



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem
Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED)

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

**Explorative Untersuchung zur Expression von C5aR1
und C5aR2 in frühen Hautveränderungen von Patienten
mit bullösen Pemphigoid**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Richard Stahlkopf
aus Büchen

Lübeck 2023

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Krüger

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.06.2023

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnisse	IV
1.1	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1.2	Tabellenverzeichnis.....	V
1.3	Abbildungsverzeichnis.....	VI
2	Einleitung	1
2.1	Anatomie der Haut.....	1
2.1.1	Dermoepidermale Junktionszone.....	2
2.1.2	Hemidesmosomen.....	2
2.2	Immunsystem.....	3
2.3	Autoimmunkrankheiten.....	4
2.4	Das Komplementsystem.....	5
2.5	Komplementfaktor C5a und seine Rezeptoren C5aR1 und C5aR2.....	6
2.5.1	C5a Rezeptor-1 (C5aR1).....	7
2.5.2	C5a Rezeptor-2 (C5aR2).....	8
2.6	Das bullöse Pemphigoid.....	9
2.6.1	Behandlung.....	12
2.6.2	Pathophysiologie des bullösen Pemphigoids.....	12
2.6.3	Die Rolle des Komplementsystems beim bullösen Pemphigoid.....	13
2.7	Projektspezifische Vorarbeiten.....	15
2.8	Fragestellung.....	17
3	Materialien und Methoden	18
3.1	Ethik.....	18
3.2	Hautproben.....	18
3.3	Herstellung der Hautschnitte.....	20
3.4	Immunhistochemie.....	20
3.4.1	Leukozytenmarker.....	22
3.4.2	Deparaffinierung.....	24
3.4.3	Antigenrückgewinnung.....	25
3.4.4	Blockierung.....	27
3.4.5	Erste Färbung.....	29
3.4.6	Zweite Färbung.....	32
3.4.7	Quantifizierung der immungefärbten Zellen.....	32
3.4.8	Spezifität des C5aR2-Antikörpers.....	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Doppelfärbungen waren bei allen Leukozyten nachzuweisen.....	37

4.2	Überprüfung der Spezifität des verwendeten C5aR2-Antikörpers	38
4.3	Immunhistochemie Bilder.....	40
4.4	T-Zellen sind die häufigsten Leukozyten in periläsionalen Hautläsionen von BP-Patienten.....	48
4.4.1	T-Zellen haben die größte C5aR1-Expression in periläsionalen Hautläsionen von BP- Patienten.....	48
4.4.2	Die C5aR2-Expression unterscheidet sich von der C5aR1-Expression in frühen BP-Läsionen.....	50
4.4.3	Mastzellen sind die Leukozyten mit der höchsten C5aR2-Expression in periläsionaler Haut der BP-Patienten	50
4.4.4	Eosinophile, Mastzellen und T-Zellen weisen die höchste Expression von C5aR in periläsionaler Haut der BP-Patienten auf.....	52
5	Diskussion	53
5.1	Ausblick.....	68
6	Zusammenfassung	70
7	Summary	71
8	Literaturverzeichnis.....	72
9	Materialien.....	86
10	Eigene Veröffentlichungen.....	89
11	Danksagungen	90

1 Verzeichnisse

1.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer, Mikrometer
AK	Antikörper
BMZ	Basalmembranzone
BSA	bovines Serumalbumin
C5aR1	C5a-Rezeptor-1
C5aR2	C5a-Rezeptor-2
C5L2	C5a Rezeptor 2, C5a-like receptor 2
CD	cluster of differentiation
COVID	coronavirus disease
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEJ	dermal-epidermaler Übergang
DIF	direkte Immunfluoreszenz
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPX	Eosinophil Peroxidase
ERK	extrazelluläre signalregulierte Kinase, Extracellular-signal Regulated Kinase
Fab-Fragment	antigenbindendes Fragment
Fc-Fragment	kristallisierbares Fragment
g	Gramm
GPR77	G Protein-gekoppelter Rezeptor 77
GRK	G-Rezeptor Kinase
HIAR	Hitze induzierte Antigen Rückgewinnung
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HMGB1	High-Mobility Group Box Protein 1, High-Mobility Group Box Protein 1
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
ka	keine Angabe
l	Liter
LAMP	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 1
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
n	Zellzahl
NCAM1	Neuronales Zelladhäsionsmolekül 1
NES	normales Eserum
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürlicher Killerzellen
PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween20
pH	negative dekadische Logarithmus der Konzentration von Protonen (H ⁺) bzw. Hydronium-Ionen (H ₃ O ⁺) in wässriger Lösung
RT	Raumtemperatur
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
β-arr	β-arrestin

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proinflammatorische Wirkung von C5aR1 in verschiedenen Krankheitsbildern bzw. Krankheitsmodellen.....	7
Tabelle 2: Proinflammatorische oder antiinflammatorische Wirkung von C5aR2 in verschiedenen Krankheitsbildern bzw. Krankheitsmodellen.....	8
Tabelle 3: Autoimmunologische Befunde der 9 BP-Patienten	19
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Reaktanten in Immunhistochemie.....	29
Tabelle 5: Beschreibung der Herstellung der Antikörperlösungen für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung und ihrer Isotyp-Kontrollen.....	30
Tabelle 6: Beschreibung der verschiedenen Fluoreszenzfarben	33
Tabelle 7: Quantifizierung der C5aR1-positiven Mastzellen in der periläsionalen Haut von BP-Patienten	34
Tabelle 8: Herstellung der C5aR2-Antikörper-Peptid Lösung	35
Tabelle 9: Antikörper	86
Tabelle 10: Chemikalien und Reagenzien	87
Tabelle 11: Laborgeräte	88

1.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch die Haut.....	1
Abbildung 2: Aufbau der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ).....	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls	4
Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Komplementaktivierung.....	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung der negativen Modulation von C5aR2 auf C5aR1 in menschlichen Neutrophilen	9
Abbildung 6: Klinische und immunpathologische Befunde beim BP	11
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Pathogenese des BP.....	15
Abbildung 8: Darstellung der Funktion von C5aR1 und C5aR2 im Mausmodell	16
Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Deparaffinierung	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Bearbeitung der Hautproben für die Immunhistochemie	26
Abbildung 11: Blockierung endogener Antikörper mit Fab-Fragmenten.....	28
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zählung	33
Abbildung 13: Spezifität des C5aR2-Antikörpers.....	39
Abbildung 14: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und C5a/C5a des-Arg	41
Abbildung 15: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und Tryptase	42
Abbildung 16: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und eosinophile Peroxidase	43
Abbildung 17: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und CD68.....	44
Abbildung 18: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und Myeloperoxidase	45
Abbildung 19: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und CD3.....	46
Abbildung 20: NK-Zellen in frühen BP-Läsionen	47
Abbildung 21: Anzahl von Leukozyten und C5aR1-Expression in Haut von BP- und Kontroll-Patienten.....	49
Abbildung 22: Anzahl von Leukozyten und C5aR2-Expression in Haut von BP- und Kontroll-Patienten.....	51
Abbildung 23: C5aR ⁺ -Expression.....	52

2 Einleitung

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist eine blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut (Schmidt und Zillikens 2013). Das Komplementsystem spielt in der Pathogenese des BP eine zentrale Rolle. Es dient als Schlüsselement für die Rekrutierung von Immunzellen in die Haut, was zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, reaktiven Sauerstoffspezies und Proteasen führt, die schließlich den dermoepidermalen Übergang abbauen und eine Blasenbildung resultiert (Edwards et al. 2019). Während Komplementfaktor C5a auf seinen C5a-Rezeptor-1 (C5aR1) beim BP einen krankheitsfördernden Einfluss ausübt, wurde vor kurzem gezeigt, dass über den C5a-Rezeptor-2 (C5aR2) ein antiinflammatorischer Effekt vermittelt wird (Karsten et al. 2018). In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, welche Zelltypen in der Haut von Patienten mit BP die stärkste C5aR1- und C5aR2-Expression aufweisen. Die Ergebnisse bieten die Möglichkeit, entscheidende Zellpopulationen als Ziel für C5aR1- oder C5aR2-Antagonisten oder Agonisten als neue pharmakologische Interventionen des BP zu identifizieren und dadurch gezielte Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

2.1 Anatomie der Haut

Die Haut besteht aus drei Schichten, die als (von außen nach innen) Epidermis, Dermis und Subkutis bezeichnet werden (**Abbildung 1**). Die Epidermis ist ein verhornendes Plattenepithel, das eine Barrierefunktion sowohl nach außen (Wärmeisolierung und Schutz vor Flüssigkeitsverlust) als auch nach innen (Schutz vor ultravioletter Strahlung und dem Eindringen körperfremder Substanzen) bietet (Kligman 2002).

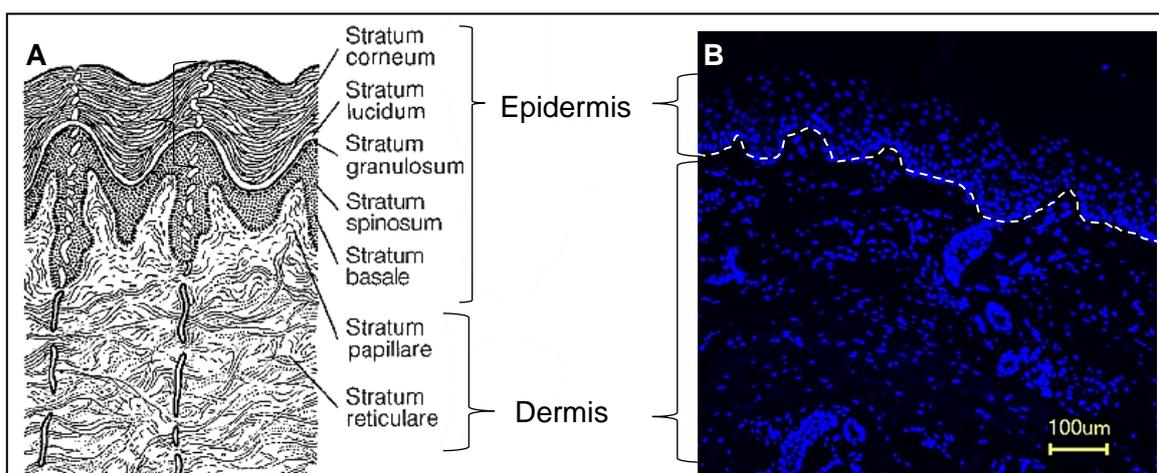


Abbildung 1: Querschnitt durch die Haut. (A) Schematischer Querschnitt durch die Haut mit Darstellung der einzelnen Hautschichten (übernommen aus Fritsch und Schwarz 2018). **(B)** Dem gegenüber ein Immunfluoreszenzbild der Haut zur anatomischen Orientierung in 100-facher Vergrößerung. Die blauen Punkte stellen Zellkerne verschiedener Zellen dar. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen Epidermis und Dermis bzw. die dermoepidermale Junctionszone. Der Maßstab hat eine Länge von 100 µm.

Die Zellen der Epidermis werden als Keratinozyten bezeichnet. Die Epidermis lässt sich wiederum in unterschiedliche Schichten unterteilen (**Abbildung 1**) (Kanitakis 2002). Die Dermis (Corium, Lederhaut) ist das bindegewebige Gerüst der Haut, welches von den Zellen der Dermis, den Fibroblasten, gebildet wird und der Haut eine hohe Reißfestigkeit verleiht. In ihr verlaufen Nervenbahnen, Blut- und Lymphgefäße (Schiebler und Korf 2007; Fritsch und Schwarz 2018).

Die Subkutis (Tela subcutanea, Unterhaut) besteht aus Unterhautfettgewebe und Faszien, die eine Wärmeisolierung und eine Verschiebeschicht bilden (Schiebler und Korf 2007).

2.1.1 Dermoepidermale Junktionszone

Die Grenzfläche zwischen Epidermis und Dermis bildet die dermoepidermale Junktionszone (DEJ) oder Basalmembranzzone (BMZ) (**Abbildung 2**). Sie besteht aus der basalen Membran, die von der Zellmembran der Keratinozyten gebildet wird, der Lamina lucida, der Basallamina (Lamina densa) und dem sublaminären Raum. Die Hauptfunktion der DEJ besteht darin, als adhärenente Verbindung zwischen Epidermis und Dermis zu dienen. Viele Autoimmunerkrankungen wie aus der Gruppe der Pemphigoiderkrankungen sind gegen Proteine der DEJ gerichtet (Goletz et al. 2017).

