und im Menschen (rechts), (Suply et al., 2017).

Ebenso zeigte sich die Infiltration der Haut mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach allogener Transplantation von GPR15L-defizientem Gewebe im Tierexperiment vermindert. Auf der anderen Seite führte GPR15L in vitro zur Abschwächung der durch das Zytokin CXCL12 induzierten Migration von humanen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>35</sup>. Dementsprechend blieb bisher umstritten, ob GPR15L die Migration von GPR15<sup>+</sup> Zellen induzieren kann und ob ein Einsatz als Arzneimittel in Zukunft sinnvoll wäre.

#### 1.4 Die Rolle von GPR15 in der Haut

Die Haut bildet wie auch die Darmschleimhaut als äußere Körperbarriere eine Angriffsfläche für diverse Erkrankungen. Im Gegensatz zum Darm ist die Einflussnahme von GPR15 auf die Immunhomöostase der Haut bisher jedoch kaum untersucht worden.

Dendritische epidermale  $\gamma\delta$ T-Zellen (DETCs) tragen zum Gleichgewichtszustand der murinen Haut bei. Sie partizipieren an der Bakterienabwehr, Wundheilung sowie Zytokinproduktion und können durch ihre spezifische Expression des  $\gamma 3\delta 1$  T-Zellrezeptors (je nach Nomenklatur auch als  $\gamma 5 \delta 1$  bezeichnet) charakterisiert werden<sup>40,41</sup>. Nach ihrer Reifung im Thymus wandern die Zellen an Tag 16-18 in die Epidermis ein und verbleiben dort. Für diesen Vorgang sind verschiedene Homing-Rezeptoren notwendig, von denen einer als GPR15 identifiziert wurde. Bereits in ihren fetalen Vorläuferzellen im Thymus wurde der Rezeptor detektiert. Dafür wurden Reporter-mäuse genutzt, in denen *Gpr15* durch die Sequenz für das Grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt wurde. Am ersten Tag nach der Geburt wiesen die *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse keine DETCs auf, wohingegen die eingewanderten epidermalen  $\gamma 3\delta 1$  T-Zellen in den heterozygoten Mäusen grün fluoreszierten. Die Fluoreszenz nahm innerhalb von wenigen Tagen rapide ab und eine GPR15 Expression konnte in den erwachsenen Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde das Defizit an DETCs in *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen über die Zeit zunehmend geringer. Die Autoren vermuteten eine Kompensation durch die bekannten Homing-Rezeptoren CCR10 und CCR4<sup>42</sup>.

Außerdem führte der neu entdeckte GPR15L sowohl zur Migration von GPR15<sup>+</sup> Vorläufer p(precursor)DETCs als auch von Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen (CLA)<sup>+</sup> GPR15<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen, die aus dem peripheren Blut in die Haut wandern<sup>36</sup>. Demzufolge könnte das Rezeptor-Liganden Paar auch eine Rolle in Situationen mit gestörter Haut-Barriere spielen.

Die GPR15L-Expression zeigte sich sowohl in der Haut von Psoriasis-Patienten als auch im Aldara<sup>®</sup> induzierten Psoriasis Mausmodell (AIPD) erhöht<sup>43,44</sup>. Die in der Aldara<sup>®</sup>-Creme enthaltene Substanz Imiquimod stimuliert insbesondere über die Aktivierung von TLR-7 und TLR-8 das Immunsystem und führt dadurch in den Mäusen zur Induktion einer Psoriasis-ähnlichen Hautentzündung<sup>45,46</sup>. In diesem Modell entwickelten Mäuse, in denen mittels RNA-Interferenz die Expression von GPR15L lokal in der Haut stillgelegt wurde, signifikant weniger Symptome als WT Mäuse. Ebenso wurde durch Blockade von *C10orf99* in vitro die Proliferation von humanen Keratinozyten gehemmt und die Überexpression des Gens förderte analog ihre Teilung<sup>43</sup>. Vorausgesetzt GPR15L hat diesen Effekt über seinen Rezeptor GPR15 ausgeübt, müsste dieser auf Keratinozyten exprimiert werden. Dies konnte bisher jedoch nicht beschrieben werden<sup>47</sup>. Demzufolge scheint GPR15L auch über GPR15-unabhängige Interaktionen zu agieren. Außerdem steht diese proliferationsfördernde Funktion des Liganden im Kontrast zur vormaligen Beschreibung als Tumorsuppressor CBSF in der Pathogenese von Kolonkarzinomen<sup>37</sup>. Die lässt vermuten, dass die Wirkung des Moleküls zusätzlich vom jeweiligen Gewebetyp abhängig ist.

Darüber hinaus zeigten *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse weder im Imiquimod noch im IL-23 induzierten Psoriasis-Mausmodell einen veränderten Krankheitsverlauf und auch die Expression des GPR15L unterschied sich nicht zwischen *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen. Zudem zeigte sich die Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der Haut erkrankter *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäuse identisch, sodass nicht von einer T-Zell-Homing-Funktion von GPR15 im Kontext mit Psoriasis auszugehen ist<sup>47</sup>.

Die Bedeutung von GPR15 für weitere chronische Entzündungsreaktionen und insbesondere für die Entwicklung von AK-vermittelter Autoimmunität in der Haut wurde bisher nicht untersucht.

## **1.5 Blasenbildende Autoimmundermatosen**

In der Haut entsteht eine Blase, sobald sich Teile der einzelnen Hautschichten ablösen. Ein Auslöser dafür können Autoimmunerkrankungen sein, bei denen sich das Immunsystem fälschlicherweise gegen körpereigene Strukturen richtet. Spezifisch bei den blasenbildenden Autoimmundermatosen werden pathogene Autoantikörper (AAK) gebildet, die sich gegen die verschiedenen Adhäsionsmoleküle der Hautschichten richten<sup>48</sup>.

Die Haut kann in drei Bereiche, Epidermis, Dermis und Subkutis gegliedert werden (Abbildung 3, A). Die Epidermis wird aus einem mehrschichtig verhornenden Plattenepithel aus Keratinozyten, welche über Desmosomen miteinander verankert sind, gebildet. Zwischen Epidermis und Dermis befindet sich die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ). Hier binden die Zellen der untersten epidermalen Schicht, die Basalzellen, mittels Hemidesmosomen an die dreischichtige Basalmembran, die aus einer Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa besteht<sup>49</sup>. Die Dermis wird aus kollagenreichem Bindegewebe gebildet und enthält im Gegensatz zur Epidermis Blutgefäße, die Hautanhangsgebilde Haare, Schweiß- und Talgdrüsen sowie Nerven und Sinnesrezeptoren. Sie geht in die aus Fettgewebe bestehende Subkutis über<sup>50</sup>.

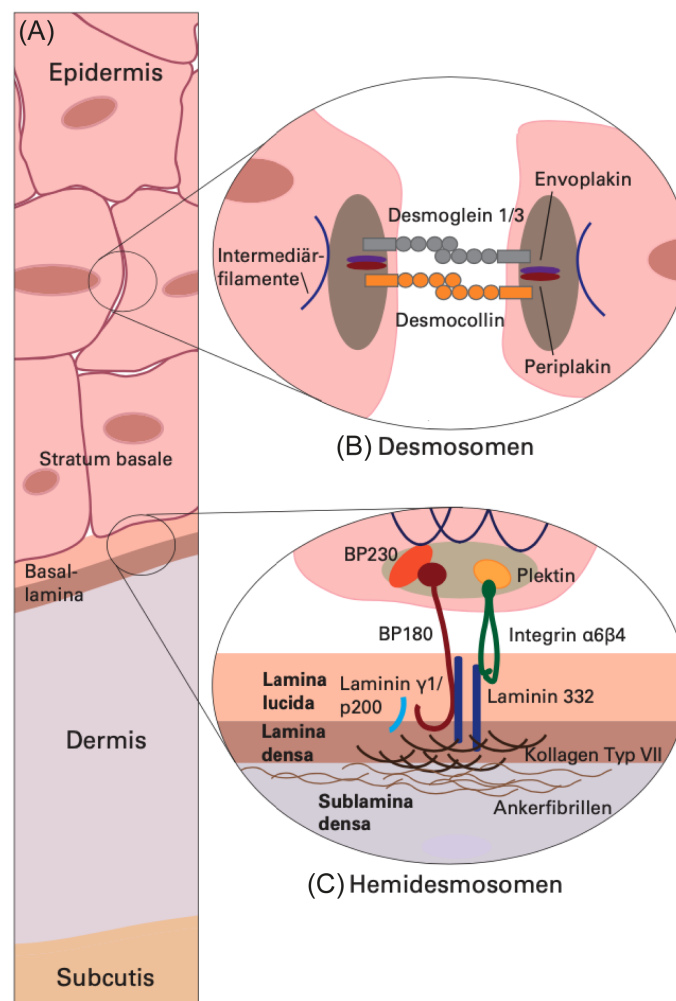


Abbildung 3: **Die menschliche Haut.** (A) Dreischichtiger Aufbau, (B) Zusammensetzung der Desmosomen (Zell-Zell-Kontakte) der Keratinozyten, (C) Darstellung der Hemidesmosomen, Verankerungskomplexe der epidermalen Basalzellschicht mit der dreischichtigen Basallamina, (Euroimmun AG, 2021).



In Abhängigkeit des Zielantigens der AAK können zwei übergeordnete Gruppen der blasenbildenden Autoimmunerkrankungen unterschieden werden<sup>51</sup>:

1. Pemphiguserkrankungen: Die AAK richten sich in diesem Fall gegen Bestandteile der Desmosomen und es entstehen dementsprechend intra-epidermale Blasen (Abbildung 3, B). Die beiden Hauptvertreter dieser Gruppe sind der Pemphigus vulgaris und der Pemphigus foliaceus.
2. Pemphigoiderkrankungen: Da sich die AAK hier gegen Hemidesmosomen an der DEJ richten, führen sie zur subepidermalen Blasenbildung (Abbildung 3, C). Zu dieser Kategorie gehören unter anderem das Bullöse Pemphigoid (BP) und die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA).

Die Inzidenz aller blasenbildenden Autoimmundermatosen ist in Deutschland mit geschätzten 13-66 Fällen pro einer Million Einwohner pro Jahr sehr gering, wobei die vornehmlich über 80-jährigen BP-Patienten den größten Anteil ausmachen<sup>52</sup>. Allerdings wurde bedingt durch die alternde Bevölkerung und verbesserte diagnostische Möglichkeiten eine 2-4fache Zunahme der Inzidenz innerhalb einer Dekade beobachtet und die 1-Jahres-Mortalität bei BP-Patienten liegt auf Grund von Superinfektionen der Hautläsionen, narbigen Kontrakturen sowie insbesondere Nebenwirkungen der Medikation mit 20-40% um das 2-3fache höher als bei gleichaltrigen Kontrollprobanden<sup>53,54</sup>. Trotz ihrer geringen Inzidenz besitzen die blasenbildenden Autoimmundermatosen demzufolge gesellschaftliche Relevanz.

### **1.6 Epidermolysis bullosa acquisita (EBA)**

Die EBA wurde erstmals 1895 von Elliott als nicht-vererbte Variante der eigentlich genetisch bedingten Epidermolysis bullosa dystrophica (EBD) beschrieben und 1904 von Kablitz mit EB-A für Aquisita, also erworben, betitelt<sup>55,56</sup>. Roenigk et al. stellten 1971 die ersten Diagnosekriterien für die EBA auf<sup>57</sup>. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung auf zwei verschiedene Arten: Zum einen als mechanisch-bullöse Form, die schon Roenigk et al. beschrieben. Diese wird durch pralle Blasen an beanspruchten Hautarealen, die zumeist unter sekundärer Zystenbildung abheilen, charakterisiert (Abbildung 4, A)<sup>57</sup>. Zum anderen als entzündliche Variante, zu der auch die BP-ähnliche EBA gehört. Sie wird durch stark juckende Blasen an den Streckseiten und am Rumpf gekennzeichnet und tritt deutlich häufiger auf (Abbildung 4, B). Beide Varianten können zudem die Schleimhäute befallen sowie parallel oder abwechselnd bei einem Patienten auftreten (Abbildung 4, C)<sup>58</sup>.



Abbildung 4: **Verschiedene klinische Manifestationen der EBA.** (A) Mechanisch-bullöse Form, (B) BP-ähnliche EBA, (C) Schleimhautbefall durch die BP-ähnlichen EBA (Koga et al., 2019).

Woodley et al. konnten bereits 1984 ein unterhalb der Lamina densa der Basalmembran lokalisiertes Protein als Autoantigen der EBA identifizieren<sup>59</sup>. Lapiere et al. zeigten 1993, ungefähr 100 Jahre nach der Erstbeschreibung, dass sich die AAK der EBA-Patienten gegen Kollagen TypVII (COL7) beziehungsweise dessen nicht-kollagenartige (NC)1-Domäne richten<sup>60</sup>. Die Tripelhelix des Kollagens ist aus drei identischen  $\alpha$ -Ketten aufgebaut, die jeweils aus einer zentralen kollagenen Region sowie den flankierenden NC-1 und NC-2 Domänen bestehen. Als Ankerfibrillen dient das Kollagen dem Zusammenhalt von Epidermis und Dermis an der DEJ<sup>51</sup>.

Die EBA ist demzufolge in die Gruppe der Pemphigoiderkrankungen einzuordnen und in der Histologie der Haut der Patienten zeigen sich subepidermale Blasen (Abbildung 5, A)<sup>61</sup>. Zur weiteren Diagnostik wird die Spezifität der krankheitsauslösenden AAK genutzt. In der direkten Immunfluoreszenz (DIF) wird ihre Ablagerung in der Haut durch mit Fluorophor-konjugierte sekundäre AK, die sich gegen die primären AAK richten, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die AAK verteilen sich entsprechend ihres Zielantigens linear an der DEJ im Gewebe. Als Besonderheit der EBA ist durch die Lokalisation des COL7 in der Sublamina densa zudem ein u-förmiges Verzahnungsmuster nachzuweisen (Abbildung 5, B)<sup>62,63</sup>. Für die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) werden zirkulierende AAK aus dem Serum der Patienten isoliert und auf durch Natriumchlorid (NaCl)-separierte Spalthaut gegeben. Bei der EBA binden diese an COL7 am Boden der separierten Blase (Abbildung 5, C)<sup>64</sup>. Zudem lassen sich die AAK, die zumeist verschiedenen Klassen von Immunglobulin (Ig)G angehören, im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) direkt bestimmen<sup>65</sup>. Ihre Pathogenität wird darin bestätigt, dass die gemessenen AAK-Titer der Patienten mit der klinischen Schwere der Erkrankungen korrelieren<sup>66</sup>.

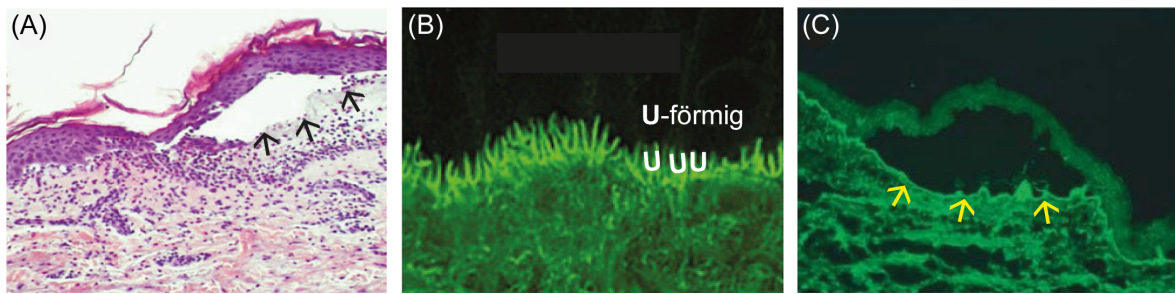


Abbildung 5: **Aspekte der EBA-Diagnostik.** (A) Subepidermale Blasenbildung in der Histologie in Hämatoxylin & Eosin-Färbung (Kawase et al., 2014), (B) U-förmiges IgG-Bindungsmuster in der direkten Immunfluoreszenz (Terra et al., 2013), (C) Darstellung der AAK am Blasenboden in der indirekte Immunfluoreszenz auf NaCl-separierter Spalthaut (Schmidt und Zillikens, 2011).

Nach der Diagnose einer Erkrankung erfolgt in der Regel ihre Therapie. Allerdings liegen spezifisch für die EBA bisher keine randomisierten Studien zur Effektivität der verschiedenen Therapieformen vor. Initial wird die systemische Gabe von Glukokortikoide empfohlen. Zudem werden das Immunsystem supprimierende und modulierende Arzneimittel wie Dapson, Colchizin, Methotrexat, Azathioprin, Ciclosporin, Mycophenolat-Mofetil oder Cyclophosphamid eingesetzt. Intravenös verabreichte Immunglobuline (IVIg) und Rituximab, einem gegen B-Zellen gerichteten Anti-CD20-AK, scheinen darüber hinaus am häufigsten mit einer kompletten Remission assoziiert zu sein, da sie effektiv die pathogene AAK>Last senken<sup>65</sup>. Plasmapherese, Immunabsorption oder extrakorporale Photochemotherapie sind weitere Ansätze<sup>67</sup>.

Da der Gebrauch der verschiedenen Medikamente jedoch zu erheblichen Nebenwirkungen führt, wäre eine spezifischere Therapie wünschenswert<sup>68</sup>. Dafür ist die Identifikation von Zielstrukturen in der Pathogenese der EBA unentbehrlich.

### 1.7 Forschungsmodelle der EBA

„From bench to bedside“, vom Labortisch zum Patientenbett, sollen mit Hilfe der translationalen Medizin neue Wirkstoffe aus dem Forschungslabor in die klinische Anwendung gebracht werden. Hierfür können in vitro Methoden, im Reagenzglas, sowie ex vivo und in vivo Modelle genutzt werden.

Im Fall der EBA kann in vitro die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten, von denen bekannt ist, dass sie an AK-vermittelter Gewebsschädigung beteiligt sind, bestimmt werden<sup>69</sup>. Beispielsweise kann nach Stimulation der Zellen durch Immunkomplexe, bestehend aus COL7 und pathogenen AK, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) quantifiziert werden<sup>70</sup>.

Darüber hinaus kann die Reaktion von Hautproben mit den pathogenen AK ex vivo observiert werden. Nach der Injektion einer Leukozyten-Suspension lässt sich in der Histologie die dermale-epidermale Separation (DES) sowie die Rekrutierung von Entzündungszellen darstellen. In diesem Modell sind jedoch weiterhin keine direkten Interaktionen der Zellen analysierbar.

Die Entwicklung von in vivo Modellen für die EBA begann 2005. Sitaru et al. konnten als erste die Pathogenität der Anti-COL7-AK in der murinen Haut beweisen<sup>71</sup>. Die heute zur Verfügung stehenden Mausmodelle werden in aktive und passive unterteilt und spiegeln alle den entzündlichen BP-ähnlichen Typ der EBA wider.

Zur Untersuchung des initialen Toleranzverlustes und der AAK-Produktion ist das aktive EBA-Mausmodell geeignet, in dem den Mäusen dreimal ein Fragment der murinen NC1-Domäne des COL7 zusammen mit einem die Immunantwort verstärkenden Hilfsstoff (TiterMax<sup>®</sup>) in die Schwanzbasis gespritzt wird. Ungefähr vier Wochen später binden die neu produzierten AAK an die DEJ und führen zu den typischen Krankheitssymptomen, die mehrere Monate anhalten. Die Sensitivität der Mauslinien variiert hierbei jedoch stark<sup>72</sup>.

Häufiger wird das passive Mausmodell genutzt. Hierbei werden aus Kaninchen gewonnene, gegen murines COL7 gerichtete AK mehrmals den Mäusen injiziert. In empfindlichen Tieren zeigen sich erste Symptome der EBA nach 2-3 Tagen, klingen jedoch ebenso nach Beendigung der AK-Injektion rasch wieder ab<sup>73</sup>. Die Prozesse, die AK-vermittelt zu Gewebsschäden führen, können dadurch gut analysiert werden. Somit ist das passive Mausmodell zur Identifikation von Zielstrukturen potentieller Arzneimittel für die EBA sehr gut geeignet und dient darüber hinaus auch als Modellerkrankung für Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen.

### **1.8 Aktueller Wissensstand zur Ätiologie und Pathogenese der EBA**

Mit Hilfe der oben genannten Forschungsmodelle wurde die Pathogenese der EBA mittlerweile gut charakterisiert. Ursächlich für Autoimmunität sind im Allgemeinen Kombinationen aus Genveränderungen und Umweltfaktoren.

Die individuelle Empfänglichkeit gegenüber der EBA ist sowohl von Genen des Major Histocompatibility Complexes (MHC), namentlich dem MHC Locus HLA-DR2, als auch von Mutationen außerhalb dessen abhängig<sup>74,75</sup>. Außerdem konnte das Mikrobiom der Haut als entscheidender Umweltfaktor identifiziert werden. Im aktiven Mausmodell wurde ein Wechsel der lokalen mikrobiellen Zusammen-

setzung vor und nach Immunisierung beobachtet und die Mäuse, die Läsionen entwickelten, wiesen eine geringere Artenvielfalt des Mikrobioms auf als die, die gesund blieben<sup>76</sup>.

Die weitere Krankheitsentstehung lässt sich in folgende vier Schritte einteilen<sup>58</sup>:

1. Afferente Phase: In dieser werden die pathogenen AAK gegen COL7 generiert, was sich experimentell im aktiven Mausmodell darstellen lässt.
2. Zirkulation: Nachfolgend zirkulieren die produzierten AAK durch das Blutssystem zu ihrem Zielorgan, also in diesem Fall zur Haut.
3. Efferente Phase: In dieser erfolgt die Bindung der AAK an COL7, was zur Entzündungsreaktion und Blasenbildung führt. Diese Geschehnisse sind im passiven Mausmodell gut nachvollziehbar.
4. Wundheilung: Zuletzt spielt auch die Effizienz der antientzündlichen Prozesse bei der Aufrechterhaltung der klinischen Läsionen eine Rolle.

Nach derzeitigem Forschungsstand führt die Präsentation des Autoantigens der EBA durch Antigenpräsentierende Zellen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Lymphknoten zur fälschlichen Aktivierung der selbigen und zur Freisetzung von proentzündlichen Zytokinen<sup>77</sup>. Dies führt zur nachfolgenden Stimulation von autoreaktiven B-Zellen, die sich zu Plasmazellen differenzieren und die spezifischen Anti-COL7-AAK produzieren, welche anschließend in das Blutssystem ausgeschwemmt werden<sup>78</sup>.

Während ihrer Zirkulation zur Haut schützt der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) die AAK vor einem vorzeitigen Abbau<sup>79</sup>. Darüber hinaus beeinflusst ihr Glykosylierungsstatus den Verlauf der EBA. Agalactolysierte AK besitzen eine hohe entzündliche Potenz, galactolysierte AK verhalten sich hingegen gegenteilig<sup>80</sup>.

In der efferenten Phase binden die AAK an COL7 in der Haut (Abbildung 6, A), wobei jedoch nur die Immunglobulin-Unterklassen IgG1 und IgG3, nicht jedoch IgG2 oder IgG4 ex vivo in menschlicher Haut pathogenetisch relevant sind<sup>81</sup>. Daraufhin setzen residente Immunzellen sowie Keratinozyten proentzündliche Modulatoren frei und das Komplementsystem wird aktiviert (Abbildung 6, B).

Zu den beteiligten Zytokinen gehören unter anderem IL-1, TNF $\alpha$  und IL-17 sowie CXCL-1/2 in der Maus, beziehungsweise IL-8 im Menschen<sup>58</sup>. Anders als in rheumatischen Autoimmunerkrankungen scheint IL-6 jedoch durch Freisetzung von IL-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) protektiv zu wirken<sup>82</sup>.

Für den symptomatischen Verlauf der EBA ist die Aktivierung des Komplementsystems dagegen unabdingbar. Mäuse, denen entweder das Gen für den Komplementfaktor C5 oder seinen Rezeptor C5a1 fehlt, sind partiell oder sogar vollständig vor der Entstehung von Läsionen im passiven Mausmodell geschützt<sup>83,84</sup>. Immunkomplexe, wie in diesem Fall aus COL7 und den AAK, aktivieren ebenso wie C5a die Arachidonat-5-Lipoxygenase (Alox5) in Granulozyten<sup>85</sup>. Dies führt zur vermehrten Produktion von Leukotrien (LT)B<sub>4</sub>, welches Neutrophile rekrutiert und aktiviert. Mäuse, in denen das Gen für Alox5 oder den LTB<sub>4</sub>-Rezeptor BLT1 ausgeschaltet wurde, verhielten sich im passiven Mausmodell gegenüber der EBA resistent<sup>86</sup>. Die Migration der Neutrophilen in die Haut erfolgt durch das auf ihrer Zelloberfläche exprimierte Integrin CD18<sup>87</sup>. Im Anschluss binden sie über den FcγIV-Rezeptor der AAK an die Immunkomplexe, woraufhin eine Signalkaskade initiiert wird, deren detaillierter Ablauf zum Teil noch unbekannt ist (Abbildung 6, C)<sup>68,88</sup>.

Letztendlich führt dies zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und proteinabbauenden Enzymen durch die Neutrophilen, welche daraufhin den epidermalen-dermalen Adhäsionskomplex degradieren (Abbildung 6, D)<sup>78</sup>. Ex vivo gibt es Anhaltspunkte dafür, dass auch Makrophagen eine Rolle in den geschilderten Prozessen spielen<sup>89</sup>. Dies konnte jedoch in vivo bisher nicht bestätigt werden<sup>77</sup>.

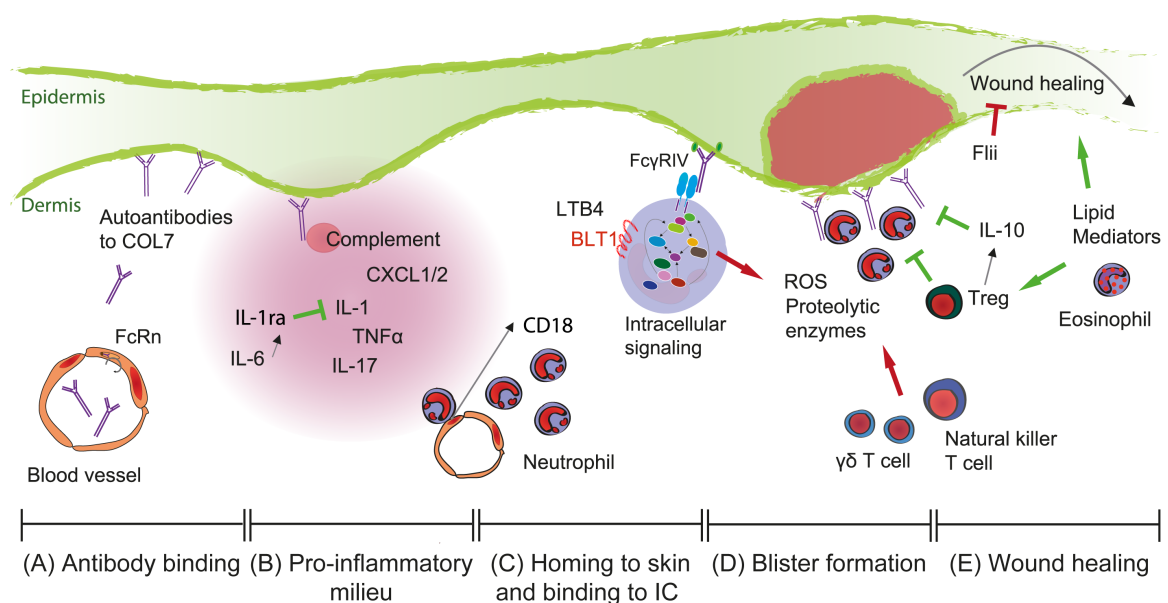


Abbildung 6: **Darstellung der efferenten Phase der EBA** (modifiziert und erweitert nach Kasperkiewicz et al., 2016; Bieber et al., 2016; Koga et al., 2019 und Sezin et al., 2020).

Des Weiteren verstärken  $\gamma\delta$  T und Natürliche Killer T-Zellen über die Interaktion mit Neutrophilen das proentzündliche Krankheitsgeschehen. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten keinen Effekt<sup>90</sup>. T<sub>regs</sub> beeinflussten den Verlauf der EBA wiederum auf protektive Weise (Abbildung 6, E)<sup>91</sup>.

Parallel zu den entzündlichen Geschehen setzen Prozesse ein, die die Wundheilung der Haut fördern. Allerdings scheinen diese in der EBA ebenfalls beeinträchtigt zu sein. Im passiven Mausmodell wurde gezeigt, dass das Aktinremodulierende Protein Flightless I (Flii) nach Induktion der EBA hochreguliert wird und dieses anschließend der Wundheilung entgegen wirkt (Abbildung 6, E)<sup>92</sup>.

Auf der anderen Seite führte die Induktion von IL-10<sup>+</sup> Plasmazellen zur Suppression der Erkrankung. Dies wurde unter anderem durch die Induktion der Freisetzung von IL-10 aus T<sub>regs</sub> erklärt. Aufgrund von in vitro Daten wurde vermutet, dass IL-10 wiederum den Effekt von C5a auf die Neutrophilen inhibiert (Abbildung 6, E)<sup>93</sup>.

Auf den Krankheitsverlauf scheinen zudem Lipid-Mediatoren, welche die Entzündung auflösen, einen entscheidenden protektiven Einfluss zu nehmen. Im passiven Tiermodell verschlimmerte sich der Krankheitsverlauf in *Alox15*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen signifikant. *Alox15* codiert für das Schlüsselenzym zur Generierung der Lipid-Mediatoren, die 12/15-Lipoxygenase. Diese wird bereits in der efferenten Phase der EBA vornehmlich in Eosinophilen Granulozyten exprimiert. Die produzierten Lipid-Mediatoren führen zur Rekrutierung von den Eosinophilen selbst sowie von T<sub>regs</sub>, welche wiederum zusätzlich die Aktivität der proentzündlichen Neutrophilen vermindern (Abbildung 6, E)<sup>91,94</sup>.

Obwohl insgesamt viele Aspekte der Pathogenese der EBA mittlerweile gut charakterisiert wurden, bleiben einige Abläufe dennoch schwer zu definieren. Die Translation der Erkenntnisse aus dem Labor ans Patientenbett bleibt somit weiterhin eine Herausforderung für die Zukunft.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

GPR15 moduliert auf vielfältige Weise den Verlauf von chronisch entzündlichen Erkrankungen, wobei ein potentieller Einfluss auf Gewebsentzündungen, die direkt durch pathogene AK vermittelt wurden, bisher noch nicht untersucht wurde. In dieser Arbeit soll daher die Rolle von GPR15 im passiven AK-transferierten Mausmodell der BP-ähnlichen EBA als prototypisches Beispiel für organspezifische AK-vermittelte Autoimmunität untersucht werden. Die BP-ähnliche EBA gehört zur Gruppe der blasenbildenden Autoimmundermatosen, die eine Immunantwort auf gut charakterisierte Zielantigene in der Haut auszeichnet.

Mit Hilfe von Mäusen, in denen *Gpr15* durch die Sequenz für GFP ersetzt wurde und die somit sowohl als KO- als auch als Reporter-Mäuse dienen, soll im Vergleich zu WT Mäusen bestimmt werden, welchen Einfluss GPR15 auf die Progression der Erkrankung hat. Darüber hinaus sollen dabei folgende Fragen beantwortet werden:

*Verändert sich das entzündliche Infiltrat aus Immunzellen? Nimmt der Rezeptor Einfluss auf das Zytokinmilieu? Beschränken sich die Geschehnisse lokal auf die Haut oder lassen sich systemische Veränderungen detektieren? Welche Zellen exprimieren GPR15? Ist die potentielle Wirkung von GPR15 über seinen Liganden vermittelt?*

Anschließend soll untersucht werden, ob sich die erhobenen Ergebnisse auch in der Haut von BP-Patienten widerspiegeln.

Außerdem ist die Signifikanz von GPR15 auf die physiologische Immunhomöostase der Haut als äußere Körperbarriere im Kontrast zur Darmschleimhaut als innere Barriere weiterhin zum Großteil noch ungeklärt. Deshalb soll zudem eine potentielle Rolle von GPR15 auf die Regulation der T-Zell-Komposition in der Haut naiver Mäuse untersucht werden.



## 2 Material und Methoden

Alle benutzten Materialien und ihre Hersteller sind im Kapitel 7 **Anhänge** aufgeführt.

### 2.1 Mäuse und Genotypisierung

Für die Versuche wurden *129P2-Gpr15<sup>tm1.1Litt/J</sup>* (*Gpr15<sup>-/-</sup>*) Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund bei *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA) kommerziell erworben. Es handelt sich um *Gpr15* GFP *knock-in* Mäuse, in denen das endogene Gen für GPR15 durch die Sequenz für GFP ersetzt wurde<sup>9</sup>. Alle Experimente wurden mit diesen *Gpr15<sup>-/-</sup>* (*Gpr15<sup>gfp/gfp</sup>*) Mäusen und deren geschlechtsgleichen WT Wurfgeschwistern (Littermates) im Alter von 8-16 Wochen durchgeführt. Dafür wurden heterozygote Mäuse in der gemeinsamen Tierhaltung (GTH) der Universität zu Lübeck verpaart und gezüchtet. Durch die Mitarbeiter der GTH wurde eine ausreichende Versorgung der Tiere mit Wasser und Futter (altromin1430, Altromin GmbH, Deutschland) sowie ein geregelter 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei einer kontrollierten Umgebungstemperatur von 23±1°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60±5% gewährleistet. Mindestens drei Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse jeweils von der spezifisch pathogenfreien (SPF) Zucht (Barriere 2) in die experimentelle Haltung überführt.

Die Autorin hat an dem „Kurs zu Grundlagen der Versuchstierkunde nach FELASA-Richtlinien (Kategorie B)“ an der Humboldt-Universität zu Berlin im März 2016 teilgenommen und der entsprechende Tierversuchsantrag mit der Nummer 5\_(113-8/15)\_Sadik wurde von den örtlichen Behörden genehmigt.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte, wie bereits in der Literatur beschrieben, weitestgehend nach dem mitgelieferten Protokoll des *Jackson Laboratory*<sup>47</sup>. Zunächst wurde die DNA aus den Stanzbiopsien der Ohren durch Inkubation mit 200µl 50mM Natronlauge (NaOH) für 45 Minuten bei 95°C isoliert. Anschließend wurde die Reaktion durch 20µl 1M Tris(hydroxymethyl)-ammoniummethan-Salzsäure (HCl) neutralisiert und eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels Phire Hot Start II DNA-Polymerase nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 3µl der isolierten DNA und 7µl des aus Tabelle 1 zu entnehmenden Mastermixes. Die verwendeten Primer wurden bei Biomers.net (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) erworben und sind im Anhang aufgelistet.

Im Thermal Cycler erfolgte eine initiale Denaturierung der DNA für 3 Minuten bei 94°C, gefolgt von 25 Zyklen je 30 Sekunden bei 94°C (DNA-Denaturierung) und jeweils einer Minute bei 66°C (Primerhybridisierung) und 72°C (DNA-Elongation) bevor die Reaktion nach weiteren 72°C für 2 Minuten auf 4°C heruntergekühlt wurde. Die molekulare Größe der PCR Produkte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe unter 2.7) kontrolliert und beträgt bei den WT Mäusen 139 Basenpaare (bp) und bei den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen 534 bp.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermixes zur Genotypisierung.