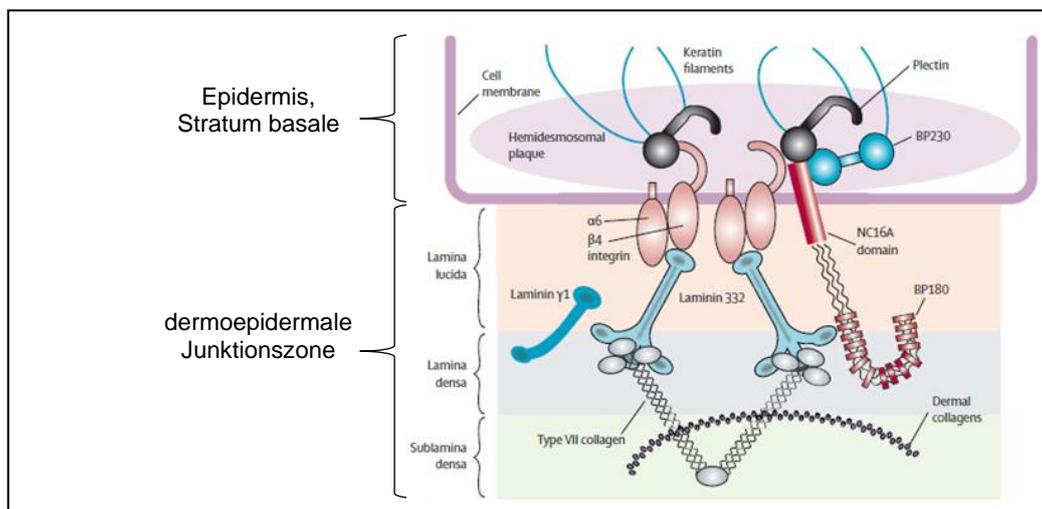


Abbildung 2: Aufbau der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ). Schematischer Aufbau der DEJ und eines Hemidesmosomen (modifiziert nach Schmidt und Zillikens 2013).

2.1.2 Hemidesmosomen

Die Keratinozyten sind an ihrer basalen Membran über Hemidesmosomen und Ankerfilamenten mit der Basallamina verbunden (**Abbildung 2**). Die Hemidesmosomen bestehen aus einer zytoplasmatischen Plaque. Das bullöse Pemphigoid-Antigen 230

(BP230) ist am Aufbau der Plaque beteiligt und dient der Anheftung von Keratinfilamenten, die am Aufbau des Zytoskeletts der Keratinozyten beteiligt sind. Das bullöse Pemphigoid-Antigen 180 (BP180, Kollagen XVII) stellt ein transmembranes Protein der Hemidesmosomen dar, das der Verbindung zwischen hemidesmosomalen Plaque und der Basalmembran dient (Borradori und Sonnenberg 1999).

2.2 Immunsystem

Das Immunsystem des Körpers dient der Abwehr von Krankheitserregern (Pathogenen), körperfremden Stoffen und körpereigenen schädlichen oder funktionslosen Zellen. Es wird das angeborene und adaptive Immunsystem unterschieden. Das angeborene Immunsystem dient der schnellen ungezielten Abwehr von Pathogenen und Zellen. Zu den Abwehrzellen (Leukozyten) gehören Monozyten/Makrophagen, neutrophile-, eosinophile-, basophile Granulozyten, Mastzellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen. Diese Zellen sind in der Lage über Phagozytose oder Freisetzung von zytotoxischer Proteine Krankheitserreger unschädlich zu machen. Außerdem sind ein Teil dieser Zellen in der Lage, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, die zum adaptiven Immunsystem gehören, Antigene zu präsentieren (Murphy und Weaver 2018). Die Antigenpräsentation erfolgt über bestimmte Proteine, die als humanes Leukozyten-Antigen (HLA) bezeichnet werden und die von einem zusammenhängenden Genort kodiert werden, der als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bezeichnet wird. Man unterscheidet drei MHC-Klassen. Klasse-I- und Klasse-II-Gene kodieren für jeweils drei HLA-Proteine. Die Gene sind hoch polymorph, d.h. innerhalb einer Population gibt es verschiedene Varianten. MHC-I-Moleküle finden sich auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers und auf Thrombozyten, wo sie hauptsächlich dazu dienen, in der Zelle hergestellte Peptide an CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen zu präsentieren, die nach Anzeichen pathogener Veränderungen suchen und die Zelle in einem solchen Falle zerstören (Rink et al. 2015). MHC-II-Moleküle dienen der Antigenpräsentation durch antigenpräsentierenden Zellen an CD4⁺-T-Zellen, die dieses Antigen spezifisch binden und daraufhin aktiviert werden (Holling et al. 2004). Die Klasse-III-Gene bestehen aus Komplement- und Zytokingenen. Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen (cluster of differentiation 8 positive T-Zellen) können durch ihren spezifischen Rezeptor Pathogene gezielt und wirkungsvoll bekämpfen. CD4⁺-T-Helferzellen (T_H-Zellen) sind für die Aktivierung von B-Zellen und für die Antikörperbildung notwendig, während regulatorische T-Zellen (T_{reg}) die Selbst-Toleranz regulieren und die Immunantwort dämpfen. Aktivierte B-Zellen reifen zu Plasmazellen heran, die Antikörper bilden und freisetzen. Antikörper sind Glykoproteine, die an spezifische Strukturen auf dem

Zielmolekül (Antigen) binden und für das Immunsystem markieren (Murphy und Weaver 2018). Antikörper (Immunglobuline, Ig) haben eine Y-förmige Gestalt (**Abbildung 3**).

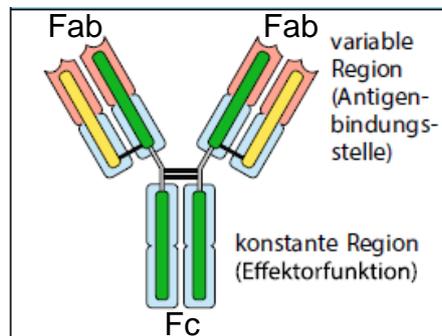


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls. Ein Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (grün) und zwei identischen leichten Ketten (gelb). Der Antikörper lässt sich in zwei antigenbindende Fragmente (Fab) und einem kristallisierbaren-Fragment (Fc) unterteilen (übernommen aus Murphy und Weaver 2018).

Die variable Region, die sich jeweils an beiden antigenbindenden Fragmenten (Fab-Fragment) befindet, ist für jeden Antikörper spezifisch und bindet ein bestimmtes Antigen. Der Ort, an dem der Antikörper bindet, wird als Epitop bezeichnet. Die konstante Region, die man auch als kristallisierbares Fragment (Fc-Fragment) bezeichnet, vermittelt die Aktivierung des Komplementsystems, Phagozytose oder aktiviert die Degranulation von NK-Zellen, Granulozyten und Mastzellen. Es gibt verschiedene Klassen von Antikörpern (IgG, IgA, IgD, IgE und IgM) mit unterschiedlicher Funktion oder Lokalisation (Murphy und Weaver 2018).

2.3 Autoimmunkrankheiten

Das Immunsystem hat die primäre Funktion den Schutz des Wirts vor Infektionserregern zu erfüllen. Dazu ist eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und fremden Antigenen notwendig. Bei Autoimmunkrankheiten werden Immunreaktionen gegen eigene Moleküle, Zellen oder Gewebe eingeleitet (Wang et al. 2015). Lymphozyten durchlaufen während ihrer Entwicklung im Thymus und im Knochenmark eine Selektion, die als primäre Selektion oder zentrale Toleranz bezeichnet wird. Hier werden den sich entwickelnden Lymphozyten Antigene von Peptiden präsentiert, die im Körper vorliegen. Autoreaktive Lymphozyten, die an körpereigene Peptide binden, werden zerstört (Cheng und Anderson 2018). Entzieht sich ein körpereigener Lymphozyt der primären Selektion, spielt die sekundäre Selektion oder periphere Toleranz eine Rolle. Als Beispiel sind hier T_{Reg} zu nennen, bei denen es sich in der Regel um $CD4^+$ - $CD25^+$ -T-Zellen handelt. Diese erkennen autoreaktive T-Zellen und supprimieren diese. Kommt es bei den T_{Reg} zu einer Mutation, z.B. des Transkriptionsfaktors Foxp3, wird das Auftreten von Autoimmunkrankheiten begünstigt

(Dominguez-Villar und Hafler 2018). Autoimmunkrankheiten entstehen durch Einwirken von Umweltfaktoren auf der Basis einer genetischen Prädisposition (Wang et al. 2015). Die Expression bestimmter MHC-Allele ist mit dem Risiko verbunden, bestimmte Autoimmunkrankheiten zu erleiden (Dendrou et al. 2018). Weiterhin können Mutationen in Genen, die für Zytokine, Zytokin-Rezeptoren und Signaltransduktionsgene kodieren, Autoimmunkrankheiten auslösen (Cheng und Anderson 2018; Mortier et al. 2020). Infektionen und Umweltfaktoren wie pharmazeutische Wirkstoffe, ultraviolettes Licht, Schwermetalle oder Impfstoffe begünstigen Autoimmunreaktionen (Wang et al. 2015).

2.4 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem gehört zum angeborenen Immunsystem und spielt eine Schlüsselrolle in der Erkennung und Zerstörung von eingewanderten Mikroorganismen, Immunkomplexen und apoptotischen Zellen. Es besteht aus über 30 plasma- und membrangebundenen Proteinen, die sich bei einem Reiz kaskadenartig aktivieren (**Abbildung 4**) (Köhl 2006). Das Komplementsystem aktiviert zum einen Komplementfaktoren, die als Opsonine bezeichnet werden. Opsonine binden an die Zelloberfläche und erleichtern deren Erkennung und Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen. Zu den Opsoninen gehören C3b und C4b (Kemper und Le Fric 2009). C3a und C5a werden als Anaphylatoxine bezeichnet. Die Anaphylatoxine haben eine chemotaktische Wirkung und dienen der Aktivierung immunkompetenter Zellen und dessen Rekrutierung zum Ort der Entzündung (Köhl 2006; Kemper und Le Fric 2009). Die Immunzellen exprimieren Rezeptoren (C3aR für C3a, C5aR1 und C5aR2 für C5a), über die die Wirkung der Anaphylatoxine vermittelt wird (Laumonnier et al. 2017). Zum anderen bildet das Komplementsystem einen Membranangriffskomplex (MAK), der sich in die Membran pathogener Zellen einfügt und zu deren direkter Lyse führt (Kemper und Le Fric 2009). Es gibt drei Wege, durch die das Komplementsystem aktiviert wird (**Abbildung 4A**):

1. *Klassischer Weg*: C1q bindet an die Fc-Region von gebundenen Antikörpern (Köhl 2006). Die Antikörperklassen IgM, IgG1 und IgG3 sind in der Lage C1q zu binden, dagegen ist IgG2 weniger kompetent in der C1q-Bindung. IgG4 sowie IgA und IgE besitzen nicht die Kapazität, Komplement zu aktivieren (Basta 2004).
2. *Lektin-Weg*: Spezifische Kohlehydratstrukturen auf der Oberfläche von Pathogenen aktivieren die MBL-assoziierte Serinprotease (MASP) (Kemper und Le Fric 2009).
3. *Alternativer Weg*: C3b bindet an Hydroxyl- oder Aminogruppen auf der Oberfläche von Pathogenen und es kommt zur Komplexbildung mit Faktor Bb (Kemper et al. 2010).

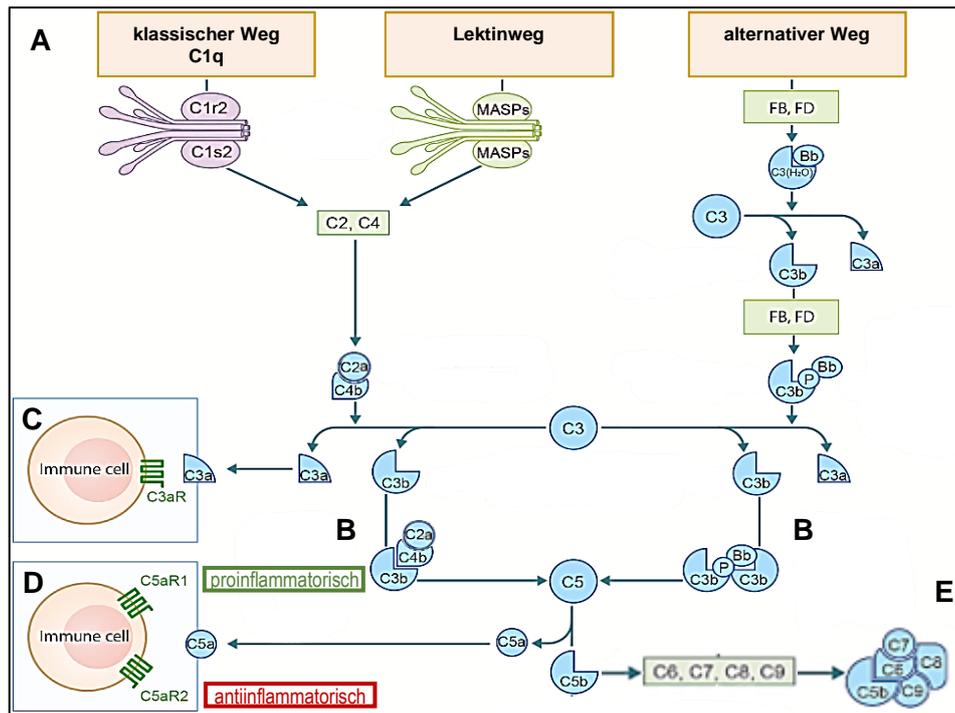


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Komplementaktivierung. Die drei Aktivierungswege, der klassische-, der Lektin- und der alternative Weg, führen zur Aktivierung von C3 und dessen Spaltung in C3a und C3b. **(B)** C3b bildet mit anderen Faktoren die C5-Konvertase, die C5 in C5a und C5b spaltet. **(C,D)** Die Anaphylatoxine C3a und C5a lösen über Bindung an ihre Rezeptoren weitere Immunreaktionen aus. Über C5aR1 übt C5a eine proinflammatorische, über C5aR2 eine antiinflammatorische Wirkung aus. **(E)** C5b bildet mit C6, C7, C8 und C9 den Membranangriffskomplex (modifiziert nach Edwards et al. 2019).

Im Verlauf kommt es im Lektinweg und im klassischen Weg zur Bildung der C3-Konvertase C4b2a sowie beim alternativen Weg der C3-Konvertase C3bBb, die C3 in C3b und C3a spaltet. C3b bildet mit der C3-Konvertase die C5-Konvertase C4b2a3b bzw. im alternativen Weg C3bBbC3b (**Abbildung 4B**). Die C5-Konvertase des klassischen Weges und des Lektinweges (C4b2aC3b) sowie des alternativen Weges C3bBbC3b spaltet C5 in C5a und C5b. C5b lagert sich auf der Pathogenoberfläche ab und initiiert die Formation des Membranangriffs-Komplexes (MAK), zu dem die Faktoren C5b, C6, C7, C8 und C9 gehören (Kemper et al. 2018). Der MAK führt zu einer Porenbildung der Pathogenmembran und damit zu seiner Zerstörung (Kemper und Le Fric 2009).

2.5 Komplementfaktor C5a und seine Rezeptoren C5aR1 und C5aR2

C5a ist einer der stärksten inflammatorischen Mediatoren des angeborenen Immunsystems. C5a wirkt auf Immunzellen, in dem es deren Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemotaxis, Degranulation und Phagozytose stimuliert und die Zytokinproduktion und -sekretion moduliert (Li et al. 2019). C5a erhöht die vaskuläre

Permeabilität bei endothelialen Zellen und aktiviert das adaptive Immunsystem (Giang et al. 2018). C5a wird leicht durch die Carboxypeptidase B metabolisiert, die das C-terminale Arginin entfernt. Dabei entsteht C5a des-Arg, das nur noch 3-10% der Potenz von C5a besitzt, die jedoch für die Chemotaxis von Neutrophilen ausreicht (Monk et al. 2007). C5a bindet an zwei Rezeptoren, die als C5aR1 (CD88) und den erst im Jahr 2000 entdeckten C5aR2 (C5L2, GPR77) bezeichnet werden (Monk et al. 2007; Bamberg et al. 2010; Colley et al. 2018). C5aR2 und C5aR1 binden C5a mit ähnlicher Affinität. C5a des-Arg bindet an C5aR2 mit etwa 10-50x höherer Affinität als an C5aR1 (Bamberg et al. 2010; Zhang et al. 2017; Colley et al. 2018). Während C5aR1 allgemein anerkannt eine proinflammatorische Rolle ausübt, herrschen bei C5aR2 noch Unklarheiten in Bezug auf Liganden, Lokalisation, Signalübertragung und seine Rolle in Pathogenität und Immunität (Zhang et al. 2017; Colley et al. 2018; Li et al. 2019).

2.5.1 C5a Rezeptor-1 (C5aR1)

C5aR1 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der die intrazelluläre Mobilisation von Kalzium stimuliert, das zu einer Aktivierung mehrerer Signalwege wie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase-, MAPK-, ERK-Weg und β -arrestin vermittelten Signalweg führt (Li et al. 2019; Bamberg et al. 2010). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind Membranproteinrezeptoren, die sieben transmembrane alpha-helikale Regionen enthalten, die eine Vielzahl von Liganden binden (Weis und Kobilka 2018). C5aR1 übt in Zellen eine proinflammatorische Wirkung aus (**Tabelle 1**) (Bamberg et al. 2010; Giang et al. 2018).

Tabelle 1: Proinflammatorische Wirkung von C5aR1 in verschiedenen Krankheitsbildern bzw. Krankheitsmodellen.

Krankheitsmodell	C5aR1 Eigenschaft
Bullöses Pemphigoid (Karsten et a. 2018)	proinflammatorisch
COVID-19 (Carvelli et al. 2020)	proinflammatorisch
Psoriasis (Zheng et al. 2019)	proinflammatorisch
Immunantwort nach Knochenbruch (Kovtun et al. 2017)	proinflammatorisch
Chronische Pyelonephritis (Choudhry et al. 2016)	proinflammatorisch
Kolorektale Tumorentstehung (Ding et al. 2020)	proinflammatorisch
Immunantwort gegen Staphylococcus aureus-Infektion (Horst et al. 2015)	proinflammatorisch

In dieser Tabelle sind Beispiele aufgeführt, an denen die ausschließlich proinflammatorische Wirkung von C5aR1 verdeutlicht wird.

2.5.2 C5a Rezeptor-2 (C5aR2)

C5aR2 (C5a-like receptor 2 (C5L2), GPR77) ist ebenfalls ein sieben-transmembranöses Rezeptorprotein, das jedoch nicht an G-Proteine koppelt (Li et al. 2019). C5aR2 schien bei humanen Granulozyten die Wirkung von C5a auf C5aR1 negativ zu modulieren. Ein möglicher antiinflammatorischer Signalweg von C5aR2 ist folgender: Hohe Konzentrationen von C5a führen zu einer Aktivierung und Heterodimerisierung von C5aR1 und C5aR2 (**Abbildung 5**). Die Assoziation von β -Arrestinen, welche die Aktivität von G-gekoppelten Rezeptoren regulieren, zu C5aR2 erleichtert die C5aR2-vermittelte Internalisierung von C5aR1 und reguliert dadurch die C5aR1-vermittelte ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinases)-Signalisierung herunter. ERK1/2 ist eine Proteinkinase, die Zellfunktionen steuert. Der Grad der C5aR2- β -Arrestin Interaktion vermittelt die hemmende Wirkung auf C5aR1. So ist die Wirkung von C5a nach Bindung an den extrazellulären C5aR1 die Nettowirkung aus C5aR1 und C5aR2 (Bamberg et al. 2010; Li et al. 2019). Während C5aR1 eine proinflammatorische Wirkung zeigt, wurden beim C5aR2 sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Wirkungen beobachtet (**Tabelle 2**) (Bamberg et al. 2010; Colley et al. 2018).

Tabelle 2: Proinflammatorische oder antiinflammatorische Wirkung von C5aR2 in verschiedenen Krankheitsbildern bzw. Krankheitsmodellen.

Krankheitsmodell	C5aR2 Eigenschaft
Bullöses Pemphigoid (Karsten et al. 2018)	antiinflammatorisch
Epidermolysis bullosa acquisita (Seiler et al. 2022)	proinflammatorisch
Hausstaubmilben induziertes experimentelles allergisches Asthma	Doppelfunktion: antiinflammatorisch: bei dendritischen Zellen von Mäusen proinflammatorisch: an Lungenzellen
Toll-like-Rezeptor (TLR) Induktion in vitro und in vivo	Doppelfunktion: antiinflammatorisch: C5aR2 moduliert die TLRs-C5aR1 Interaktion auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Vollblutzellen negativ. proinflammatorisch: C5aR2 fördert die HMGB1-Expression
Experimentell induzierte allergische Kontaktdermatitis	antiinflammatorisch
Lipopolysaccharide-induzierte akute Lungenerkrankung	antiinflammatorisch
Dextransulfat-Natriumsalz induzierte akute Kolitis	proinflammatorisch
Metacholin-induziertes Asthma	proinflammatorisch

In dieser Tabelle sind Beispiele aufgeführt, an denen der antiinflammatorische und proinflammatorische Charakter von C5aR2 verdeutlicht wird (modifiziert nach Zhang et al. 2017).

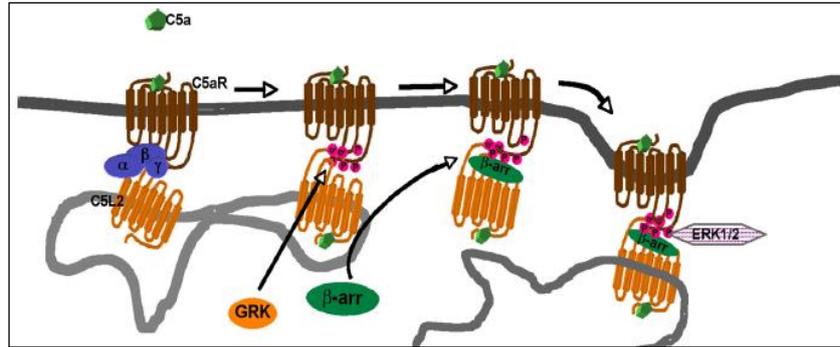


Abbildung 5: Schematische Darstellung der negativen Modulation von C5aR2 auf C5aR1 in menschlichen Neutrophilen. Intrazellulärer C5aR2 bindet an extrazellulären C5aR1, nachdem C5a an C5aR1 gebunden hat. C5aR1 aktiviert eine G-Rezeptor Kinase (GRK), das zu einer Anlagerung von β -Arrestin (β -arr) führt. Der C5aR2- β -Arrestin Komplex hemmt die ERK1/2 Aktivierung und fördert die Internalisierung von C5aR1, sodass dieser nicht mehr für C5a zur Verfügung steht (modifiziert nach Bamberg et al. 2010).

Zum Teil führte jedoch auch die Hemmung oder das Fehlen von C5aR2 zu einem besseren Krankheitsverlauf. Hierbei zeigte C5aR2 eine proinflammatorische Funktion (Zhang et al. 2017). C5aR2^{-/-} Mäuse schienen vor allergischem Asthma und Atemwegsentzündungen geschützt zu sein. Der Grund dafür schien die negative Beeinflussung von C5aR2 auf die Antigenpräsentation zwischen dendritischen Zellen und CD4⁺-T-Zellen zu sein. Außerdem schien die Expression von C5aR2 auf Lungenzellen eine erhöhte T_H2-Produktion zu bewirken, die zu einer eosinophilen Entzündung, Schleimproduktion und erhöhter IgE-Produktion führten (Zhang et al. 2010). In einer weiteren Studie war C5aR2 für eine höhere Letalität bei Patienten mit Sepsis verantwortlich und trug zum Auftreten proinflammatorischer Transmitter bei. Dabei schien C5aR2 an der Sekretion des entzündungsfördernden High-Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) beteiligt zu sein (Rittirsch et al. 2008). Ein Erklärungsversuch für die Physiologie des proinflammatorischen Rezeptors wäre, dass C5aR2 das Recycling und die Expression von C5aR1 fördert und auf diese Weise eine proinflammatorische Reaktion auslöst (Li et al. 2019).