Substanzen	Volumen (µl)
10mM dNTPs	0,2
5x Phire Reaction Buffer	2
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0,2
Wasser	1,6
Primer oIMR9208 (0,25 µM)	1
Primer oIMR209 (0,25 µM)	1
Primer oIMR9210 (0,25 µM)	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>7</b>

## 2.2 Passives Mausmodell der BP-ähnlichen EBA

Das passive, durch Antikörper transferierte EBA Mausmodell ist eine etablierte Methode zur Erfassung der efferenten Phase der BP-ähnlichen EBA. Das dafür benötigte murine anti-COL7 IgG wurde, wie in der Literatur beschrieben, in folgenden drei Schritten gewonnen<sup>73</sup>.

Zunächst wurden Neuseeland-Kaninchen gegen das murine COL7 immunisiert. Dafür wurden drei Epitope der NC1-Domäne des Kollagens durch die technische Mitarbeiterin Claudia Kauderer synthetisiert und die Kaninchen durch die Firma *Eurogentec* dreimalig mit den Proteinen immunisiert, sodass anschließend in regelmäßigen Intervallen Serum gewonnen werden konnte<sup>71</sup>.

Im zweiten Schritt wurde das insgesamt vorhandene IgG aus den Kaninchen-Seren über eine Protein G Säule chromatographisch aufgereinigt. Dafür wurden 100ml des Serums mit 5 ml Protein G, welches an die Fc-Region des Kaninchen-IgGs bindet, inkubiert. Das Gesamt-IgG wurde mit 0,1M Glycinpuffer ausgewaschen und mit 1M Tris-Salzsäure neutralisiert. Zur Fällung der gewonnen IgG Fraktion wurde Polyethylenglycol verwendet und dieses anschließend über Nacht mit Hilfe einer Dialysemembran gegen 0,01M PBS Puffer wieder aus dem Proteinpellet entfernt<sup>95</sup>. Zuletzt konnte auf gleiche Weise das spezifische, pathogene anti-COL7 IgG isoliert werden. Dafür wurde unter Anwendung von His-Tag-Proteinen eine Metall-Chelat-

Chromatographie-Säule von Frau Dr. Tanya Sezin generiert. His-Tag-Proteine sind rekombinante Proteine, bestehend aus einem Zielprotein, in diesem Fall murines COL7, und einem Polyhistidin-Schwanz. Letzterer chelatiert mit Metallen und bindet darüber an das Säulenmaterial<sup>96</sup>. Mit Hilfe dieser Säule wurde die Chromatographie wie oben beschrieben fortgeführt.

Die isolierten AK wurden anschließend mittels Amicon® Ultra-15 (50kDa) Zentrifugenfilter konzentriert, durch einen Filter der Porengröße 0,2µm sterilisiert, mit dem Nanodrop 2000c Spektrometer quantifiziert und durch indirekte Immunfluoreszenz auf ihre Reaktivität gegen murines COL7 geprüft. Dafür wurden 6µm dicke schockgefrorene Hautschnitte muriner Schwänze mit verschiedenen Verdünnungen des gewonnenen AKs von 1:100 bis 1:256000 in 0,01M PBS Puffer inkubiert. Nach intensiver Spülung mit PBS wurde Alexa Fluor 594® donkey anti-rabbit IgG für 1 Stunde appliziert, um die gebundenen AK zu detektieren. Nach erneutem Waschen und dem Auftragen von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Fluoromount G zur Zellkernfärbung konnten die an der DEJ gebundenen AK mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ-900E series von Keyence visualisiert werden<sup>97</sup>.

Die Induktion der AK transferierten EBA erfolgte wie in der Literatur beschrieben<sup>98</sup>. Den Mäusen wurde 50µg des aufgereinigten anti-COL7 IgGs, jeweils auf drei Dosen verteilt, in den Nacken, das rechte Vorderbein und das linke Hinterbein an den Tagen 0, 2 und 4 des Experimentes subcutan (s.c.) injiziert. Die geschilderten Prozesse sind in Abbildung 7 (A) zusammengefasst. Um das Ausmaß der Erkrankung zu quantifizieren wurden an den Tagen 4, 7, 9, 10, 12 und 14 die Hautareale, die Hautrötungen, Blasen, Erosionen, Krusten oder Haarausfall aufwiesen, als „affected“ kategorisiert. Die jeweiligen Prozentanteile der Hautareale an der gesamten Körperoberfläche sind in Abbildung 7 (B) dargestellt. Auf diese Weise wurde die prozentual betroffene Körperoberfläche, affected body surface area (ABSA), kalkuliert. Dieser Prozess wurde in einer Kurznarkose der Mäuse durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Ketaminhydrochlorid (10mg/ml) und Xylazinhydrochlorid (1,5mg/ml) in destilliertem Wasser durchgeführt.

An Tag 14 nach Induktion der EBA wurden die Mäuse in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Blut- und Hautproben sowie Lymphknoten und die Milz entnommen. Das Blut wurde auf Eis zu einem Teil gemeinsam mit den lymphoiden Organen direkt zur Durchflusszytometrischen-Analyse genutzt und zum anderen Teil in PBS mit 1mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bei

500 bpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die dadurch erhaltenen Seren sowie zellulären Sedimente wurden bis zur weiteren Nutzung separat bei -80°C gelagert. Die Hautproben wurden zum einen in 4% (w/v) Phosphat-gepufferten Formaldehyd fixiert und zum anderen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

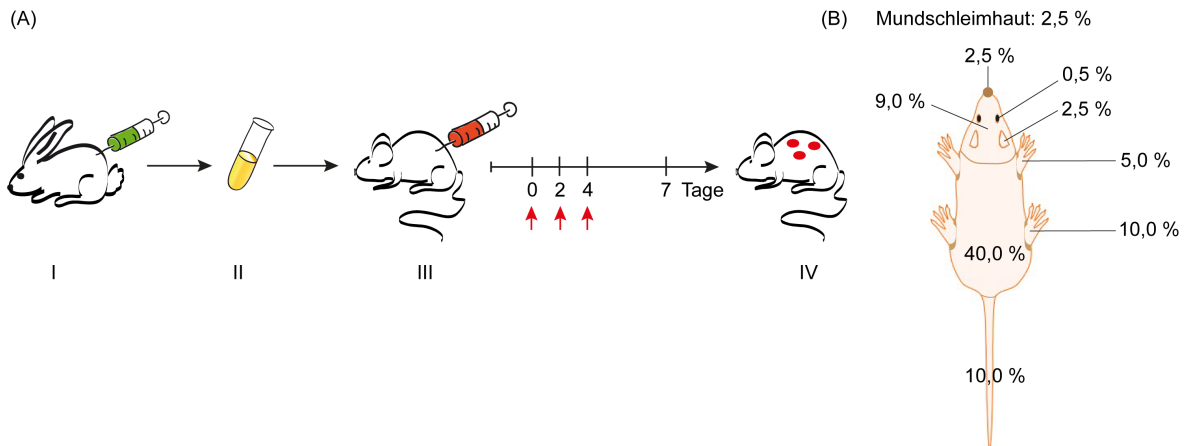


Abbildung 7: **Passives Mausmodell der BP-ähnliches EBA.** (A) Schematische Präsentation der Induktion der EBA. (I) Immunisation der Neuseeland-Kaninchen mit der NC-1 Domäne des murinen COL7; (II) Aufreinigung des anti-COL7 IgGs aus dem Serum der Kaninchen; (III) Subkutane Injektion des anti-COL7 IgGs an Tag 0, 2 und 4; (IV) Erfolgreiche Induktion der EBA, (modifiziert nach Ludwig, 2011). (B) Prozentuale Anteile der Körperoberfläche zur quantitativen Beurteilung der affected body surface area (ABSA).

### 2.3 Histopathologie und direkte Immunfluoreszenz (DIF)

Für die Histologie wurden in Formaldehyd fixierte Biopsien läsionärer Haut verwendet. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet, in 6µm dicke Teilstücke mittels Mikrotoms geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) nach Standardprotokoll durch den technischen Mitarbeiter Sadegh Mousavi gefärbt. Das Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen, insbesondere die Zellkerne, blau, während Eosin azidophile Strukturen wie das Zytoplasma rosa färbt. Dadurch wurde die durch die EBA induzierte dermale Zellinfiltration ersichtlich.

Um das Ausmaß der dermalen-epidermalen Separation (DES) zu bestimmen, wurden jeweils drei Aufnahmen der H&E Färbung pro Maus wie folgt kategorisiert. Wenn keine DES zu erkennen war, wurde eine „0“ vergeben. Im umgekehrten Fall wurde das Vorhandensein einer DES mit „1“ bewertet. Anschließend wurden die relativen Häufigkeiten der beiden Kategorien ermittelt, indem alle positiv für eine DES mit „1“ bewerteten Bilder beziehungsweise alle negativ mit „0“ beurteilten Bilder ins Verhältnis zu allen insgesamt quantifizierten Aufnahmen gesetzt wurde. Der statistische Vergleich der ermittelten Frequenzen erfolgte, wie bereits in der Literatur beschrieben, mit Hilfe des Fisher's exact test<sup>98</sup>.

Zur Detektion des gebundenen anti-COL7 IgGs und des Komplementfaktors C3 wurde die direkte Immunfluoreszenz genutzt. Dafür wurden periläsionäre, schockgefrorene Hautabschnitte mit dem Kryostaten auf eine Dicke von  $6\mu\text{m}$  geschnitten. Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten Hautschnitte wurden für 10 Minuten an der Luft bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, 10 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Aceton fixiert und dreimal für 5 Minuten in  $0,01\text{M}$  PBS gewaschen. Um eine unspezifische AK-Bindung zu vermeiden, wurde 30 Minuten bei RT mit 3% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in PBS geblockt, bevor die Färbungen mit Alexa Fluor 488<sup>®</sup> goat anti-rabbit IgG und purified rat anti-mouse complement C3 IgG sowie polyclonal rat IgG als Isotyp-Kontrolle für 1 Stunde bei RT durchgeführt wurden. Zur Detektion der letztgenannten AK erfolgte nach Spülung mit PBS eine Inkubation mit Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG für 1 Stunde bei RT. Nach erneutem Waschen wurde zuletzt zur nukleären Färbung DAPI Fluoromount G aufgetragen und die Schnitte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Aufnahmen wurden mit dem BZ-9000E series Keyence microscope gemacht und mit der BZ-II Analyzer software analysiert.

#### **2.4 Immunhistochemische Färbung (IHC)**

Zur Quantifizierung von residenten sowie infiltrierenden Zellpopulationen in der Haut wurde die Methode der immunhistochemischen Färbung (IHC) genutzt. Diese beruht darauf, dass AK an spezifische Markerproteine der jeweiligen Zellpopulation binden. Zur Detektion dieser primären AK wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zum einen wurden Biotin-gekoppelte Antikörper genutzt, bei denen das Biotin spezifisch und hochaffin an Fluorophor-konjugiertes Streptavidin bindet. Zum anderen wurden nicht konjugierte, „purified“, AK verwendet, welche aus Rattenserum gewonnen wurden. Diese konnten mittels sekundärer AK, die das Fc-Fragment der Ratten-AK binden, detektiert werden. Die sekundären AK waren entweder direkt mit Fluorophor oder wiederum mit Biotin konjugiert.

Zur Detektion der Zellpopulationen wurden schockgefrorene naive oder periläsionäre Hautproben in Tissue-Tek eingebettet und mit dem Kryostaten in  $6\mu\text{m}$  dicke Teilstücke durch Sadegh Mousavi geschnitten. Alle bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten Schnitte wurden vor Applikation des AKs 10 Minuten bei RT getrocknet, 10 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Aceton fixiert und dreimal 5 Minuten mit  $0,01\text{M}$  PBS gewaschen. Anschließend wurden die einzelnen Gewebeabschnitte mit einem hydrophoben Stift markiert.

Zur Vermeidung von Artefakten wurde vor Inkubation mit einem Biotin-konjugierten AK das Avidin/Biotin Blocking Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet und für 30 Minuten bei RT mit 3% (w/v) biotin-freiem BSA in PBS geblockt. Im Falle der „purified“ Ratten-AK wurde 5% normales Ziegenerum in PBS für 1 Stunde bei RT zum Blocken genutzt, da der sekundäre AK aus immunisierten Ziegen gewonnen wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären AK und parallel als Negativkontrolle mit dem entsprechenden Isotypen für 1 Stunde bei RT. Eine Liste mit allen AK in ihren entsprechenden Konzentrationen ist im Anhang aufgeführt. Die Verdünnung der AK erfolgte im jeweiligen Blockungsmedium. Nach erneuter Spülung mit PBS wurde entweder Streptavidin-konjugiertes Fluorophor Dylight 488/594 für 30 Minuten bei RT oder die sekundären AK (Alexa Fluor® 594 goat anti-rat IgG, Biotin goat anti-rat IgG) für 1 Stunde bei RT appliziert. Im Fall des Biotin-konjugierten sekundären AKs wurde nach erneuter Spülung zusätzlich Streptavidin-konjugiertes Fluorophor aufgetragen. Die Inkubationsschritte wurden alle in einer dunklen Feuchtkammer durchgeführt. Zuletzt erfolgte die Benetzung der Gewebeschnitte mit DAPI Fluoromount G.

Im Fluoreszenzmikroskop, BZ-9000E series Keyence microscope, konnte das nach Anregung emittierte Licht der jeweiligen Fluorophoren detektiert werden. Das Mikroskop besitzt hierfür vier verschiedene Kanäle der Wellenlängen 594nm für rotes, 488nm für grünes und 350nm für blaues (DAPI) Licht sowie ein Hellfeld für die Lichtmikroskopie. Es wurden je Färbung mindestens zwei Aufnahmen pro Hautprobe in 200facher Vergrößerung, definiert als High power field (HPF), quantifiziert. Zur besseren Darstellung wurden einige Bilder digital, wie in den entsprechenden Legenden angegeben, weiter vergrößert.

Um infiltrierende Granulozyten zu detektieren wurden die bereits etablierten Protokolle der Markerproteine Ly6G für Neutrophile und F4/80 für Makrophagen genutzt. Die Quantifizierung erfolgte mit der „hybrid cell count“ Funktion der BZ-II Analyzer Software. Es wurde pro Bild jeweils ein  $314 \times 333 \mu\text{m}^2$  großer Bereich mit der höchsten Zellinfiltration ausgewählt. Der Anteil der positiv gefärbten Fläche des gewählten Bereiches wurde statistisch ausgewertet<sup>86</sup>.

Residente sowie infiltrierende Lymphozyten wurden einzeln manuell ausgezählt. Zu den im Labor bestehenden Protokollen für die Marker CD3 und  $\delta$ TCR wurden weitere AK für  $\beta$ TCR, CD4, CD8 und FOXP3 etabliert.

Ebenso wurden Doppelfärbungen mit den genannten AK eingerichtet, indem nach Applikation des Fluorophors am Ende des primären Protokolls und Spülung mit PBS nach erneutem Blocken die Inkubation mit dem zweiten primären AK und die weitere Fortführung des Protokolls erfolgte.

Außerdem wurde die GPR15 Expression in der Haut von BP-Patienten und hautgesunden, alters- und geschlechtsgleichen Kontrollen untersucht. Die dafür benötigten Stanzbiopsien wurden für diese Arbeit von der Datenbank der Klinischen Forscherorganisation, KFO303: Pemphigoid Diseases – Molecular Pathways and their Therapeutic Potential, zur Verfügung gestellt. Die Färbung von GPR15 sowie die Doppelfärbungen mit CD3 als T-Zellmarker und von Willebrand Faktor (vWF) für Endothelzellen wurden von Frau Dr. Tanya Sezin eingeführt und erfolgten ebenfalls nach dem bereits beschriebenen Schema. Die Quantifizierung wurde in gleicher Weise wie für Lymphozyten durchgeführt.

In den murinen Hautproben an Tag 14 der EBA wurde darüber hinaus die epidermale Proliferation der Keratinozyten mittels IHC bestimmt. Dafür wurde der Proliferationsmarker Kiel-67 (Ki-67), welcher während der Mitose der Zellen auf der Oberfläche der Chromosomen vorhanden ist, verwendet<sup>99</sup>. Für dieses bereits im Labor etablierte Protokoll wurden keine schockgefrorenen, sondern 6  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte verwendet und zweimal für jeweils 3 Minuten in Xylen deparaffinisiert und mittels absteigender Alkoholverdünnungsreihe und destilliertem Wasser rehydriert. Zur Freilegung des Antigens wurden die Schnitte mit 10mM Zitrat Puffer mit 0.05% Tween20 für 10 Minuten im Schnellkochtopf erhitzt. Nach Abkühlung der Proben auf RT und Spülung mit PBS konnte ab dem Blockungsschritt mit der Färbung, wie bereits beschrieben, weiter verfahren werden.

## **2.5 Alcianblau-Färbung**

Um den Wundheilungsprozess in der Haut zu bewerten, wurde die Färbung mit Alcianblau etabliert. Bei dieser werden Glycosaminoglykane (GAG), insbesondere Hyaluronsäure, bei niedrigen pH-Werten cyan-blau gefärbt. Die GAGs kommen dabei als eine der wichtigsten Komponenten der extrazellulären Matrix vermehrt während der Wundheilung vor<sup>100</sup>.

Für die Alcianblau-Färbung wurden Paraffinschnitte, wie bereits oben beschrieben, deparaffinisiert und rehydriert. Anschließend wurden die Proben mit Alcian Blau 8GX in 3% Essigsäure bei einem pH-Wert von 2,5 für 1 Stunde inkubiert.

Nach 3-minütiger Waschung in Leitungswasser und Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Zellkerne mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung 3 Minuten gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte wieder mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Xylen geklärt. Zuletzt wurde Eindeckmedium aufgetragen. Jeweils drei Bilder pro Maus wurden in 200facher Vergrößerung unter dem Mikroskop aufgenommen. Zur Analyse wurde erneut die BZ-II Analyser Software genutzt. Der blau gefärbte Bereich wurde berechnet und in einer numerische Scala von 0-4, wie in Tabelle 2 aufgeführt, kategorisiert. Die Intensität der Blaufärbung wurde ebenfalls von 0-4 bewertet und zu der berechneten Fläche addiert. Der auf diese Weise eingeführte Gesamtscore von 0-8 wurde statistisch verglichen.

Tabelle 2: Numerische Skala zur Kategorisierung der Alcian Blau Färbung. Es wurde der Mittelwert der blau gefärbten Bereiche von je drei Bildern pro Maus ermittelt.

Alcian Blau gefärbter Bereich ( $\mu\text{m}^2$ )	Scala (0-4)
> 150.000	4
$\leq$ 150.000	3
$\leq$ 100.000	2
$\leq$ 50.000	1
0	0

## 2.6 RNA Isolation und quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Während mit Hilfe der IHC Proteine angefärbt werden, ist die quantitative PCR (qPCR) zur Detektion von mRNA geeignet. In der PCR wird ein von genspezifischen Primern markierter, doppelsträngiger DNA-Abschnitt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase amplifiziert. Demzufolge muss vor Durchführung der PCR die Synthese einer komplementären DNA (cDNA) zu der einzelsträngigen mRNA erfolgen. Bei der qPCR wird die amplifizierte DNA zusätzlich unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes, in diesem Fall SYBR<sup>®</sup> Green, quantifiziert. Der Farbstoff bindet doppelsträngige DNA und emittiert nach Anregung durch blaues Licht der Wellenlänge 494nm grünes Licht mit 521nm. Diese Fluoreszenz kann nach jedem PCR-Zyklus bestimmt werden und gibt Aufschluss über die Menge der amplifizierten DNA.

Diese Methode wurde insbesondere zur Bestimmung transkribierter Zytokingene in der Haut der Mäuse an Tag 14 der EBA verwendet. Die qPCR ist dabei sehr sensitiv. Allerdings ist auch die Kontaminationsgefahr entsprechend hoch, sodass bei allen Arbeitsschritten auf besonders reine Bedingungen geachtet wurde.



Außerdem ist bei der Interpretation der gemessenen mRNA Level zu beachten, dass nach der Synthese der mRNA weitere intrazelluläre Prozesse, wie die Translation und Proteinreifung, folgen. Die gemessenen mRNA Level sind demzufolge nicht direkt mit den letztendlich exprimierten Proteinmengen gleichzusetzen.

Zur Extraktion der mRNA wurden schockgefrorene Proben naiver oder perilesionärer Haut der Mäuse an Tag 14 der EBA sowie ein Teil der Hautstanzen der BP-Patienten verwendet. Für die Analyse der separat aus der Epidermis und der Dermis naiver Mäuse isolierten mRNA wurden Hautproben ihrer Schwänze von Frau Dr. Tanya Sezin, wie in der Literatur beschrieben, in 0,25% (w/v) Trypsin Lösung bei 37°C für 90 Minuten vorbehandelt und die beiden Kompartimente der Haut mittels Pinzetten voneinander getrennt und bei -80°C gelagert<sup>101</sup>.

Die Isolation erfolgte mittels TRIzol™ Reagent, modifiziert nach der Instruktion des Herstellers. Die Gewebeproben wurden mit einem Mörser in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver verarbeitet und anschließend in 1ml TRIzol™, einem Reagenzgemisch aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, homogenisiert. Dadurch wurden die Zellmembranen zerstört und die mRNA besser zugänglich gemacht. Anschließend erfolgte zur Sedimentation der Gewebe- und Zelltrümmer die Zentrifugation der Proben. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 0,2ml Chloroform dazugegeben. Die Proben wurden gemischt, für 2-3 Minuten inkubiert und erneut zentrifugiert. So bildeten sich drei Phasen aus. Unten verblieb die organische Phenol-Chloroform Phase. In der Mitte bildete sich eine die DNA enthaltene Interphase und oben befand sich die isolierte mRNA in einer wässrigen Phase. Diese wurde abpipettiert und mit 0,5ml Isopropanol gemischt, um nach 10-minütiger Inkubation und Zentrifugation die mRNA als gelähnliches Präzipitat am Boden des Gefäßes zu erhalten. Der Überstand wurde verworfen und die mRNA Pellets mit 75% Ethanol zweimal gewaschen. Nach dem Abkippen des Ethanols wurden die mRNA Pellets an der Luft getrocknet und in 20-50µl Wasser, welches zuvor mit Ribonukleasen inaktivierendem Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurde, wieder aufgelöst<sup>102</sup>.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten mRNA wurde mit dem Nanodrop 2000c Spektrometer bestimmt. Bei 260nm verhält sich die Absorption proportional zur RNA-Konzentration. Das Verhältnis der optischen Dichte von 260nm zu 280nm sollte zudem >1,8 betragen, um eine Verunreinigung mit Proteinen auszuschließen.

Das Verhältnis von 260nm zu 230nm diente bei einem Wert >2 zum Ausschluss einer Kontamination mit organischen Substanzen, wie das im TRIzol™ enthaltene Phenol<sup>103</sup>. Die mRNA wurde anschließend auf 50ng/μl verdünnt und bei -80°C gelagert.

Es folgte die Transkription von jeweils 500ng der mRNA in cDNA mit Hilfe des ReversAid First Strand cDNA Synthesis Kits. In diesem Reaktionsansatz wurden 10μl des in Tabelle 3 aufgeführten Mastermixes zu 10μl der mRNA, respektive DEPC-behandeltem Wasser als Negativkontrolle, pipettiert und das Gemisch im Thermal Cycler für 60 Minuten bei 42°C erhitzt. Bei 70°C für 5 Minuten wurde die Reaktion beendet. Die synthetisierte cDNA wurde weiter 1:10 mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und bei 4°C oder für eine spätere Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes zur cDNA Synthese.

Substanzen	Volumen (μl)
Oligo(dT) <sub>18</sub> primer	1
5x Reaktionspuffer	4
10mM dNTP Mix	2
DEPC-behandeltes Wasser	1
RiboLock RNase Inhibitor (20U/μl)	1
RevertAid M-MuLV RT 200 U/μl	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10</b>

Die qPCR wurde mit dem SYBR® Select Master Mix nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden in eine 96-Well Platte jeweils 10μl des Reaktionsansatzes pipettiert. Dieser bestand aus 4μl der verdünnten cDNA und 6μl Mastermix, welcher sich aus 0,5μL 5μM Vorwärts(forward)-primer, 0,5μL 5μM Rückwärts(reverse)-primer und 5μl des SYBR® Select Master Mixes zusammensetzte. Letzterer enthielt das Enzym AmpliTaq® DNA-Polymerase, den Farbstoff SYBR® GreenER™ dye und eine hitzeinstabile Uracil-DNA Glycosylase (UDG). Die UDG degradiert DNA, die bereits vor der eigentlichen qPCR entstanden ist, um eine Kontamination zu vermeiden. Beim Start des qPCR-Zyklus wird sie von der eingesetzten Hitze zerstört.

Die Bestimmung aller Proben erfolgte in Doppelansätzen und DEPC-behandeltes Wasser wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Zur Durchführung der qPCR und Detektion der entstandenen Fluoreszenz wurde der Mastercycler ep realplex von Eppendorf genutzt. Die Zyklusbedingungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zyklusbedingungen der durchgeführten qPCRs.

Funktion	Grad (°C)	Zeit (Minuten)	Zyklen
Aktivierung der Uracil-DNA Glycosylase	50	2	1
Aktivierung der „hot start“ AmpliTaq® Polymerase	95	2	1
Denaturierung der DNA	95	15	40
Primerhybridisierung und Elongation der DNA	60	1	

Um die Expression der einzelnen Gene vergleichen zu können, wurden diese auf die Expressionslevel eines Referenzgenes, in diesem Fall das Haushaltsgen *Gapdh*, normalisiert. *Gapdh* wird kontinuierlich exprimiert und codiert für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, welche als Katalysator in der Glykolyse unentbehrlich ist. Zur Normalisierung wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode verwendet.  $C_T$  beschreibt die Zyklusnummer, ab der ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignales detektiert wurde und  $\Delta C_T$  die Differenz der  $C_T$  Werte des Zielgenes von denen des Haushaltsgenes. Da es sich bei den erhobenen Daten nicht um Zeitkinetikversuche, sondern um Endpunktexperimente handelt, entfällt die zusätzliche Normalisierung auf einen Referenzzeitpunkt<sup>104</sup>.

Alle genutzten Primer wurden bei Biomers.net (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland) kommerziell erworben und sind im Anhang aufgelistet. Die Primer für *2610528A11Rik*, *Tcrg-V3*, *Trdv1*, *Tcrg-V4*, *Fgf7*, *Fgf10*, *Igf1*, *Arg1*, *Fizz1*, *Adgre1*, *Il10*, *Tgfb1* und *Foxp3* wurden unter zur Hilfe Name der Online-Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information) neu entworfen. Zunächst wurde die jeweilig benötigte Gensequenz bei NCBI herausgesucht und mittels Nukleotid-BLAST der Exon-Sequenzbereich identifiziert. Die isolierte mRNA der Hautproben enthält bekanntlich bereits keine Introns mehr, da diese nicht-kodierenden Abschnitte zuvor bei der Prozessierung der prä-mRNA in den Zellkernen herausgespleißt wurden. Auf Grundlage dieser Sequenz wurden die Primer mit dem Primer-BLAST vorzugsweise Intron-überspannend designt, um möglichst spezifische Primer zu erhalten und Kontamination durch genomische DNA zu verhindern. Zuletzt wurden die neu entworfenen Primer mittels Agarose-Gelelektrophorese der entstandenen PCR-Produkte (siehe unter 2.7) auf ihre Spezifität getestet.

## **2.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Phosphatgruppen in der DNA besitzen eine negative elektrische Ladung, sodass die Fragmente in Richtung Pluspol laufen. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit der DNA in den verwendeten Agarosegelen umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Kleine Fragmente wandern schneller im Agarosegel als große.

Die verwendeten Gele wurden aus 1,5% Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Bereits während dieses Prozesses wurde das Ethidiumbromid-Derivat GelStar® Stain als Fluoreszenzfarbstoff zugefügt, welcher zwischen die Basen der DNA interkaliert. Die DNA wurde mit einem Auftragsfarbstoff zur Visualisierung der DNA während der Elektrophorese gemischt und in die Kammern des Gels pipettiert. Es erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte bei 100V. Die Laufzeit betrug auf diese Weise durchschnittlich 40 Minuten. Anschließend wurden die DNA-Agarosegele mittels Fluoreszenzphotographie dokumentiert. Um die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden zusätzlich DNA-Marker mit vorbestimmten bp-Längen als Maßstab aufgetragen.

## **2.8 Durchflusszytometrie**

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde verwendet, um ähnlich wie bei der IHC auch im peripheren Blut, in den inguinalen Lymphknoten und in der Milz Zellpopulationen mit Hilfe von Markerproteinen zu detektieren. Die Zellen können dabei nach Größe, Morphologie oder durch Fluoreszenz markierte AK ausgezählt werden.

Das Durchflusszytometer besitzt einen Laserstrahl, den die Zellen einzeln durchqueren und dabei das Licht entsprechend ihrer Größe und Granularität streuen. Lymphozyten haben eine glatte Oberfläche und besitzen keine intrazellulären Vesikel, sodass sie deutlich weniger Licht streuen als Granulozyten. Dabei wird die Beugung des Lichtes im flachen Winkel, welche insbesondere von der Zellgröße abhängt, im Vorwärtstreulicht, Forward Scatter (FSC), gemessen. Im Seitwärtstreulicht, Side Scatter (SSC) wird dagegen die Brechung im rechten Winkel bestimmt. Diese hängt vor allem von der Zellgranularität ab. Gleichzeitig misst das Durchflusszytometer die von den gebundenen AK emittierten Fluoreszenzfarbstoffe<sup>105</sup>.

Ebenso wurde das Vorkommen von GPR15 untersucht. Da die Experimente, wie oben beschrieben, mit *knock-in* Mäusen durchgeführt wurden, exprimieren die *Gpr15<sup>-/-</sup>* (*Gpr15<sup>gfp/gfp</sup>*) Mäuse anstelle von GPR15 das GFP. Dieses fluoresziert im Fluorescein Isothiocyanat (FITC) Kanal und kann somit durchflusszytometrisch detektiert werden.

Die Organe der Mäuse wurden direkt nach ihrer Tötung im naiven Zustand beziehungsweise an Tag 14 der EBA weiter prozessiert und durch einen 70 $\mu$ m Filter gegeben. Das periphere Blut wurde in 100 $\mu$ l 50mM EDTA transportiert. Danach wurden die Erythrozyten in den Proben mit 500 $\mu$ l Erythrozyten Lyse Puffer bei RT für 10 Minuten lysiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 500 $\mu$ l FACS Puffer gestoppt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand abgegossen und die Proben noch zweimal mit FACS Puffer gewaschen. Es folgte die Resuspension in FcRezeptor Block für 5 Minuten, um eine unspezifische Bindung der Fc-Region der AK an die Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Immunzellen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 30 Minuten mit dem für die Zellpopulation spezifischen AK inkubiert. Eine Liste aller verwendeten AK in ihren entsprechenden Konzentrationen liegt der Arbeit im Anhang bei. Zur Markierung toter Zellen wurde 1:1000 (v/v) verdünntes DAPI in PBS genutzt. Nach erneuter Waschung wurden die Proben mit dem MACSQuant<sup>®</sup> Analyzer 10 Flow Cytometer bestimmt.

Es wurden verschiedene Färbeprotokolle zum einen mit Markern für Granulozyten (Ly6G, CD11b, CD11c), und zwei verschiedene zur Färbung von Lymphozyten (CD3, CD19, CD8 $\alpha$ , CD4,  $\delta$ TCR oder CD8  $\alpha$ , CD4, CD25, CD127, CD49b) neu etabliert. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, dass das Farbspektrum der AK nicht mit dem FITC Kanal interferiert, um weiterhin GFP, also GPR15, zu detektieren. Zur Etablierung der Protokolle wurden neben Einzelfärbungen stets „Fluorescence Minus One“ (FMO) Kontrollen genutzt. So ließ sich die spezifische Färbung von Artefakten abgrenzen und die Platzierung der Bereiche für positiv angefärbte Zellen wurde dementsprechend ausgerichtet. Als Negativkontrolle für die GFP Expression wurden stets WT (*Gpr15<sup>+/+</sup>*) Mäuse verwendet.

Die Auswertung und Analyse der Zellpopulationen erfolgte mit Hilfe der FlowJo<sup>™</sup> Software Version 10. Die erhobenen Gating-Strategien sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil der Arbeit abgebildet.

## 2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Nach der systemischen Bestimmung verschiedener Zellpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie, wurden lösliche Proteine im Serum mittels ELISA detektiert. Mit dieser Methode wurden sezernierte Zytokine sowie Komplementfaktoren bestimmt. Die Substrate wurden zwischen einem auf einer Reaktionsplatte befindlichen Fang-AK und einem nach dem Auftragen der Proben hinzugegeben sekundären Detektions-AK in einem „AK-Antigen-AK Sandwich“ festgehalten. Der Detektions-AK ist mit Biotin konjugiert, welches fest an Avidin bindet. Das Avidin ist wiederum an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welche die Reaktion von Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Endprodukt katalysiert. Durch Zugabe von Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) bildete sich letztendlich ein detektierbarer, stabiler gelber Farbkomplex.

Auf diese Weise wurden IL-17A, IL-6, TGF $\beta$ 1 und C5a im Serum der Mäuse an Tag 14 der EBA oder im naiven Zustand detektiert. Die ELISA Kits wurden weitestgehend nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Am Vortag wurden die 96-Well-ELISA-Platten mit 100  $\mu$ l des in PBS verdünnten Fang-AKs bei 4°C beschichtet und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten dreimal mit PBS mit 0.05% Tween20 gewaschen und für 1 Stunde bei RT mit 200  $\mu$ l 1% BSA in PBS auf einem Rüttler geblockt. Nach erneuter Waschung wurden jeweils 100  $\mu$ l der Standardreihe und der Proben, beziehungsweise der Negativkontrollen, im Doppelansatz aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert. Die Verdünnung der Proben erfolgte im Bereich von 1:70 bis 1:980 in PBS. Nach erneuter Waschung, einstündiger Inkubation mit 100  $\mu$ l des Biotin-konjugierten Detektion-AKs und Spülung, wurden 100  $\mu$ l Avidin-HRP Lösung für 30 Minuten dazugegeben. Nach gründlicher Waschung erfolgte das Auftragen von 100  $\mu$ l der TMB Substrat Lösung. Die Platten wurden im Dunkeln maximal für 30 Minuten, beziehungsweise bis der Farbwechsel eintrat, inkubiert und die Reaktion anschließend mit 50  $\mu$ l 1M Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) gestoppt. Zuletzt wurde die Extinktion der Proben im Tecan ELISA Reader bei 450nm gemessen.

Die Extinktionswerte der Standardreihe für die verschiedenen Zytokine wurden auf der y-Achse gegen die vorgegebenen Standardkonzentrationen auf der x-Achse aufgetragen und eine Ausgleichskurve konstruiert. Im Anschluss konnten die Extinktionswerte der Proben anhand der ermittelten Standardkurven unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung bestimmt werden.

Zur Quantifizierung der Extinktionswerte des Komplementfaktors 5a wurde dagegen mit Hilfe der Software GraphPad Prism direkt eine logistische Regressionskurve mit 4 Parametern (4-PL) generiert und die entsprechenden Extinktionswerte der Proben interpoliert.