2.6 Das bullöse Pemphigoid

Das bullöse Pemphigoid (BP) lässt sich der Gruppe der bullösen Autoimmundermatosen zuordnen und tritt unter diesen am häufigsten auf (Witte et al. 2018; Porro et al. 2019; van Beek et al. 2021a). Es handelt sich demnach um eine Autoimmunerkrankung, bei der Autoantikörper gegen Strukturproteine der Basalmembranzzone, welche die Epidermis und die Dermis zusammenhalten, vorhanden sind. Das BP gehört zu den Pemphigoid-Erkrankungen. Hierbei kommt es durch eine Autoantikörper-vermittelte Zerstörung der Proteine der BMZ zu einer subepidermalen Spaltbildung (van Beek et al. 2021a). Die

subepidermale Spaltbildung ist charakteristisch für die Pemphigoid-Erkrankungen (Schmidt und Zillikens 2013). In diese Gruppe gehören weiterhin das Pemphigoid gestationis, das Schleimhautpemphigoid, Lichen planus pemphigoides, anti-p200-Pemphigoid, Epidermolysis bullosa acquisita und die lineare IgA-Dermatose (Amber et al. 2018a). Beim BP werden Autoantikörper gegen zwei hemidesmosomale Proteine gebildet, die als BP180 und BP230 bezeichnet werden. Durch die Antikörper wird eine Zerstörung dieser Haftproteine eingeleitet, dadurch löst sich die Epidermis von der Basalmembran und eine Spaltbildung resultiert (van Beek et al. 2021a). Sekundär strömt Gewebwasser ein und es entstehen makroskopisch Blasen (Schmidt und Zillikens 2013).

In Schleswig-Holstein konnte im Jahr 2016 eine Inzidenz von 19,6 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Einwohner/Jahr ermittelt werden (van Beek et al. 2021b). Eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse aus 27 Studien aus Europa, Asien, Afrika und Nordamerika ermittelte Inzidenzen zwischen 8,2 und 34,2 pro 1 Millionen Einwohner/Jahr. Daraus ließ sich eine Inzidenz von 8,2 pro 1 Millionen Einwohner/Jahr ableiten sowie von 10,3 auf Europa beschränkt (Persson et al. 2022).

BP tritt im höheren Alter auf und die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter deutlich (Joly et al. 2012). Das Haupterkrankungsalter liegt bei etwa 80 Jahren, wobei die höchste Anzahl an Neuerkrankungen ab einem Alter von 90 Jahren liegt (Langan et al. 2008; Marazza et al. 2009; van Beek et al. 2021b). Die Inzidenz hat sich im Vergleich vor 15 Jahren verdreifacht (Joly et al. 2012; Persson et al. 2022). Dieser Befund wird zum einen mit der steigenden Lebenserwartung begründet. Zum anderen werden neben besseren diagnostischen Möglichkeiten eine Zunahme an neurodegenerativen Erkrankungen wie Demenz, Morbus Parkinson und Schlaganfällen, die sowohl im Alter als auch beim BP gehäuft auftreten, als Ursache betrachtet (Joly et al. 2012; Kridin und Ludwig 2018).

Das BP entsteht meist spontan (Schmidt und Zillikens 2013). Neben dem beschriebenen höheren Lebensalter und neurogenerativer Erkrankungen als Risikofaktoren für die Auslösung eines BP wurden weiterhin eine Auslösung durch Triggerfaktoren beschrieben, zu denen ultraviolette- bzw. Röntgenstrahlung, Verbrennung, Medikamente, Traumata und Impfungen zählen (Schmidt und Zillikens 2013; Liu et al. 2020).

Die Angaben zur Mortalität reichen von einem 2-fach erhöhten Sterberisiko in England bis zu einem 6-fach erhöhten Sterberisiko in Frankreich im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (Langan et al. 2008; Joly et al. 2012; Kridin et al. 2018). Ebenso schwankt die Ein-Jahres Mortalität zwischen 6% in den Vereinigten Staaten, 19% in England und 41% in Frankreich (Langan et al. 2008; Joly et al. 2012; Kridin et al. 2018). Unter anderem hohes Alter, Schwere der Erkrankung, der Allgemeinzustand, Demenz, Schlaganfall, kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus beeinflussen die Prognose des BP negativ und tragen

zu einer erhöhten Mortalität bei (Schmidt und Zillikens 2013; Kridin et al. 2018; Chen et al. 2022).

Das Krankheitsbild äußert sich durch einen über Wochen bis Monate schubweise auftretenden intensiven Juckreiz, der zusammen oder alleine mit ekzematösen, papulären oder urtikariellen Läsionen erscheint (Schmidt et al. 2011). In der Folge kommt es aufgrund der Spaltbildung zwischen Dermis und Epidermis zu prallen Blasen mit einer dicken Blasendecke (**Abbildung 6A,B**) (Schmidt und Zillikens 2011). Die BP Blasen entstehen oft auf den Beugeseiten der Gliedmaßen und am Körperstamm und können mehrere Tage bestehen bleiben (Amber et al. 2018a). Diese hinterlassen Erosionen und Krusten und heilen ohne Narbenbildung ab. Erytheme können viele Wochen bis Monate lang bestehen bleiben (Griffiths et al. 2016).

Die Diagnose der Erkrankung erfolgt mittels histologischer Untersuchung, direkte Immunfluoreszenz (DIF) und immunserologische Untersuchungen wie der indirekten Immunfluoreszenz und der ELISA (**Abbildung 6C,D**) (van Beek et al. 2020). Bei der DIF lassen sich beim BP im Immunfluoreszenzmikroskop lineare IgG-, IgA- und/oder C3-Ablagerungen an der BMZ nachweisen. Mittels ELISA kann der Nachweis von IgG- und IgE-Antikörpern gegen BP180 oder BP230 erfolgen sowie die Antikörper-Konzentration im Serum, die mit der Krankheitsaktivität korreliert (Schmidt et al. 2015; van Beek et al. 2020).

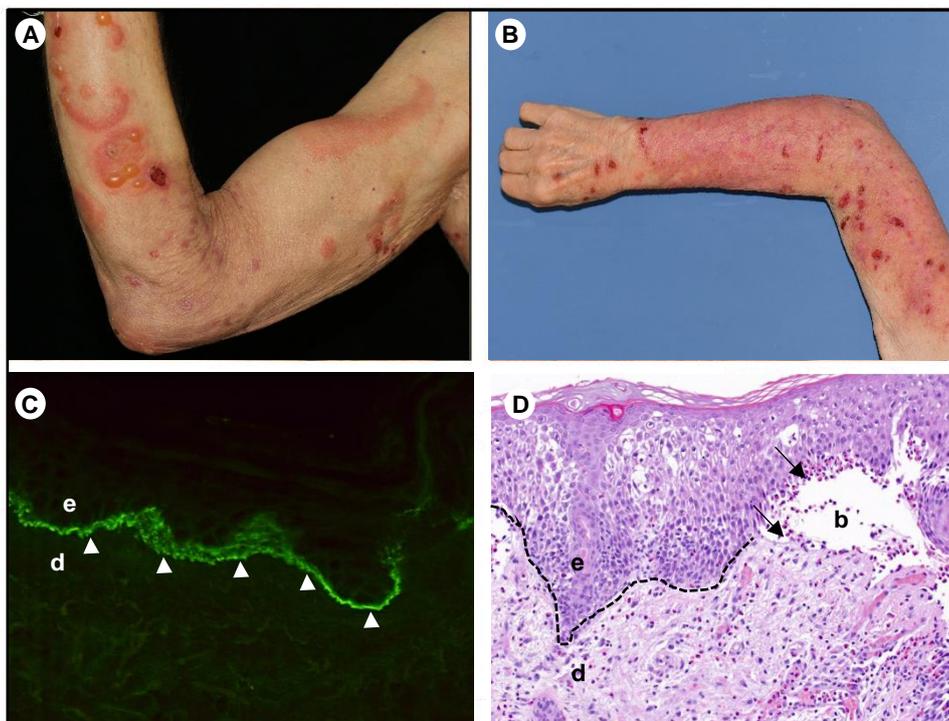


Abbildung 6: Klinische und immunpathologische Befunde beim BP. (A,B) Blasen am Arm in unterschiedlichen Stadien nebeneinander bei Patienten mit BP. (C) Direkte Immunfluoreszenz (DIF) zeigt C3-Ablagerungen (Pfeil) an der BMZ in Haut eines BP-Patienten mit n-Muster (Bögen oben geschlossen). (D) Histologisches Bild zeigt eine subepidermale Blasenbildung (b), die für die Pemphigoid Erkrankungen charakteristisch ist. Außerdem ist ein entzündliches Zellinfiltrat aus eosinophilen Granulozyten zu erkennen (Pfeil) (übernommen aus van Beek et al. 2020). Die gestrichelte Linie zwischen e und d zeigt die noch intakte BMZ. e=Epidermis, d=Dermis.

2.6.1 Behandlung

Die vorhandene Evidenz zur Wirksamkeit der Therapien des BP ist begrenzt. Es kommen topische Kortikosteroide zum Einsatz, die bei schwereren Formen mit einer systemischen Prednisolontherapie kombiniert werden (Joly et al. 2002). Hohe insbesondere orale Glukokortikoid-Dosierungen sind mit einer erhöhten Mortalität verbunden (Joly et al. 2002). Um die Glukokortikoid-Dosierung zu verringern, bieten sich eine Kombination oder auch eine Monotherapie mit Azathioprin, Dapson, Doxycyclin, Methotrexat oder Mycophenolat an (Schmidt et al. 2020; van Beek et al. 2021a). Es liegen nur begrenzt Studien über die Wirksamkeit der Therapiemöglichkeiten vor. Dabei ließ sich kein Medikament bzw. eine Therapiekombination hervorheben (Schmidt et al. 2020). Bleibt ein Therapieerfolg aus, kommen hochdosiert intravenöse Immunglobuline, Immunadsorption oder CD20-Antikörper und Anti-IgE-Antikörper zum Einsatz (Schmidt et al. 2020; van Beek et al. 2021a). Nebenwirkungen waren vor allem bei älteren Menschen zu beobachten aufgrund häufiger Komorbiditäten und einer schwächeren Immunabwehr (Brick et al. 2014). Spezifische und nebenwirkungsarme Therapieoptionen werden dringend benötigt (Schmidt et al. 2020).

2.6.2 Pathophysiologie des bullösen Pemphigoids

Es besteht eine genetische Disposition beim BP. Das HLA-Klasse-II-Allel DQB1*03:01 war bei den meisten BP-Patienten vorhanden und scheint die Ausbildung der Krankheit zu begünstigen (Büdinger et al. 1998). Neben HLA-DQB1*03:01 konnte bei deutschen BP-Patienten vor kurzem außerdem eine Assoziation zwischen den HLA-Klasse-II Allelen DQA1*05:05 und DRB1*07:01 und dem BP festgestellt werden (Schwarm et al. 2021). Die HLA-Klasse-II-Allele dürften bei der Präsentation immundominanter Epitope von BP180 an autoreaktive T-Zellen beteiligt sein (Büdinger et al. 1998). Es wird vermutet, dass eine Imbalance zwischen T_H und T_{Reg} beim BP besteht, die zu einer Stimulation von B-Zellen führt, die Autoantikörper gegen BP180 und BP230 bilden (Genovese et al. 2019). Bei den meisten Patienten wurden IgG-Antikörper gegen den extrazellulären Abschnitt der 16. nicht-kollagenen Domäne (NC16A) von BP180 nachgewiesen (Giudice et al. 1993). IgG1 und IgG4 waren die häufigsten IgG-Subtypen, die sich bei BP-Patienten entlang der BMZ nachweisen ließen (Mihai et al. 2007). BP180 NC16A ist der immundominante Abschnitt bei BP180 (Schmidt und Zillikens 2013). Die Serumkonzentration von Anti-BP180-NC16A-spezifischen IgG-Antikörpern bei BP-Patienten korrelierte mit der Krankheitsaktivität (Schmidt et al. 2000b). Jedoch auch andere Domänen als BP180 NC16A wurden von Antikörpern erkannt, wie z.B. die C-terminale Domäne von BP180 und ein 120 kDa großes C-terminales Fragment, das bekannt ist als LAD-1 (Genovese et al. 2019). Neben IgG-

Antikörpern lagen bei den meisten BP-Patienten auch IgE-Antikörper vor (22-100%) (van Beek et al. 2016). Die Serumkonzentration der IgE-Antikörper korrelierte mit der Krankheitsaktivität und hohe Serumkonzentrationen waren mit schweren Verläufen assoziiert (Kromminga et al. 2000; van Beek N. et al. 2017). Daneben waren IgA-Antikörper bei 20-65% der BP-Patienten sowie IgM-Antikörper bei nur 6-22% der BP-Patienten im Serum nachgewiesen wurden (Liu et al. 2017).