## **2.10 Präparation und IHC-Färbung der Epidermis**

Zur umfassenden Quantifizierung der epidermalen Immunzellen wurde die Präparation der Epidermis von der Haut der Ohren naiver Mäuse etabliert.

Dafür wurden die entnommenen Ohren in 0,01M PBS eingetaucht und für 4 Minuten mit Enthaarungscreme behandelt. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurde der Knorpel vom Ohr mit Pinzetten entfernt und jeweils ein Ohrenpaar einer Maus in eine Vertiefung einer six-well Platte mit jeweils 1,5ml 1M Ammoniumthiocyanat Lösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ohren erneut mit PBS gespült und mit Hilfe von Pinzetten konnte die Epidermis von der Dermis abgelöst werden. Die Epidermis wurden auf Superfrost Plus™ Adhesion Microscope Slides zur weiteren Prozessierung aufgetragen<sup>42</sup>

Die immunhistochemische Färbung sowie Auswertung der Epidermis erfolgte größtenteils nach dem oben beschriebenen Schema (Abschnitt 2.8). Ausschließlich die Inkubation des primären AKs sowie des Streptavidin-konjugierten Fluorophors erfolgte nicht bei RT, sondern bei 37°C.

## **2.11 Statistische Auswertung**

Alle Analysen der Originaldaten wurden mit GraphPad Prism 8 durchgeführt. Unter der Annahme, dass die Daten nicht normalverteilt sind, wurde für den Vergleich zweier Gruppen der Mann-Whitney-U Test verwendet. Der entsprechende Vergleich bei mehr als zwei Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis Test mit Dunnett's multiple comparison test geführt. Die Ergebnisse des passiven Tiermodelles der BP-ähnlichen EBA wurden mit einem 2-way analysis of variance (ANOVA) mit Holm-Sidak's multiple comparison test analysiert. Der Vergleich der beiden Tiergruppen in Bezug auf die histologische Auswertung der DES erfolgte durch den Fisher's exact test. Alle Daten werden in den Abbildungen als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) präsentiert. Der jeweils verwendete Test wurde in der Legende aufgeführt. Die analysierten Daten wurden ab einem p-Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Krankheitsaktivität der *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse im passiven EBA-Tiermodell

Der Verlauf der BP-ähnlichen EBA wurde in *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen mithilfe des passiven Tiermodells über 14 Tage vergleichend beobachtet. Nach Injektion von anti-COL7 IgG begannen beide Gruppen innerhalb der ersten vier Tage Zeichen einer Hautschädigung durch die Erkrankung zu entwickeln (Abbildung 8, A/B). Die Entzündungsreaktion setzte sich weiter fort, bis sie ab Tag 9 ein Plateau erreichte. Im gesamten beobachteten Zeitraum zeigten sich die *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse stärker von der EBA betroffen als die WT Mäuse (Abbildung 8, A). Zum Zeitpunkt der Plateauphase der Erkrankung hat die Hautsymptomatik mit 8% ungefähr doppelt so viel Prozent an betroffener Körperoberfläche (ABSA) in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen eingenommen als in der Vergleichsgruppe mit 4%. Erosionen, Krusten, Hautrötung und Haarausfall sind in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen deutlich an Tag 9 zu erkennen (Abbildung 8, B).

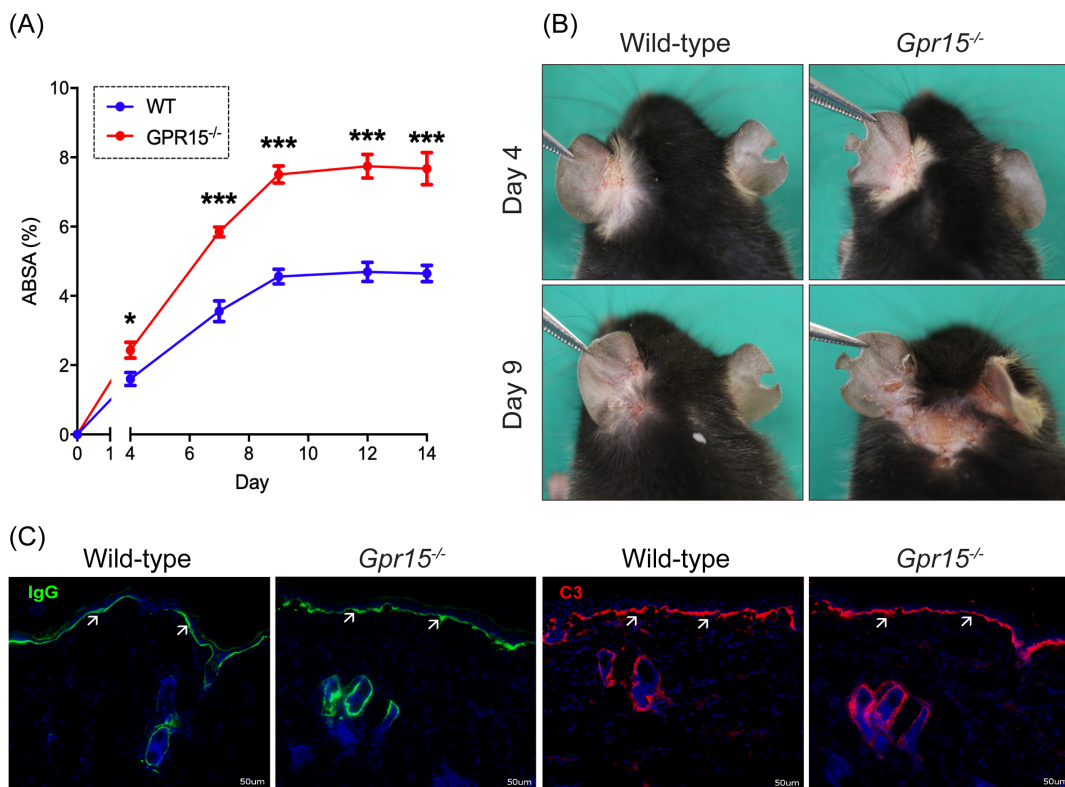


Abbildung 8: **GPR15 supprimiert die EBA-Symptomatik im passiven Tiermodell.** Der Verlauf der Hauterkrankung wurde zwischen *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen verglichen. (A) Das Fortschreiten der Erkrankung ist als prozentualer Anteil des Areals der betroffenen Körperoberflächen (ABSA) über einen Zeitraum von 14 Tagen dargestellt. (B) Die Fotos der *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäuse repräsentieren den Krankheitsverlauf an Tag 4 und Tag 9 des Experimentes. (C) Die DIF von periläsionärer Haut zeigt die mit weißen Pfeilen indizierte lineare Deposition von IgG (grün) in den linken sowie von C3 (rot) in den rechten Bildern. Angegeben für die ASBA sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 10 Mäuse je Gruppe. Die Daten wurden in drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten erhoben. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels 2-way ANOVA mit Holm-Sidak's multiple comparison test an dem jeweils angegeben Tag. \*, p < 0.05; \*\*\*, p < 0.001



Um die Spezifität der Entzündungsreaktion darzustellen, wurden sowohl das injizierte anti-COL7 IgG als auch C3 in der periläsionären Haut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz (DIF) angefärbt. In beiden Gruppen lagerten sich die Marker deutlich linear an der DEJ ab (Abbildung 8, C). Dies bestätigt eine erfolgreiche Induktion der EBA im passiven Tiermodell.

In der Histopathologie läsionärer Haut von Tag 14 des Experimentes zeigte sich in beiden Gruppen eine deutliche Zellinfiltration in der Dermis und eine Spaltbildung an der DEJ (Abbildung 9, A). Letztere spiegelt die aufgezeigten klinischen Zeichen der Blasenbildung und nachfolgenden Erosion der BP-ähnlichen EBA wider. In der Haut der *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse war die Separation von Dermis und Epidermis signifikant häufiger zu beobachten (Abbildung 9, B). Der Verlust von GPR15 verschlechtert demzufolge die Symptomatik der BP-ähnlichen EBA im passiven Tiermodell und führt zur verstärkten Spaltung von Epidermis und Dermis.

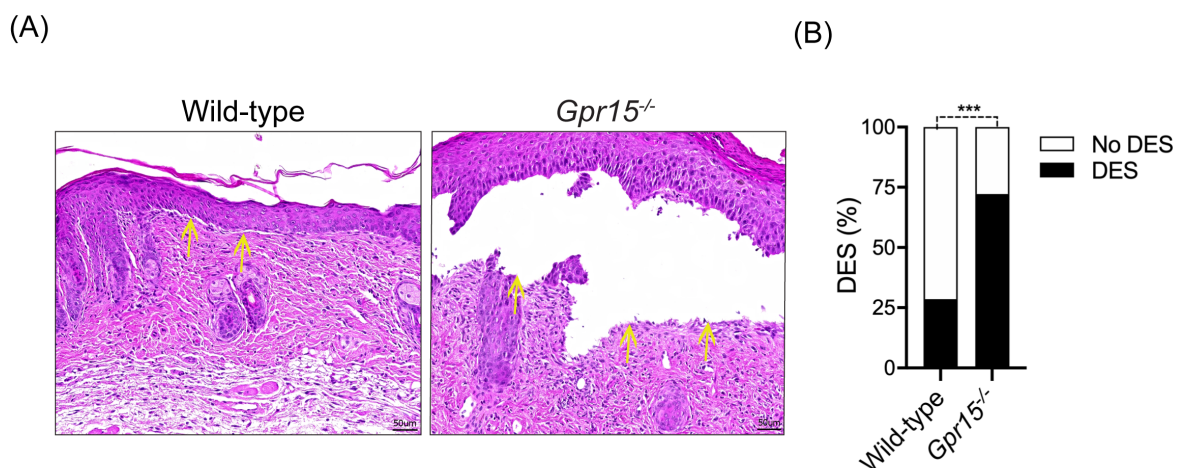


Abbildung 9: **GPR15 verringert die EBA-typische Spaltbildung an der DEJ.** Analyse der Histopathologie der Haut von Tag 14 des passiven EBA Modells. (A) Die Bilder in der H&E Färbung zeigen läsionale Haut der *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäuse. Die dermale-epidermale Separation (DES) wird durch die gelben Pfeile verdeutlicht. (B) Quantifizierung der DES als prozentuales Auftreten einer Spaltbildung auf den Bildern der jeweiligen Gruppe, n = 5-7 Mäuse je Gruppe, erhoben in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Der statistische Vergleich erfolgte mittels Fisher's exact test. \*\*\*, p < 0.001

### 3.2 Klassifikation des dermalen Infiltrates

Zur weiteren Differenzierung des in der Histopathologie ersichtlichen dermalen Infiltrates wurden nachfolgend verschiedene immunhistochemische Färbungen an periläsionärer, dorsaler Rückenhaut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14 nach Induktion der EBA durchgeführt.

Zur Darstellung der Neutrophilen wurde das Markerprotein Ly6G angefärbt. In beiden untersuchten Gruppen konnte eine dermale Infiltration gleichermaßen dargestellt werden (Abbildung 10, B/C). Ebenso zeigte sich ein vermehrtes, jedoch gleichwertiges Vorkommen von Makrophagen, markiert als F4/80<sup>+</sup> Zellen, in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> sowie WT Mäusen (Abbildung 10, E/F). Diese Beobachtungen sind mit den mRNA Expressionsleveln des granulären Proteins der Neutrophilen, *Ngp*, und dem Gen für F4/80, *Adgre1*, vereinbar (Abbildung 10, A/D). Die für die efferente Phase der EBA typischen Zytokine *Il1β*, *Tnfa*, *CXCL1*, *CXCL2*, *Il17a* und *Il6* zeigten in der qPCR-Analyse an Tag 14 des Experimentes keine Unterschiede (Abbildung 10, G).

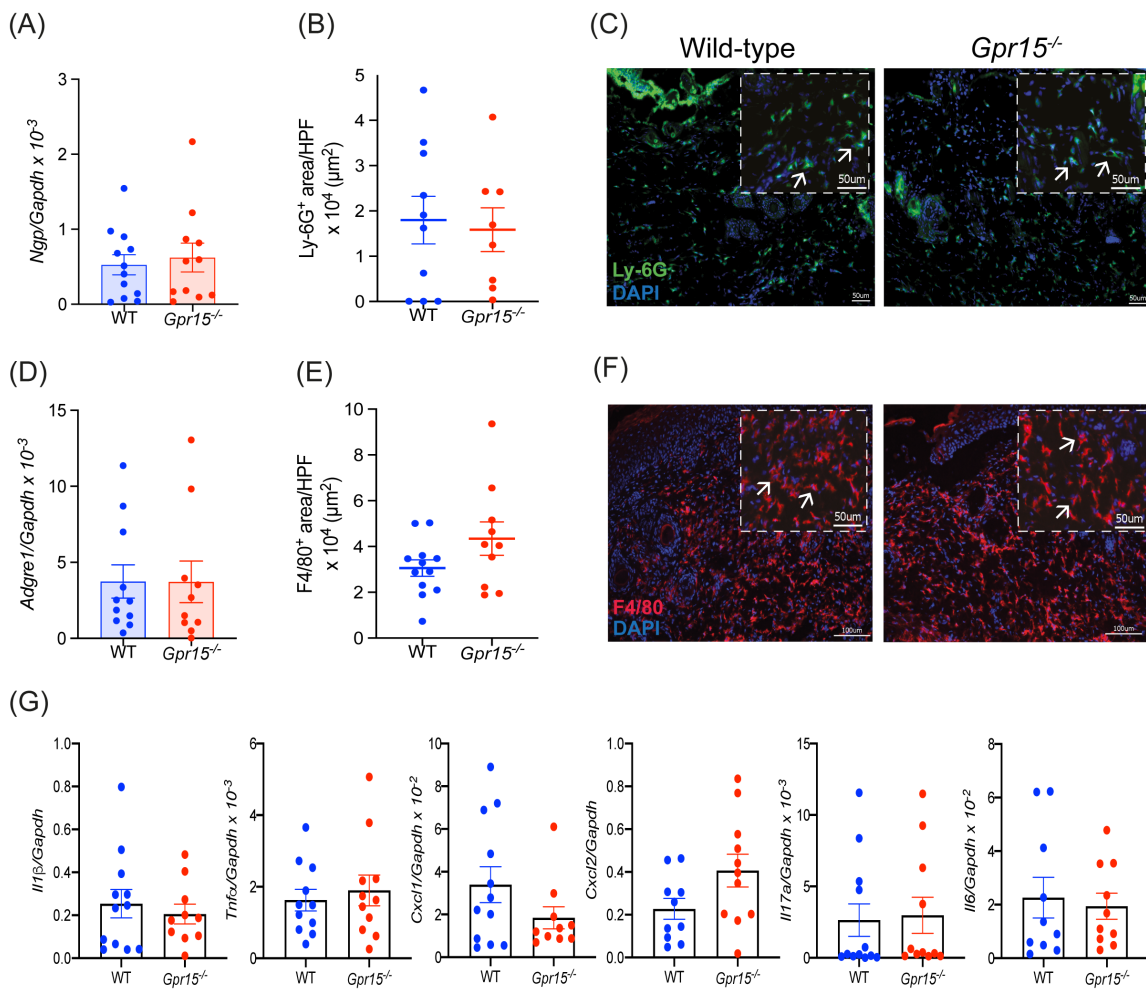


Abbildung 10: **Quantifizierung der infiltrierenden Granulozyten in perilesionärer Haut.** Die Akkumulation von Ly6G<sup>+</sup> und F4/80<sup>+</sup> Zellen wurde in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen an Tag 14 des Tierexperimentes evaluiert. Es sind die mRNA-Expressionslevel von *Ngp* (A) und *Adgre1* (D) angegeben. Quantifizierung von Ly6G<sup>+</sup> (B) und F4/80<sup>+</sup> (E) Zellen. Repräsentative Bilder der Ly6G (C) und F4/80 (F) Färbungen. In gestrichelten Linien ist eine dreifache Vergrößerung des dermalen Bereiches gezeigt. Die weißen Pfeile markieren Beispiele für positiv angefärbte Zellen. (G) Darstellung der mRNA Expressionslevel von *Il1β*, *Tnfa*, *CXCL1*, *CXCL2*, *Il17a* und *Il6*. Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte ± SEM, n = 10-12 Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test.

Neben Granulozyten spielen Lymphozyten über die Modulation der Akkumulation und Aktivität der Neutrophilen in der Pathogenese der Krankheitssymptomatik eine Rolle. Die Anzahl CD3<sup>+</sup> T-Zellen ist in der Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse an Tag 14 des Experimentes signifikant vermindert (Abbildung 11, A). Dabei unterscheidet sich jedoch nicht die Menge der dermalen, sondern diejenige, der epidermalen T-Zellen (Abbildung 11, B/C/D). Zur Unterscheidung zwischen  $\alpha\beta$ T oder  $\gamma\delta$ T-Zellen wurden Doppelfärbungen mit CD3 und den jeweiligen Korezeptoren etabliert. Es ist eine deutliche Reduktion von epidermalen CD3<sup>+</sup>  $\delta$  TCR<sup>+</sup> Zellen, den DETCs, zu beobachten. In den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen sind DETCs, auf den Aufnahmen mit gelben Pfeilen markiert, nur vereinzelt vorhanden oder fehlen gänzlich (Abbildung 11, D/E).

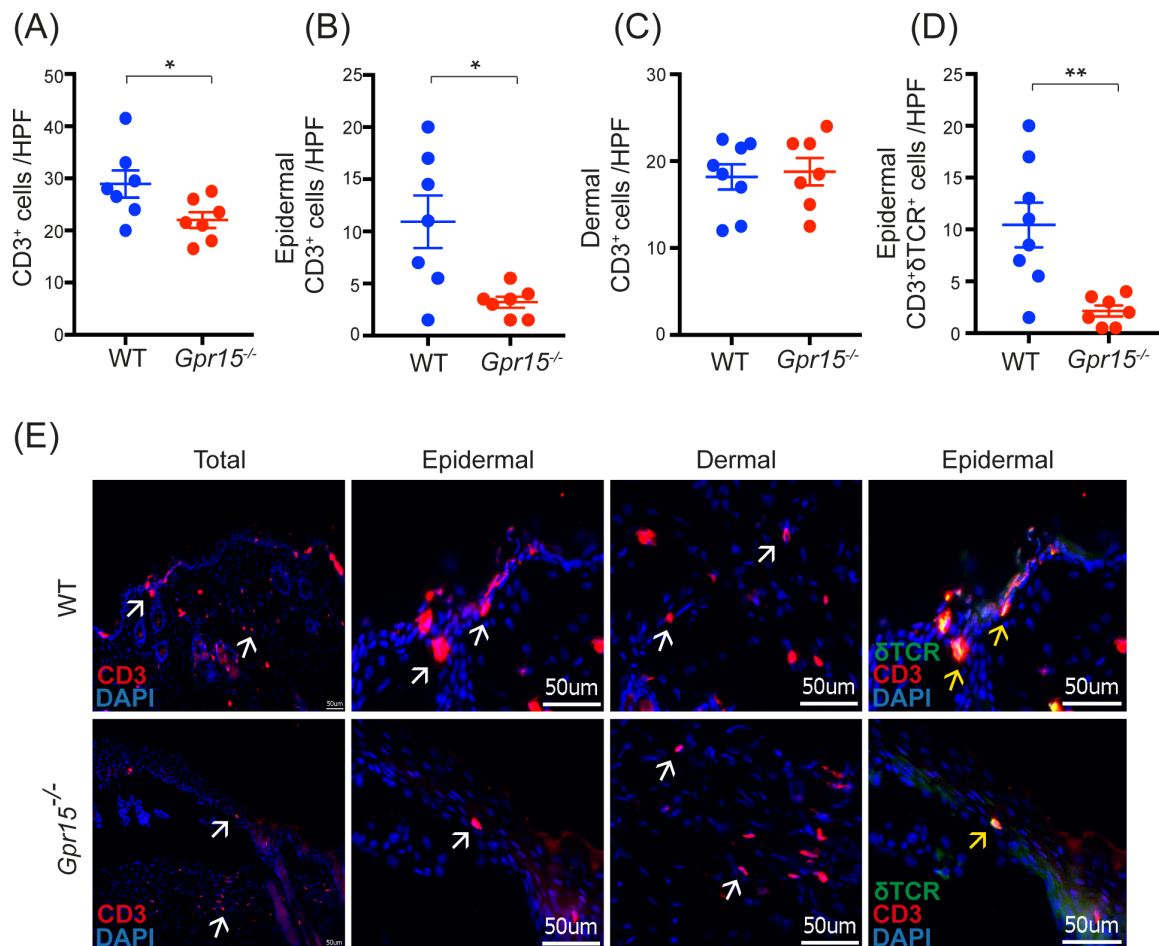


Abbildung 11: **Auftreten und Verteilung von T-Zellen in periläsionärer Haut.** Das Vorkommen von CD3<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis und Dermis wurde in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen an Tag 14 des Tierexperimentes untersucht. Quantifizierung CD3<sup>+</sup> Zellen in (A) der gesamten Hautbreite, (B) der Epidermis und (C) der Dermis. (D) Evaluation von epidermalen CD3<sup>+</sup>  $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen. (E) Immunhistochemische Bilder der angefärbten T-Zellen. Von der Epidermis und Dermis sind jeweils dreifach vergrößerte Aufnahmen gezeigt. Die weißen Pfeile zeigen CD3<sup>+</sup>, die gelben Pfeile CD3<sup>+</sup>  $\delta$ TCR<sup>+</sup> doppelt positiv angefärbte Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n= 7-8 Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \* < 0.05; \*\*, p < 0.01

Im Gegensatz dazu verhält es sich mit der für das Krankheitsgeschehen relevanten Infiltration der dermalen  $\gamma\delta$  T-Zellen genau andersherum. In den WT Mäusen akkumulierten an Tag 14 des Experimentes mit durchschnittlich 6 Zellen pro HPF signifikant weniger  $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen als in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen mit 9 Zellen pro HPF (Abbildung 12, A/B).

Ebenfalls über die Kommunikation mit Neutrophilen wirken T<sub>regs</sub> supprimierend auf die lokale Entzündungsreaktion in der EBA. Die T<sub>regs</sub> sind als CD4<sup>+</sup>βTCR<sup>+</sup> Zellen zu klassifizieren, die als spezifisches Merkmal den Transkriptionsfaktor FOXP3 exprimieren. Weder die Quantifizierung von CD4<sup>+</sup>βTCR<sup>+</sup> Zellen noch die von FOXP3<sup>+</sup> Zellen zeigte einen Unterschied im Vergleich zwischen *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen (Abbildung 12, A/C/D). Auch die mRNA Expressionslevel von Foxp3 sowie Tgfb1 und Il-10, als die zwei typischen Schlüsselzytokine der T<sub>regs</sub>, zeigten sich gleichwertig (Abbildung 12, E).

CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind an Tag 14 des Experimentes weder in die Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> noch in die der WT Mäuse in relevantem Ausmaß eingewandert (Abbildung 13, A/B).

Zusammenfassend akkumulieren in *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 14 der EBA vermehrt  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Dermis bei gleichzeitigem Defizit von DETCs in der Epidermis.

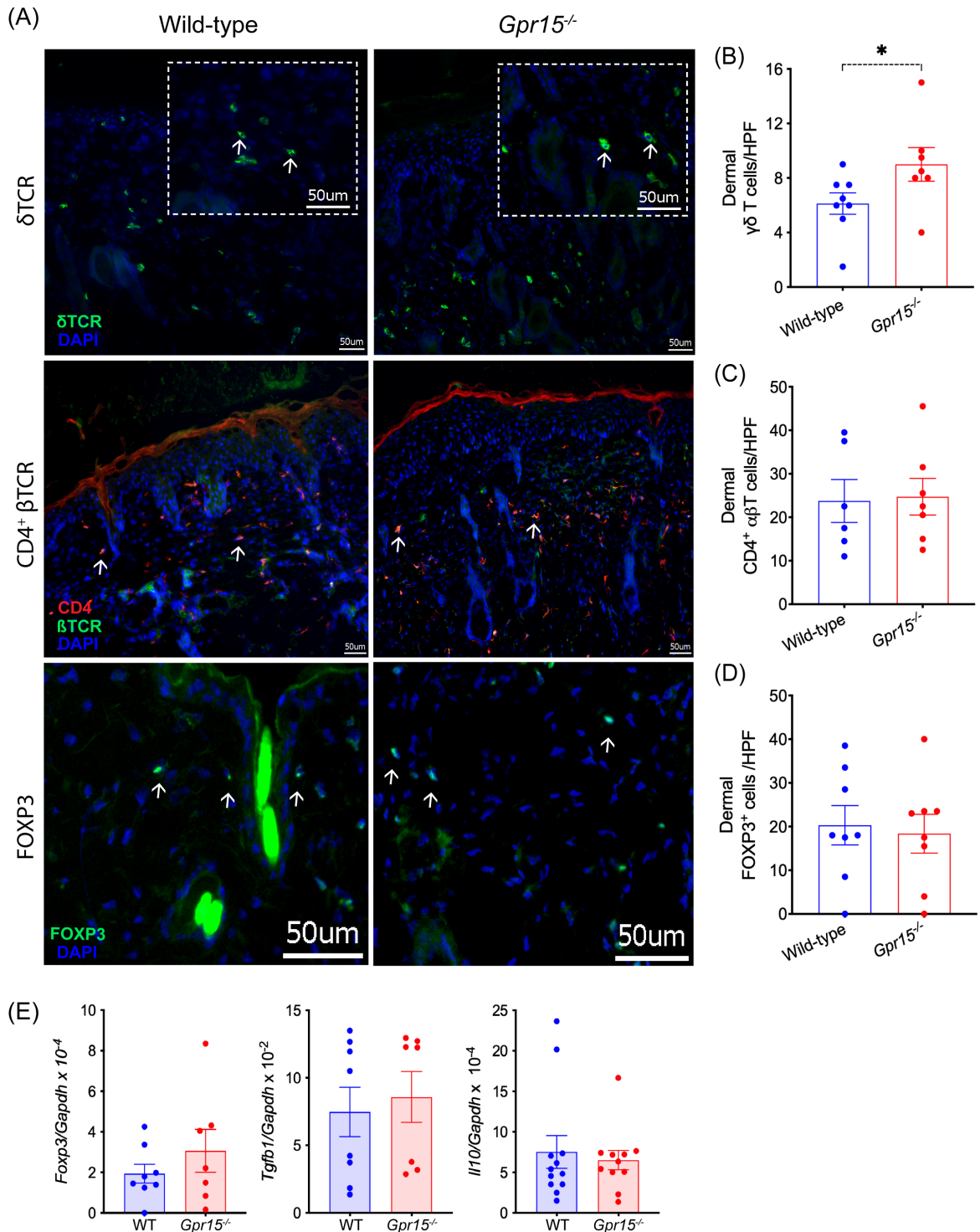


Abbildung 12: **Quantifizierung der infiltrierenden T-Zellen in periläsionärer Haut.** Das dermale Infiltrat von  $\gamma\delta$ T,  $CD4^+\alpha\beta$ T und  $FOXP3^+$  Zellen wurde in *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14 des passiven EBA Modells untersucht. (A) Repräsentative Bilder der  $\delta$ TCR<sup>+</sup> (oben),  $CD4^+\beta$ TCR<sup>+</sup> (mitte) und  $FOXP3^+$  Zellfärbungen (unten). Die  $FOXP3^+$  Färbung sowie die gestrichelten Bildeinsätze zeigen dermale Bereiche in dreifacher Vergrößerung. Die weißen Pfeile weisen auf positiv angefärbte Zellen hin. Auszählung der dermalen (B)  $\delta$ TCR<sup>+</sup>, (C)  $CD4^+\beta$ TCR<sup>+</sup> und (D)  $FOXP3^+$  Zellen. (E) Es sind die mRNA-Expressionslevel von *Foxp3*, *Tgfb1* und *Il10* aufgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt,  $n = 6-12$  Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Der statistische Vergleich erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \*,  $p < 0.05$



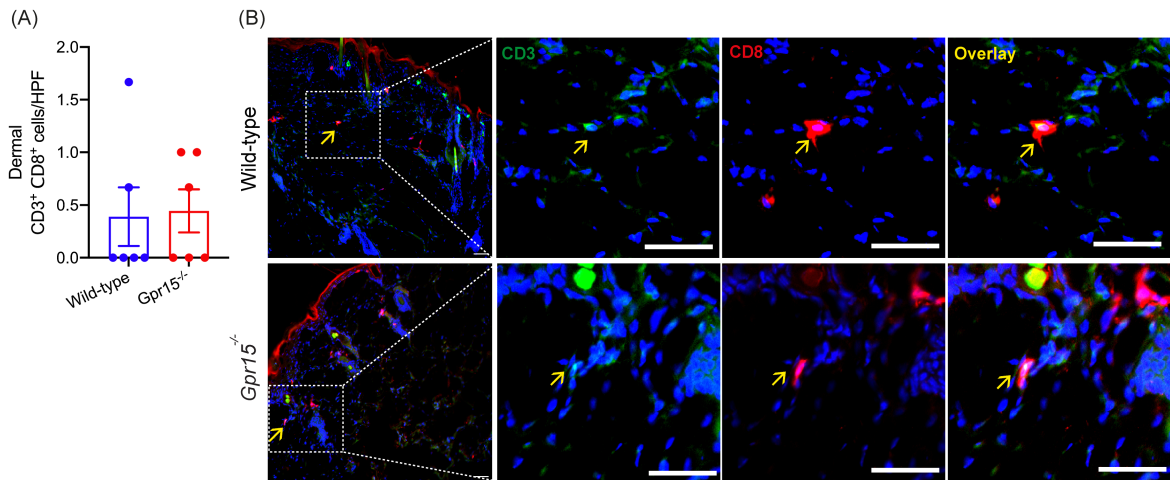


Abbildung 13: **Quantifizierung von infiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in periläsionärer Haut.** Das dermale Infiltrat von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen an Tag 14 des passiven EBA Modells wurde untersucht. (A) Auszählung der dermalen CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen. (B) Immunhistochemische Bilder der Doppelfärbung. In gestrichelten Linien werden dreifach vergrößerte Ausschnitte gezeigt. Die gelben Pfeile weisen auf doppelt positiv gefärbte Zellen hin. Der Maßstab beträgt 50µm. Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte ± SEM, n = 6 Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test.

### 3.3 Expression von GPR15 und seinem Liganden in muriner Haut

Die Begutachtung der mRNA Expressionslevel von GPR15 und seinem Liganden GPR15L in der Haut von naiven, gesunden Mäusen im Vergleich zu den Leveln in periläsionärer Haut an Tag 14 nach Induktion der EBA zeigte eine gegensätzliche Regulation der beiden Gene.

Während GPR15 mRNA in der Haut naiver WT Mäuse in relativ hohem Ausmaß exprimiert wurde, ist die Expression während des entzündlichen Geschehens signifikant niedriger (Abbildung 14, A). Dagegen ist der Ligand, GPR15L, in naiver Haut kaum detektierbar, aber wiederum durch die Erkrankung deutlich hochreguliert. Die mRNA Expressionslevel des Liganden unterscheiden sich zwischen *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen quantitativ nicht (Abbildung 14, B).

GPR15L fördert in vitro die Proliferation von Keratinozyten. Daher wurde zur Bewertung der Proliferation der Keratinozyten in der Epidermis von *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen an Tag 14 der EBA der Proliferationsmarker Ki-67 in der periläsionären, dorsalen Rückenhaut bestimmt. Dieser ist in der Epidermis der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant häufiger detektierbar (Abbildung 9, A/B). In einem HPF sind in *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen im Durchschnitt 80 mit weißen Pfeilen markierte epidermale Ki-67<sup>+</sup> Zellen auszuzählen, wohingegen es in der WT Epidermis 50 Ki-67<sup>+</sup> Zellen pro HPF sind (Abbildung 15, B).

Die Evaluation der mRNA Expressionslevel der Keratinozytenproliferationsmarker Fibroblast growth factor (Fgf)7, Fgf10 und Insulin-like growth factor (Igf)1 wies jedoch keinen Unterschied zwischen den Mäusen auf (Abbildung 15, E).

Als antimikrobielles Peptid fördert GPR15L außerdem die Wundheilung. Zur Quantifizierung dieses Prozesses in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen wurde Hyaluronsäure, welche vermehrt während der Wundheilung produziert wird, mithilfe von Alcianblau angefärbt. An Tag 14 des Experimentes ist in der Haut der klinisch kränkeren *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant weniger Blaufärbung zu erkennen (Abbildung 15, C/D). Es ist demzufolge eine geringere Menge der bei der Wundheilung produzierten Hyaluronsäure in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen vorhanden. In gleicher Weise zeigte sich bei der Analyse der mRNA Expressionslevel der beiden Marker für antientzündlich wirkende Makrophagen vom M2-Phänotyp, Arginase (Arg)1 und Found in Inflammatory Zone (Fizz)1, im Vergleich zu WT Mäusen eine minimale Tendenz zu geringeren Leveln in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 15, F).

Die stärker erkrankten *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse weisen somit bei gleichen Leveln an GPR15L an Tag 14 der EBA kaum Hinweise für eine aktive Wundheilung, aber eine stärkere epidermale Keratinozytenproliferation als die weniger betroffenen WT Mäuse auf.

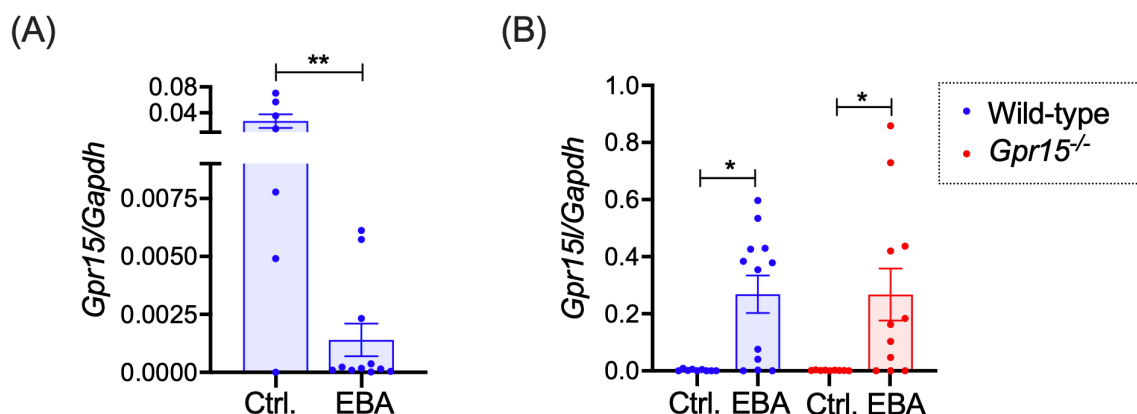


Abbildung 14: **GPR15 und GPR15L mRNA Expression in periläsionärer Haut.** Es wurden die mRNA Expressionslevel in naiver Haut gesunder Mäuse sowie von periläsionärer Haut von erkrankten Mäusen an Tag 14 der EBA bestimmt. (A) GPR15 mRNA Expressionslevel in WT Mäusen. (B) GPR15L mRNA Expressionslevel in WT und *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert, n = 6-12 Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten. Die Gruppen wurden in (A) mit dem Mann-Whitney-U Test und in (B) mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunnett's multiple comparison test statistisch ausgewertet. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01

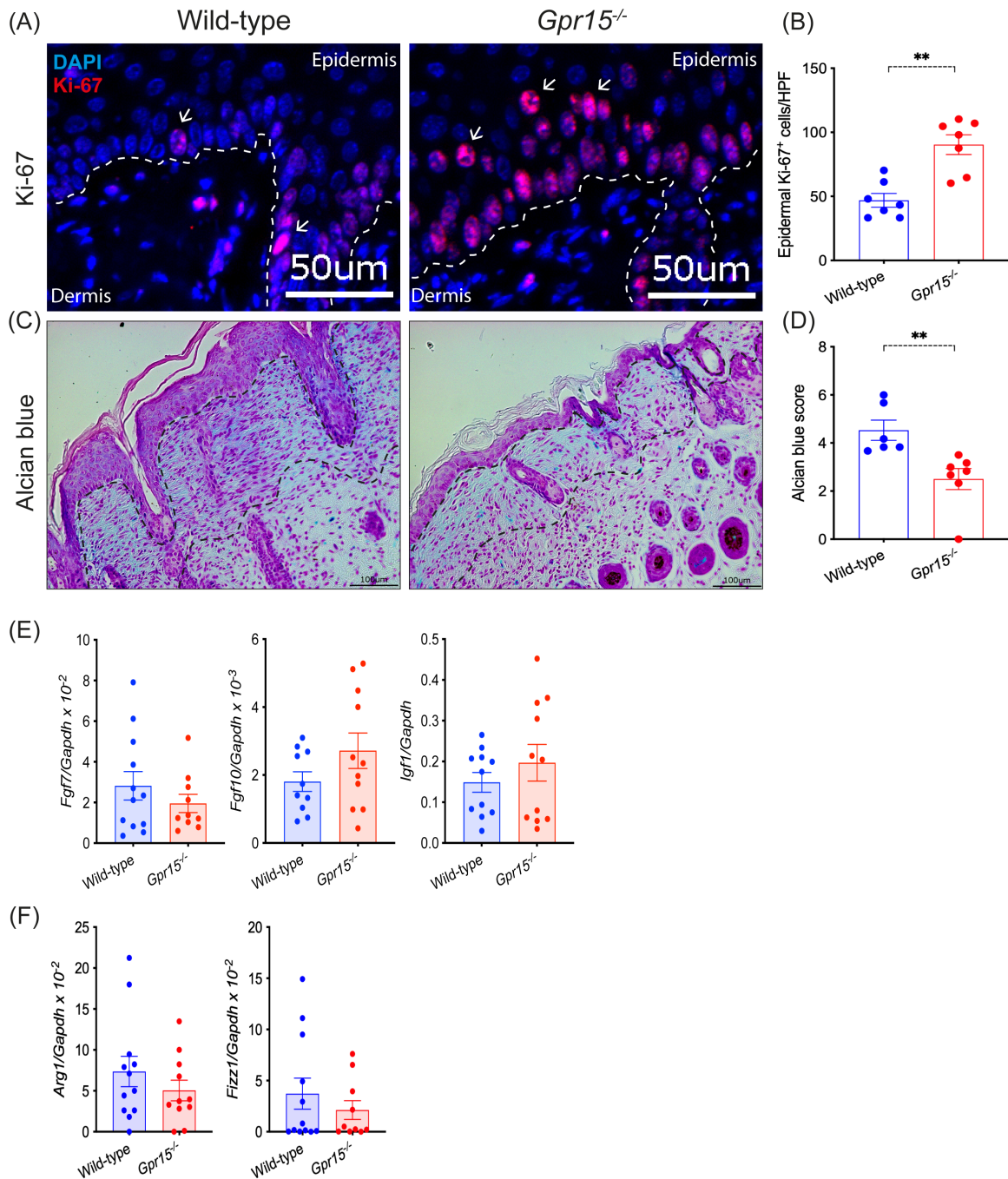


Abbildung 15: ***Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse weisen eine verstärkte Keratinozytenproliferation bei gleichzeitig weniger Zeichen einer aktiven Wundheilung auf.** Die Verteilung des Proliferationsmarkers Ki-67 in der Epidermis sowie von Hyaluronsäure in der gesamten Haut wurde in *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14 des Tierexperimentes evaluiert. (A) Repräsentative Bilder der Ki-67 Färbung in perilesionärer Haut. Die Aufnahmen sind in vierfacher Vergrößerung gezeigt. Die weiße gestrichelte Linie markiert die DEJ. Die weißen Pfeile deuten auf positiv angefärbte Zellen. (B) Quantifizierung von Ki-67+ Zellen in der Epidermis pro HPF. (C) Repräsentative Bilder der Alcianblau Färbung in perilesionärer Haut. (D) Semi-quantitative Analyse der Intensität und der angefärbten Arealgröße der Alcianblau-Färbung. (E) Fgf7, Fgf10 und Igf1 mRNA Expressionslevel. (F) Arg1 und Fizz1 mRNA Expressionslevel. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM präsentiert, n = 6-12 Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \*\*, p < 0.01



### 3.4 Systemische Expression von GPR15

Nach der Evaluation der lokalen Effekte von GPR15 in der Haut der *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäuse wurde systemisch die Expression von GPR15 in verschiedenen lymphoiden Organen und im peripheren Blut mittels Durchflusszytometrie analysiert. Durch den Ersatz des *Gpr15* Genes durch das Gen für GFP in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen lässt sich die GPR15<sup>+</sup> Population mit der in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen zu detektierenden GFP<sup>+</sup> Population gleichsetzen.

Demzufolge wurde ausgehend von der gesamten Zellmasse zunächst für einzelne, lebende (DAPI<sup>-</sup>) Zellen gated und anschließend deren GFP Signal bestimmt. Dabei wurde die Frequenz der GFP<sup>+</sup>, beziehungsweise der GPR15<sup>+</sup>, Zellpopulation in den inguinalen Lymphknoten und in der Milz an Tag 14 nach Induktion der EBA vergleichend zum naiven Status betrachtet (Abbildung 17). Unter naiven, also gesunden Konditionen zeigten  $\pm$  2-3% der lebenden Zellen sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz eine Expression von GFP beziehungsweise GPR15. In den Lymphknoten wurde an Tag 14 der EBA eine Erhöhung dieses Prozentsatzes auf  $\pm$  4-6% beobachtet (Abbildung 16, A/B).

Zur weiteren Charakterisierung wurde diese GPR15<sup>+</sup> Zellpopulation mit dem T-Zellmarker CD3 und dem B-Zellmarker CD19 angefärbt (Abbildung 17). Während sich im gesunden Zustand die GPR15<sup>+</sup> Zellen vor allem CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> zeigten, exprimierte der Großteil der GPR15<sup>+</sup> Zellen an Tag 14 des Experimentes CD3. Eine Koexpression von GPR15 und CD19 konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Abbildung 16, C/D).

Zur weiteren Differenzierung der GPR15<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Zellpopulation an Tag 14 wurde die Expression von CD8 und CD4 gemessen (Abbildung 17). GPR15 wurde zum überwiegenden Teil auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert (Abbildung 16, E/F).

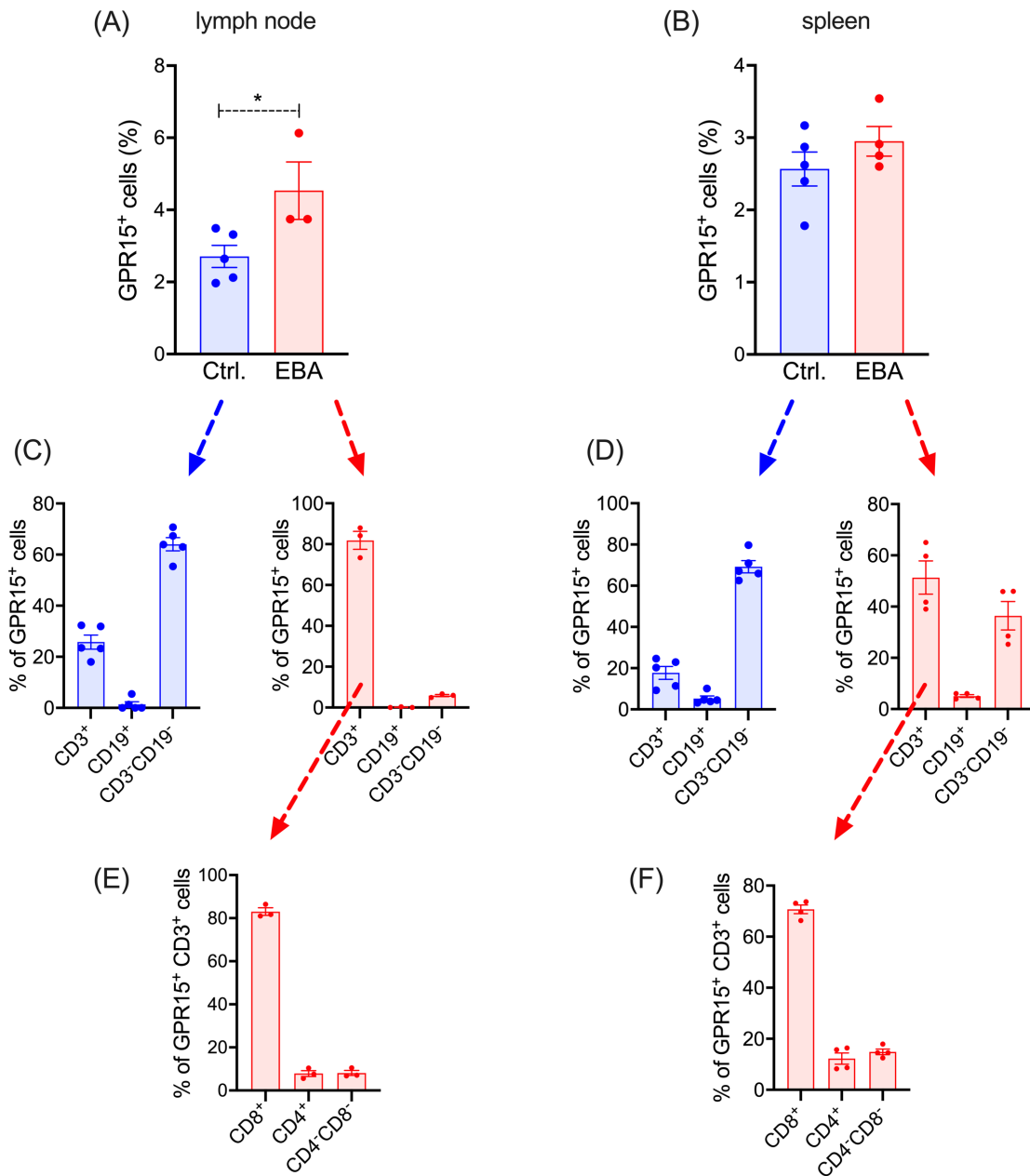


Abbildung 16: **Systemische Expression von GFP in der EBA.** Quantifizierung der GFP<sup>+</sup> Zellen in (A) inguinalen Lymphknoten und (B) der Milz von gesunden (control/Ctrl.) und erkrankten *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 14 nach Induktion der EBA mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Relativer Anteil der GFP<sup>+</sup> Zellen innerhalb von T(CD3<sup>+</sup>), B(CD19<sup>+</sup>) und nicht-lymphozytären (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>) Zellen in gesunden und erkrankten *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 14 des Experimentes in (C) inguinalen Lymphknoten und (D) der Milz. Relative Verteilung der GFP<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in gesunden und erkrankten *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 14 des Experimentes in (E) inguinalen Lymphknoten und (F) der Milz. Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte ± SEM, n = 3-4 Mäuse pro Gruppe. Die statistische Analyse erfolgte in (A/B) mittels Mann-Whitney-U test. \*, p < 0.05

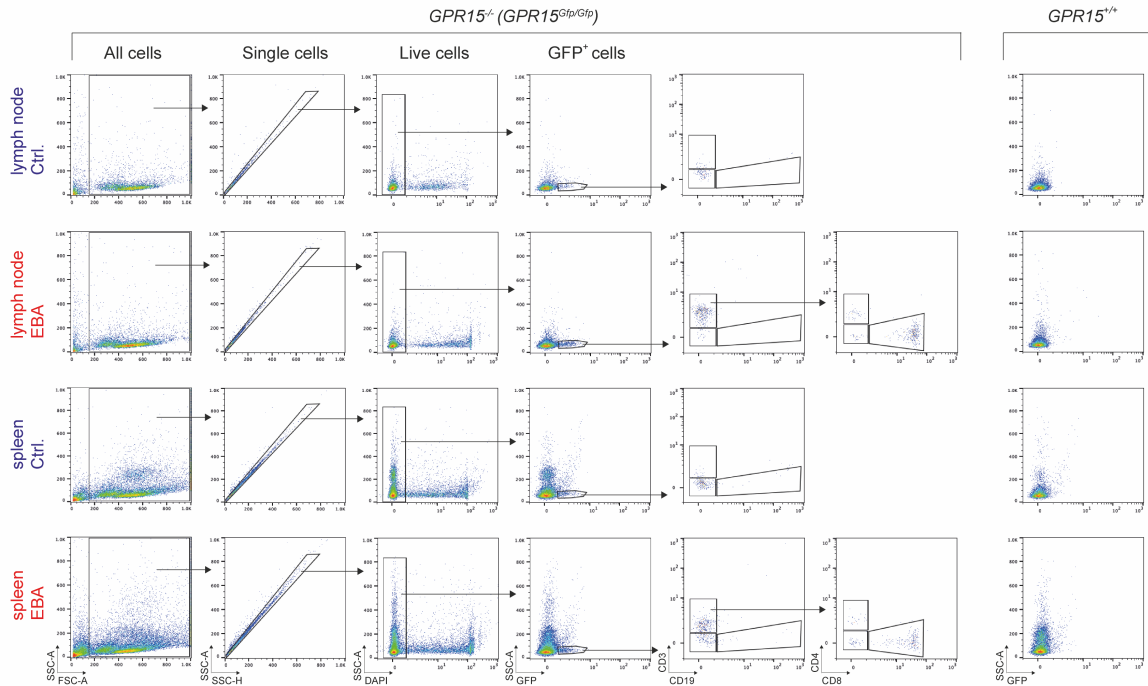


Abbildung 17: **Gating Strategie zur Detektion und Analyse von GFP.** Es wird die Gating Strategie zur GFP Detektion in inguinalen Lymphknoten und in der Milz von *Gpr15*<sup>-/-</sup> (*Gpr15*<sup>gfp/gfp</sup>) Mäusen vor und nach Induktion der EBA an Tag 14 illustriert. Die anschließende Analyse der Expression von CD3 und CD19 innerhalb der GFP<sup>+</sup> Population wird gezeigt, ebenso wie die Verteilung von CD4 und CD8 innerhalb der GFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Population an Tag 14. Als negative Kontrollgruppe wurden WT (*Gpr15*<sup>+/+</sup>) Mäuse genutzt.

Darüber hinaus wurden die Populationen von T<sub>regs</sub> und  $\gamma\delta$ T-Zellen in inguinalen Lymphknoten und in der Milz an Tag 14 des Experimentes auf die Expression von GPR15 untersucht. T<sub>regs</sub> wurden durchflusszytometrisch als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> definiert und im Anschluss wurde das GFP Signal der so detektierten T<sub>reg</sub> Population analysiert (Abbildung 19, A). Wie in der Haut zeigte sich weder in den Lymphknoten noch in der Milz ein Unterschied hinsichtlich der Anzahl von T<sub>regs</sub> zwischen *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen (Abbildung 18, A). Eine GFP beziehungsweise GPR15 Expression konnte auf  $\pm$  5-7% der T<sub>regs</sub> jeweils in den Lymphknoten und in der Milz detektiert werden (Abbildung 18, B).

In der CD3<sup>+</sup> $\delta$ T<sup>+</sup> Zellpopulation nahmen die GPR15<sup>+</sup> Zellen einen höheren Prozentanteil von durchschnittlich  $\pm$  15-20% sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz ein (Abbildung 19, B; Abbildung 18, D). Die Gesamtmenge an  $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte dagegen keinen Unterschied zwischen *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen (Abbildung 18, C).

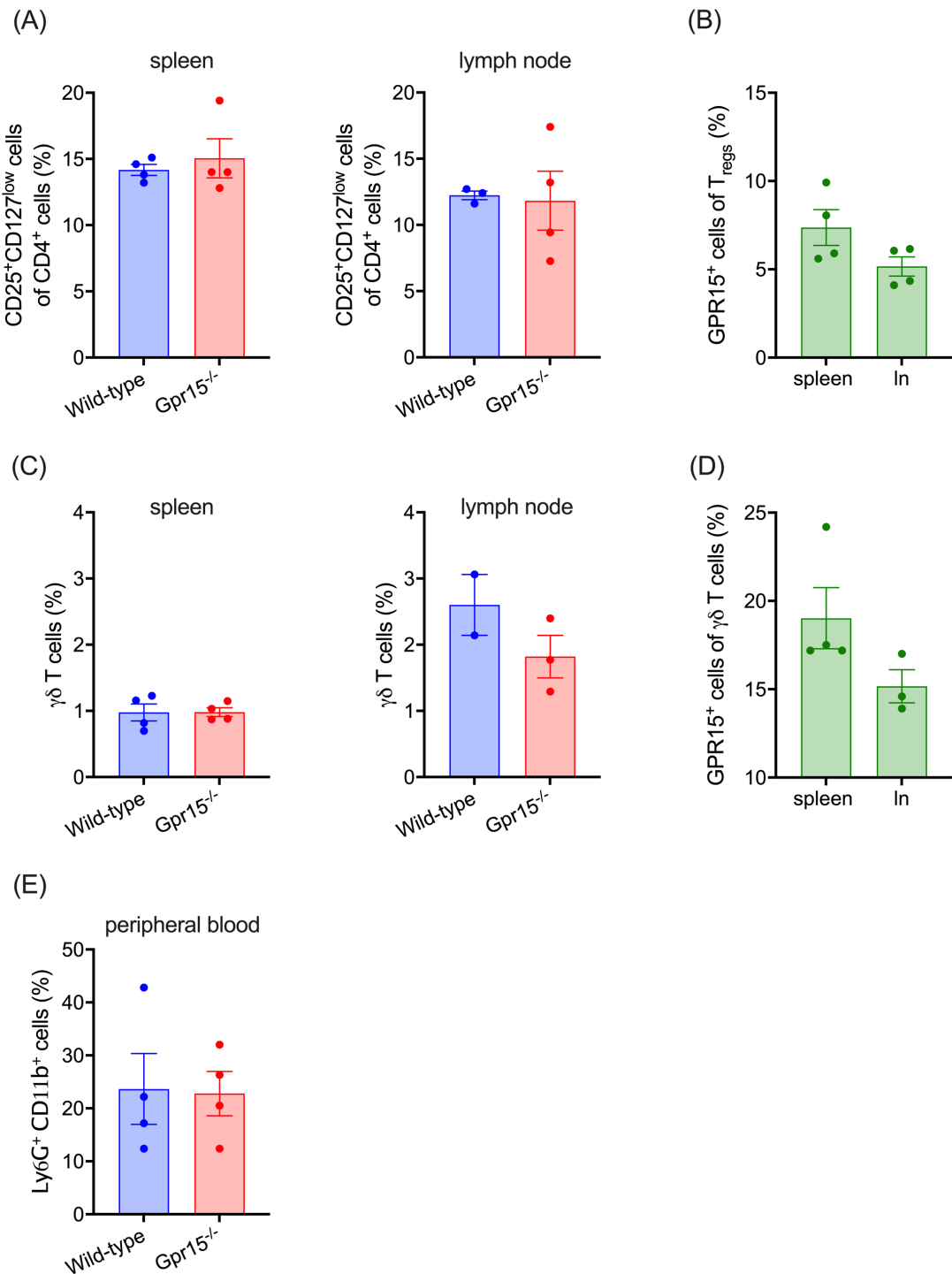


Abbildung 18: **Expression von GFP auf T<sub>regs</sub>,  $\gamma\delta$ T-Zellen und Neutrophilen.** (A) Relative Anzahl von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen von allen gemessenen CD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz und in inguinalen Lymphknoten von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14 des Experimentes, erhoben mittels Durchflusszytometrie. (B) Prozentsatz von GFP<sup>+</sup> Zellen von allen detektierten T<sub>regs</sub> in der Milz und in den Lymphknoten. (C) Anteil von CD3<sup>+</sup> $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Milz und in inguinalen Lymphknoten von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14. (D) Quote von GFP<sup>+</sup> Zellen von allen detektierten  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten. (E) Quantifizierung von Neutrophilen im peripheren Blut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert, n = 2-4 Mäuse pro Gruppe, und wurden statistisch mittels Mann-Whitney-U test verglichen.

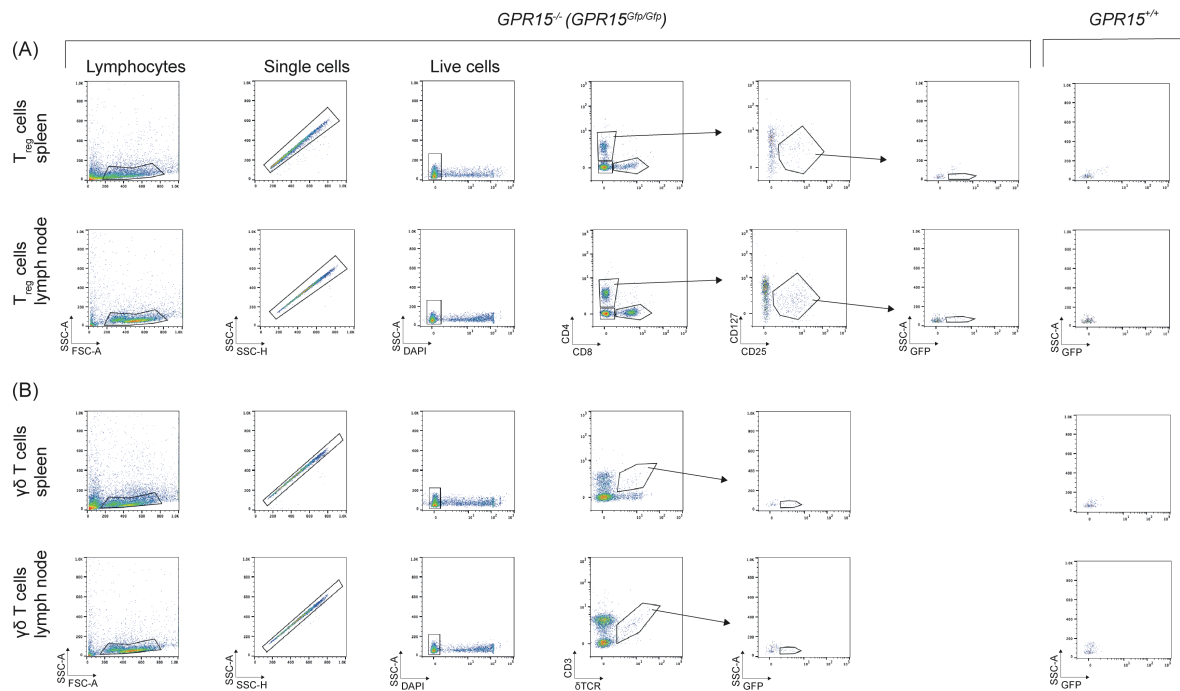


Abbildung 19: **Gating Strategie zur systemischen Detektion und Analyse von T<sub>regs</sub> und  $\gamma\delta$ T-Zellen.** Es wurde in der Milz und in den inguinalen Lymphknoten an Tag 14 der EBA von (A) Lymphozyten, singulären und lebenden Zellen für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen und anschließend deren GFP Expression gated. In gleicher Weise wurde in (B) für CD3<sup>+</sup> $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen und deren GFP Expression gated. Als negative Kontrollgruppe wurden WT (*Gpr15*<sup>+/+</sup>) Mäuse genutzt.

Wie bereits in der Haut wurden auch Neutrophile Granulozyten, definiert als Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Population, an Tag 14 nach Induktion der EBA systemisch betrachtet (Abbildung 20, A). Im peripheren Blut wurden vergleichbare Mengen an Neutrophilen in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen detektiert (Abbildung 18, E). Es zeigte sich weder eine GFP Positivität bei Betrachtung der Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Population noch ein überlappendes Signal mit den jeweiligen Einzelmarkern (Abbildung 20, A/B).

Bei Betrachtung der GFP<sup>+</sup>, alias GPR15<sup>+</sup>, Population im peripheren Blut im SSC-A /FSC-A Plot kann diese deutlich im Bereich von lymphozytären Zellen an Tag 14 des Experimentes lokalisiert werden (Abbildung 20, C). Dies stimmt mit der Detektion von GPR15 auf überwiegend CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in den inguinalen Lymphknoten und in der Milz zum selben Zeitpunkt überein. Demzufolge lässt sich die systemisch detektierte GPR15<sup>+</sup> Population an Tag 14 nach Induktion der EBA zusammenfassend überwiegend als CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation beschreiben.

peripheral blood EBA

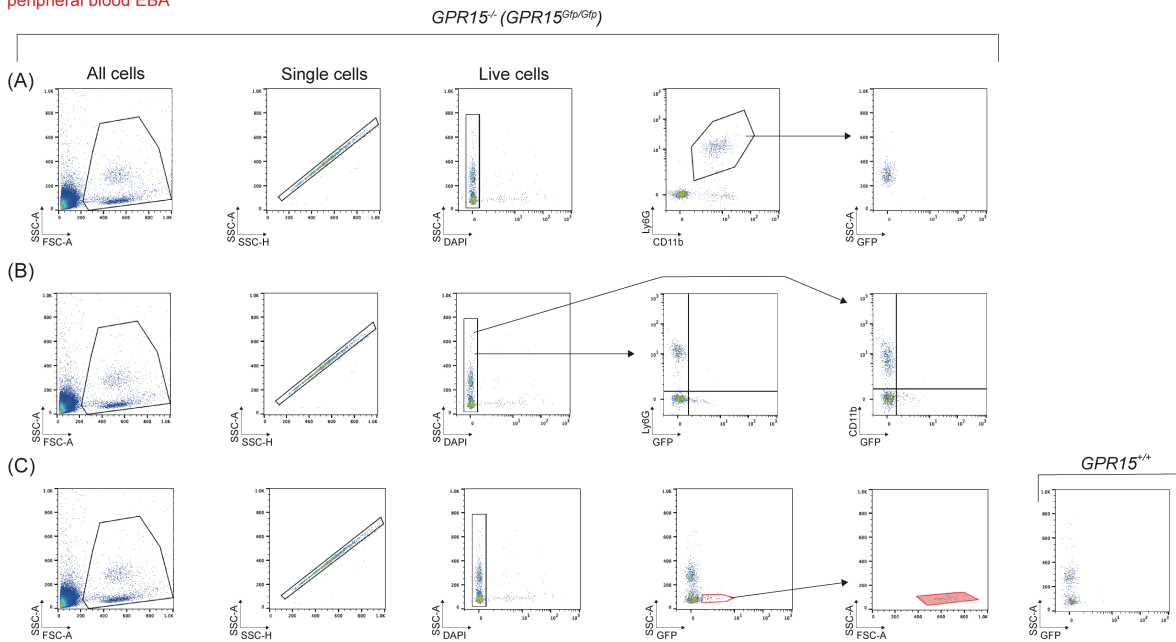


Abbildung 20: **GFP ist im peripheren Blut nicht auf Neutrophilen exprimiert.** Es wird ausgehend von allen, singulären, lebenden Zellen das Gating zu Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Neutrophilen und deren GFP Expression im peripheren Blut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen nach Induktion der EBA illustriert. (B) Overlay der Marker Ly6G beziehungsweise CD11b und GFP. (C) Die Lokalisation der GFP<sup>+</sup> Zellen im SSC-A/FSC-A Plot wurde in roter Farbe markiert. Als negative Kontrollgruppe wurden WT (*Gpr15<sup>+/+</sup>*) Mäuse genutzt.

Darüber hinaus wurde das systemische Zytokinmilieu mittels ELISA im Serum der Mäuse analysiert. Es konnte an Tag 14 des Experimentes keine Tendenz zwischen den entweder pro- oder antientzündlich wirkenden Signalmolekülen Il17a, Il6 und Tgfb1 in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen beobachtet werden (Abbildung 21, A/B/C). In Hinblick auf das Komplementsystem wurde eine merkliche Erhöhung von C5a im Serum der *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen an Tag 14 detektiert (Abbildung 21, E). Im naiven, gesunden Zustand beider Genotypen verhielten sich die Serum Level von C5a vergleichbar, sodass nicht von einer generellen spontanen Hyperaktivität des Komplementsystems in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen auszugehen ist (Abbildung 21, D).

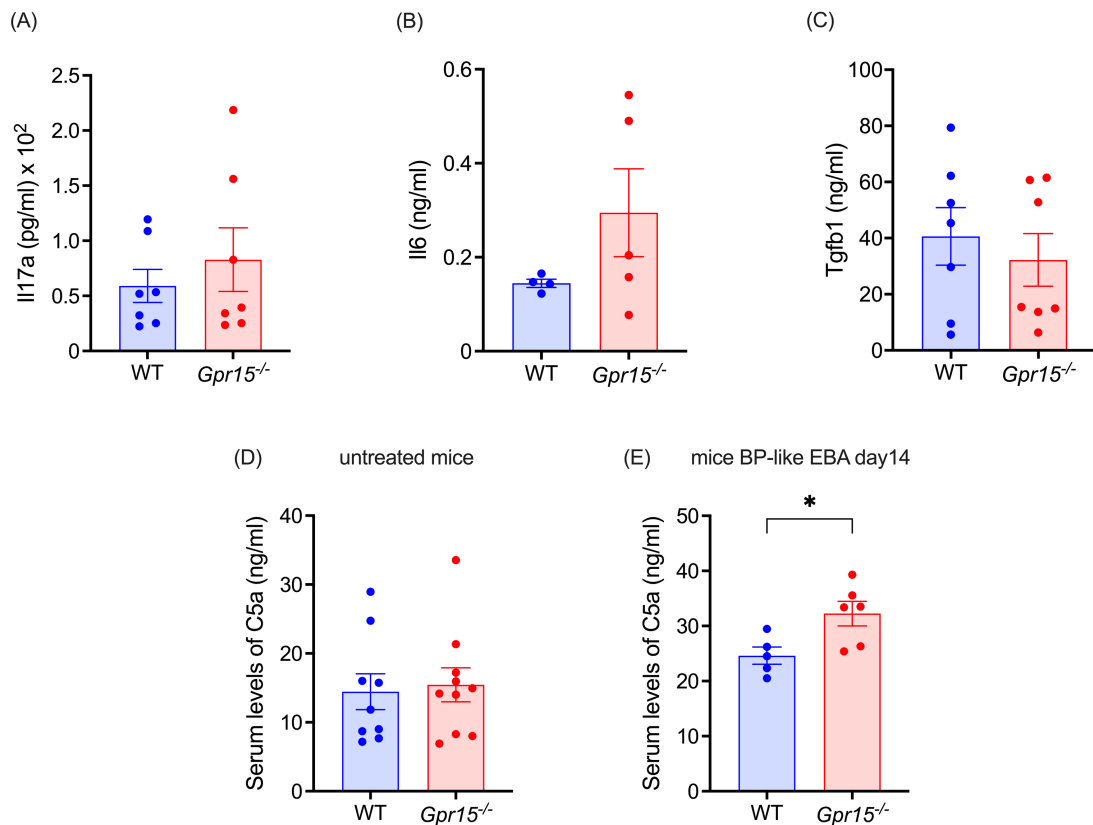


Abbildung 21: **Systemische Analyse verschiedener Zytokine in der EBA.** Es wurden die Serum Level von (A) Il17a, (B) Il6 und (C) Tgfb1 in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen an Tag 14 nach Induktion der EBA mittels ELISA bestimmt. Ebenso werden die Serum Level von C5a in gesunden (D) und erkrankten (E) *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen dargestellt. Die Präsentation der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte ± SEM, n = 4-10 Mäuse pro Gruppe, erhoben in zwei bis drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U test. \*p < 0.05

### 3.5 Klassifikation der epidermalen T-Zellpopulation im naiven Status

Nachdem an Tag 14 des Experimentes eine deutliche Reduktion von CD3<sup>+</sup>δTCR<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse zu beobachten war, sollte auch die Komposition der T-Zellpopulationen in gesunder, naiver Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum WT untersucht werden.

Für dieses Vorhaben wurde zunächst die Menge an CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der dorsalen Rückenhaut mittels Immunfluoreszenz quantifiziert. Wie bereits an Tag 14 der EBA zeigte sich die Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen in *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant vermindert, in diesem Fall um circa 1/3 (Abbildung 22, A). Bei getrennter Betrachtung des dermalen und epidermalen Kompartiments wurde deutlich, dass die Differenz durch eine beträchtliche Verminderung der epidermalen CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen bedingt ist, wobei sich kein Unterschied in der Menge von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der Dermis darstellen lässt (Abbildung 22, A).

Erneut wurde nachfolgend die Anzahl an  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$ T-Zellen in der gesamten Haut, sowie separat für Dermis und Epidermis analysiert. Weder die Anzahl von  $\delta$ TCR<sup>+</sup>, noch die von  $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Dermis unterschied sich voneinander (Abbildung 22, B/C). Allerdings zeigten sich beträchtliche Unterschiede im epidermalen Kompartiment (Abbildung 22, D/E). Insbesondere die Menge an epidermalen  $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen, den DETCs, war in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant vermindert (Abbildung 22, D), wohingegen  $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen, die normalerweise nicht Teil der murinen Epidermis sind, deutlich detektierbar waren (Abbildung 22, E).

Um einen möglichen dosisabhängigen Effekt GPR15s nachzuweisen, wurde die Menge an DETCs auch in der Haut von heterozygoten *Gpr15*<sup>+/-</sup> Mäusen analysiert. In ähnlicher Weise wie in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich eine signifikante Reduktion um  $\pm 60\%$  an epidermalen  $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen (Abbildung 23, A). Andererseits wurde, anders als in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen, nur eine minimale Zunahme, auf circa das doppelte, an epidermalen  $\alpha\beta$ T-Zellen in den heterozygoten Mäusen im Vergleich zum WT observiert (Abbildung 23, B).

Um das Ausmaß des Defizites an DETCs in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen detaillierter zu erfassen, wurde singulär die Epidermis von der Haut vom Ohr präpariert und angefärbt, sodass jeweils ein größerer Bereich als bei der Betrachtung des Querschnittes dargestellt werden konnte.  $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen waren im Vergleich zum WT in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen in der epidermalen Schicht um durchschnittlich 80% reduziert, wobei viele der Mäuse gar keine  $\gamma\delta$ T-Zellen aufwiesen. Dies zeigt, dass die Epidermis von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen fast komplett frei von DETCs ist. Gleichzeitig konnte mit dieser Methode die Morphologie der DETCs beobachtet werden, die sich typischerweise als dendritisch geformte Zellen, mit Ausläufern durch alle Schichten der Epidermis wie ein Netzwerk präsentieren (Abbildung 22, F).

Darüber hinaus ist die kompensatorische Zunahme an  $\alpha\beta$ T-Zellen in der Epidermis der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse im Speziellen auf die Zunahme von CD8<sup>+</sup> $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen zurückzuführen (Abbildung 23, C/D).