Etwa die Hälfte der BP-Patienten bilden Antikörper gegen BP180 und BP230 (Ludwig 2019). Es wird vermutet, dass es im Krankheitsverlauf durch ein epitope-spreading zu einer Ausweitung der Autoimmunreaktion auf BP230 kommt. Die Rolle von BP230 im Krankheitsgeschehen ist jedoch noch unklar. Eine Korrelation der IgG-Reaktivität mit BP230 und der Krankheitsaktivität konnte beobachtet werden (Di Zenzo et al. 2011). Das Potenzial zur Bildung von Blasen durch Antikörper gegen BP230 wurde kürzlich im Mausmodell dargestellt, bei dem es unter Abwesenheit von T_{Reg} zur Bildung autoreaktiver Antikörper gegen BP230 kam (Haeberle et al. 2018). Bei einem geringen Anteil von 4-5% der Patienten wurden Antikörper gegen ausschließlich BP230 nachgewiesen. Es zeigten sich im Vergleich zu BP-Patienten mit Antikörpern gegen BP180 und BP230 weniger Ablagerungen von Komplement-aktivierenden IgG1 und IgG3 sowie C3 an der BMZ. Die Hypothese, dass aufgrund der daraus folgenden geringeren Kompetenz, das Komplementsystem zu aktivieren, sich ein geringerer Krankheitsverlauf entwickeln würde, bestätigte sich in der Praxis. Dieser Erkenntnis muss jedoch aufgrund des geringen Patientenanteils weiter nachgegangen werden (Ludwig 2019).

2.6.3 Die Rolle des Komplementsystems beim bullösen Pemphigoid

Die Bindung von Antikörpern führt beim BP zu einer subepidermalen Blasenbildung. Die Blasenbildung scheint sowohl abhängig als auch unabhängig vom Komplementsystem zu verlaufen (Ujiie et al. 2014).

Komplementabhängiger Verlauf

Neben dem alternativen Weg spielte beim BP vor allem der klassische Weg bei der Aktivierung des Komplementsystems eine Rolle (Nelson et al. 2006). Das Komplementsystem wird über die Fc-Region der Antikörper aktiviert (**Abbildung 7**). Dabei wird C5a gebildet, das eine starke chemotaktische Wirkung, höchstwahrscheinlich über C5aR1, auf inflammatorische Zellen ausübt (Heimbach et al. 2011). C5a und anti-BP180-IgE aktivieren Mastzellen über C5aR1 bzw. FcεRI, das zu einer Degranulation der Mastzellen führt (Heimbach et al. 2011). Mastzell-Degranulation und Komplementaktivierung führen zu einer Infiltration von Makrophagen, Neutrophilen und Eosinophilen (Chen et al. 2001; Marshall 2004). Hautansässige Makrophagen scheinen

Hauptquelle von Leukotrien B4 (LTB₄) zu sein, das an der Infiltration von Neutrophilen beteiligt ist (Sadik und Schmidt 2019). Neutrophile und Eosinophile setzen reaktive Sauerstoffspezies und Proteinase wie neutrophile Elastase und Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 frei, die zusammen in der Lage sind, BP180 abzubauen und eine subepidermale Spaltbildung zu bewirken (Sadik und Schmidt 2019).

Viele Untersuchungen konnten einen Einfluss des Komplementsystems beim BP feststellen. Eine Aktivierung des Komplementsystems wurde nahezu bei allen BP-Patienten festgestellt. Ablagerungen von C3 an der BMZ waren bei >80% der BP-Patienten festzustellen. Das Ausmaß der C3-Ablagerungen korrelierte mit der Krankheitsaktivität (Romeijn et al. 2017).

IgG4-Antikörper hatten ein geringeres pathogenes Potenzial BP auszulösen als IgG1-Antikörper. Möglicherweise da IgG1 im Gegensatz zu IgG4 in der Lage ist, das Komplementsystem zu aktivieren (Mihai et al. 2007). Mäusen, denen Komplementfaktor C5 fehlte, hatten eine um etwa die Hälfte verringerte Ausbildung von Läsionen nach Gabe von Anti-BP180 IgG, unabhängig von der IgG Dosis (Karsten et al. 2018). In einem anderen Mausmodell, dem Komplementfaktor C4 fehlte und damit der klassische und alternative Komplementweg bzw. die Bildung der C5-Kinase außer Kraft gesetzt war, kam es zu keiner Bildung vom BP. Es zeigte sich in der Haut der Mäuse eine signifikant geringere Konzentration an Granulozyten und C5a als bei dem Wildtyp. Hierdurch ließ sich zeigen, dass das KS für die Rekrutierung von Granulozyten und bei der Blasenbildung eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Heimbach et al. 2011). Mäusen, denen der C5aR1-Rezeptor auf Mastzellen fehlte, oder die Mastzellen an sich, entwickelten kein BP. Es wurde festgestellt, dass die Infiltration von Neutrophilen zumindest teilweise von der Degranulation von Mastzellen abhängig war, welche durch C5aR1 gefördert wurde (Giang et al. 2018; Karsten et al. 2018; Edwards et al. 2019). Aus diesen Erkenntnissen schließt man, dass das Komplementsystem keine Voraussetzung für die Entstehung vom BP zu sein scheint, wohl jedoch eine wichtige und modulierende Rolle spielt und die Krankheitsaktivität verstärkt (Liu et al. 2017; Karsten et al. 2018).

Komplementunabhängiger Verlauf

Komplementunabhängige Ereignisse wurden im Mausmodell nach Gabe von F(ab')₂-Fragmenten von Anti-BP180 Antikörpern beobachtet. Trotz des Fehlens der Komplement-aktivierenden Bindungsstelle der F(ab')₂-Fragmente, wurde eine Blasenbildung induziert. Gleiches wurde nach Injektion von Anti-BP180-IgG4, das nicht in der Lage ist Komplement zu aktivieren, ausgelöst (Ujii et al. 2014). IgG4 war gefolgt von IgG1 die dominante Antikörperklasse, die bei etwa der Hälfte der BP-Patienten in der Haut nachgewiesen wurde. Es zeigte sich jedoch ein geringeres pathogenes Potenzial von IgG4 beim BP (Sitaru

et al. 2007; Zhou et al. 2016). An kultivierten Keratinozyten ließen sich in der frühen Phase der Krankheitsentwicklung komplementunabhängige Ereignisse beobachten. Nach Gabe von BP180-IgG kam es bei humanen kultivierten Keratinozyten zu einer Freisetzung von IL-6 und IL-8 (Schmidt et al. 2000a). In Blasen von BP-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von IL-6 und IL-8 festgestellt (Schmidt et al. 1996b; Schmidt et al. 1996a). Die Serumkonzentration von IL-6 und IL-8 korrelierte mit der Krankheitsaktivität (Inaoki und Takehara 1998). IL-8 wirkt auf Neutrophile, die an der Separation der DEJ beteiligt sind, chemotaktisch (Schmidt et al. 2001). IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin. Im Mausmodell zur Untersuchung der BP-ähnlichen Epidermolysis bullosa acquisita war bei IL-6 ein antiinflammatorischer Effekt beobachtet worden, trotz erhöhter Konzentrationen in Serum, Haut und Blasen von BP-Patienten (Schmidt et al. 1996a; Samavedam et al. 2013). Außerdem wurde eine Internalisierung von BP180 nach Bindung von BP180-Antikörpern beobachtet, das die Bindung der Keratinozyten zur Basalmembran schwächt und eine Spaltbildung ermöglicht. Nur bei Antikörpern, die gegen BP180 NC16A gerichtet waren, konnte ein Internalisierung beobachtet werden, nicht jedoch bei Antikörpern, die andere Epitope von BP180 erkannten. Daraus lässt sich vermuten, dass Antikörper gegen BP180 NC16A zu einem schwereren Krankheitsverlauf führen (Imafuku et al. 2017).

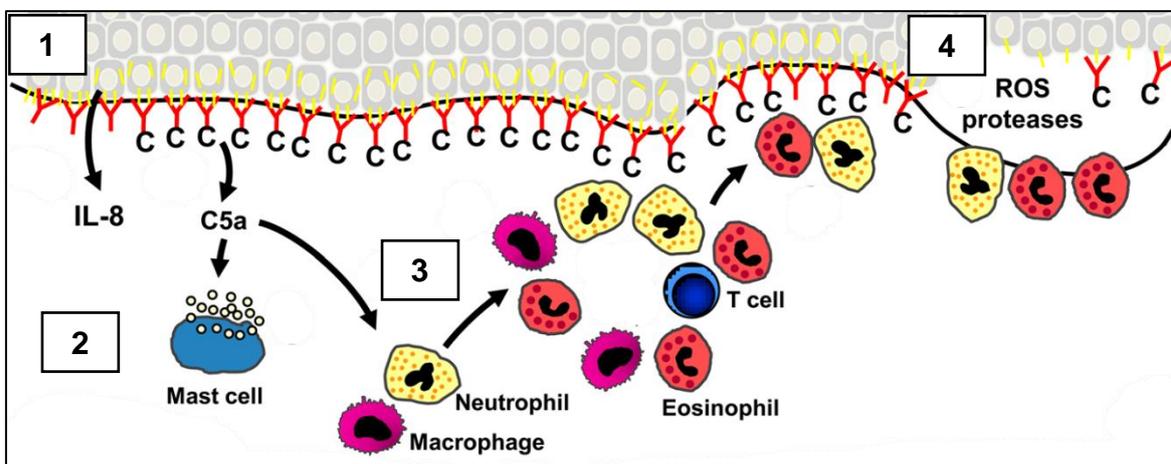


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Pathogenese des BP. Autoantikörper binden an der BMZ an BP180 und BP230. (2) Bindung der Antikörper führt zu einer Freisetzung von IL-8 aus Keratinozyten und zur Bindung von Komplement an die Antikörper. (3) C5a, Mastzellen und IL-8 führen zu einer Rekrutierung von Neutrophilen, Makrophagen, Eosinophilen und weiteren T-Zellen. (4) Neutrophile und Eosinophile setzen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Proteinase frei, die die Hemidesmosomen zerstören und eine Spaltbildung resultiert (modifiziert nach Sadik und Schmidt 2019).

2.7 Projektspezifische Vorarbeiten

Karsten et al. beobachteten im Antikörpertransfer-Modell beim BP, dass C5aR1 eine krankheitsfördernde Funktion ausübte (**Abbildung 8A-E**), während sich bei C5aR2 ein protektiver Effekt nachweisen ließ (**Abbildung 8F-J**) (Karsten et al. 2018). Weiterhin

konnten Beobachtungen gemacht werden, die darauf schließen lassen, dass das Komplementsystem in der Frühphase beim BP auf den Krankheitsverlauf einwirkt. Zu diesen Ergebnissen führte die Erkenntnis, dass bei $C5aR1^{-/-}$ Mäusen die Infiltration von Neutrophilen in die Haut, die das frühe Stadium der Erkrankung darstellt, etwas geringer war als beim Wildtyp. Bei $C5aR2^{-/-}$ Mäusen waren keine Veränderungen in der Neutrophilen-Konzentration festzustellen (**Abbildung 8K,L**). Dahingegen war bei der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies von Neutrophilen in der Haut von $C5^{-/-}$ Mäusen, die den Prozess der Blasenbildung und damit das späte Stadium der Erkrankung darstellten, kein Unterschied zu den Wildtypieren festzustellen (Karsten et al. 2018). Weiterhin spricht für den Einfluss des Komplementsystems in der frühen Phase, dass eine Hemmung von $C5aR1$ mit dem $C5aR1$ -Antagonisten PMX53 nur in prophylaktischer Gabe, das heißt vor Ausbruch der Krankheit, zu einer Reduzierung der Krankheitsaktivität führte, dies jedoch nicht bei therapeutischer Gabe, nach Ausbruch der Erkrankung, der Fall war (Karsten et al. 2018). Aus den Beobachtungen kann man darauf schließen, dass das Komplementsystem im frühen Stadium der Krankheitsentwicklung vom BP beteiligt ist und die Rezeptoren $C5aR1$ und $C5aR2$ wichtige Stellschrauben darstellen (Liu et al. 2017; Karsten et al. 2018). Im Mausmodell konnte dargestellt werden, dass das Komplement ein notwendiger Schritt im Prozess der subepidermalen Blasenbildung ist und durch BP180-Antikörper getriggert wird (Liu et al. 1995).