Um näher zu bestimmen, in welchem Ausmaß die mRNA von GPR15 in DETCs möglicherweise exprimiert wird, wurde diese in epidermalen und dermalen Präparationen aus murinen Schwänzen analysiert. Dabei zeigten sich vergleichbare Level an mRNA in beiden Kompartimenten (Abbildung 22, G).



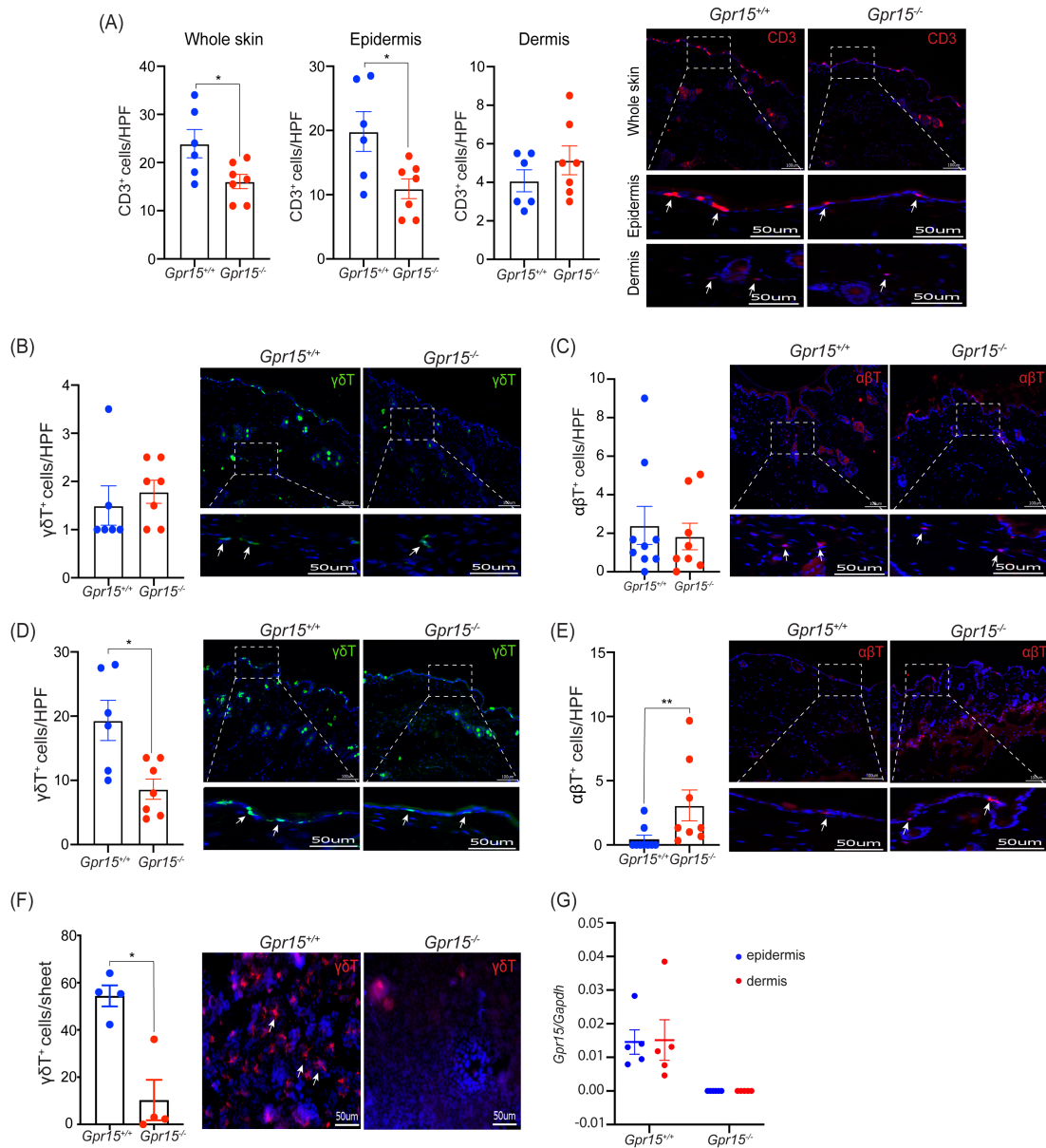


Abbildung 22: **In der Haut ausgewachsener, gesunder *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse ist die Menge an DETCs vermindert.** Die immunohistochemischen Analysen wurden an naiven, gesunden *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen durchgeführt. Auszählung und repräsentative Bilder von (A) CD3<sup>+</sup>, (B) dermalen  $\delta$ TCR<sup>+</sup>, (C) dermalen  $\beta$ TCR<sup>+</sup>, (D) epidermalen  $\delta$ TCR<sup>+</sup> und (E) epidermalen  $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Rückenhaut. (F) Quantifizierung und fluoreszenzmikroskopische Bilder von  $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis, isoliert von der Haut der Ohren. (G) GPR15 mRNA Expression separat in der Epidermis und Dermis, welche aus der Haut von Schwänzen präpariert und mittels qPCR ermittelt wurde. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, n = 4-9 Mäuse pro Gruppe, erhoben in zwei bis drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U test. \* p < 0.05; \*\*, p < 0.01

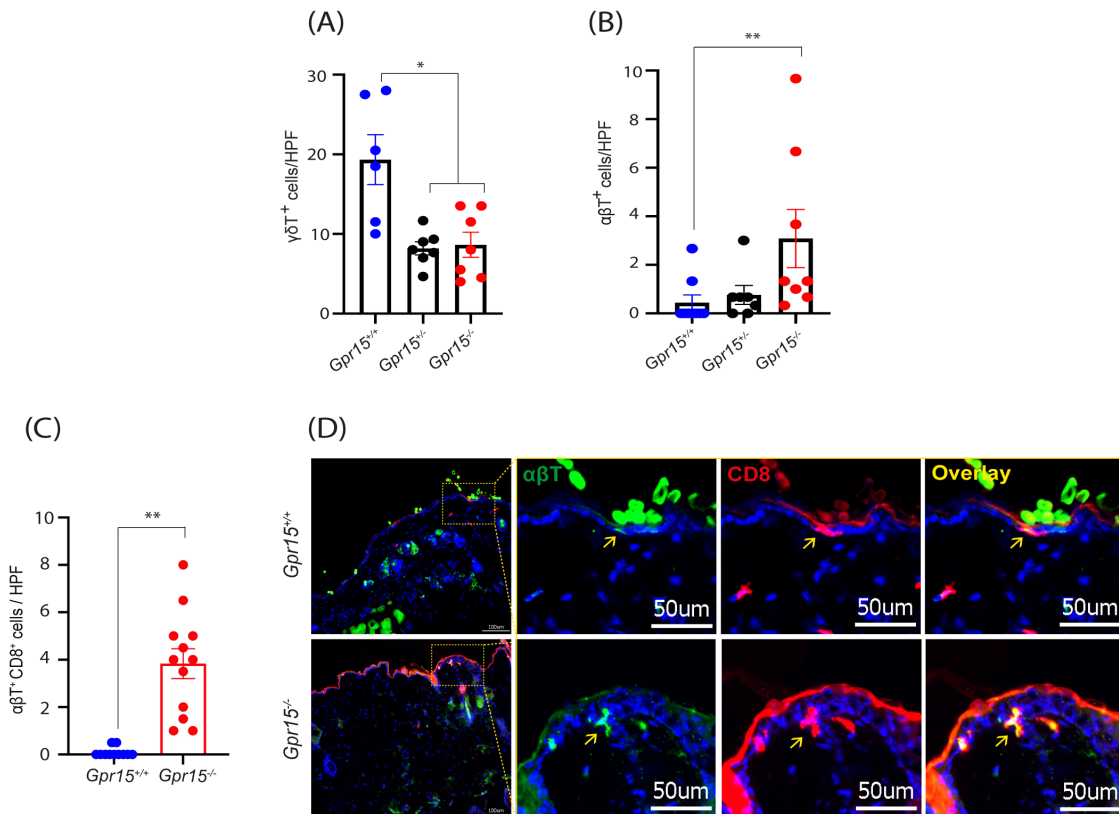


Abbildung 23: **Anstelle von DETCs sind in der naiven Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen vermehrt CD8<sup>+</sup> $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen vorhanden.** Auszählung von (A) epidermalen  $\delta$ TCR<sup>+</sup> und (B) epidermalen  $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Rückenhaut von *Gpr15*<sup>-/-</sup>, *Gpr15*<sup>+/-</sup> und WT Mäusen. (C) Quantifizierung von epidermalen CD8<sup>+</sup> $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen. (D) Repräsentative immunhistochemische Bilder der  $\beta$ TCR und CD8 Doppelfärbung. Die in gestrichelten, weißen Linien markierten Bereiche der Epidermis sind vierfach digital vergrößert dargestellt. Die gelben Pfeile markieren doppelt positiv angefärbte Zellen. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, n = 6-12 Mäuse pro Gruppe, erhoben in zwei bis drei unabhängig durchgeführten Experimenten. In (A) und (B) wurden die Daten mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunnett's multiple comparison test, in (D) mittels Mann-Whitney-U test statistisch ausgewertet. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01

Darüber hinaus wurden ebenfalls per qPCR die mRNA Expressionslevel einzelner V(variable)-Regionen der  $\gamma\delta$ T-Subgruppen sowohl in der Haut von gesunden Kontrollen als auch an Tag 14 nach Induktion der EBA in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen bestimmt. Die deutlichen Tendenzen stimmen mit den bisher geschilderten Ergebnissen der immunhistochemischen Analysen überein und unterstützen diese. Insbesondere im gesunden Zustand, aber auch am Ende des Experimentes wird die mRNA für die V $\gamma$ 3 und V $\delta$ 1 Regionen, die spezifisch für die in der Epidermis residenten DETCs sind, in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen vermindert exprimiert (Abbildung 24, A/B). Im Unterschied dazu zeigt sich durch die Erkrankung in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikante Zunahme an mRNA der V $\gamma$ 4 Region, die typischerweise dermalen  $\gamma\delta$ T-Zellen zugeordnet werden kann (Abbildung 24, C).

Ausgewachsene *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen also bereits im gesunden Zustand ein gravierendes Defizit an DETCs bei gleichzeitig vermehrtem Vorkommen von epidermalen CD8<sup>+</sup>βTCR<sup>+</sup> Zellen.

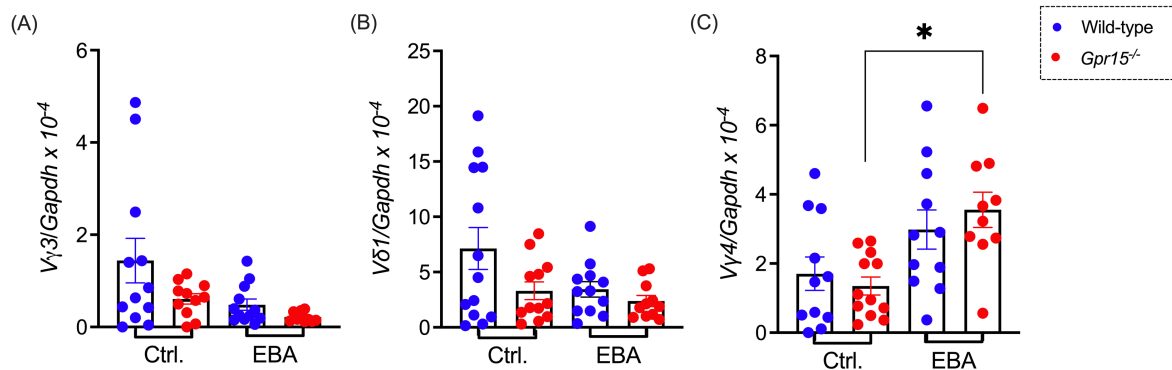


Abbildung 24: **mRNA Expressionslevel der verschiedenen  $\gamma\delta$ T-Subtypen.** Es wurden die mRNA Expressionslevel in naiver Haut gesunder Mäuse sowie von perilesionärer Haut von erkrankten Mäusen an Tag 14 des Experimentes bestimmt. Expression der mRNA von (A) V $\gamma$ 3, (B) V $\delta$ 1 und (C) V $\gamma$ 4 in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert, n = 11-13 Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und Dunnett's multiple comparison test. \*\*, p < 0.01

### 3.6 Expression von GPR15 in der Haut von BP-Patienten

Im Anschluss an die Betrachtung der Rolle von GPR15 im passiven Tiermodell der BP-ähnlichen EBA wurde die GPR15 Expression in der Haut von BP-Patienten analysiert. Hierfür wurde zunächst das mRNA Expressionslevel von *Gpr15* in der Haut von BP-Patienten bestimmt. Da ein positiver Nachweis geführt werden konnte (Abbildung 25, A), erfolgte anschließend die immunhistochemische Färbung des GPR15 Moleküls in der Haut der BP-Patienten im Vergleich zu hautgesunden, alters- und geschlechtsgleichen Kontrollen.

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl GPR15<sup>+</sup> Zellen in der Haut von BP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe von durchschnittlich 8 GPR15<sup>+</sup> Zellen pro HPF auf durchschnittlich 21 GPR15<sup>+</sup> Zellen pro HPF (Abbildung 25, B).

In der Doppelfärbung mit dem von Willebrandt Faktor (vWF) als Marker für Endothelzellen wird eine fast 100%ige Doppelpositivität von GPR15 und vWF deutlich (Abbildung 25, B/C). Entsprechend nimmt die Menge an GPR15<sup>+</sup> vWF<sup>+</sup> Zellen in der Haut der BP-Patienten in gleicher Weise im Vergleich zur Kontrollgruppe zu (Abbildung 25, B). In der singulären Auswertung der vWF<sup>+</sup> Zellen steigt die Gesamtzahl an Endothelzellen in den BP-Patienten ebenfalls deutlich (Abbildung 25, B).

Demzufolge exprimieren zwar nicht alle Endothelzellen GPR15, GPR15 ist jedoch zum Großteil ausschließlich auf Endothelzellen vorzufinden. Eine Koexpression von GPR15 und dem T-Zellmarker CD3 konnte dagegen weder in der Haut der BP-Patienten noch in der Kontrollgruppe detektiert werden (Abbildung 25, D/E).

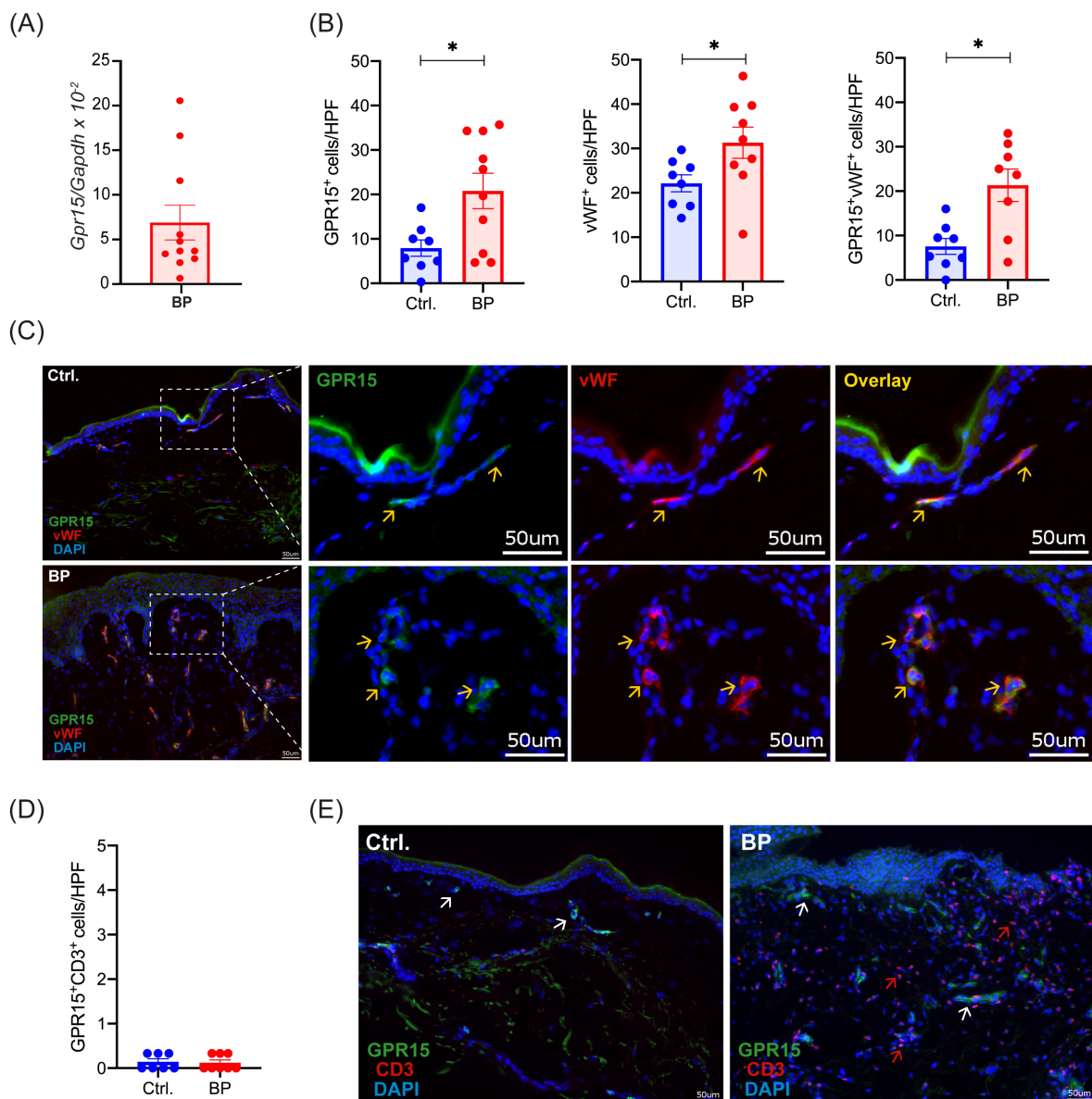


Abbildung 25: **GPR15 ist in menschlicher Haut auf vWF<sup>+</sup> Zellen exprimiert.** (A) GPR15 mRNA Expressionslevel in der Haut von BP-Patienten. (B) Quantifizierung von GPR15<sup>+</sup>, vWF<sup>+</sup> und GPR15<sup>+</sup>vWF<sup>+</sup> Zellen in der Haut von PB-Patienten und hautgesunden Kontrollen. (C) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für GPR15 und vWF. In den weißen gestrichelten Linien sind dreifach vergrößerte Ausschnitte gezeigt. Die gelben Pfeile markieren doppelt positiv angefärbte Zellen. (D) Auszählung von GPR15<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Zellen in der Haut von PB-Patienten und hautgesunden Kontrollen. (E) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz von GPR15 und CD3. Die weißen Pfeile zeigen GPR15<sup>+</sup> gefärbte Zellen, die roten Pfeile CD3<sup>+</sup> gefärbte Zellen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, n = 7-11 pro Gruppe, und wurden statistisch mittels Mann-Whitney-U test analysiert. \*, p < 0.05

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des passiven EBA Mausmodells erstmalig gezeigt werden, dass GPR15 nicht nur einen Einfluss auf verschiedene T-Zell-abhängige chronisch entzündliche Erkrankungen besitzt, sondern auch eine Rolle in Gewebsentzündungen spielt, die direkt durch pathogene Antikörper vermittelt werden. Durch den Rezeptor wurde die efferente Phase der BP-ähnlichen EBA, die durch den Transfer von anti-COL7-AK in den Mäusen induziert wurde, auf protektive Weise signifikant beeinflusst.

Dieser Effekt konnte sowohl in der klinischen Begutachtung der deutlich stärker ausgeprägten Entzündung in der Haut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen, in Form eines höheren Anteils an Hautrötungen, Blasen, Erosionen, Krusten oder Haarausfall an der gesamten Körperoberfläche der Tiere, als auch äquivalent in der Histologie beobachtet werden. Dort war die dermale-epidermale Separation (DES) signifikant häufiger in der Haut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse nachzuweisen. Diese Spaltung wird durch die Aktivität der einwandernden Neutrophilen Granulozyten verursacht, die reaktive Sauerstoffspezies und proteolytische Enzyme freisetzen, welche nachfolgend den epidermalen-dermalen Adhäsionskomplex degradieren. Dabei hängt das Ausmaß der DES von der Rekrutierung sowie in gleicher Weise von der Aktivität der Neutrophilen ab<sup>78</sup>.

In der immunhistochemischen Auswertung des dermalen Infiltrates konnte zwar weder in der Anzahl von Neutrophilen Granulozyten noch in der von Makrophagen ein Unterschied zwischen den *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen dargestellt werden, aber Chiriac et al. haben bereits demonstriert, dass selbst, wenn die Rekrutierung der Neutrophilen in die Haut nicht kompromittiert ist, eine Verminderung ihrer Aktivität das Ausmaß der Entzündung dämpft<sup>106</sup>. Sezin et al. führten die quantitative Bestimmung der DES in perilesionären Hautschnitten als Parameter für die Aktivität der Neutrophilen ein. Demzufolge kann das vermehrte Auftreten einer DES als Zeichen einer verstärkten Aktivität der Neutrophilen in der Haut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen gewertet werden<sup>98</sup>.

Dieses Geschehen wird im passiven EBA Mausmodell sowohl von T<sub>regs</sub> als auch von  $\gamma\delta$ T-Zellen moduliert. Dabei führen T<sub>regs</sub> letztendlich zu einer verminderten,  $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer vermehrten Aktivität der Neutrophilen in der Dermis<sup>90,91</sup>.

Im Gegensatz zu einigen Studien, die GPR15 in der Darmschleimhaut als Homing-Rezeptor für CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschreiben, scheint GPR15 in der Haut weder die Anzahl dieser Zellpopulation insgesamt noch die der T<sub>regs</sub> im Speziellen zu beeinflussen<sup>9,10</sup>. Eine potentiell verminderte Menge an T<sub>regs</sub> in der Dermis von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen, welche zu einer verstärkten Krankheitsaktivität hätte führen können, wurde nicht nachgewiesen.

Dagegen zeigte sich bei der Betrachtung des dermalen Infiltrates aber eine signifikant höhere Menge an  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse. Dieses Ergebnis kann mit dem bisher beschriebenen Wissen über die Modulation der Aktivität von Neutrophilen in Zusammenhang gestellt werden und lässt vermuten, dass GPR15 über die Rekrutierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen und die nachfolgende Aktivierung von Neutrophilen einen Einfluss auf die verstärkte Entzündungsreaktion in der Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse ausübt (Abbildung 26).

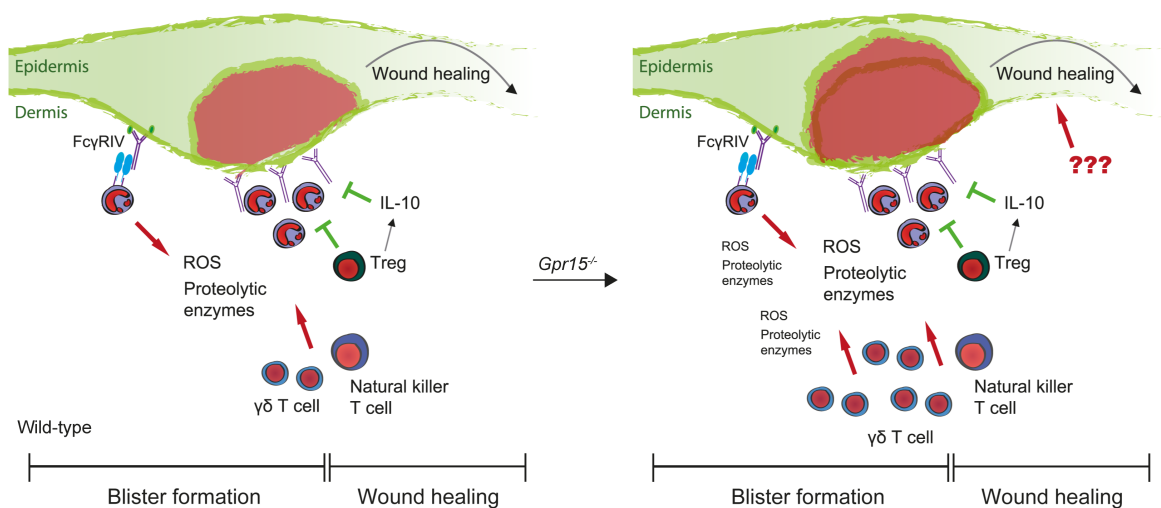


Abbildung 26: **Hypothetisches Modell der efferenten Phase der EBA in *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Das vermehrte Auftreten von  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Dermis der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse führt nachfolgend zu einer stärkeren Aktivierung der Neutrophilen, die sich in einer gesteigerten Produktion von ROS und proteolytischen Enzymen darstellt. Dies bewirkt letztendlich eine gesteigerte DES, die sich klinisch in der deutlich kränkeren Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse widerspiegelt.

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise der Rezeptor diesen Effekt ausübt und ob er direkt in  $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird oder durch andere Mechanismen indirekt zu deren Rekrutierung beiträgt. Die mRNA von GPR15 konnte in der Haut der WT Mäuse an Tag 14 der EBA mittels qPCR in sehr geringen Mengen detektiert werden. Dagegen gelang es nicht, GPR15 als Protein nachzuweisen. Für diese Konstellation sind verschiedene Begründungen aufzuführen:



1. GPR15 könnte wie viele andere GPCRs nach der Bindung seines Liganden, GPR15L, internalisiert und degradiert worden sein und lässt sich somit nicht mehr als Protein nachweisen.
2. Zudem wurde die GPR15 Expression ausschließlich an Tag 14 des Experimentes untersucht. Möglicherweise ist der Rezeptor zu einem früheren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf aktiv und zum Zeitpunkt der voll ausgebildeten Entzündungsreaktion bereits wieder inaktiviert.
3. Alternativ wäre es möglich, dass GPR15 die Entzündung auch von außerhalb der Haut moduliert.

Für die erste Überlegung spricht, dass in der perilesionären Haut an Tag 14 der EBA die mRNA von GPR15L in größerer Menge detektierbar war und der Ligand somit vollständig an die GPR15 Rezeptoren gebunden haben könnte. Außerdem beschrieben Okamoto und Shikano, dass die dauerhafte Internalisierung im stabilen Zustand des Rezeptors partiell von  $\beta$ -Arrestin abhängig ist, welches zu einer Clathrin-abhängigen Endozytose führt<sup>29</sup>. Es ist zu vermuten, dass dieser Weg wie bei vielen anderen GPCRs nach Aktivierung durch den entsprechenden Liganden im Sinne eines kurzfristigen negativen Rückkopplungsmechanismus verstärkt wird und zur vermehrten Internalisierung von GPR15 führt<sup>107</sup>.

Zudem wäre es denkbar, dass parallel zusätzlich die zweite Möglichkeit zutrifft. Der Prozess der Rekrutierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen könnte bereits vor Tag 14 des Experimentes und somit vor dem Zeitpunkt, an dem die GPR15 Expression untersucht wurde, vollständig abgeschlossen sein.

Bezüglich der dritten Alternative ist zu beachten, dass im passiven BP-ähnlichen Mausmodell eine Kontribution von Prozessen von außerhalb der Haut größtenteils unbekannt ist und die Erkrankung dementsprechend am ehesten auf lokale Geschehen, die auf die Haut beschränkt sind, zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz wurde die GPR15 Expression auch systemisch mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Sowohl in den inguinalen Lymphknoten als auch in der Milz der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen lässt sich die detektierte GFP<sup>+</sup>, alias GPR15<sup>+</sup>, Population an Tag 14 nach Induktion der EBA überwiegend als CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation identifizieren, allerdings zeigten auch  $\gamma\delta$ T-Zellen sowie T<sub>regs</sub> ein moderates GFP-Signal.

In der Literatur wurde GPR15 zwar insbesondere auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben, durch die Stimulation von TLR-3 zeigte sich der Rezeptor jedoch auch im menschlichen Blut bereits auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen hochreguliert<sup>5</sup>. Außerdem wurde der Rezeptor in der murinen Darmschleimhaut ebenfalls nicht nur auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sondern auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Lymphozyten nachgewiesen<sup>9</sup>. Im Blut von Patienten mit Rheumatoider Arthritis scheint GPR15 dagegen von Neutrophilen exprimiert zu werden<sup>26</sup>. In der BP-ähnlichen EBA zeigte der Rezeptor jedoch keine Koexpression mit Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann anhand der erhobenen Daten nicht unterschieden werden, ob die höhere Anzahl an GPR15<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Lymphknoten und der Milz an Tag 14 der EBA das Resultat einer Expansion dieser Zellen ist oder durch eine vermehrte Gentranskription von *Gpr15* in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Antwort auf die Induktion der Hautentzündung hervorgerufen wurde. Darüber hinaus konnte bei der Betrachtung der Anzahl CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Zellen in der perilesionären Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäuse an Tag 14 der EBA kein Unterschied ermittelt werden. Bieber et al. haben zudem beschrieben, dass die Blockade von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch einen anti-CD8 AK keinen Einfluss auf den Verlauf der BP-ähnlichen EBA im passiven Tiermodell zeigt<sup>90</sup>. Dies spricht insgesamt gegen eine signifikante Rolle der GPR15<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen in den lymphoiden Organen auf den Verlauf der Erkrankung.

Eine eher lokale Wirkungsweise von GPR15 unterstützt dagegen wiederum die Tatsache, dass der GPR15-Ligand an Tag 14 der EBA im Vergleich zum naiven Status deutlich hochreguliert wurde. Auf der anderen Seite waren die mRNA Expressionslevel von GPR15 in der entzündlichen Haut im Vergleich zur gesunden Haut deutlich reduziert. Eine mögliche Erklärung für diese Situation ist, dass GPR15L/GPR15 inhibitorische oder negativ-chemotaktische Effekte als Repellent auf die Migration von GPR15<sup>+</sup> Zellen ausüben, was wiederum der Rekrutierung von verschiedenen Immunzellen, inklusive der  $\gamma\delta$ T-Zellen, in die Dermis entgegenwirkt. Eine solche Interaktion von GPR15L/GPR15 würde auch erklären, warum keine GFP Expression in der Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> (*Gpr15*<sup>gfp/gfp</sup>) Mäusen detektiert werden konnte, aber im peripheren Blut, in der Milz und in inguinalen Lymphknoten. Dies zeigt ebenfalls eine weitere Begründung auf, warum es nicht möglich war, GPR15 als Protein in der Haut zu bestimmen.



Des Weiteren ähnelt die Struktur von GPR15 nur in geringem Ausmaß der von anderen Chemokin Rezeptoren und es ist bisher umstritten, ob GPR15L die Migration von GPR15<sup>+</sup> Zellen induzieren kann. Während in einer Studie berichtet wurde, dass GPR15L chemotaktisch auf T-Zellen wirkt, publizierte eine weitere Studie, dass der Ligand ganz im Gegenteil die Bewegung der T-Zellen durch den chemotaktischen Einfluss des Zytokins CXCL12 dosisabhängig inhibiert<sup>35,36</sup>. Es wäre erstrebenswert den Einfluss von GPR15L/GPR15 auf die Migration von  $\gamma\delta$ T-Zellen zu studieren. Allerdings wäre hierfür die Verfügbarkeit einer größeren Anzahl GPR15<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T-Zellen sowie des rekombinanten GPR15L nötig, was derzeit leider nicht der Fall ist.

Darüber hinaus fördert der Ligand zum einen die epidermale Proliferation von Keratinozyten sowie zum anderen in seiner Funktion als antimikrobielles Peptid die Wundheilung der Haut<sup>43</sup>. GPR15L-mRNA wurde beispielsweise vermehrt während der Regenerationsphase nach Verbrennungsschäden in muriner Haut produziert<sup>36</sup>. In diesem Prozess spielen außerdem die dendritischen epidermalen  $\gamma\delta$ T-Zellen, die DETCs, eine signifikante Rolle. Ihre Anzahl war in der Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu der von WT Mäusen an Tag 14 der EBA signifikant vermindert. DETCs induzieren über die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren die Produktion von Glykosaminoglykanen wie insbesondere Hyaluronsäure in den Keratinozyten beziehungsweise können letztere auch direkt selber synthetisieren. Die Hyaluronsäure lenkt wiederum proregenerativ wirkende Makrophagen vom M2-Phänotyp zur Wundseite<sup>100</sup>. In den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen sind signifikant weniger DETCs an Tag 14 des Experimentes in der Haut vorhanden und entsprechend konnte weniger Hyaluronsäure mit Hilfe von Alcian Blau angefärbt werden als in den WT Mäusen. Die beiden Marker für M2-Makrophagen, Arg1 und Fizz1, zeigten sich in gleicher Weise geringfügig erniedrigt<sup>108</sup>. Auf der anderen Seite wiesen die *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse keine eindeutigen Unterschiede in den mRNA Expressionsleveln der Wachstumsfaktoren für Keratinozyten im Vergleich zu den WT Mäusen auf und zeigten eine vermehrte epidermale Proliferation der selbigen. Außerdem wurde der GPR15L in der Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäuse an Tag 14 des Experimentes in vergleichbar hohen Mengen nachgewiesen.

Schon Sezin et al. vermuteten weitere Faktoren, wie etwa den Kontakt mit verschiedenen Mikroorganismen während des Entzündungsgeschehens, als Ursache für eine sekundäre Erhöhung des Liganden. Sie hatten beobachtet, dass

die Expression des GPR15Ls nicht notwendigerweise mit der Keratinozytenproliferation in verschiedenen Psoriasis-Mausmodellen korrelierte<sup>47</sup>.

Es lässt sich demzufolge kein einheitliches Bild bezüglich des Wundheilungsprozesses in *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum WT darstellen. Eine plausible Erklärung dafür ist, dass in dieser Arbeit die Wundheilungs-Phase der EBA mit dem verwendeten passiven Mausmodell gar nicht endgültig bewertet werden kann. Bereits in WT Mäusen ist die Auflösung der Hautentzündung erst am Ende der vierten Woche zu beobachten. Die Evaluation des EBA-Verlaufes war in dieser Arbeit jedoch nur über zwei Wochen nach Induktion der Erkrankung gestattet. Diese Zeitperiode wurde initial gewählt, um entzündliches Gewebe der efferenten Phase der BP-ähnlichen EBA zu entnehmen und zwischen den Mäusen zu vergleichen. Obwohl also zu diesem Zeitpunkt nicht bestätigt werden kann, ob GPR15 auch in der Regulation der Wundheilung involviert sein könnte, ist zu erwarten, dass diese in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen ohnehin mehr Zeit benötigt. Dies basiert allein schon darauf, dass die Entzündung der Haut in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen ein signifikant höheres Level erreicht hat als in den WT Mäusen und dies generell eine längere Zeitperiode in Anspruch nimmt, bis sich die Haut regeneriert.