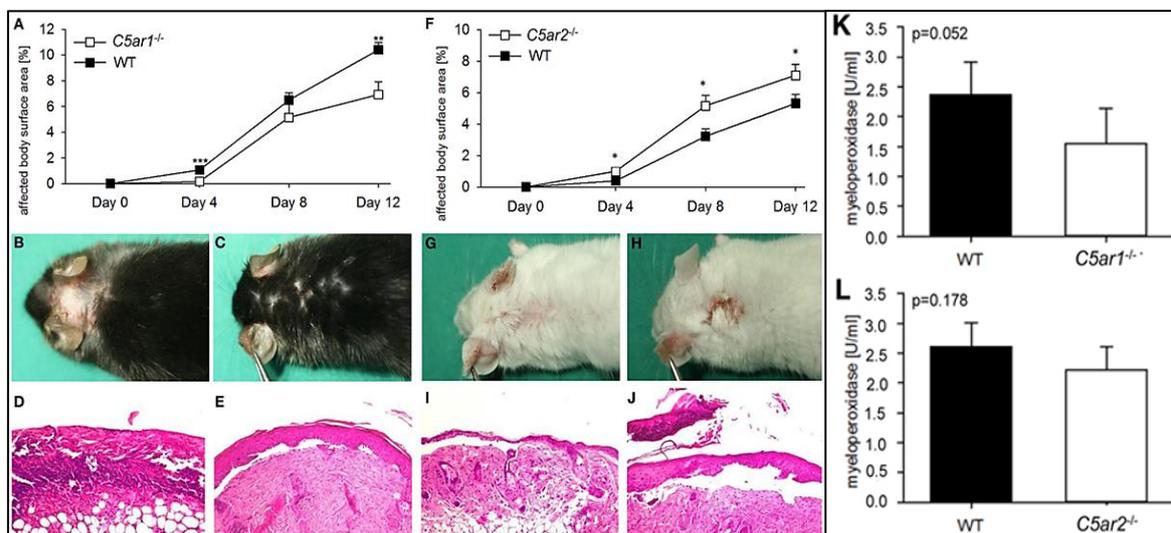


Abbildung 8: Darstellung der Funktion von $C5aR1$ und $C5aR2$ im Mausmodell. $C5aR1$ vermittelte nach Anti-BP180-IgG Injektion eine Gewebezzerstörung, während $C5aR2$ eine protektive Funktion zeigte. **(A)**: Injektion von anti-BP180-IgG in $C5aR1^{-/-}$ Mäuse ($n=10$) resultierte in signifikant weniger Hautläsionen durch BP verglichen mit dem Wildtyp [$n=10$]. **(F)**: Im Kontrast bewirkte die Injektion von anti-BP180-IgG in $C5aR2^{-/-}$ Mäuse ($n=15$) eine höhere Krankheitsaktivität verglichen mit dem Wildtyp [$n=18$]. Repräsentative klinische Bilder **(B,C,G,H)** und histologische Bilder **(D,E,I,J)** zeigen $C5aR1^{-/-}$ **(C,E)**, $C5aR2^{-/-}$ -Mäuse **(H,D)** und Wildtyp **(B,D,G,I)**. Infiltration von Neutrophilen in Hautläsionen, dargestellt durch die Myeloperoxidaseaktivität, war in $C5aR1^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp reduziert **(K)** und zeigte in $C5aR2^{-/-}$ Mäusen keine Veränderung **(L)** (übernommen aus Karsten et al. 2018)

2.8 Fragestellung

Die derzeitige Behandlung des BP ist durch die Nebenwirkungen der entzündungshemmenden Therapie limitiert, die zu einer erhöhten Sterblichkeit und zu Rezidiven bei 20-40% der Patienten führt (Schmidt und Zillikens 2013; Brick et al. 2014). Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie und neue Therapieansätze sind daher dringend notwendig und Gegenstand aktueller Forschungsprojekte (van Beek et al. 2021a). Die aktuelle Arbeit basiert auf der vor kurzen gewonnenen Erkenntnis, dass C5aR1 beim BP einen krankheitsfördernden Effekt zeigt, während C5aR2 protektiv wirkt (Karsten et al. 2018). C5aR1 und C5aR2 könnten als Angriffspunkte einer Therapie des BP verwendet werden. C5aR1 und C5aR2 werden von Immunzellen exprimiert (Laumonier et al. 2017; Verghese et al. 2018; West et al. 2020). Die Kenntnis über das Expressionsverhalten dieser Rezeptoren auf Immunzellen, die am Krankheitsverlauf vom BP beteiligt sind, könnte eine gezielte Therapie ermöglichen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression von C5aR1 und C5aR2 in frühen Hautläsionen von Patienten mit BP zu quantifizieren. Bislang ist das Wissen über die C5aR1- und C5aR2-Expression bei Menschen mit BP nur gering. Die Arbeit soll eine Übersicht über die C5aR1- und C5aR2-Expression beim BP verschaffen mit Augenmerk auf die dominierende Zellpopulation. Die aus dieser explorativen und deskriptiven Studie gewonnenen Erkenntnisse sollen eine Grundlage für Folgeuntersuchungen zur C5aR1/C5aR2-Expression beim BP darstellen. Die Expression von C5aR1 und C5aR2 sollte mit der Haut von Kontroll-Patienten mit nicht-entzündlichen Dermatosen verglichen werden. Dazu wurden folgende Hypothesen überprüft:

- 1.) Die Haut von BP-Patienten ist von Immunzellen infiltriert. Dazu zählen T-Zellen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen und Makrophagen.
- 2.) Immunzellen exprimieren C5aR1 und C5aR2 in unterschiedlicher Ausprägung. Die Expression lässt sich immunhistochemisch untersuchen.
- 3.) Mit Hilfe der Immunhistochemie kann die Immunzelle mit der höchsten C5aR1-/C5aR2-Expression festgestellt werden.
- 4.) Die verwendeten C5aR1- und C5aR2-Antikörper binden spezifisch an den jeweiligen Komplement-Rezeptor.
- 5.) Immunzellen kommen in gesunder Haut praktisch nicht vor und die Expression von C5aR1/C5aR2 ist vernachlässigbar.
- 6.) Es lassen sich C5aR1- und C5aR2-exprimierende Immunzellen identifizieren, die für neue und gezielte Therapiemöglichkeiten pharmakologisch targetiert werden können.

3 Materialien und Methoden

3.1 Ethik

Für die Versuche wurden in Paraffin eingebettete Biopsien von Patienten aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins Campus Lübeck verwendet. Bei der Arbeit wurden die Richtlinien der Deklaration von Helsinki beachtet. Die Arbeit wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck positiv begutachtet (Antragsnummer: 15-051, 18-046).

3.2 Hautproben

In dieser Studie wurden periläsionale Hautbiopsien von 9 BP-Patienten und 4 Kontroll-Patienten mit Basalzellkarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Haut mit Biopsien derselben Körperlokalisierung für immunhistochemische Untersuchungen verwendet (**Tabelle 3**). 8 BP-Patienten waren männlich und 1 BP-Patientin war weiblich. Das mittlere Alter war 78 Jahre und die Altersspanne betrug 65 bis 93 Jahre.

Die Diagnose der BP-Patienten wurde histologisch durch subepidermale Blasen, in der direkten Immunfluoreszenz durch lineare C3- und IgG-Ablagerungen an der BMZ und durch den Nachweis von zirkulierenden Autoantikörpern gegen BP180 oder BP230 gestellt (van Beek et al. 2021a). Vier Kontroll-Patienten wurden als ausreichend angesehen, da in gesunder Haut kein erhöhtes Vorkommen von Entzündungszellen zu erwarten ist.

Da beim BP bisher keine geschlechts-spezifischen Befunde beschrieben wurden, wurde das Geschlecht der zu untersuchenden Patienten nicht berücksichtigt (Egami et al. 2020; Chen et al. 2022).

Tabelle 3: Autoimmunologische Befunde der 9 BP-Patienten.

BP Patient (P) (Alter, Geschlecht)	DIF BMZ				IIF BMZ		ELISA		sonstiger ELISA	Lokalisation der Biopsie
	IgG	IgM	IgA	C3	IgG (Affe)	IgG (NaCl)	BP180 NC16A	BP230		
P1 73 Jahre männlich	+	+	-	+	+	-	10*	2*	LAD1	Oberarm
P2 65 Jahre männlich	-	-	-	+	-	+	492*	12*	n.d.	Unterarm
P3 81 Jahre männlich	-	-	-	+	+	+	179*	14*	n.d.	Oberarm
P4 72 Jahre männlich	-	-	-	+	+	+	555*	2*	n.d.	Unterarm
P5 74 Jahre männlich	+	-	-	+	+	+	766*	n.d.	n.d.	Oberschenkel
P6 93 Jahre weiblich	-	-	-	-	+	+	130*	n.d.	-	Keine Lokalisation angegeben
P7 83 Jahre männlich	+	-	-	+	+	+	718*	n.d.	n.d.	Unterschenkel
P8 77 Jahre männlich	+	-	-	-	+	+	148*	42*	n.d.	Oberarm
P9 84 Jahre männlich	+	-	+	-	+	+	11*	4*	LAD 1	Unterarm

*in U/ml, ein Antikörpertiter <20 U/ml ist normal und in roten Zahlen markiert, ein Antikörpertiter >20 U/ml ist ein positiver Nachweis von Antikörpern und die Zahl grün markiert.

(+) = nachgewiesen, (-) = nicht nachgewiesen; DIF: direkte Immunfluoreszenz; IIF: indirekte Immunfluoreszenz; BMZ: Basalmembranzone; n.d.: nicht durchgeführt; LAD1: lineares IgA-Dermatose-Antigen, lösliche 120 kDa schwere kollagenöse Ektodomäne von BP180.

In **Tabelle 3** sind die autoimmunologischen Befunde dargestellt, die zur Diagnose der Erkrankung geführt haben. Die direkte Immunfluoreszenz (DIF) gilt als Goldstandard in der Diagnostik des BP. Mit der DIF lassen sich Ablagerungen von IgG, IgA, IgM und/oder Komplement C3 entlang der DEJ nachweisen. Mit der DIF ist auch die Abgrenzung von anderen Autoimmundermatosen möglich (van Beek et al. 2020). Die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) hat sich als Screeningmethode bewährt. Bei der IIF wird Patientenserum auf mit NaCl generierter humaner Spalthaut oder Ösophagusgewebe des Affen gegeben. Liegen im Patientenserum Antikörper gegen BP180 oder BP230 vor, lassen sich diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachweisen (Saschenbrecker et al. 2019; van Beek et al. 2020). Die Serumkonzentration von Anti-BP180-NC16A-IgG korreliert mit der Krankheitsschwere (Schmidt et al. 2000b). Durch das ELISA-Verfahren lassen sich Antikörper gegen BP180-NC16A und BP230 nachweisen sowie deren Serumkonzentration bestimmen (Saschenbrecker et al. 2019). Die Rolle von IgG gegen BP230 im Krankheitsverlauf ist unklar und eine Korrelation der IgG-Reaktivität mit BP230 und der Krankheitsaktivität konnte nicht beobachtet werden (Di Zenzo et al. 2011).

3.3 Herstellung der Hautschnitte

Für die Untersuchung wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Hautbiopsien von Patienten mit BP verwendet. Es handelte sich hierbei um periläsionale Biopsien, bei denen die Hautbiopsien von der unmittelbaren Nähe zur Hautläsion stammten. Die Hautstruktur ist hierbei weitestgehend erhalten und nicht wie in einer läsionalen Hautbiopsie durch die Blasenbildung zerstört (Schmidt und Zillikens 2016). Es standen Kryoschnitte sowie in Paraffin eingebettete Biopsien für die Arbeit zur Verfügung. Bei der Verwendung von Kryoschnitten konnte trotz unterschiedlichster immunhistochemischer Verfahren die gesuchten Zellen nicht angefärbt werden. Mit Paraffinschnitten konnten jedoch erfolgreich immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden. Diese wurden daher im weiteren Verlauf genutzt. Zu diesen BP-Proben wurden Kontroll-Proben von Patienten herausgesucht, die nicht am BP erkrankt waren und somit als Vergleich eines gesunden Patienten dienten. Die Paraffinblöcke stammten aus der Routinesammlung der Dermatologie der Universität zu Lübeck. Die Paraffinblöcke wurden am Mikrotom mit einer Dicke von 4,5 µm geschnitten und auf Thermo Scientific™ SuperFrostPlus™ Adhäsionsobjektträger aufgezogen. Um eine bessere Objektträgerhaftung zu gewährleisten, wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4 Immunhistochemie

Um die Expression von C5aR1 und C5aR2 zu untersuchen, wurde das Verfahren der Immunhistochemie verwendet. Bei der Immunhistochemie wird ein Antigen bzw. ein Epitop im Gewebe (z.B. ein bestimmter Rezeptor) unter Verwendung eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers nachgewiesen. Der bindende Antikörper wird anschließend mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs visualisiert, den man durch ein Fluoreszenzmikroskop erkennen kann. Der Marker ist entweder direkt am primären Antikörper gebunden (direkte Antigen-Erkennung) oder es handelt sich um einen sekundär fluoreszenzmarkierten Antikörper, der spezifisch an den primären Antikörper bindet und ihn so markiert (indirekte Antigen-Erkennung). Obwohl die direkte Methode einfacher und schneller ist als die indirekte Methode, da nur ein Antikörper verwendet wird, hat die direkte Methode eine wesentlich geringere Empfindlichkeit als die indirekte Methode, weil die Signalverstärkung geringer ist. Daher ist die indirekte Methode zu bevorzugen. Bei der indirekten Methode ist der sekundäre Antikörper so zu wählen, dass, wenn es sich beim primären Antikörper um einen IgG-Antikörper einer Maus (gegen menschliche Antigene gerichtet) handelt, der sekundäre Antikörper gegen IgG-Antikörper der Maus, also derselben

Immunoglobulinklasse und Immunoglobulin-Spenderspezies, gerichtet ist (Luttmann et al. 2014; Orakpoghenor et al. 2018). In dieser Studie wurde die indirekte Methode praktiziert. Um die Zellen bzw. die Leukozyten, die C5aR1 oder C5aR2 exprimieren, zu identifizieren, wurde der C5aR1- bzw. C5aR2-Antikörper (Antikörper A) mit einem weiteren Antikörper (Antikörper B) gemischt, der als Marker für den jeweiligen Leukozyten dient und an spezifische Strukturen bindet, und eine Doppelfärbung durchgeführt. Bei der Doppelfärbung wird ein zweiter fluoreszierender sekundärer Antikörper für Antikörper B verwendet. Bei einer Doppelfärbung ist zu beachten, dass Antikörper B von einer anderen Spezies stammt. Würden beide Antikörper von der gleichen Spezies stammen, so würde der sekundäre fluoreszierende Antikörper auch an beide binden und eine Unterscheidung unmöglich sein. In dieser Arbeit stammten daher die C5aR1- und C5aR2-Antikörper vom Kaninchen und es wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, der gegen Immunoglobuline des Kaninchens gerichtet war. Die Antikörper, die als Leukozytenmarker verwendet wurden, waren Maus-Antikörper. Hier waren die sekundären Antikörper gegen Immunoglobuline der Maus gerichtet. Dadurch, dass die sekundären Antikörper unterschiedliche fluoreszierende Signale abgeben, ist eine Unterscheidung aufgrund der Farbe zwischen C5aR1- bzw. C5aR2-Rezeptor (rot) und Leukozyt (grün) möglich. Handelt es sich um eine Zelle, die für beide Antikörper Bindungsstellen trägt, z.B. ein Makrophage der C5aR1 exprimiert, kommt es zur Aussendung von zwei fluoreszierenden Signalen und zu einer Überlagerung beider Signale. Eine Überlagerung von rotem und grünem Signal ergibt die Farbe Gelb. Auf diese Weise konnten in dieser Arbeit im Fluoreszenzmikroskop Zellen unterschieden werden, die (a) nur C5aR1 bzw. C5aR2 exprimierten, (b) bei denen es sich um Leukozyten ohne C5aR-Expression handelte oder (c) bei denen es sich um Leukozyten handelte, die zusätzlich C5aR1/C5aR2 exprimierten.

Weiterhin musste eine Isotyp-spezifische Negativkontrolle durchgeführt werden. Die verwendeten Antikörper, die einer Antikörperklasse (IgG1, IgG2, IgA...) einer Spezies (Maus oder Kaninchen) angehören, gehen in einem bestimmten Maß auch unspezifische Bindungen ein. Dies führt zu unspezifischen Signalen und verfälscht das Ergebnis. Durch Antikörper der gleichen Antikörperklasse und -spezies, die an ein Antigen binden, das im menschlichen Organismus nicht vorkommt (in der Regel Antigene vom Schimmelpilz), kann dieses unspezifische Signal interpretiert werden. Diese Antikörper werden als Isotypen bezeichnet und dienen der Isotyp-Kontrolle oder Negativkontrolle (Luttmann et al. 2014). Außerdem binden die Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper an unspezifische Strukturen und verursachen ein nicht-spezifisches Hintergrundsignal. Auch dafür dient die Isotyp-Kontrolle. Das Fluoreszenzmikroskop wird so eingestellt und angepasst, dass im Negativbild keine Signale mehr zu erkennen sind. Auf diese Weise ist im zu

untersuchenden Objekt bei Signalen von spezifischen Antikörper-Antigen-Bindungen auszugehen (antikoerper-online.de/1223).

3.4.1 Leukozytenmarker

In dieser Studie wurde die Expression von C5aR1 und C5aR2 auf Leukozyten untersucht, die beim BP eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören Neutrophile, Mastzellen, Makrophagen/Monozyten, T-Zellen und, für BP charakteristisch, Eosinophile (Kasperkiewicz und Zillikens 2007). Zum Nachweis dieser Leukozyten, gibt es spezifische Antikörper, die an bestimmte, für die Zellen charakteristische, Strukturen binden und die Zelle sich so identifizieren lässt. Folgende Marker wurden in dieser Studie eingesetzt:

3.4.1.1. Myeloperoxidase (MPO) – Neutrophile Granulozyten

MPO ist ein Peroxidaseenzym und wird am häufigsten intrazellulär in der primären/azurophilen Granula von Neutrophilen exprimiert (Kato 2016). MPO ist daher ein üblicher Marker zur Identifikation von Neutrophilen (rndsistemas.com/cell-markers). Mit Hilfe von H₂O₂ oxidiert MPO Chloridionen zu Hypochlorsäure (HOCl). HOCl ist stark bakterizid und ein kritischer Bestandteil der Wirtsabwehr gegen eindringende Bakterien, Pilze und Viren. MPO spielt eine wichtige Rolle bei der Abtötung von Mikroben durch Neutrophile (Brown et al. 2001; Rehg et al. 2012; Aratani 2018).

3.4.1.2. CD68 – Makrophagen

CD68 ist ein Glykoprotein, das im Zytoplasma der meisten Monozyten bzw. Makrophagen exprimiert wird (Rehg et al. 2012; Chistiakov et al. 2017). Humanes CD68 gehört zur Familie der LAMP-Proteine, die sich in der lysosomalen Membran befinden. Die Funktion von CD68 ist noch unklar. Es wird eine Rolle beim Peptidtransport oder der Antigenverarbeitung vermutet (Chistiakov et al. 2017).

3.4.1.3. Tryptase – Mastzellen

Tryptase ist eine neutrale Serinprotease und der am häufigsten im Mastzellgranulat gespeicherte Mediator. Die Freisetzung von Tryptase ist ein charakteristisches Merkmal der Degranulation von Mastzellen und spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungen. Tryptase kann eine Reihe von Peptiden aktivieren, wie Fibronectin, Kinogenen und stimuliert die Degranulation von benachbarten Mastzellen. Während der Entzündung kann Tryptase die Freisetzung des Granulozyten-Chemokins IL-8 stimulieren und die Expression von ICAM-1 auf Epithelzellen hochregulieren (Payne und Kam 2004).

3.4.1.4. Eosinophile Peroxidase (EPX) – Eosinophile Granulozyten

EPX ist spezifisch für Eosinophile und ist in deren Granula exprimiert. EPX ist eine Peroxidase, die Radikale bildet, welche schädigend auf Zellmembranen wirken und an Abwehrreaktionen gegen eine Vielzahl von Mikroben beteiligt ist (Borelli et al. 2003; Lee und Rosenberg 2013).

3.4.1.5. CD3 - T-Zellen

CD3 sind transmembranöse Proteinketten, die zum T-Zell-Rezeptorkomplex gehören. CD3 ist als T-Zell-Marker anerkannt (Rehg et al. 2012). CD3 ist an der Signalübertragung beteiligt, nachdem ein Antigen mittels MHC-Molekül an den T-Zell-Rezeptor der T-Zelle bindet (Alcover et al. 2018).

3.4.1.6. C5a/C5a des-Arg

C5a und C5a des-Arg sind die Liganden von C5aR1 und C5aR2. C5a des-Arg ist das Abbauprodukt von C5a, dem durch das Enzym Carboxypeptidase B das C-terminale Arginin entfernt wurde. C5a des-Arg bindet mit 10-50fach höherer Affinität an C5aR2 als an C5aR1 und liegt aufgrund der hohen Aktivität der Carboxypeptidase in höherer Konzentration im Serum vor als C5a (Cain und Monk 2002).

3.4.1.7. Neuronales Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1) - NK-Zellen

NCAM1, auch als CD56 bezeichnet, ist ein Oberflächenmolekül und der typische Marker für NK-Zellen. Die Funktion von NCAM1 ist bisher unklar, wird jedoch bei Aktivierung von NK-Zellen mehr exprimiert und könnte bei der Kontaktaufnahme mit Zielzellen eine Rolle spielen (Van Acker et al. 2017).

3.4.2 Deparaffinierung

Die Proben mussten zunächst deparaffiniert werden, da das Paraffin eine weitere Arbeit mit Antikörpern verhindert. Die Deparaffinierung erfolgte in 7 verschiedenen Bädern wie folgt (**Abbildung 9**):

1. 3 min in Roti®-Histol
2. 3 min in Roti®-Histol
3. 3 min in Roti®-Histol
4. 3 min in 100% Ethanol
5. 3 min in 96% Ethanol
6. 3 min in 70% Ethanol
7. 3 min in 50% Ethanol

Anschließend wurden die Proben für mindestens 10 min in destilliertem Wasser gewaschen bzw. dort für die nächsten Schritte verwahrt, damit die Proben nicht austrocknen. Ein Austrocknen würde zu unspezifischen und schlechteren Ergebnissen führen.

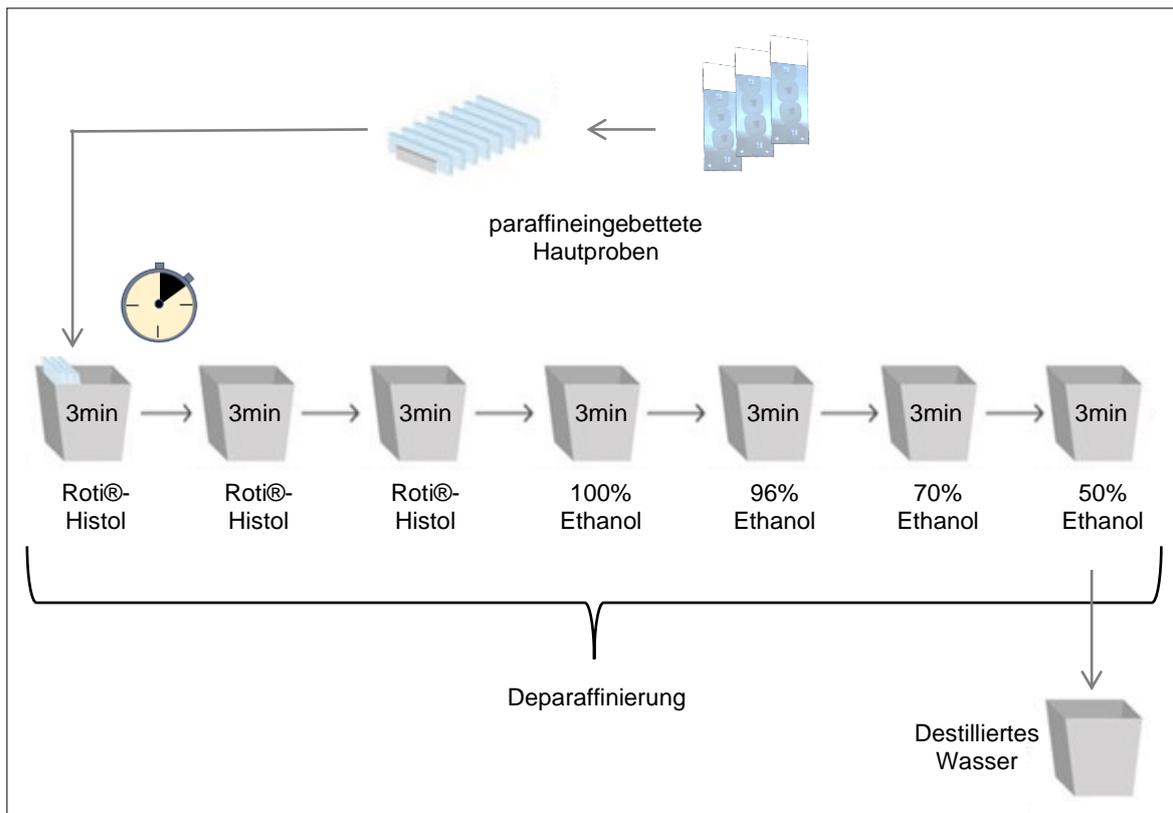


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Deparaffinierung. Für die weitere Behandlung mussten die Hautproben deparaffiniert werden. Dies erfolgte in mehreren Bädern mit Roti®-Histol und Ethanol für jeweils 3 Minuten (modifiziert nach labclinics.com/immunohistochemistry).