Ungeachtet der Induktion der EBA konnten keine Zeichen einer Infektion, eines Tumors oder anderer nicht-infektiöser Entzündungen in der naiven Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen detektiert werden, wobei diese bereits im gesunden Zustand ein gravierendes Defizit an DETCs zeigten (Abbildung 27). Diese Zellen scheinen als Komponente des angeborenen Abwehrsystems einen bedeutenden Einfluss auf die Protektion und Verteidigung des stabilen Gleichgewichtszustandes der Haut und, wie bereits beschrieben, auf ihre Regenerationsfähigkeit zu haben<sup>100,109–111</sup>. Ihre physiologische Rolle ist allerdings ebenso wie ihr Einfluss auf die Pathophysiologie von Hauterkrankungen im Detail kaum verstanden<sup>112,113</sup>. Lediglich in der Pathogenese des Kontaktekzemes wurde die Funktion von DETCs bisher analysiert<sup>114,115</sup>. Die ausgeprägte Reduktion der DETCs könnte demzufolge die Kontrollfunktionen des Immunsystems und die Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichts in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen gefährden. Die Signifikanz von GPR15 auf die physiologische Homöostase der Haut als äußere Körperbarriere wurde jedoch im Gegensatz zur Darmschleimhaut als innere Barriere zuvor noch nicht analysiert.

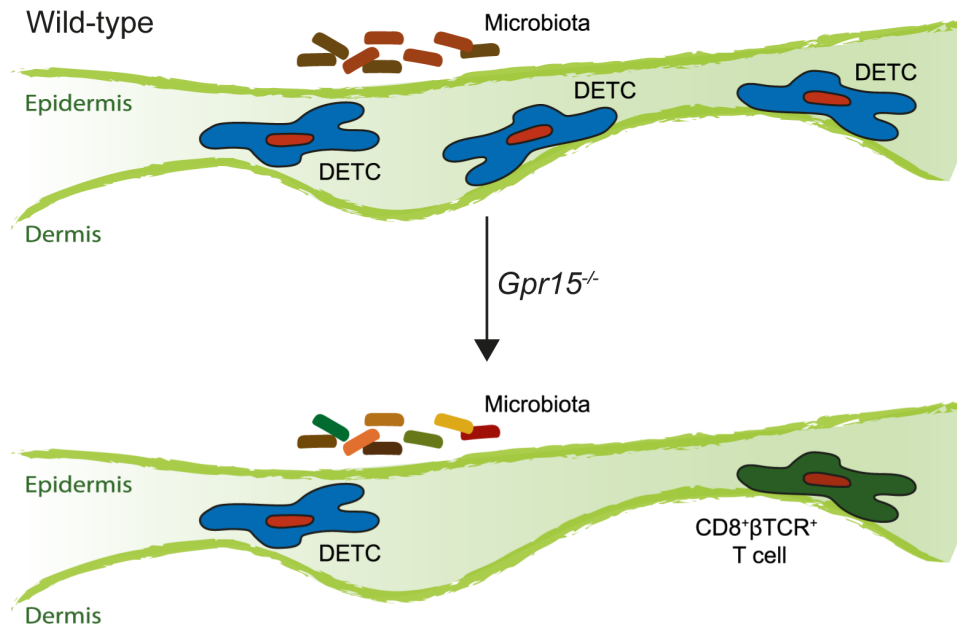


Abbildung 27: **Schematische Darstellung der Komposition der T-Zellpopulationen sowie des Mikrobioms in der Epidermis von naiven *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen.** In den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen sind signifikant weniger DETCs vorzufinden als in den WT Mäusen. Dagegen wird die epidermale Nische in diesen Mäusen durch CD8<sup>+</sup> αβT-Zellen besetzt. Außerdem weist das Mikrobiom der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse eine breitere Artenvielfalt als das der WT Mäuse auf.

Die Menge an DETCs in der Haut der Mäuse ist das Resultat aus ihrer Migration in die Epidermis während der Embryogenese, ihrer lokalen Selbsterneuerung durch klonale Expansion und ihrer Erhaltung vor Ort<sup>116</sup>.

Im Zusammenhang mit der embryonalen Wanderung der DETCs aus dem fetalen Thymus in die Epidermis der Mäuse wurde die Rolle von GPR15 als Homing-Rezeptor bereits von Lahl et al. untersucht. Die Autoren fokussierten sich dabei auf die Begutachtung der neonatalen Haut der Mäuse, in der sie ein nahezu vollständiges Defizit an DETCs in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen nachwiesen. Nachfolgend suggerierten Lahl et al. in ihrer Studie jedoch, dass die Anzahl an DETCs im Erwachsenenalter der Mäuse durch weitere Homing-Rezeptoren zum Großteil wiederhergestellt wird. Obwohl sie in erwachsenen Mäusen ähnliche Prozentangaben für das Verhältnis von DETCs zu allen erfassten epidermalen CD3<sup>+</sup> T-Zellen in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen erhoben haben, wie sie auch in dieser Arbeit ermittelt wurden, interpretierten die Autoren diese Ergebnisse im direkten Vergleich zu den Daten neonataler Mäuse als unbedeutend<sup>42</sup>. Diese Arbeit indiziert jedoch, dass der Unterschied in den Prozentangaben auch auf eine deutliche Differenz der absoluten Zahlen an DETCs zu übertragen ist und somit biologische Relevanz hat.

Insgesamt sind diese Ergebnisse demzufolge eher als eine Erweiterung anstatt als ein Gegensatz zur vorherigen Studie zu betrachten.

Lahl et al. erklärten ihre Interpretation der Daten dadurch, dass im Erwachsenenalter im Vergleich zum neonatalen Zustand die Anzahl an DETCs vermutlich durch GPR15 unabhängige Signalwege ausgeglichen werden konnte. Zu nennen sind hier die beiden Rezeptoren CCR4 und CCR10, welche bereits zuvor in der Regulation der Migration von DETCs aus dem Thymus in die Epidermis in Verbindung gebracht wurden<sup>42</sup>. Allerdings wurden bereits auch sehr widersprüchliche Ergebnisse und eine entweder nahezu überflüssige oder aber unverzichtbare Rolle für CCR4 und CCR10 in der Regulation der DETC Migration berichtet<sup>117–120</sup>. Die zu dieser Diskrepanz führenden Gründe sind bisher ungewiss. Es ist möglich, dass die Mechanismen, die die DETCs in der Haut regulieren, dynamisch sind und sich mit dem Alter oder durch verschiedene Umweltfaktoren ändern.

In Bezug auf die Aufrechterhaltung der DETCs in der Epidermis wurden IL-15, der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ahr) und die NAD(P)H-Dehydrogenase Chinon 1 (Nqo1) als wichtige Signalwege identifiziert<sup>110,115,121</sup>. Die Rolle von Ahr in der Biologie der DETCs ist dabei von besonderem Interesse, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass die Expression von GPR15 auf menschlichen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Ahr reguliert wird<sup>13</sup>. Demnach ist es naheliegend, dass GPR15 einen Signalweg nachgeschaltet von Ahr in DETCs darstellen könnte und möglicherweise somit teilweise für die Abhängigkeit dieser Zellen von der Ahr-Aktivität verantwortlich ist.

Lahl et al. berichteten, dass Vorläuferzellen der DETCs im Thymus der Mäuse auf ihrer Oberfläche GPR15 exprimieren, diese Expression aber kurz nach der Geburt in der Epidermis wieder verlieren<sup>42</sup>. In dieser Arbeit wurde das Vorkommen von GPR15 in der Haut von erwachsenen Mäusen untersucht. Sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis konnten mRNA Expressionslevel von GPR15 in vergleichbareren Mengen detektiert werden. Dies indiziert, dass möglicherweise DETCs, aber auch weitere Zellpopulationen, die in der Dermis resident sind, *Gpr15* transkribieren.

Ein von der Gendosis abhängiger Effekt von *Gpr15* konnte durch die Untersuchung heterozygoter Mäuse nicht bestätigt werden. Die *Gpr15*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten wie die *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse eine Reduktion der DETCs um ungefähr 60%.

Des Weiteren konnte erstmals eine deutliche Expansion von epidermalen CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T-Zellen, welche statt der DETCs in der epidermalen Nische residieren, in der Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen dargestellt werden (Abbildung 27). Das Vorkommen von  $\alpha\beta$ T-Zellen in der Epidermis bei einer gleichzeitig reduzierten Anzahl von DETCs wurde bereits in der Literatur beschrieben<sup>120,122</sup>. Allerdings ist bisher unklar geblieben, in welcher Form die Zellen möglicherweise den Verlust von DETCs in den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen funktionell ausgleichen könnten.

Durch die Interaktion mit verschiedenen kutanen T-Zellpopulationen gewinnt daneben die Abhängigkeit der Immunhomöostase von der mikrobiellen Zusammensetzung auf der Haut zunehmend an Bedeutung<sup>120</sup>. Das Mikrobiom kann eine schützende Immunität gegen eindringende Pathogene initiieren, in dem es die Verteilung und Immunantwort der T-Zellen in der Haut reguliert<sup>123</sup>. Im umgekehrten Fall können Zytokine der T-Zellen die Komposition des Mikrobioms beeinflussen. Aktivierte DETCs produzieren unter anderem als Antwort auf Gewebsverletzungen oder geschädigte Keratinozyten in großen Mengen IL-17A. Dieses wiederum induziert die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden, wie möglicherweise auch GPR15L, welche daraufhin die epidermale Barriere aufrechterhalten<sup>124</sup>. Gleichzeitig wurde beschrieben, dass bakteriellen Produkte wie die SCFAs Butyrat und Propionat die Biosynthese von verschiedenen Proteinen in den DETCs modulieren<sup>125</sup>. Ebenso soll die Expression von GPR15 auf verschiedenen T-Zellen durch SCFA reguliert werden<sup>9,16</sup>.

Wenn die Anzahl von DETCs in der Haut von GPR15 abhängig ist, könnte der Verlust von GPR15 ebenfalls einen Einfluss auf die Komposition des Haut-Mikrobioms zeigen. Diese Vermutung konnte Frau Dr. Tanya Sezin in einer Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung auf der Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen bestätigen. Die vier am häufigsten detektierten Bakterien-Stämme unterscheiden sich zwar nicht zwischen *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen, ihre relativen Mengen weichen jedoch sogar in den taxonomischen Unterebenen noch signifikant voneinander ab. Zudem wies das Mikrobiom der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant größere Artenvielfalt auf als das der WT Mäuse (Abbildung 27)<sup>126</sup>.

Zu diesem Zeitpunkt ist es nicht möglich zu differenzieren, in welchem Ausmaß der Verlust von GPR15 möglicherweise direkt diese Veränderungen im Mikrobiom bedingt hat oder diese auch indirekt durch das Defizit an DETCs aufgetreten sind.

Zudem wäre es möglich, dass GPR15 indirekt durch die Modulation der mikrobiellen Komposition der Haut die Menge an DETCs minimiert hat.

Darüber hinaus ist bisher nicht untersucht, ob Veränderungen im Haut-Mikrobiom einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf in der efferenten Phase der EBA haben. Somit ist nicht auszuschließen, ob die beobachteten klinischen Ergebnisse in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen über diesen Effekt möglicherweise zusätzlich beeinflusst wurden. In der afferenten Phase haben Ellebrecht et al. dagegen bereits gezeigt, dass die Prädisposition, ob es überhaupt zum Ausbruch der Erkrankung in den Mäusen kommt, wesentlich von der mikrobiellen Zusammensetzung auf der Haut abhängig ist<sup>76</sup>. Es ist somit denkbar, dass die *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse durch das veränderte Mikrobiom eine unterschiedliche Bereitschaft zur Entwicklung der BP-ähnlichen EBA aufweisen. Um diese Hypothese zu analysieren, wäre es wünschenswert zukünftig mit den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen auch das aktive Mausmodell durchzuführen.

GPR15 hat in den letzten Jahren vermehrt das Interesse der Wissenschaft geweckt. Die Erforschung dieses Rezeptors konnte jedoch bisher die Frage nach seiner möglichen physiologischen Signifikanz nicht vollständig beantworten. In dieser Arbeit wurde die Rolle von GPR15 in der Regulation der Haut-Physiologie im naiven Status, insbesondere seine Rolle in der Regulation der DETCs, herausgearbeitet. Die Position der DETCs in der Epidermis als Außengrenze des Körpers in Kombination mit ihrer Fähigkeit Pathogene zu überprüfen und schnell auf diese zu reagieren, weist den DETCs eine potentielle Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Haut-Homöostase und Integrität zu. Darüber hinaus weisen die *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse zum jetzigen Zeitpunkt der Literaturrecherche als einzige Mauslinie ein DETC-spezifisches Defizit auf. Demzufolge könnten *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse ein nützliches Forschungsmodell darstellen, um die biologische Signifikanz der DETCs weiter aufzuklären.

Im Menschen scheinen  $\nu\delta 1$   $\gamma\delta$ T-Zellen ähnliche Funktionen wie die DETCs der Mäuse auszuführen. Allerdings sind die Mechanismen, die zu ihrer Rekrutierung und Aktivierung führen, zum Großteil noch unverstanden<sup>127</sup>. Morphologisch zeigen sie anders als die DETCs eine runde Form und befinden sich meist in der Dermis<sup>109</sup>. Insofern bleibt die Frage, inwiefern GPR15 ebenfalls eine Rolle in der physiologischen Regulation dieser Zellpopulation in humaner Haut spielt, vorerst noch offen.

Die Ergebnisse zum Verlauf der BP-ähnlichen EBA demonstrieren, dass GPR15 ein Regulator von Gewebsentzündungen auch außerhalb des Dickdarms und unabhängig von reinen T-Zell induzierten Immunantworten ist. Diese Ergebnisse sind deshalb bedeutsam, weil die Hochregulation der GPR15 Expression für eine steigende Anzahl chronisch entzündlicher Konditionen berichtet wurde, aber die Signifikanz dieser Beobachtungen bisher größtenteils unklar geblieben ist<sup>11,25-27</sup>. Da GPR15 protektive Effekte auf die efferente Phase der BP-ähnliche EBA im Mausmodell zeigt, könnte seine Aktivierung eine effektive neue Therapieoption in der Behandlung der EBA sowie möglicherweise weiterer Pemphigoider Erkrankungen darstellen.

Deswegen sollte zuletzt untersucht werden, inwiefern die Ergebnisse des passiven EBA Mausmodells auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Für dieses Vorhaben wurde die Expression von GPR15 in Hautproben von BP-Patienten sowie von hautgesunden, alters- und geschlechtsgleichen Kontrollen vergleichend analysiert. Das Vorkommen des Rezeptors auf Endothelzellen (ECs) sowie dessen Hochregulation in den Hautproben der BP-Patienten macht eine Einflussnahme von GPR15 auf den Krankheitsverlauf auch beim Menschen wahrscheinlich. Exprimiert auf ECs ist es durchaus möglich, dass GPR15 die Migration verschiedener Zellen, wie insbesondere auch die von  $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflusst. Dabei könnte er in dieser Position die Einwanderung von Zellen in die Haut sowohl fördern, als auch ebenso blockieren. Auf der anderen Seite ist zusätzlich ein direkter Einfluss von GPR15 auf die ECs denkbar. Pan et al. beschrieben den Rezeptor bereits auf murinen ECs und fanden heraus, dass die Funktionen von TME5, einer Domäne von Thrombomodulin, auf die Protektion und Angiogenese der ECs von GPR15 abhängig sind<sup>32</sup>. In dieser Arbeit wurde GPR15 erstmals auf humanen ECs nachgewiesen. Welche Rolle der Rezeptor auf diesen Zellen einnimmt, wurde dementsprechend bisher noch nie untersucht. Für den möglichen Einsatz von GPR15 als Zielmolekül von Arzneimitteln, wäre es wünschenswert seine Funktion auf menschlichen ECs weiter zu charakterisieren. In diesem Sinne ist es hilfreich, dass GPR15L als in situ Hydrogel System (AP-57-NPs-H) auf der Haut aufgetragen werden kann<sup>128</sup>. Dies erlaubt prinzipiell klinische Studien durchzuführen, um die Effekte einer Aktivierung von GPR15 in der menschlichen Haut zukünftig zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Der G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR15 wurde bisher als essentieller Regulator für die Migration verschiedener T-Zellen im Darm sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Konditionen untersucht. Zudem weisen verschiedene Studien darauf hin, dass der Rezeptor weitere chronische Entzündungsreaktionen beeinflussen könnte. Nichtsdestotrotz blieb die (patho)physiologische Relevanz dieser Erkenntnisse weitestgehend im Unklaren.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von GPR15 im Antikörper transferierten Mausmodell der Bullöses Pemphigoid-ähnlichen Epidermolysis bullosa acquisita adressiert. Im Vergleich von *Gpr15<sup>-/-</sup>* (Knockout) und Wildtyp Mäusen wurde ein protektiver Effekt von GPR15 auf den Krankheitsverlauf beobachtet. Klinisch wie histologisch war die Erkrankung in den *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen signifikant stärker ausgeprägt, was gleichzeitig mit einer deutlichen Akkumulation von  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Dermis assoziiert war. Von diesen ist bekannt, dass sie die Aktivität der einwandernden pathogenen Neutrophilen verstärken können und dadurch die Entzündung begünstigen. Außerdem wurde der kürzlich entdeckte GPR15-Ligand in der entzündeten Haut erheblich hochreguliert. Diese Ergebnisse beschreiben erstmals eine Rolle für GPR15 als Gegenregulator von Antikörper vermittelter Entzündung und identifizieren ihn potentiell als neues therapeutisches Ziel in der Therapie von Pemphigoiden Erkrankungen. In der Haut von Patienten mit Bullösem Pemphigoid wurde eine Kolo-kalisation des Rezeptors mit dem von Willebrand Faktor (vWF), einem Marker für Endothelzellen, ermittelt. Es wäre somit denkbar, dass GPR15 ebenfalls die Einwanderung von Entzündungszellen in der menschlichen Haut regulieren könnte. Darüber hinaus wurde der Einfluss von GPR15 auf die kutanen T-Zellpopulationen in naiven Mäusen untersucht, da eine potentielle Funktion des Rezeptors in der Erhaltung der Homöostase auch an anderen Körperaußengrenzen als der Darmschleimhaut wahrscheinlich ist. Der genetische Verlust des Rezeptors veränderte signifikant die Komposition der residenten T-Zellen in der Haut. In *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen war die Anzahl an dendritischen epidermalen  $\gamma\delta$ T-Zellen (DETCs) signifikant vermindert und die Nische der DETCs in der Epidermis stattdessen von  $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen besetzt. Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse eine relevante Rolle für GPR15 in der Regulation des kutanen Immunsystems.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Heiber, M., Marchese, A., Nguyen, T., Heng, H. H. Q., George, S. R. & O'Dowd, B. F. A Novel Human Gene Encoding a G-Protein-Coupled Receptor (GPR15) Is Located on Chromosome 3. *Genomics* **32**, 462–465 (1996).
2. Clapham, P. R. & Weiss, R. A. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature* **388**, 230 (1997).
3. Deng, H., Unutmaz, D., KewalRamani, V. N. & Littman, D. R. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296 (1997).
4. Münch, J., Pöhlmann, S., Kirchhoff, F., Stahl-Hennig, C., Stolte, N., Heeney, J. L. & Ten Haaf, P. Co-receptor Usage of BOB/GPR15 in Addition to CCR5 Has No Significant Effect on Replication of Simian Immunodeficiency Virus In Vivo. *J. Infect. Dis.* **180**, 1494–1502 (1999).
5. Kiene, M., Rethi, B., Jansson, M., Dillon, S., Lee, E., Lantto, R., Wilson, C., Pöhlmann, S. & Chiodi, F. Toll-Like Receptor 3 Signalling Up-Regulates Expression of the HIV Co-Receptor G-Protein Coupled Receptor 15 on Human CD4+ T Cells. *PLOS ONE* **9**, e88195 (2014).
6. Clayton, F., Kotler, D. P., Kuwada, S. K., Morgan, T., Stepan, C., Kuang, J., Le, J. & Fantini, J. Gp120-induced Bob/GPR15 activation: a possible cause of human immunodeficiency virus enteropathy. *Am. J. Pathol.* **159**, 1933–1939 (2001).
7. Kiene, M., Marzi, A., Urbanczyk, A., Bertram, S., Fisch, T., Nehlmeier, I., Gnirß, K., Karsten, C. B., Palesch, D., Münch, J., Chiodi, F., Pöhlmann, S. & Steffen, I. The role of the alternative coreceptor GPR15 in SIV tropism for human cells. *Virology* **433**, 73–84 (2012).
8. Elbim, C., Monceaux, V., Mueller, Y. M., Lewis, M. G., François, S., Diop, O., Akarid, K., Hurtrel, B., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Lévy, Y., Katsikis, P. D. & Estaquier, J. Early divergence in neutrophil apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 8613–8623 (2008).
9. Kim, S. V., Xiang, W. V., Kwak, C., Yang, Y., Lin, X. W., Ota, M., Sarpel, U., Rifkin, D. B., Xu, R. & Littman, D. R. GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science* **340**, 1456–1459 (2013).
10. Nguyen, L. P., Pan, J., Dinh, T. T., Hadeiba, H., O'Hara, E., Ebtikar, A., Hertweck, A., Gökmen, M. R., Lord, G. M., Jenner, R. G., Butcher, E. C. & Habtezion, A. Role and species-specific expression of colon T cell homing receptor GPR15 in colitis. *Nat. Immunol.* **16**, 207–213 (2015).
11. Adamczyk, A., Gageik, D., Frede, A., Pastille, E., Hansen, W., Rueffer, A., Buer, J., Büning, J., Langhorst, J. & Westendorf, A. M. Differential expression of GPR15 on T cells during ulcerative colitis. *JCI Insight* **2**, e90585 (2017).
12. Fischer, A., Zundler, S., Atreya, R., Rath, T., Voskens, C., Hirschmann, S., López-Posadas, R., Watson, A., Becker, C., Schuler, G., Neufert, C., Atreya, I. & Neurath, M. F. Differential effects of  $\alpha 4\beta 7$  and GPR15 on homing of effector and regulatory T cells from patients with UC to the inflamed gut in vivo. *Gut* **65**, 1642–1664 (2016).
13. McAleer, J. P., Fan, J., Roar, B., Primerano, D. A. & Denvir, J. Cytokine Regulation in Human CD4 T Cells by the Aryl Hydrocarbon Receptor and Gq-Coupled Receptors. *Sci. Rep.* **8**, 10954 (2018).

14. Xiong, L., Dean, J. W., Fu, Z., Oliff, K. N., Bostick, J. W., Ye, J., Chen, Z. E., Mühlbauer, M. & Zhou, L. Ahr-Foxp3-ROR $\gamma$ t axis controls gut homing of CD4<sup>+</sup> T cells by regulating GPR15. *Sci. Immunol.* **5**, eaaz7277 (2020).
15. Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N. & Garrett, W. S. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic T<sub>reg</sub> Cell Homeostasis. *Science* **341**, 569 (2013).
16. Jacob, N., Jaiswal, S., Maheshwari, D., Nallabelli, N., Khatri, N., Bhatia, A., Bal, A., Malik, V., Verma, S., Kumar, R. & Sachdeva, N. Butyrate induced Tregs are capable of migration from the GALT to the pancreas to restore immunological tolerance during type-1 diabetes. *Sci. Rep.* **10**, 19120 (2020).
17. Perrigoue, J., Das, A. & Mora, J. R. Interplay of nutrients and microbial metabolites in intestinal immune homeostasis: distinct and common mechanisms of immune regulation in the small bowel and colon. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* **79**, 57–71 (2014).
18. Parkes, G. C., Whelan, K. & Lindsay, J. O. Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J. Crohns Colitis* **8**, 717–725 (2014).
19. Zhang, P., Wang, R., Li, Z., Wang, Y., Gao, C., Lv, X., Song, Y. & Li, B. The risk of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis based on 20,626 cases from case-control and cohort studies. *PeerJ* **4**, e1797–e1797 (2016).
20. Chang, K., Yang, S. M., Kim, S. H., Han, K. H., Park, S. J. & Shin, J. I. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22279–22295 (2014).
21. Sun, Y. V., Smith, A. K., Conneely, K. N., Chang, Q., Li, W., Lazarus, A., Smith, J. A., Almlı, L. M., Binder, E. B., Klengel, T., Cross, D., Turner, S. T., Ressler, K. J. & Kardina, S. L. R. Epigenomic association analysis identifies smoking-related DNA methylation sites in African Americans. *Hum. Genet.* **132**, 1027–1037 (2013).
22. Dogan, M. V., Xiang, J., Beach, S. R. H., Cutrona, C., Gibbons, F. X., Simons, R. L., Brody, G. H., Stapleton, J. T. & Philibert, R. A. Ethnicity and Smoking-Associated DNA Methylation Changes at HIV Co-Receptor GPR15. *Front. Psychiatry* **6**, 132–132 (2015).
23. Köks, G., Uudelepp, M.-L., Limbach, M., Peterson, P., Reimann, E. & Köks, S. Smoking-Induced Expression of the GPR15 Gene Indicates Its Potential Role in Chronic Inflammatory Pathologies. *Am. J. Pathol.* **185**, 2898–2906 (2015).
24. Bauer, M., Hackermüller, J., Schor, J., Schreiber, S., Fink, B., Pierzchalski, A. & Herberth, G. Specific induction of the unique GPR15 expression in heterogeneous blood lymphocytes by tobacco smoking. *Biomarkers* **24**, 217–224 (2019).
25. Ammitzbøll, C., von Essen, M. R., Börnsen, L., Petersen, E. R., McWilliam, O., Ratzner, R., Romme Christensen, J., Oturai, A. B., Søndergaard, H. B. & Sellebjerg, F. GPR15+ T cells are Th17 like, increased in smokers and associated with multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* **97**, 114–121 (2019).
26. Cartwright, A., Schmutz, C., Askari, A., Kuiper, J.-H. & Middleton, J. Orphan receptor GPR15/BOB is up-regulated in rheumatoid arthritis. *Cytokine* **67**, 53–59 (2014).
27. Schmutz, C., Hulme, A., Burman, A., Salmon, M., Ashton, B., Buckley, C. & Middleton, J. Chemokine receptors in the rheumatoid synovium: upregulation of CXCR5. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R217–R229 (2005).
28. Taams, L. S. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: Trials and tribulations. *J. Exp. Med.* **217**, e20192048 (2020).
29. Okamoto, Y. & Shikano, S. Differential phosphorylation signals control endocytosis of GPR15. *Mol. Biol. Cell* **28**, 2267–2281 (2017).

30. Haase, T., Müller, C., Krause, J., Röthemeier, C., Stenzig, J., Kunze, S., Waldenberger, M., Münzel, T., Pfeiffer, N., Wild, P. S., Michal, M., Marini, F., Karakas, M., Lackner, K. J., Blankenberg, S. & Zeller, T. Novel DNA Methylation Sites Influence GPR15 Expression in Relation to Smoking. *Biomolecules* **8**, 74 (2018).
31. Croitoru-Lamoury, J., Guillemin, G. J., Boussin, F. D., Mognetti, B., Gigout, L. I., Chéret, A., Vaslin, B., Le Grand, R., Brew, B. J. & Dormont, D. Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia* **41**, 354–370 (2003).
32. Pan, B., Wang, X., Nishioka, C., Honda, G., Yokoyama, A., Zeng, L., Xu, K. & Ikezoe, T. G-protein coupled receptor 15 mediates angiogenesis and cytoprotective function of thrombomodulin. *Sci. Rep.* **7**, 692 (2017).
33. Pan, B., Wang, X., Kojima, S., Nishioka, C., Yokoyama, A., Honda, G., Xu, K. & Ikezoe, T. The Fifth Epidermal Growth Factor-like Region of Thrombomodulin Alleviates Murine Graft-versus-Host Disease in a G-Protein Coupled Receptor 15 Dependent Manner. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 746–756 (2017).
34. Pan, B., Wang, Xiangmin, Kojima, Shinsuke, Nishioka, Chie, Yokoyama, Akihito, Honda, Goichi, Xu, Kailin, & Ikezoe, Takayuki. The fifth epidermal growth factor like region of thrombomodulin alleviates LPS-induced sepsis through interacting with G-protein coupled receptor 15. *Thromb Haemost* **117(03)**, 570–579 (2017).
35. Suply, T., Hannedouche, S., Carte, N., Li, J., Grosshans, B., Schaefer, M., Raad, L., Beck, V., Vidal, S., Hiou-Feige, A., Beluch, N., Barbieri, S., Wirsching, J., Lageyre, N., Hillger, F., Debon, C., Dawson, J., Smith, P., Lannoy, V., Detheux, M., Bitsch, F., Falchetto, R., Bouwmeester, T., Porter, J., Baumgarten, B., Mansfield, K., Carballido, J. M., Seuwen, K. & Bassilana, F. A natural ligand for the orphan receptor GPR15 modulates lymphocyte recruitment to epithelia. *Sci Signal* **10**, eaal0180 (2017).
36. Ocón, B., Pan, J., Dinh, T. T., Chen, W., Ballet, R., Bscheider, M., Habtezion, A., Tu, H., Zabel, B. A. & Butcher, E. C. A Mucosal and Cutaneous Chemokine Ligand for the Lymphocyte Chemoattractant Receptor GPR15. *Front. Immunol.* **8**, 1111–1111 (2017).
37. Pan, W., Cheng, Y., Zhang, H., Liu, B., Mo, X., Li, T., Li, L., Cheng, X., Zhang, L., Ji, J., Wang, P. & Han, W. CSBF/C10orf99, a novel potential cytokine, inhibits colon cancer cell growth through inducing G1 arrest. *Sci. Rep.* **4**, 6812 (2014).
38. Yang, M., Tang, M., Ma, X., Yang, L., He, J., Peng, X., Guo, G., Zhou, L., Luo, N., Yuan, Z. & Tong, A. AP-57/C10orf99 is a new type of multifunctional antimicrobial peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 347–352 (2015).
39. Boyle, J. O., Gümüs, Z. H., Kacker, A., Choksi, V. L., Bocker, J. M., Zhou, X. K., Yantiss, R. K., Hughes, D. B., Du, B., Judson, B. L., Subbaramaiah, K. & Dannenberg, A. J. Effects of cigarette smoke on the human oral mucosal transcriptome. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **3**, 266–278 (2010).
40. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88–100 (2013).
41. Girardi, M., Lewis, J. M., Filler, R. B., Hayday, A. C. & Tigelaar, R. E. Environmentally Responsive and Reversible Regulation of Epidermal Barrier Function by  $\gamma\delta$  T Cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 808–814 (2006).
42. Lahl, K., Sweere, J., Pan, J. & Butcher, E. Orphan chemoattractant receptor GPR15 mediates dendritic epidermal T-cell recruitment to the skin. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2577–2581 (2014).

43. Chen, C., Wu, N., Duan, Q., Yang, H., Wang, X., Yang, P., Zhang, M., Liu, J., Liu, Z., Shao, Y. & Zheng, Y. C10orf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes. *Sci. Rep.* **8**, 8590 (2018).
44. Guo, P., Luo, Y., Mai, G., Zhang, M., Wang, G., Zhao, M., Gao, L., Li, F. & Zhou, F. Gene expression profile based classification models of psoriasis. *Genomics* **103**, 48–55 (2014).
45. van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Florencia, E., Prens, E. P. & Lubberts, E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 5836–5845 (2009).
46. Schön, M. P. & Schön, M. Imiquimod: mode of action. *Br. J. Dermatol.* **157**, 8–13 (2007).
47. Sezin, T., Kempen, L., Meyne, L.-M., Mousavi, S., Zillikens, D. & Sadik, C. D. GPR15 is not critically involved in the regulation of murine psoriasiform dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* **94**, 196–204 (2019).
48. Schmidt, E. & Zillikens, D. Pemphigoid diseases. *The Lancet* **381**, 320–332 (2013).
49. Euroimmun AG, Bullöse Autoimmundermatosen. Übersicht über die serologische Diagnostik blasenbildender Autoimmunerkrankungen der Haut. Letterhead EA\_1490\_I\_DE\_A04, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, 2021.
50. Hertl M. Kapitel 1 - Dermatologische Grundlagen. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, Herausgeber. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie (7. Auflage). Springer Reference Medizin, Hamburg. 2018. S. 3-19.
51. Sadik CD, Zillikens D, Hertl M. Kapitel 49 - Bullöse Autoimmundermatosen. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, Herausgeber. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie (7. Auflage). Springer Reference Medizin, Hamburg. 2018. S. 839-873.
52. 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).
53. Langan, S. M., Smeeth, L., Hubbard, R., Fleming, K. M., Smith, C. J. P. & West, J. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* **337**, a180–a180
54. Bertram, F., Bröcker, E.-B., Zillikens, D. & Schmidt, E. Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **7**, 434–439 (2009).
55. Elliott GT. Two cases of epidermolysis bullosa. *J cutan Genitourin Dis.* 1895;13:10.
56. Kablitz. Ein Beitrag zur Frage der Epidermolysis Bullosa (Hereditary et Acquisita). Dissertation, Rostock. 1904.
57. Roenigk, H. H., Jr., Ryan, J. G. & Bergfeld, W. F. Epidermolysis Bullosa Acquisita: Report of Three Cases and Review of All Published Cases. *Arch. Dermatol.* **103**, 1–10 (1971).
58. Koga, H., Prost-Squarcioni, C., Iwata, H., Jonkman, M. F., Ludwig, R. J. & Bieber, K. Epidermolysis Bullosa Acquisita: The 2019 Update. *Front. Med.* **5**, 362–362 (2019).
59. Woodley, D. T., Briggaman, R. A., O'Keefe, E. J., Inman, A. O., Queen, L. L. & Gammon, W. R. Identification of the Skin Basement-Membrane Autoantigen in Epidermolysis Bullosa Acquisita. *N. Engl. J. Med.* **310**, 1007–1013 (1984).
60. Lapiere, J. C., Woodley, D. T., Parente, M. G., Iwasaki, T., Wynn, K. C., Christiano, A. M. & 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).

61. Kawase, K., Oshitani, Y., Mizutani, Y., Shu, E., Fujine, E. & Seishima, M. Inflammatory Epidermolysis Bullosa Acquisita Effectively Treated with Minocycline. *Acta Derm Venereol* **94**(5), 615–6 (2014).
62. Vodegel, R. M., Jonkman, M. f., Pas, H. H. & De Jong, M. C. J. M. U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br. J. Dermatol.* **151**, 112–118 (2004).
63. Terra, J. B., Meijer, J. M., Jonkman, M. F. & Diercks, G. F. H. The n- vs. u-serration is a learnable criterion to differentiate pemphigoid from epidermolysis bullosa acquisita in direct immunofluorescence serration pattern analysis. *Br. J. Dermatol.* **169**, 100–105 (2013).
64. Schmidt, E. & Zillikens, D. The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Dtsch. Arzteblatt Int.* **108**, 399–III (2011).
65. Iwata, H., Vorobyev, A., Koga, H., Recke, A., Zillikens, D., Prost-Squarcioni, C., Ishii, N., Hashimoto, T. & Ludwig, R. J. Meta-analysis of the clinical and immunopathological characteristics and treatment outcomes in epidermolysis bullosa acquisita patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **13**, 153–153 (2018).
66. Kim, J. H., Kim, Y. H., Kim, S., Noh, E. B., Kim, S.-E., Vorobyev, A., Schmidt, E., Zillikens, D. & Kim, S.-C. Serum levels of anti-type VII collagen antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay in patients with epidermolysis bullosa acquisita are correlated with the severity of skin lesions. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **27**, e224–e230 (2013).
67. Witte, M., Koga, H., Hashimoto, T., Ludwig, R. J. & Bieber, K. Discovering potential drug-targets for personalized treatment of autoimmune disorders - what we learn from epidermolysis bullosa acquisita. *Expert Opin. Ther. Targets* **20**, 985–998 (2016).
68. Ludwig, R. J. Signalling and targeted therapy of inflammatory cells in epidermolysis bullosa acquisita. *Exp. Dermatol.* **26**, 1179–1186 (2017).
69. Sitaru, C., Kromminga, A., Hashimoto, T., Bröcker, E. B. & Zillikens, D. Autoantibodies to type VII collagen mediate Fcγ-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *Am. J. Pathol.* **161**, 301–311 (2002).
70. Ludwig, R. J. Model systems duplicating epidermolysis bullosa acquisita: A methodological review. *Autoimmunity* **45**, 102–110 (2012).
71. Sitaru, C., Mihai, S., Otto, C., Chiriac, M. T., 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).
72. Pollmann, R. & Eming, R. Research Techniques Made Simple: Mouse Models of Autoimmune Blistering Diseases. *J. Invest. Dermatol.* **137**, e1–e6 (2017).
73. Bieber, K., Sun, S., Ishii, N., Kasperkiewicz, M., Schmidt, E., Hirose, M., Westermann, J., Yu, X., Zillikens, D. & Ludwig, R. J. Animal models for autoimmune bullous dermatoses. *Exp. Dermatol.* **19**, 2–11 (2010).
74. Ludwig, R. J., 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, S. M. 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).
75. Ludwig, R. J., Müller, S., Marques, A. d C., Recke, A., Schmidt, E., Zillikens, D., Möller, S. & Ibrahim, S. M. Identification of Quantitative Trait Loci in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1409–1415 (2012).

76. Ellebrecht, C. T., Srinivas, G., Bieber, K., Banczyk, D., Kalies, K., Künzel, S., Hammers, C. M., Baines, J. F., Zillikens, D., Ludwig, R. J. & Westermann, J. Skin microbiota-associated inflammation precedes autoantibody induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J. Autoimmun.* **68**, 14–22 (2016).
77. Iwata, H., Bieber, K., Tiburzy, B., Chrobok, N., Kalies, K., Shimizu, A., Leineweber, S., Ishiko, A., Vorobyev, A., Zillikens, D., Köhl, J., Westermann, J., Seeger, K., Manz, R. & Ludwig, R. J. B Cells, Dendritic Cells, and Macrophages Are Required To Induce an Autoreactive CD4 Helper T Cell Response in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J. Immunol.* **191**, 2978 (2013).
78. Kasperkiewicz, M., Sadik, C. D., Bieber, K., Ibrahim, S. M., Manz, R. A., Schmidt, E., Zillikens, D. & Ludwig, R. J. Epidermolysis Bullosa Acquisita: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Options. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 24–33 (2016).
79. Rath, T., Baker, K., Pyzik, M. & Blumberg, R. S. Regulation of immune responses by the neonatal Fc receptor and its therapeutic implications. *Front. Immunol.* **5**, 664–664 (2015).
80. Collin, M. & Ehlers, M. The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. *Exp. Dermatol.* **22**, 511–514 (2013).
81. Recke, A., Sitaru, C., Vidarsson, G., Evensen, M., Chiriac, M. T., Ludwig, R. J. & Zillikens, D. Pathogenicity of IgG subclass autoantibodies to type VII collagen: Induction of dermal–epidermal separation. *J. Autoimmun.* **34**, 435–444 (2010).
82. Samavedam, U. K. S. R. L., Kalies, K., Scheller, J., Sadeghi, H., Gupta, Y., Jonkman, M. F., Schmidt, E., Westermann, J., Zillikens, D., Rose-John, S. & Ludwig, R. J. Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction. *J. Autoimmun.* **40**, 74–85 (2013).
83. Sitaru, C., Chiriac, M. T., 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 (2006).
84. Karsten, C. M., Pandey, M. K., Figge, J., Kilchenstein, R., Taylor, P. R., Rosas, M., McDonald, J. U., Orr, S. J., Berger, M., Petzold, D., Blanchard, V., Winkler, A., Hess, C., Reid, D. M., Majoul, I. V., Strait, R. T., Harris, N. L., Köhl, G., Wex, E., Ludwig, R., Zillikens, D., Nimmerjahn, F., Finkelman, F. D., Brown, G. D., Ehlers, M. & Köhl, J. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat. Med.* **18**, 1401–1406 (2012).
85. Sadik, C. D., Kim, N. D., Iwakura, Y. & Luster, A. D. Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR and FcγR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E3177 (2012).
86. Sezin, T., Krajewski, M., Wutkowski, A., Mousavi, S., Chakievska, L., Bieber, K., Ludwig, R. J., Dahlke, M., Rades, D., Schulze, F. S., Schmidt, E., Kalies, K., Gupta, Y., Schilf, P., Ibrahim, S. M., König, P., Schwudke, D., Zillikens, D. & Sadik, C. D. The Leukotriene B4 and its Receptor BLT1 Act as Critical Drivers of Neutrophil Recruitment in Murine Bullous Pemphigoid-Like Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 1104–1113 (2017).
87. Yu, X., Akbarzadeh, R., Pieper, M., Scholzen, T., Gehrig, S., Schultz, C., Zillikens, D., König, P. & Petersen, F. Neutrophil Adhesion Is a Prerequisite for Antibody-Mediated Proteolytic Tissue Damage in Experimental Models of Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1990–1998 (2018).
88. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 34 (2008).

89. Hirose, M., Kasprick, A., Beltsiou, F., Dieckhoff, K. S., Schulze, F. S., Samavedam, U. K. J. S. R. L., Hundt, J. E., Pas, H. H., Jonkman, M. F., Schmidt, E., Kalies, K., Zillikens, D., Ludwig, R. J. & Bieber, K. Reduced Skin Blistering in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita After Anti-TNF Treatment. *Mol. Med.* **22**, 918–926 (2016).
90. Bieber, K., Witte, M., Sun, S., Hundt, J. E., Kalies, K., Dräger, S., Kasprick, A., Twelkmeyer, T., Manz, R. A., König, P., Köhl, J., Zillikens, D. & Ludwig, R. J. T cells mediate autoantibody-induced cutaneous inflammation and blistering in epidermolysis bullosa acquisita. *Sci. Rep.* **6**, 38357–38357 (2016).
91. Bieber, K., Sun, S., Witte, M., Kasprick, A., Beltsiou, F., Behnen, M., Laskay, T., Schulze, F. S., Pipi, E., Reichhelm, N., Pagel, R., Zillikens, D., Schmidt, E., Sparwasser, T., Kalies, K. & Ludwig, R. J. Regulatory T Cells Suppress Inflammation and Blistering in Pemphigoid Diseases. *Front. Immunol.* **8**, 1628–1628 (2017).
92. Kopecki, Z., Arkell, R. M., Strudwick, X. L., Hirose, M., Ludwig, R. J., Kern, J. S., Bruckner-Tuderman, L., Zillikens, D., Murrell, D. F. & Cowin, A. J. Overexpression of the Flii gene increases dermal–epidermal blistering in an autoimmune ColVII mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *J. Pathol.* **225**, 401–413 (2011).
93. Kulkarni, U., Karsten, C. M., Kohler, T., Hammerschmidt, S., Bommert, K., Tiburzy, B., Meng, L., Thieme, L., Recke, A., Ludwig, R. J., Pollok, K., Kalies, K., Bogen, B., Boettcher, M., Kamradt, T., Hauser, A. E., Langer, C., Huber-Lang, M., Finkelman, F. D., Köhl, J., Wong, D. M. & Manz, R. A. IL-10 mediates plasmacytosis-associated immunodeficiency by inhibiting complement-mediated neutrophil migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 1487-1497.e6 (2016).
94. Sezin, T., Ferreirós, N., Jennrich, M., Ochirbold, K., Seutter, M., Attah, C., Mousavi, S., Zillikens, D., Geisslinger, G. & Sadik, C. D. 12/15-Lipoxygenase choreographs the resolution of IgG-mediated skin inflammation. *J. Autoimmun.* **115**, 102528–102528 (2020).
95. Polson, A., Potgieter, G. M., Largier, J. F., Mears, G. E. F. & Joubert, F. J. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **82**, 463–475 (1964).
96. Sesarman, A., Mihai, S., Chiriac, M. T., Olaru, F., Sitaru, A. G., Thurman, J. M., 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).
97. Wannick, M., Bezdek, S., Guillen, N., Thieme, M., Meshrkey, F., Mousavi, S., Seeling, M., Nimmerjahn, F., Mócsai, A., Zillikens, D., Sezin, T. & Sadik, C. D. Oral administration of the selective GPR120/FFA4 agonist compound A is not effective in alleviating tissue inflammation in mouse models of prototypical autoimmune diseases. *Pharmacol. Res. Perspect.* **6**, e00438–e00438 (2018).
98. Sezin, T., Murthy, S., Attah, C., Seutter, M., Holtsche, M. M., Hammers, C. M., Schmidt, E., Meshrkey, F., Mousavi, S., Zillikens, D., Nunn, M. A. & Sadik, C. D. Dual inhibition of complement factor 5 and leukotriene B4 synergistically suppresses murine pemphigoid disease. *JCI Insight* **4**, e128239 (2019).
99. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **182**, 311–322 (2000).
100. Jameson, J. M., Cauvi, G., Sharp, L. L., Witherden, D. A. & Havran, W. L. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 1269–1279 (2005).

101. Steinmuller, D. & Wunderlich, J. R. The use of freshly explanted mouse epidermal cells for the in vitro induction and detection of cell-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* **24**, 146–163 (1976).
102. Farrell, R. E. in *RNA Methodol. Fourth Ed.* (ed. Farrell, R. E.) 155–172 (Academic Press, 2010).
103. Armbrecht M. Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. Application Note No. 279, Eppendorf AG, Hamburg, 2013.
104. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
105. Brown, M. & Wittwer, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clin. Chem.* **46**, 1221–1229 (2000).
106. Chiriac, M., 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).
107. Cahill, T. J., 3rd, Thomsen, A. R. B., Tarrasch, J. T., Plouffe, B., Nguyen, A. H., Yang, F., Huang, L.-Y., Kahsai, A. W., Bassoni, D. L., Gavino, B. J., Lamerdin, J. E., Triest, S., Shukla, A. K., Berger, B., Little, J., 4th, Antar, A., Blanc, A., Qu, C.-X., Chen, X., Kawakami, K., Inoue, A., Aoki, J., Steyaert, J., Sun, J.-P., Bouvier, M., Skiniotis, G. & Lefkowitz, R. J. Distinct conformations of GPCR- $\beta$ -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 2562–2567 (2017).
108. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* **6**, 13–13 (2014).
109. Sutoh, Y., Mohamed, R. H. & Kasahara, M. Origin and Evolution of Dendritic Epidermal T Cells. *Front. Immunol.* **9**, 1059 (2018).
110. Wang, Y., Bai, Y., Li, Y., Liang, G., Jiang, Y., Liu, Z., Liu, M., Hao, J., Zhang, X., Hu, X., Chen, J., Wang, R., Yin, Z., Wu, J., Luo, G. & He, W. IL-15 Enhances Activation and IGF-1 Production of Dendritic Epidermal T Cells to Promote Wound Healing in Diabetic Mice. *Front. Immunol.* **8**, 1557–1557 (2017).
111. Keyes, B. E., Liu, S., Asare, A., Naik, S., Levorse, J., Polak, L., Lu, C. P., Nikolova, M., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. Impaired Epidermal to Dendritic T Cell Signaling Slows Wound Repair in Aged Skin. *Cell* **167**, 1323-1338.e14 (2016).
112. Chodaczek, G., Toporkiewicz, M., Zal, M. A. & Zal, T. Epidermal T Cell Dendrites Serve as Conduits for Bidirectional Trafficking of Granular Cargo. *Front. Immunol.* **9**, 1430 (2018).
113. Macleod, A. S. & Havran, W. L. Functions of skin-resident  $\gamma\delta$  T cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**, 2399–2408 (2011).
114. Nielsen, M. M., Lovato, P., MacLeod, A. S., Witherden, D. A., Skov, L., Dyring-Andersen, B., Dabelsteen, S., Woetmann, A., Ødum, N., Havran, W. L., Geisler, C. & Bonefeld, C. M. IL-1 $\beta$ -Dependent Activation of Dendritic Epidermal T Cells in Contact Hypersensitivity. *J. Immunol.* **192**, 2975 (2014).
115. Kitajima, M., Kimura, A. & Suzuki, H. Cutting Edge: Nqo1 Regulates Irritant Contact Hypersensitivity against Croton Oil through Maintenance of Dendritic Epidermal T Cells. *J. Immunol.* **200**, 1555 (2018).
116. Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Jorquera, A., Msallam, R., Wienert, S., Klauschen, F., Ginhoux, F. & Bajénoff, M. Epidermal  $\gamma\delta$  T cells originate from yolk sac hematopoiesis and clonally self-renew in the adult. *J. Exp. Med.* **215**, 2994–3005 (2018).



117. Jiang, X., Campbell, J. J. & Kupper, T. S. Embryonic trafficking of  $\gamma\delta$  T cells to skin is dependent on E/P selectin ligands and CCR4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7443 (2010).
118. Jin, Y., Xia, M., Sun, A., Saylor, C. M. & Xiong, N. CCR10 Is Important for the Development of Skin-Specific  $\gamma\delta$ T Cells by Regulating Their Migration and Location. *J. Immunol.* **185**, 5723 (2010).
119. Nakamura, K., White, A. J., Parnell, S. M., Lane, P. J., Jenkinson, E. J., Jenkinson, W. E. & Anderson, G. Differential requirement for CCR4 in the maintenance but not establishment of the invariant V $\gamma$ 5(+) dendritic epidermal T-cell pool. *PloS One* **8**, e74019–e74019 (2013).
120. Nielsen, M. M., Witherden, D. A. & Havran, W. L.  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 733–745 (2017).
121. Kadow, S., Jux, B., Zahner, S. P., Wingerath, B., Chmill, S., Clausen, B. E., Hengstler, J. & Esser, C. Aryl Hydrocarbon Receptor Is Critical for Homeostasis of Invariant  $\gamma\delta$  T Cells in the Murine Epidermis. *J. Immunol.* **187**, 3104–3110 (2011).
122. Mueller, S. N., Zaid, A. & Carbone, F. R. Tissue-resident T cells: dynamic players in skin immunity. *Front. Immunol.* **5**, 332–332 (2014).
123. Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M. J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J. A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D. J., Trinchieri, G., Segre, J. A. & Belkaid, Y. Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. *Science* **337**, 1115 (2012).
124. Suwanpradid, J., Holcomb, Z. E. & MacLeod, A. S. Emerging Skin T-Cell Functions in Response to Environmental Insults. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 288–294 (2017).
125. Häselbarth, L., Ouwens, D. M., Teichweyde, N., Hochrath, K., Merches, K. & Esser, C. The small chain fatty acid butyrate antagonizes the TCR-stimulation-induced metabolic shift in murine epidermal gamma delta T cells. *EXCLI J.* **19**, 334–350 (2020).
126. Sezin, T.<sup>#</sup>, Jegodzinski, L.<sup>#</sup>, Meyne, L., Gupta, Y., Mousavi, S., Ludwig, R.J., Zillikens, D. & Sadik, C.D. The G protein-coupled receptor (GPR) 15 regulates cutaneous immunology maintaining dendritic epidermal T cells and regulating the skin microbiome. <sup>#</sup>, equal contribution. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1390-1398 (2021).
127. Cruz, M. S., Diamond, A., Russell, A. & Jameson, J. M. Human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T Cells in Skin Immunity and Disease. *Front. Immunol.* **9**, 1304–1304 (2018).
128. Li, X., Fan, R., Tong, A., Yang, M., Deng, J., Zhou, L., Zhang, X. & Guo, G. In situ gel-forming AP-57 peptide delivery system for cutaneous wound healing. *Int. J. Pharm.* **495**, 560–571 (2015).

## 7 Anhänge

### 7.1 Materialien

#### Chemikalien:

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien, ihrer Katalognummer und ihres Herstellers.

Chemikalie	Katalognummer	Hersteller
2-Propanol (Isopropylalkohol)	T910.1	Carl Roth, Deutschland
Agarose LE	840004	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Alcianblau 8GX Lösung	66011	Sigma Aldrich, Deutschland
Ammoniumthiocyanat	4477.1	Carl Roth, Deutschland
Azeton	5025.1	Carl Roth, Deutschland
Bepanthen Augensalbe	01578675	BayerVital GmbH, Deutschland
EDTA 0,5M (pH 8)	A4892.0100	AppliChem GmbH, Deutschland
Enthaarungscreme	4010355712486	DM Drogeriemarkt GmbH + Co.KG, Deutschland
Eosin Y	102439	Merck, Deutschland
Essigsäure	1000562500	Merck, Deutschland
Ethanol 70%	T913.3	Carl Roth, Deutschland
Ethanol 96%	T171.4	Carl Roth, Deutschland
Glycin	3908.2	Carl Roth, Deutschland
Hämatoxylin	104302	Merck, Deutschland
Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung	N069.1	Carl Roth, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	K2753	Sigma Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid	A317188	Merck, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat	W302600	Sigma Aldrich, Deutschland
Natriumhydroxid	1091361000	Merck, Deutschland
Polyethylenglykol 20000	33138.02	Serva electrophoresis GmbH, Deutschland
Protein G Resin	L00209	Hölzel Diagnostik Handels GmbH, Deutschland
Rinderserumalbumin (biotinfrei)	163.2	Carl Roth, Deutschland
ROTI®Histofix (4%)	P087.2	Carl Roth, Deutschland
Salzsäure (25%)	6331.1	Carl Roth, Deutschland
Schwefelsäure	1603131000	Merck, Deutschland
Trichlormethan (Chloroform)	T901.1	Carl Roth, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	37190.02	Serva electrophoresis GmbH, Deutschland
Triton X-100	3051.2	Carl Roth, Deutschland
Trypsin Lösung	T2601	Sigma Aldrich, Deutschland
Tween 20	P1379	Sigma Aldrich, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	X1251	Sigma Aldrich, Deutschland
Xylene	534056	Sigma Aldrich, Deutschland

## Kits, Puffer und Lösungen:

Tabelle 6: Auflistung der eingesetzten, kommerziell erworbenen Kits, Puffer und Lösungen.

Kit/Puffer/Lösung	Katalognummer	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	00-4303	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
DAPI Fluoromount G <sup>®</sup>	0100-20	SouthernBiotech, USA
DEPC-behandeltes Wasser	750023	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6x)	R0611	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
DPBS pH 7,2, 0,01M	14190-094	Gibco, Dänemark
Einbettmedium Tissue-Tek <sup>®</sup> O.C.T. <sup>™</sup>	Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland	Einbettmedium Tissue-Tek <sup>®</sup> O.C.T. <sup>™</sup>
Erythrozyten Lysepuffer	R7757	Sigma Aldrich, Deutschland
FcR Blocking Reagent, Maus	130-092-575	Miltenyi Biotec, Deutschland
Fluoromount G <sup>®</sup>	0100-01	SouthernBiotech, USA
GelStar <sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain (10000x)	50535	Lonza Rockland, USA
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready to use	SM0324	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready to use	SM1193	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
MassRuler <sup>™</sup> Low Range DNA Ladder, ready-to-use	SM0283	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Maus IL-17A ELISA Max <sup>™</sup> Standard Set	432501	BioLegend, UK
Maus IL-6 ELISA Max <sup>™</sup> Standard Set	431301	BioLegend, UK
Maus Komplementfaktor C5a DuoSet <sup>®</sup> ELISA	DY2150	R&D Systems, USA
Mensch/Maus TGF beta 1 (2nd Generation) ELISA Ready-Set-Go	88-8350-22	eBioscience (Affymetrix), USA
Normales Ziegenserum	X0907	Dako Deutschland GmbH, Deutschland
Normales Eselserum	017-000-121	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
PBS pH 7,2, 1M	70013-016	Gibco, Dänemark
Phire Hot Start II DNA-Polymerase	F122L	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	K1621	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
RNase Away Dekontaminationspray	7002	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
SYBR <sup>®</sup> Select Master Mix	4472908	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
TMB-ELISA Substrat Lösung	34028	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland

TRIzol™	15596018	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
---------	----------	---

## Hergestellte Puffer und Lösungen:

Tabelle 7: Auflistung und Zusammensetzung der hergestellten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
FACS Puffer	3% BSA in 100ml 0.01M DPBS. pH 7,2.
Glycin 0,1 M pH 2,9	7,5 g Glycin gelöst in 1l ddH <sub>2</sub> O. pH auf 2,9.
Ketamin/Xylazin	2 ml Ketamin (100 mg/ml), 300µl Xylazin (100mg/ml), 17,7 ml ddH <sub>2</sub> O.
NaCl 850mM + 0,1% Triton X100	49,67 g NaCl, 1ml Triton X-100 gelöst in 1l PBSx1.
Natriumcitrat 10mM + 0,05% Tween20	2,9 g Natriumcitrat dihydrat, 0,5 ml Tween20 gelöst in 1l ddH <sub>2</sub> O. pH auf 6.
PBS 0,01M pH 7,2	Verdünt 1:10 PBS 0,1M. pH auf 7,2.
PBS 0,1M	450,0 g NaCl, 87,0 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O, 10,17 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O gelöst in 5l ddH <sub>2</sub> O.
TAE Puffer 50x	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100ml 0,5M EDTA.
TBS 10x	500 mM Tris/l, 1500 mM NaCl/l.
TBST	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 500 µl/l. pH auf 7.6.
Tris 20mM pH 7,2	2,42 g Tris gelöst in 1l ddH <sub>2</sub> O. pH auf 7,2.
Tris 20mM+0,5 M NaCl pH 7,2	2,42 g Tris, 29,22 g NaCl gelöst in 1l ddH <sub>2</sub> O. pH auf 7,2.
Tris-HCl 1M pH 9,0	121,10 g Tris gelöst in 1l ddH <sub>2</sub> O. pH auf 9,0.

## Antikörper:

Tabelle 8: Auflistung der für immunhistochemische Färbungen verwendeten primären, sekundären und Isotyp-AK sowie konjugierte Fluorophore.

Primärer AK	Klon	Hersteller	Konzentration (mg/ml)
Alexa Fluor® 488 mouse anti-human GPR15	FAB3654G	R&D Systems, USA	0,01
Biotin anti mouse CD3ε	145-2C11	BioLegend, UK	0,005
Biotin anti-mouse TCR β	H57-597	BioLegend, UK	0,005
Biotin anti-mouse TCR δ	GL3	BioLegend, UK	0,005
Biotin Rat anti-mouse Ly6G	1A8	BioLegend, UK	0,00125
Purified Mouse anti-human CD3	F7.2.38	Agilent DAKO, USA	0,008
Purified Rabbit anti-human vWF	Polyclonal	Abcam, UK	0,02
Purified Rat anti-mouse CD3	17A2	BD Biosciences, USA	0,005
Purified Rat anti-mouse CD4	RM4-5	BD Biosciences, USA	0,00063
Purified Rat anti-mouse CD8α	KT15	Bio-Rad Laboratories, USA	0,01
Purified Rat anti-mouse Complement C3	RmC11H9	Cederlane Laboratories, Kanada	0,005
Purified Rat anti-mouse F4/80	A3-1	Bio-Rad Laboratories, USA	0,00143
Purified Rat anti-mouse Ki-67	16A8	BioLegend, UK	0,05

Sekundärer AK/Streptavidin	Klon	Hersteller	Konzentration
Alexa Fluor® 488 Goat anti-rabbit IgG	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA	0,003
Alexa Fluor® 594 Donkey anti-rabbit IgG	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA	0,004
Alexa Fluor® 594 Goat anti-mouse IgG	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA	0,003
Alexa Fluor® 594 Goat anti-rat IgG	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA	0,001
Biotin Goat anti-rat IgG	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA	0,006
Streptavidin Dylight 488		Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland	0,002
Streptavidin Dylight 594		Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland	0,002
Isotyp AK	Klon	Hersteller	
Alexa Fluor® 488 Mouse IgG2b Isotype	IC004IG	R&D Systems, USA	
Alexa Fluor® 488 Rat IgG2b k Isotype	eB149/10H5	eBioscience, USA	
Biotin Armenian Hamster IgG Isotype	HTK888	BioLegend, UK	
Biotin Rat IgG2a k Isotype	RTK2758	BioLegend, UK	
Mouse IgG2a k Isotype	eBM2a	eBioscience, USA	
Nonimmune Rat IgG	Polyclonal	EMFRET Analytics GmbH & Co. KG, Deutschland	
Purified normal Rabbit IgG	Polyclonal	Bio-Rad Laboratories, USA	

Tabelle 9: Auflistung der für die Durchflusszytometrie verwendeten AK.

Durchflusszytometrie AK	Klon	Hersteller	Konzentration (µg/ml)
APC-conjugated anti-CD127	A7R34	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
APC-conjugated anti-γδT	REA63 3	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
APC-Vio770-conjugated anti-CD11b	REA59 2	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
APC-Vio770-conjugated anti-CD19	6D5	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
APC-Vio770-conjugated anti-CD49b	DX5	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
PE-conjugated anti-CD11c	N418	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
PE-conjugated anti-CD25	7D4	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
PE-conjugated anti-CD8α	53-6.7	eBioscience, USA	2
PE-conjugated anti-γδT	REA63 3	Miltenyi Biotec, Deutschland	3

PE-Vio770-conjugated anti-CD3	REA64 1	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
PE-Vio770-conjugated anti-CD8α	53-6.7	Miltenyi Biotec, Deutschland	3
PerCP conjugated anti-CD4	RM4-5	BD Biosciences, USA	2
PerCP conjugated anti-CD8α	53-6.7	BD Biosciences, USA	2
PerCP-Vio770-conjugated anti-Ly6G	1A8	Miltenyi Biotec, Deutschland	3

## Primersequenzen der qPCRs & Genotypisierung:

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primersequenzen.

Gen	Vorwärtsprimer (→3')	Rückwärtsprimer (→3')	Länge (bp)
2610528 A11Rik	5'-CACCACCCATGACTTGACTG-3'	5'-CTTCTAGCCCTTTCCGGTCT-3'	207
Adgre1	5'-GAGTGAATGTCAAGATGTTA-3'	5'-CAGTGGAAGAAGAGAAGC-3'	126
Arg1	5'-TGACATCAACTCCCCTGACAAC-3'	5'-GCCTTTTCTTCCCTCCAGCAG-3'	251
Cxcl1	5'-CCAACCACCAGGCTACAGG-3'	5'-GCGTCACACTCAAGCTCTG-3'	108
Cxcl2	5'-CTGGGATTCACCTCAAGAACATC-3'	5'-CAGGGTCAAGGCAAGCCTC-3'	117
Fgf10	5'-CCGTACAGTGTCTGGAGATAA-3'	5'-TTTCCCCTTCTTGTTTCATGGCT-3'	99
Fgf7	5'-GAGAGGCTCAAGTTGCACGA-3'	5'-CGGTTGCTCCTTGACTTTTGT-3'	90
Fizz1	5'-ACCTTTCTGAGATTCTGCCCC-3'	5'-CAGTGGTCCAGTCAACGAGTAAGC-3'	356
Foxp3	5'-CAAGTGGCCTGGTTGTGAGA-3'	5'-ATGATCTGCTTGGCAGTGCT-3'	70
Gapdh	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	123
Gpr15	5'-CGTTATTATTGCGGTGGCGG-3'	5'-TCTGGCTGGAACCCTGAAAC-3'	90
hGpadh	5'-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3'	5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'	101
hGpr15	5'-TCTAGGACTGTGGAGGACGG-3'	5'-ATGCAAGTGAGCAGGAGGAC-3'	96
Igf1	5'-GCTTTTACTTCAACAAGCCCAC-3'	5'-CGGAAGCAACTCATCCAC-3'	85
IL10	5'-GCTGTCATCGATTTCTCCCC-3'	5'-ACACCTTGGTCTTGAGCTTAT-3'	88
Il17a	5'-TCAGCGTGTCCAAACTGAG-3'	5'-CGCCAAGGGAGTTAAAGACTT-3'	79
Il1b	5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3'	5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'	116
Il6	5'-TAGTCCTTCCACCCCAATTTCC-3'	5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'	76
Ngp	5'-AGACCTTTGTATTGGTGGTGGC-3'	5'-GGTTGTATGCCTCTATGGGCTCTA-3'	103
Tcrg-V3	5'-CTGGGTTTTTGGGCTTGGG-3'	5'-CACTCTCATCTGTTGCTCTGGT-3'	68
Tcrg-V4	5'-GCCTCTGACATTTGGACATGG-3'	5'-TGTGCAGTCTCATCTCTTGGT-3'	76
Tgfb1	5'-CTGCTGACCCCACTGATAC-3'	5'-AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3'	94
Tnfa	5'-GGTGATCGGTCCCAAAGG-3'	5'-GTTTGCTACGACGTGGGCTA-3'	133
Trdv1	5'-TCTGCTGCCTCTGGGTTTTTG-3'	5'-CACTCTCATCTGTCTCTCTGGTG-3'	78
oIMR9208	AAGGCACTTACCAGATTCAGCG		
oIMR209	AGACAGATGTGTAGGACAGGTGGG		
oIMR9210	GAAGTTCACCTTGATGCCGTTC		

## Verbrauchsmaterialien:

Tabelle 11: Auflistung der eingesetzten Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Amicon Ultra-15 (50kDa)	Merck Millipore, Deutschland
Crystalcruz Chromatographie Säule 1,5cmx10cm	Santa Cruz Biotechnology, Deutschland
Deckgläser (24mmx60mm)	Paul Marienfeld GmbH, Deutschland
Dialysemembran ZelluTrans/ROTH T3	Carl Roth, Deutschland
Einbettformen Tissue-Tek®	Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland
Einwegskalpelle	Feather Safety Razor CO. LTD, Japan
ELISA 96 Platten (high binding)	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Feindosierungsspritzen 30G (1 ml)	B Braun Melsungen AG, Deutschland
Hydrophober Stift	Dako Deutschland GmbH, Deutschland
Parafilm	Th.Geyer, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Sarstedt, Deutschland
Spritzen (1 ml; 5ml; 20ml)	Becton Dickinson, USA
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius Stedim biotech, Deutschland GmbH & Co. KG, Deutschland
SuperFrost/Plus-Objektträger	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk, GmbH&Co. KG, Deutschland
Zellsieb 70 µm	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Sarstedt, Deutschland

## Laborgeräte:

Tabelle 12: Auflistung der eingesetzten Laborgeräte und ihre Hersteller.

Laborgerät	Hersteller
Accu-jet pro Pipette	BRAND GmbH, Deutschland
Bio-Photometer plus 8,5mm	Eppendorf AG, Deutschland
CFI Plan Apo $\lambda$ 10x und $\lambda$ 20x Linse	Keyence Deutschland GmbH, Deutschland
Elektrophoresekammer wide blu	bsb11 biotech service blu, Deutschland
Feinwaage ABS/ABJ-BA-def-1019	KERN-Sohn GmbH, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Geldokumentation QUANTUM ST5	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Deutschland
HandyStep S Dispenser	BRAND GmbH, Deutschland
HERA Zellinkubator	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Isoliergefäß 30/4-32C	KGW-Isotherm, Deutschland
Keyence Mikroskop BZ-9000E	Keyence, Japan
Kryostat CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Kühlschrank	Siemens, Deutschland

MACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer	Miltenyi Biotec, Deutschland
Magnet-Rührer/Heizplatte VMS-C4	VMR, USA
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Deutschland
Mikrotom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Mikrowelle 700 & Grill	Severin Elektrogeräte, Deutschland
Mikrozentrifuge 17R VWR	VMR, USA
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
pH-Meter HI208	HANNA instruments, UK
Power Pac basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Sicherheitswerkbank	NuAire Biological cabinets, USA
Tecan Infinite M200 Pro ELISA Reader	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, USA
Transferpette S (10 µl, 100 µl, 1000µl)	BRAND GmbH, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Deutschland

## Software:

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Software.

Software	Anbieter
Eppendorf Realplex (Version 2.2)	Eppendorf AG, Deutschland
FlowJo (Version 10.6.1)	BD FlowJo LLC, USA
GraphPad Prism (Version 8)	GraphPad Software, USA
Keyence BZ-II Analyzer (Version 2.1)	Keyence, Japan
Microsoft Excel für Mac (Version 16.45)	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Word für Mac (Version 16.45)	Microsoft Corporation, USA
Zotero (Version 5.0.95)	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermixes zur Genotypisierung. ....	20
Tabelle 2: Numerische Skala zur Kategorisierung der Alcian Blau Färbung. Es wurde der Mittelwert der blau gefärbten Bereiche von je drei Bildern pro Maus ermittelt. ....	26
Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes zur cDNA Synthese. ....	28
Tabelle 4: Zyklusbedingungen der durchgeführten qPCRs. ....	29
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien, ihrer Katalognummer und ihres Herstellers. ....	76
Tabelle 6: Auflistung der eingesetzten, kommerziell erworbenen Kits, Puffer und Lösungen. ....	77
Tabelle 7: Auflistung und Zusammensetzung der hergestellten Puffer und Lösungen. ....	78
Tabelle 8: Auflistung der für immunhistochemische Färbungen verwendeten primären, sekundären und Isotyp-AK sowie konjugierte Fluorophore. ....	78
Tabelle 9: Auflistung der für die Durchflusszytometrie verwendeten AK. ....	79
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primersequenzen. ....	80
Tabelle 11: Auflistung der eingesetzten Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller. ....	81
Tabelle 12: Auflistung der eingesetzten Laborgeräte und ihre Hersteller. ....	81
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Software. ....	82



### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <b>GPR15-Expression</b> in verschiedenen Geweben im Western Blot (Clayton et al., 2001). .....	1
Abbildung 2: <b>Gewebsverteilung von GPR15L messenger (m)RNA</b> in der Maus (links) und im Menschen (rechts), (Suply et al., 2017).....	7
Abbildung 3: <b>Die menschliche Haut.</b> (A) Dreischichtiger Aufbau, (B) Zusammensetzung der Desmosomen (Zell-Zell-Kontakte) der Keratinozyten, (C) Darstellung der Hemidesmosomen, Verankerungskomplexe der epidermalen Basalzellschicht mit der dreischichtigen Basallamina, (Euroimmun AG, 2021).....	10
Abbildung 4: <b>Verschiedene klinische Manifestationen der EBA.</b> (A) Mechanisch-bullöse Form, (B) BP-ähnliche EBA, (C) Schleimhautbefall durch die BP-ähnlichen EBA (Koga et al., 2019).....	12
Abbildung 5: <b>Aspekte der EBA-Diagnostik.</b> (A) Subepidermale Blasenbildung in der Histologie in Hämatoxylin & Eosin-Färbung (Kawase et al., 2014), (B) U-förmiges IgG-Bindungsmuster in der direkten Immunfluoreszenz (Terra et al., 2013), (C) Darstellung der AAK am Blasenboden in der indirekte Immunfluoreszenz auf NaCl-separierter Spalthaut (Schmidt und Zillikens, 2011).....	13
Abbildung 6: <b>Darstellung der efferenten Phase der EBA</b> (modifiziert und erweitert nach Kasperkiewicz et al., 2016; Bieber et al., 2016; Koga et al., 2019 und Sezin et al., 2020). .....	16
Abbildung 7: <b>Passives Mausmodell der BP-ähnliches EBA.</b> (A) Schematische Präsentation der Induktion der EBA. (I) Immunisation der Neuseeland-Kaninchen mit der NC-1 Domäne des murinen COL7; (II) Aufreinigung des anti-COL7 IgGs aus dem Serum der Kaninchen; (III) Subkutane Injektion des anti-COL7 IgGs an Tag 0, 2 und 4; (IV) Erfolgreiche Induktion der EBA, (modifiziert nach Ludwig, 2011). (B) Prozentuale Anteile der Körperoberfläche zur quantitativen Beurteilung der affected body surface area (ABSA).....	22
Abbildung 8: <b>GPR15 supprimiert die EBA-Symptomatik im passiven Tiermodell.</b> Der Verlauf der Hauterkrankung wurde zwischen <i>Gpr15<sup>-/-</sup></i> und WT Mäusen verglichen. (A) Das Fortschreiten der Erkrankung ist als prozentualer Anteil des Areal der betroffenen Körperoberflächen (ABSA) über einen Zeitraum von 14 Tagen dargestellt. (B) Die Fotos der <i>Gpr15<sup>-/-</sup></i> und WT Mäuse repräsentieren den Krankheitsverlauf an Tag 4 und Tag 9 des Experimentes. (C) Die DIF von periläsionärer Haut zeigt die mit weißen Pfeilen indizierte lineare Deposition von IgG (grün) in den linken sowie von C3 (rot) in den rechten Bildern. Angegeben für die ASBA sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 10 Mäuse je Gruppe. Die Daten wurden in drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten erhoben. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels 2-way ANOVA mit Holm-Sidak's multiple comparison test an dem jeweils angegeben Tag. *, p < 0.05; ***, p < 0.001.....	34
Abbildung 9: <b>GPR15 verringert die EBA-typische Spaltbildung an der DEJ.</b> Analyse der Histopathologie der Haut von Tag 14 des passiven EBA Modells. (A) Die Bilder in der H&E Färbung zeigen läsionale Haut der <i>Gpr15<sup>-/-</sup></i> und WT Mäuse. Die dermale-epidermale Separation (DES) wird durch die gelben Pfeile verdeutlicht. (B) Quantifizierung der DES als prozentuales Auftreten einer Spaltbildung auf den Bildern der jeweiligen Gruppe, n = 5-7 Mäuse je Gruppe, erhoben in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Der statistische Vergleich erfolgte mittels Fisher's exact test. ***, p < 0.001.....	35
Abbildung 10: <b>Quantifizierung der infiltrierenden Granulozyten in periläsionärer Haut.</b> Die Akkumulation von Ly6G <sup>+</sup> und F4/80 <sup>+</sup> Zellen wurde in <i>Gpr15<sup>-/-</sup></i> und WT Mäusen an Tag 14 des Tierexperimentes evaluiert. Es sind die mRNA-Expressionslevel von <i>Ngp</i> (A) und <i>Adgre1</i> (D) angegeben. Quantifizierung von Ly6G <sup>+</sup> (B) und F4/80 <sup>+</sup> (E) Zellen. Repräsentative Bilder der Ly6G (C) und F4/80 (F) Färbungen. In gestrichelten Linien ist eine dreifache Vergrößerung des dermalen Bereiches gezeigt. Die weißen Pfeile markieren Beispiele für positiv angefärbte Zellen. (G) Darstellung der mRNA	

- Expressionslevel von  $Il1\beta$ ,  $Tnf\alpha$ ,  $CXCL1$ ,  $CXCL2$ ,  $IL17a$  und  $Il6$ . Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 10-12$  Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. .... 36
- Abbildung 11: **Auftreten und Verteilung von T-Zellen in periläsionärer Haut.** Das Vorkommen von  $CD3^+$  Zellen in der Epidermis und Dermis wurde in  $Gpr15^{-/-}$  und WT Mäusen an Tag 14 des Tierexperimentes untersucht. Quantifizierung  $CD3^+$  Zellen in (A) der gesamten Hautbreite, (B) der Epidermis und (C) der Dermis. (D) Evaluation von epidermalen  $CD3^+\delta TCR^+$  Zellen. (E) Immunhistochemische Bilder der angefärbten T-Zellen. Von der Epidermis und Dermis sind jeweils dreifach vergrößerte Aufnahmen gezeigt. Die weißen Pfeile zeigen  $CD3^+$ , die gelben Pfeile  $CD3^+\delta TCR^+$  doppelt positiv angefärbte Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 7-8$  Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \* $< 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  ..... 37
- Abbildung 12: **Quantifizierung der infiltrierenden T-Zellen in periläsionärer Haut.** Das dermale Infiltrat von  $\gamma\delta T$ ,  $CD4^+\alpha\beta T$  und  $FOXP3^+$  Zellen wurde in  $Gpr15^{-/-}$  und WT Mäusen an Tag 14 des passiven EBA Modells untersucht. (A) Repräsentative Bilder der  $\delta TCR^+$  (oben),  $CD4^+\beta TCR^+$  (mitte) und  $FOXP3^+$  Zellfärbungen (unten). Die  $FOXP3^+$  Färbung sowie die gestrichelten Bildeinsätze zeigen dermale Bereiche in dreifacher Vergrößerung. Die weißen Pfeile weisen auf positiv angefärbte Zellen hin. Auszählung der dermalen (B)  $\delta TCR^+$ , (C)  $CD4^+\beta TCR^+$  und (D)  $FOXP3^+$  Zellen. (E) Es sind die mRNA-Expressionslevel von  $Foxp3$ ,  $Tgfb1$  und  $Il10$  aufgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt,  $n = 6-12$  Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Der statistische Vergleich erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \*,  $p < 0.05$  ..... 39
- Abbildung 13: **Quantifizierung von infiltrierenden  $CD8^+$  T-Zellen in periläsionärer Haut.** Das dermale Infiltrat von  $CD8^+$  T-Zellen in  $Gpr15^{-/-}$  und WT Mäusen an Tag 14 des passiven EBA Modells wurde untersucht. (A) Auszählung der dermalen  $CD3^+CD8^+$  Zellen. (B) Immunhistochemische Bilder der Doppelfärbung. In gestrichelten Linien werden dreifach vergrößerte Ausschnitte gezeigt. Die gelben Pfeile weisen auf doppelt positiv gefärbte Zellen hin. Der Maßstab beträgt  $50\mu m$ . Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 6$  Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. .... 40
- Abbildung 14: **GPR15 und GPR15L mRNA Expression in periläsionärer Haut.** Es wurden die mRNA Expressionslevel in naiver Haut gesunder Mäuse sowie von periläsionärer Haut von erkrankten Mäusen an Tag 14 der EBA bestimmt. (A) GPR15 mRNA Expressionslevel in WT Mäusen. (B) GPR15L mRNA Expressionslevel in WT und  $Gpr15^{-/-}$  Mäusen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM präsentiert,  $n = 6-12$  Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten. Die Gruppen wurden in (A) mit dem Mann-Whitney-U Test und in (B) mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunnett's multiple comparison test statistisch ausgewertet. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  ..... 41
- Abbildung 15:  **$Gpr15^{-/-}$  Mäuse weisen eine verstärkte Keratinozytenproliferation bei gleichzeitig weniger Zeichen einer aktiven Wundheilung auf.** Die Verteilung des Proliferationsmarkers Ki-67 in der Epidermis sowie von Hyaluronsäure in der gesamten Haut wurde in  $Gpr15^{-/-}$  und WT Mäusen an Tag 14 des Tierexperimentes evaluiert. (A) Repräsentative Bilder der Ki-67 Färbung in periläsionärer Haut. Die Aufnahmen sind in vierfacher Vergrößerung gezeigt. Die weiße gestrichelte Linie markiert die DEJ. Die weißen Pfeile deuten auf positiv angefärbte Zellen. (B) Quantifizierung von  $Ki-67^+$  Zellen in der Epidermis pro HPF. (C) Repräsentative Bilder der Alcianblau Färbung in periläsionärer Haut. (D) Semi-quantitative Analyse der Intensität und der angefärbten Arealgröße der Alcianblau-Färbung. (E)  $Fgf7$ ,  $Fgf10$  und  $Ifg1$  mRNA Expressionslevel. (F)  $Arg1$  und  $Fizz1$  mRNA Expressionslevel. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert,  $n = 6-12$  Mäuse pro Gruppe,

- erhoben in drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. \*\*,  $p < 0.01$  ..... 42
- Abbildung 16: **Systemische Expression von GFP in der EBA.** Quantifizierung der GFP<sup>+</sup> Zellen in (A) inguinalen Lymphknoten und (B) der Milz von gesunden (control/Ctrl.) und erkrankten *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen an Tag 14 nach Induktion der EBA mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Relativer Anteil der GFP<sup>+</sup> Zellen innerhalb von T(CD3<sup>+</sup>), B(CD19<sup>+</sup>) und nicht-lymphozytären (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>) Zellen in gesunden und erkrankten *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen an Tag 14 des Experimentes in (C) inguinalen Lymphknoten und (D) der Milz. Relative Verteilung der GFP<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in gesunden und erkrankten *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen an Tag 14 des Experimentes in (E) inguinalen Lymphknoten und (F) der Milz. Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3-4$  Mäuse pro Gruppe. Die statistische Analyse erfolgte in (A/B) mittels Mann-Whitney-U test. \*,  $p < 0.05$  ..... 44
- Abbildung 17: **Gating Strategie zur Detektion und Analyse von GFP.** Es wird die Gating Strategie zur GFP Detektion in inguinalen Lymphknoten und in der Milz von *Gpr15<sup>-/-</sup>* (*Gpr15<sup>gfp/gfp</sup>*) Mäusen vor und nach Induktion der EBA an Tag 14 illustriert. Die anschließende Analyse der Expression von CD3 und CD19 innerhalb der GFP<sup>+</sup> Population wird gezeigt, ebenso wie die Verteilung von CD4 und CD8 innerhalb der GFP<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Population an Tag 14. Als negative Kontrollgruppe wurden WT (*Gpr15<sup>+/+</sup>*) Mäuse genutzt..... 45
- Abbildung 18: **Expression von GFP auf T<sub>regs</sub>,  $\gamma\delta$ T-Zellen und Neutrophilen.** (A) Relative Anzahl von CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen von allen gemessenen CD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz und in inguinalen Lymphknoten von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14 des Experimentes, erhoben mittels Durchflusszytometrie. (B) Prozentsatz von GFP<sup>+</sup> Zellen von allen detektierten T<sub>regs</sub> in der Milz und in den Lymphknoten. (C) Anteil von CD3<sup>+</sup> $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Milz und in inguinalen Lymphknoten von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14. (D) Quote von GFP<sup>+</sup> Zellen von allen detektierten  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten. (E) Quantifizierung von Neutrophilen im peripheren Blut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert,  $n = 2-4$  Mäuse pro Gruppe, und wurden statistisch mittels Mann-Whitney-U test verglichen..... 46
- Abbildung 19: **Gating Strategie zur systemischen Detektion und Analyse von T<sub>regs</sub> und  $\gamma\delta$ T-Zellen.** Es wurde in der Milz und in den inguinalen Lymphknoten an Tag 14 der EBA von (A) Lymphozyten, singulären und lebenden Zellen für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen und anschließend deren GFP Expression gated. In gleicher Weise wurde in (B) für CD3<sup>+</sup> $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen und deren GFP Expression gated. Als negative Kontrollgruppe wurden WT (*Gpr15<sup>+/+</sup>*) Mäuse genutzt. .... 47
- Abbildung 20: **GFP ist im peripheren Blut nicht auf Neutrophilen exprimiert.** Es wird ausgehend von allen, singulären, lebenden Zellen das Gating zu Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Neutrophilen und deren GFP Expression im peripheren Blut von *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäusen nach Induktion der EBA illustriert. (B) Overlay der Marker Ly6G beziehungsweise CD11b und GFP. (C) Die Lokalisation der GFP<sup>+</sup> Zellen im SSC-A/FSC-A Plot wurde in roter Farbe markiert. Als negative Kontrollgruppe wurden WT (*Gpr15<sup>+/+</sup>*) Mäuse genutzt..... 48
- Abbildung 21: **Systemische Analyse verschiedener Zytokine in der EBA.** Es wurden die Serum Level von (A) Il17a, (B) Il6 und (C) Tgfb1 in *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen an Tag 14 nach Induktion der EBA mittels ELISA bestimmt. Ebenso werden die Serum Level von C5a in gesunden (D) und erkrankten (E) *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen dargestellt. Die Präsentation der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 4-10$  Mäuse pro Gruppe, erhoben in zwei bis drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten. Die statische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U test. \* $p < 0.05$  ..... 49
- Abbildung 22: **In der Haut ausgewachsener, gesunder *Gpr15<sup>-/-</sup>* Mäuse ist die Menge an DETCs vermindert.** Die immunhistochemischen Analysen wurden an naiven, gesunden *Gpr15<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen durchgeführt. Auszählung und repräsentative Bilder von (A) CD3<sup>+</sup>, (B) dermalen  $\delta$ TCR<sup>+</sup>, (C) dermalen  $\beta$ TCR<sup>+</sup>, (D) epidermalen

$\delta$ TCR<sup>+</sup> und (E) epidermalen  $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Rückenhaut. (F) Quantifizierung und fluoreszenzmikroskopische Bilder von  $\delta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis, isoliert von der Haut der Ohren. (G) GPR15 mRNA Expression separat in der Epidermis und Dermis, welche aus der Haut von Schwänzen präpariert und mittels qPCR ermittelt wurde. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, n = 4-9 Mäuse pro Gruppe, erhoben in zwei bis drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U test. \* p < 0.05; \*\*, p < 0.01 ..... 51

Abbildung 23: **Anstelle von DETCs sind in der naiven Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen vermehrt CD8<sup>+</sup> $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen vorhanden.** Auszählung von (A) epidermalen  $\delta$ TCR<sup>+</sup> und (B) epidermalen  $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Rückenhaut von *Gpr15*<sup>-/-</sup>, *Gpr15*<sup>+/-</sup> und WT Mäusen. (C) Quantifizierung von epidermalen CD8<sup>+</sup> $\beta$ TCR<sup>+</sup> Zellen in der Haut von *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen. (D) Repräsentative immunhistochemische Bilder der  $\beta$ TCR und CD8 Doppelfärbung. Die in gestrichelten, weißen Linien markierten Bereiche der Epidermis sind vierfach digital vergrößert dargestellt. Die gelben Pfeile markieren doppelt positiv angefärbte Zellen. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, n = 6-12 Mäuse pro Gruppe, erhoben in zwei bis drei unabhängig durchgeführten Experimenten. In (A) und (B) wurden die Daten mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunnett's multiple comparison test, in (D) mittels Mann-Whitney-U test statistisch ausgewertet. \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 ..... 52

Abbildung 24: **mRNA Expressionslevel der verschiedenen  $\gamma\delta$ T-Subtypen.** Es wurden die mRNA Expressionslevel in naiver Haut gesunder Mäuse sowie von perilesionärer Haut von erkrankten Mäusen an Tag 14 des Experimentes bestimmt. Expression der mRNA von (A) V $\gamma$ 3, (B) V $\delta$ 1 und (C) V $\gamma$ 4 in *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert, n = 11-13 Mäuse pro Gruppe, erhoben in drei unabhängig durchgeführten Tierexperimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test und Dunnett's multiple comparison test. \*\*, p < 0.01 ..... 53

Abbildung 25: **GPR15 ist in menschlicher Haut auf vWF<sup>+</sup> Zellen exprimiert.** (A) GPR15 mRNA Expressionslevel in der Haut von BP-Patienten. (B) Quantifizierung von GPR15<sup>+</sup>, vWF<sup>+</sup> und GPR15<sup>+</sup>vWF<sup>+</sup> Zellen in der Haut von PB-Patienten und hautgesunden Kontrollen. (C) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für GPR15 und vWF. In den weißen gestrichelten Linien sind dreifach vergrößerte Ausschnitte gezeigt. Die gelben Pfeile markieren doppelt positiv angefärbte Zellen. (D) Auszählung von GPR15<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Zellen in der Haut von PB-Patienten und hautgesunden Kontrollen. (E) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz von GPR15 und CD3. Die weißen Pfeile zeigen GPR15<sup>+</sup> gefärbte Zellen, die roten Pfeile CD3<sup>+</sup> gefärbte Zellen. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, n = 7-11 pro Gruppe, und wurden statistisch mittels Mann-Whitney-U test analysiert. \*, p < 0.05 ..... 54

Abbildung 26: **Hypothetisches Modell der efferenten Phase der EBA in *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Das vermehrte Auftreten von  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Dermis der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse führt nachfolgend zu einer stärkeren Aktivierung der Neutrophilen, die sich in einer gesteigerten Produktion von ROS und proteolytischen Enzymen darstellt. Dies bewirkt letztendlich eine gesteigerte DES, die sich klinisch in der deutlich kränkeren Haut der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse widerspiegelt. .... 56

Abbildung 27: **Schematische Darstellung der Komposition der T-Zellpopulationen sowie des Mikrobioms in der Epidermis von naiven *Gpr15*<sup>-/-</sup> und WT Mäusen.** In den *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäusen sind signifikant weniger DETCs vorzufinden als in den WT Mäusen. Dagegen wird die epidermale Nische in diesen Mäusen durch CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T-Zellen besetzt. Außerdem weist das Mikrobiom der *Gpr15*<sup>-/-</sup> Mäuse eine breitere Artenvielfalt als das der WT Mäuse auf. .... 61

## 7.4 Genehmigung der Tierversuche und Ethikvota

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



### Teilnahmebescheinigung / Certificate of Attendance

**Name / surname** Jegodzinski  
**Vorname / first name** Lina  
**Geboren am / date of birth** 20.01.1995  
**Geboren in / place of birth** Henstedt-Ulzburg, Deutschland

hat vom 09.03.2016 bis 11.03.2016 regelmäßig am 20 Stunden umfassenden praktischen Teil des „Kurs zu Grundlagen der Versuchstierkunde nach FELASA-Richtlinien (Kategorie B)“ teilgenommen und diesen nach Absolvieren des 20 Stunden umfassenden theoretischen Teils (e-learning) mit einer Prüfung erfolgreich abgeschlossen. Der Kurs entspricht inhaltlich den Empfehlungen der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) und der Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animals (GV-SOLAS) für die Aus- und Weiterbildung von Personen, die an der Durchführung von Tierversuchen beteiligt sind (FELASA, Kategorie B). Der Kurs wurde von der Humboldt-Universität zu Berlin / Berlin Mouse Clinic for Neurology and Psychiatry durchgeführt.

has successfully completed (passed the exam) a 40-hours course on Laboratory Animal Science. Its contents are in accordance with the recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animals (GV-SOLAS) on the education and training of persons carrying out animal experiments (FELASA, category B). The course was organized and performed by the scientific staff of Humboldt University of Berlin / Berlin Mouse Clinic for Neurology and Psychiatry.

Berlin, den 29. März 2016

Prof. Dr. York Winter

(Kursleiter / Instructor)

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

Herrn  
Prof. Dr. Christian Sadik  
Klinik für Dermatologie, Allergologie  
und Venerologie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Ihr Zeichen:  
Ihr Antrag vom: 03.11.2015  
Mein Zeichen: V 242 - 81015/2015 (113-9/15)  
Meine Nachricht vom: /

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

nachrichtlich:

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

10. Dezember 2015

**Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Sehr geehrter Herr Prof. Sadik,

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

Die Rolle des Rezeptors GPR15 in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen  
zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 80 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Dezember 2018 befristet.
3. Ort der Durchführung:  
Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung



4. Leiter des Versuchsvorhabens:  
Herr Prof. Dr. Christian Sadik
5. Stellvertreter:  
Herr Prof. Dr. Ralf Ludwig
6. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
7. Verantwortlicher Tierarzt nach § 28 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125):  
Herr Dr. B. Schmelting
8. Weitere Nebenbestimmungen:  
Keine.

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

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

#### **Rechtsbehelfsbelehrung**

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

#### **Hinweis:**

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

Mit freundlichen Grüßen

  
Dr. Bähr

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

Herrn  
Prof. Dr. Christian Sadik  
Klinik für Dermatologie, Allergologie  
und Venerologie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Ihr Zeichen:  
Ihr Antrag vom: 05.08.2016  
Mein Zeichen: V 242 - 54303/2016 (113-8/15)  
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

07. September 2016

**Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken**

Sehr geehrter Herr Prof. Sadik,

aufgrund Ihres o. a. Antrages können im Rahmen meiner Genehmigung vom 10.  
Dezember 2015 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle des Rezeptors GPR15 in der  
Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen“ weitere 388 Mäuse für Experimente der  
Stufen A und B verwendet werden.

Die von Ihnen beantragte Stufe C steht, nach Ansicht der Kommission, thematisch nicht  
im Zusammenhang mit dem ursprünglich beantragten und genehmigten  
Tierversuchsvorhaben, sodass für die Stufe C keine Tiere genehmigt werden können.  
Hier wäre ein Neuantrag erforderlich.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Michael Sekulla



Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt,  
Natur und Digitalisierung | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn  
Prof. Dr. Christian Sadik  
Klinik für Dermatologie, Allergologie  
und Venerologie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Ihr Zeichen:  
Ihr Antrag vom: 05.11.2018  
Mein Zeichen: V 242 - 55842/2018 (113-8/15)  
Meine Nachricht vom: /

Anja Hinz  
Anja.Hinz@melund.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

22. November 2018

**Durchführung von Tierversuchsvorhaben**

Sehr geehrter Herr Prof. Sadik,

aufgrund Ihres o. a. Antrages verlängere ich die Gültigkeitsdauer meiner Genehmigung vom 10. Dezember 2015 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle des Rezeptors GPR15 in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen“ bis zum 31. Dezember 2019.

**Rechtsbehelfsbelehrung**

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

Hinweis:

Bei der Verwendung der elektronischen Form sind besondere Voraussetzungen zu beachten (vgl. Landesverordnung über den elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften vom 12.12.2006 (GVOBl. 2006, 361) in der z. Zt. geltenden Fassung. *Hiernach wird die elektronische Form insbesondere durch eine qualifiziert signierte Datei gewahrt, die nach den Maßgaben der genannten Landesverordnung übermittelt wird.*

Weitere Informationen zum elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften sind auf der Internetseite [www.justizpoststelle.schleswig-holstein.de](http://www.justizpoststelle.schleswig-holstein.de) abrufbar.

Mit freundlichen Grüßen

  
Hinz

stein  
den



Schleswig-Holstein  
Ministerium für Energiewende,  
Landwirtschaft, Umwelt, Natur  
und Digitalisierung

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt,  
Natur und Digitalisierung | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn  
Prof. Dr. Christian Sadik  
Klinik für Dermatologie, Allergologie  
und Venerologie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Ihr Zeichen:  
Ihr Antrag vom: 29.04.2019  
Mein Zeichen: V 242 - 28721/2019  
Meine Nachricht vom: /

Anja Hinz  
Anja.Hinz@melund.landsch.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

20. Mai 2019

**Durchführung von Tierversuchsvorhaben**

Sehr geehrter Herr Prof. Sadik,

aufgrund Ihres o. a. Antrages verlängere ich die Gültigkeitsdauer

- meiner Genehmigung vom 23. April 2015 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle der Dipeptidyl Peptidase-IV in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen“ letztmalig bis zum 30. April 2020 (41-3/15),
- meiner Genehmigung vom 20. Oktober 2015 für das Versuchsvorhaben „Molekulare Mechanismen der 15-Lipoxygenase in der Kontrolle der Effektorphase der Pemphigoid-Erkrankungen“ letztmalig bis zum 31. Oktober 2020 (68-5/15),
- meiner Genehmigung vom 23. Juli 2015 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle der 15-Lipoxygenase in der IL-23- und der TPA-induzierten psoriasiformen Dermatitis“ letztmalig bis zum 31. Juli 2020 (69-5/15),
- meiner Genehmigung vom 09. Dezember 2015 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle des peripheren Nervensystems in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen“ letztmalig bis zum 31. Dezember 2020 (107-8/15),

Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Niemannsweg 220, 24106 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 | poststelle@melund.landsch.de | De-Mail: poststelle@melund.landsch.de-mail.de | www.melund.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch verschlüsselte Dokumente. In der Mercatorstraße 3 steht eine Ladesäule für E-Fahrzeuge (22kw) zur Verfügung.

- meiner Genehmigung vom 10. Dezember 2015 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle des Rezeptors GPR15 in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen“ letztmalig bis zum 31. Dezember 2020 (113-8/15),
- meiner Genehmigung vom 08. Juni 2016 für das Versuchsvorhaben „Funktion und Rolle der Phospholipase D5 in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen“ bis zum 30. Juni 2020 (65-5/16),
- meiner Genehmigung vom 08. Juni 2016 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle von CCR1/CXCR2 in der Pathogenese von Pemphigoid-Erkrankungen“ bis zum 30. Juni 2020 (66-5/16) sowie
- meiner Genehmigung vom 25. Juli 2016 für das Versuchsvorhaben „Die Rolle eines neuen des Rezeptors GPR15 in der Pathogenese der Psoriasis und der rheumatoiden Arthritis“ bis zum 30. Juli 2020 (83-7/16).

Eine Verlängerung des Versuchsvorhabens „Die Rolle von Integrin alpha11 in der Pathogenese der Psoriasis“ (55-5/14) über den 31. Juli 2019 hinaus ist aufgrund rechtlicher Vorgaben nicht möglich. Das Versuchsvorhaben ist daher abzuschließen.

Um das Vorhaben fort zu führen, ist ein kommissionspflichtiger Neuantrag, unter Vorlage der bisherigen Ergebnisse, erforderlich.

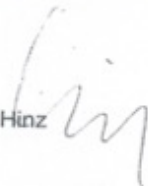
#### **Rechtsbehelfsbelehrung**

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

#### Hinweis:

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

Mit freundlichen Grüßen

Hinz 



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Hr. Prof. Dr. Dr. E. Schmidt  
Klinik für Dermatologie, Allergologie  
und Venerologie

im Haus

#### Ethik-Kommission

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Stellv. Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler

Geschäftsstelle:  
Frau Dr. A. Hüppe  
Tel.: +49 451 500 5854  
Fax: +49 451 500 5872  
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 15-051

Datum: 20.02.2015

#### Betreff: Votum zur Vorlage bei der DFG zur KFO 303 „Pemphigoid Diseases“ (PD)

Sehr geehrter Herr Professor Schmidt,

hiermit bestätigen wir den Eingang Ihres „Proposal for the Clinical Research Unit 303: Pemphigoid Diseases – Molecular Pathways and their Therapeutic Potential“ zur Vorlage bei der DFG sowie der für die ethische Beratung erforderlichen Antragsunterlagen für einzelne Teilprojekte.


Die vorgelegten Unterlagen wurden unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Es bestehen **keine ethischen Bedenken** gegen die Durchführung der in den Teilprojekten geschilderten Forschungsvorhaben.

Dieses Votum ist abschließend, insofern es sich auf die Studien, wie sie im Antrag beschrieben sind, bezieht und umfasst die folgenden Teilprojekte:

- Project 1: Genetics in PD in humans
- Project 2: The skin microbiome modulating PD
- Project 3: Reduced galactosylation of autoreactive IgG as driver of PD
- Project 4: Therapeutic potential of sialylated PD IgG autoantibodies
- Project 5: LTB4/BLT1 gatekeeping effector cell recruitment in PD
- Project 6: The role of lymphocytes in the effector phase of PD
- Project 7: Keratinocytes regulating PD skin inflammation
- Project 8: HCA<sub>2</sub> activation in PD – therapeutic effects and mode of action
- Project Z1: Central clinical infrastructure (PD patient sample collection; PD patient database; PD patient registry)
- Project Z2: Biostatistics and systems medicine core unit

*Bei Änderung der Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die im Rahmen der Durchführung der Einzelstudien auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen. Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter [www.ctrks.de](http://www.ctrks.de)). Die ärztliche und juristische Verantwortung der Studienleiter und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.*

Mit freundlichem Gruß

  
Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Vorsitzender





UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck - Ratzeburger Allee 160 - 23538 Lübeck

Hr. Prof. Dr. Dr. E. Schmidt  
Klinik für Dermatologie, Allergologie  
und Venerologie

im Haus

#### Ethik-Kommission

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Stellv. Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler

Geschäftsstelle:  
Frau Dr. A. Hüppe  
Tel.: +49 451 500 5854  
Fax: +49 451 500 5872  
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 18-046

Datum: 15.02.2018

#### Betreff: Votum zur Vorlage bei der DFG zur KFO 303 „Pemphigoid Diseases“ (PD)

Sehr geehrter Herr Professor Schmidt,

uns wurde das „Proposal for the Clinical Research Unit 303: Pemphigoid Diseases – Molecular Pathways and their Therapeutic Potential“ (zweite Förderphase) sowie weitere für eine ethische Beratung erforderliche Angaben für die Teilprojekte vorgelegt.


Die Unterlagen wurden unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Es bestehen **keine ethischen Bedenken** gegen die Durchführung der in den Teilprojekten geschilderten Forschungsvorhaben.

Dieses Votum ist abschließend, insofern es sich auf die Studien, wie sie im Antrag beschrieben sind, bezieht und umfasst die folgenden Teilprojekte:

- Project 1: Mitochondrial Regulation of PD (Hirose/Ibrahim)
- Project 2: Functional Characterization and directed Modulation of the Skin Microbiome in PDs (Baines/Schmidt)
- Project 3: The C5a/C5aR1 axis as a Regulator of autoreactive IgG glycosylation in PDs (Köhl)
- Project 4: The Role of C5aR2 in Pathogenesis of PDs (Karsten/Schmidt)
- Project 5: The Role of Monocyte-derived Cells and the molecular Mechanisms of their Recruitment in the Pathogenesis of PDs (König/Sadik)
- Project 6: The Role of Lymphocytes in the Effector Phase of PDs (Bieber/Manz)
- Project 7: Cutaneous Complement C3 as Key Driver of PD (Ludwig/Verschoor)
- Project 8: HCA<sub>2</sub> Activation in PD – Therapeutic Effect and Mode of Action (Schwaninger/Zillikens)  
(Anmerkung: Für die klinische Erprobung von DMF bei PD-Patienten ist ein gesondertes Ethikvotum notwendig)
- Project P9: Lipid Mediator – orchestrated molecular Mechanisms resolving Skin Inflammation in PD (Sadik)
- Project Z1: Central clinical infrastructure (Sadik/Schmidt/van Beek/Zillikens)
- Project Z2: Biostatistics and systems medicine core unit (Sadik, König, Busch, Erdmann)

*Bei Änderung der Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die im Rahmen der Durchführung der Einzelstudien auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen. Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Die ärztliche und juristische Verantwortung der Studienleiter und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.*

Mit freundlichem Gruß

  
Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Vorsitzender

## 8 Danksagungen

Im Folgenden möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Christian Sadik für die Bereitstellung des Themas sowie die kontinuierliche und konstruktive Betreuung.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik für Dermatologie der Universität zu Lübeck durchzuführen.

Bei Frau Dr. rer. nat. Tanya Sezin möchte ich mich für die ausführliche Einarbeitung, die fortlaufende Hilfsbereitschaft während der Experimente und die wertvolle Unterstützung über die Dauer der gesamten Arbeit bedanken.

Darüber hinaus danke ich Sadegh Mousavi für seine ausdauernde Assistenz in allen experimentellen und technischen Fragen.

Dem gesamten Team der AG Sadik verdanke ich viele hilfreiche Hinweise zur Durchführung von Versuchen, ein produktives Arbeitsklima und eine angenehme Atmosphäre. Die gemeinsame Zeit im Labor hat mir immer Freude bereitet.

Außerdem möchte ich mich bei der Klinischen Forscherorganisation, KFO303: Pemphigoid Diseases – Molecular Pathways and their Therapeutic Potential, für die Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums während des praktischen Teils der Dissertation sowie für die Bereitstellung der humanen Hautproben bedanken.

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs, GRK1727 "Modulation of Autoimmunity", und insbesondere meinen beiden Mentoren, Prof. Dr. med. Ralf Ludwig und Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz, danke ich für die entgegenkommende Kooperation sowie für die Möglichkeit an der 9<sup>th</sup> Autumn School der Deutschen Gesellschaft für Immunologie teilzunehmen.

Zuletzt möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie & Freunden für die stete Begleitung, ihr Verständnis und die liebevolle Unterstützung bedanken.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Lina Jegodzinski aus Henstedt-Ulzburg



### Hochschulstudium:

10/2013-12/2020: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck:

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2015)

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2019)

Praktisches Jahr (2019-2020):

Innere Medizin: UKSH Lübeck

Chirurgie: Zuger Kantonsspital, Schweiz & UKSH Lübeck

Dermatologie: UKSH Lübeck

3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2020)

04/2016-04/2017: Stipendium der Klinischen Forscherorganisation KFO303:  
Pemphigoid Diseases – Molecular Pathways and their  
Therapeutic Potential

02/2015-12/2020: Stipendium des Evangelischen Studienwerkes Villigst

03/2018-12/2020: Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes

04/2019: Hendrik Lehnert Preis für besonderes studentisches Engagement

### Beruflicher Werdegang:

Ab 04/2021 Weiterbildungsassistentin in der Medizinischen Klinik I des  
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck

### Zeitraum der Dissertation:

04/2016-04/2017: Experimentelle Untersuchungen

04/2018-01/2020: Fertigstellung der Publikationen



### Publikationen:

- **Jegodzinski, L.**, Sezin, T., Loser, K., Mousavi, S., Zillikens, D. & Sadik, C.D. The G Protein-Coupled Receptor (GPR) 15 Counteracts Antibody-Mediated Skin Inflammation. *Front. Immunol.* **11**, 1858–1858 (2020).
- Sezin, T.#, **Jegodzinski, L.#**, Meyne, L.-M., Gupta, Y., Mousavi, S., Ludwig, R.J., Zillikens, D. & Sadik, C.D. The G protein-coupled receptor 15 (GPR15) regulates cutaneous immunology maintaining dendritic epidermal T cells and regulating the skin microbiome. *Eur. J. Immunol.* **51**, 1390-1398 (2021).

**Die beiden Publikationen beinhalten die wesentlichen Daten dieser Arbeit und sind separat beigelegt.**

- O'Neill, J., **Jegodzinski, L.** & Tayebjee, M. H. Incidence of subclinical atrial fibrillation in a South Asian population. *Pacing Clin. Electrophysiol.* **41**, 1600–1605 (2018).

### Posterbeiträge:

- Posterbeitrag bei der *Scientific Conference der International Pemphigus and Pemphigoid Foundation (IPPF)*: Sezin, T.#, **Jegodzinski, L.#**, Kempen, L., Sadik, C.D. The orphan receptor GPR15 suppresses pemphigoid disease-like dermatitis. Lübeck (2017).
- Posterbeitrag bei der *9<sup>th</sup> Autumn School der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI)*: Sezin, T.#, **Jegodzinski, L.#**, Kempen, L., Sadik, C.D. The orphan receptor GPR15 suppresses pemphigoid disease-like dermatitis. Merseburg (2017).
- Posterbeitrag beim *46th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)*: Sezin, T.#, **Jegodzinski, L.#**, Meyne, L., Mousavi, S., Gupta, Y., Ludwig, R.J., Zillikens, D., Sadik, C.D. The G protein-coupled receptor GPR15 suppresses pemphigoid disease-like dermatitis. München (2019).

#, equal contribution