3.4.3 Antigenrückgewinnung

Durch das Verfahren der Formalinfixierung und der Paraffineinbettung der Hautbiopsien wurden die Proteine denaturiert und miteinander vernetzt (crosslinks). Dadurch gingen auch Bindungsstellen für Antikörper verloren und eine weitere immunhistochemische Bearbeitung ist nicht mehr möglich. Daher musste ein Antigen Retrieval (Antigenrückgewinnung) erfolgen, welches diese crosslinks beseitigt und die Epitope für die Antikörper wieder freigibt. Die Brechung der crosslinks kann enzymatisch (Proteinase K oder Pepsin) oder mit Hitze (HIAR = Hitze-induzierte-Antigen-Rückgewinnung) in einem Puffer, der je nach Antikörpereigenschaft entweder basisch oder sauer sein muss, erfolgen. Es wurden drei verschiedene Protokolle für das Antigen Retrieval für die folgenden Antikörper erarbeitet (**Abbildung 10**):

3.4.3.1. Tryptase und C5a/C5a des-Arg

Tryptase und C5a/C5a des-Arg benötigen ein enzymatisches Antigen Retrieval mit Proteinase K. Dazu wurden 50 µl Proteinase K (Arbeitslösung, QIAGEN) (**Tabelle 4**) auf die Schnitte pipettiert und die Proben 15 min bei 37°C inkubiert.

3.4.3.2. Myeloperoxidase (MPO), CD3 und CD68

MPO, CD3 und CD68 benötigten HIAR. Dafür wurden die Proben im Druckkochtopf in Citratpuffer (pH 6) 10 min gekocht (**Tabelle 4**). Anschließend ließ man diese 10 min im Topf auf Eis abkühlen.

3.4.3.3. Eosinophile Peroxidase (EPX)

EPX benötigte zwei Antigen Retrievals. Zuerst wurde ein HIAR im Dampfgarer in Citratpuffer (pH 6) durchgeführt, da dieser Antikörper ein schonenderes Verfahren benötigte. Sobald die Citratlösung eine Temperatur von 60°C erreicht hatte, wurde diese für 30 min gehalten. Nachdem die Proben 10 min abgekühlt waren, wurden diese 2x mit destilliertem Wasser für 5 min gewaschen. Anschließend musste noch ein enzymatisches Antigen Retrieval mit Proteinase K (Arbeitslösung, QIAGEN) durchgeführt werden. Dazu wurden 50 µl Proteinase K auf die Schnitte pipettiert und die Proben 15 min bei 37°C inkubiert.

3.4.3.4. NCAM1

Bei NCAM1 wurden verschiedene Antigen Retrievals angewendet, da insbesondere das vom Hersteller empfohlene Verfahren erfolglos blieb. Es wurde wie bei EPX ein Antigen Retrieval im Dampfgarer in Citratpuffer durchgeführt, das im Datenblatt für den NCAM1-Antikörper empfohlen war. Aufgrund des Misserfolgs wurde weiterhin wie bei Tryptase Proteinase K (Arbeitslösung, QIAGEN) getestet und außerdem in einem anderen Versuch Pepsin (Fertigmischung, Thermo Fisher Scientific) (**Tabelle 4**), welche beide nach Auftragung 15 min bei 37°C inkubiert wurden.

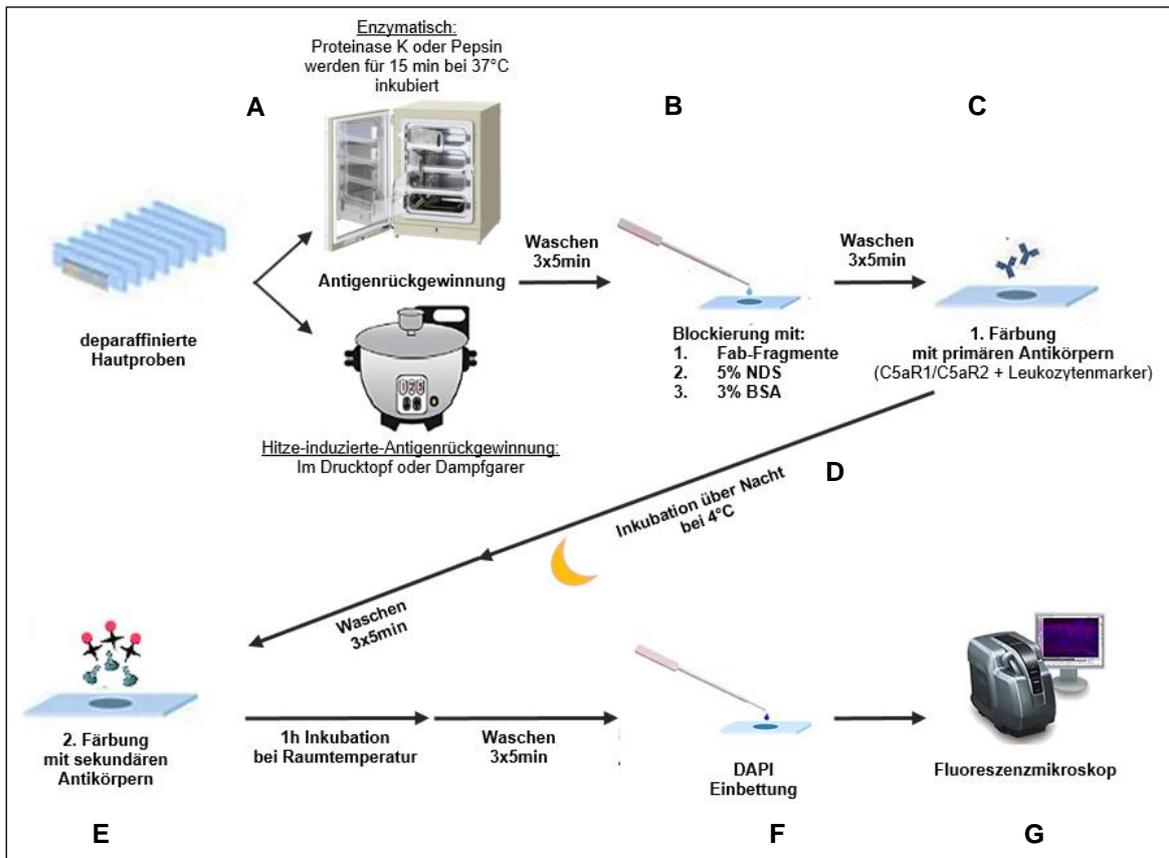


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Bearbeitung der Hautproben für die Immunhistochemie. Die Hautproben benötigen als Erstes eine Antigenrückgewinnung, die enzymatisch oder durch Hitze durchgeführt wird. **(B)** Anschließend erfolgt die Blockierung, zunächst der in der Haut vorhandenen Immunglobuline mit Fab-Fragmenten, dann der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% normalen Eselserum (NES) und anschließen mit 3% bovinen Serumalbumin (BSA). **(C)** Dann erfolgt die erste Färbung, die Antikörper gegen C5aR1 oder C5aR2 und den jeweiligen Antikörper gegen den gesuchten Leukozyten enthält. **(D)** Es erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 4°C. **(E)** Am nächsten Tag erfolgt die zweite Färbung mit sekundären bzw. immunfluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen die C5aR1/C5aR2- und leukozytenspezifischen Antikörper und Inkubation für 1h bei Raumtemperatur (RT). **(F)** Zur Färbung der Zellkerne und Konservierung erfolgt die Einbettung mit DAPI. **(G)** Anschließend wurden die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und quantifiziert (modifiziert nach O'Hurley et al. 2014 und labclinics.com/immunohistochemistry).

3.4.4 Blockierung

Nach dem Antigen Retrieval wurden die Proben 3 x 5 min in PBS-T gewaschen. EPX benötigte TBS-T als Waschpuffer.

Der Antigennachweis wird durch eine unspezifische Hintergrundfärbung erschwert, wenn indirekte immunhistochemische Nachweismethoden verwendet werden. Die Hauptursache für die Hintergrundfärbung ist die Bindung des sekundären Antikörpers an im Gewebe vorkommende Antikörper und andere Komponenten. Der Blockiervorgang ist unabkömmlich, um eine nicht spezifische Bindung von Antikörpern oder anderen Reagenzien an das Gewebe zu vermeiden. Selbst dann, wenn der Antikörper eine hohe Spezifität gegenüber dem Ziel aufweist, können intermolekulare Kräfte eine nicht spezifische Bindung an andere Moleküle begünstigen. Diese nicht-spezifische Bindung verhindert die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindung, die untersucht werden soll. Um eine nicht-spezifische Bindung nach Möglichkeit auszuschließen, muss ein Blockiervorgang vor der Inkubation mit dem Primärantikörper durchgeführt werden. Generell wird Serum (von derselben Spezies wie der Sekundärantikörper) oder bovines Serumalbumin (BSA) für die Blockierung verwendet. Seren können helfen, die nicht-spezifische Bindung zu verhindern. Wenn eine Färbung mit mehreren Antikörpern durchgeführt wird, müssen Blocksera gegen alle verwendeten Sekundärantikörper verwendet werden (ptglab.com/ihc-blockierung). Bei Proteinen wie BSA oder Casein besteht jedoch keine Notwendigkeit, das Reagenz an die Spezies des sekundären Antikörpers anzupassen (abcam.com/blocking-for-ihc).

Die Blockierung erfolgte wie folgt:

3.4.4.1. Blockierung endogener Immunglobuline mit Fab-Fragmenten

Das Blockieren von im Gewebe vorkommender (endogener) Antikörper durch Vorinkubation mit monovalenten Fab-Fragmenten führt zur Eliminierung der Hintergrundfärbung und erzielt zufriedenstellende Ergebnisse (**Abbildung 11**). Monovalente Fab-Fragmente sind die antikörperbindenden Bestandteile von Antikörpern und besitzen nur eine Bindungsstelle, die an Antikörper bindet, die in der zu untersuchenden Hautbiopsie vorkommen (dianova.com/fab-fragmente). Damit wird verhindert, dass sekundäre Antikörper an diese Antikörper binden und ein unspezifisches Signal aussenden. Dies ermöglicht die Spezifität des Fluoreszenzsignals zu erhöhen (dianova.com/immunohistochemische-faerbung). Dafür wurden die Proben für 60 min mit Esel-anti-Mensch-Anti-F(ab')-Antikörpern (Verdünnung: 1:200, Jackson ImmunoResearch; in PBS bzw. TBS bei EPX) bedeckt (**Abbildung 10B, Tabelle 4**). Anschließend wurden die Proben 3 x 5 min mit PBS-T bzw. bei Verwendung von EPX mit TBS-T gewaschen.

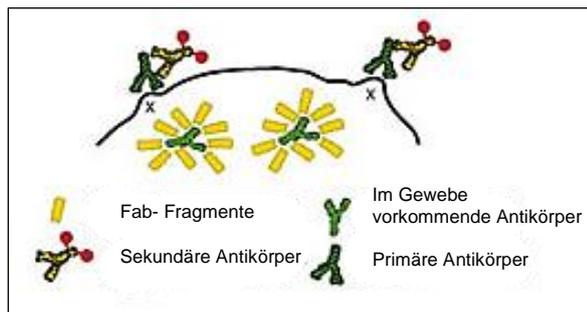


Abbildung 11: Blockierung endogener Antikörper mit Fab-Fragmenten. Fab-Fragmente binden an endogene Antikörper und ermöglichen sekundären Antikörpern eine spezifischere Bindung an die primären Antikörper. Dadurch ist ein Hintergrundsignal durch unspezifische Bindungen vermeidbar (dianova.com/immunohistochemische-faerbung).

3.4.4.2. Blockierung mit normalen Eselserum (NES)

Die Blockierung mit NES war für die Verwendung von Kaninchen-Antikörpern gegen C5aR1/C5aR2 notwendig. 5% NES/PBS-T bzw. für EPX 5% NES/TBS-T wurden für 60 min auf die Proben gegeben (**Tabelle 4**).

3.4.4.3. Blockierung mit bovines Serumalbumin (BSA)

Nun erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen bei Raumtemperatur für 30 min mit 3% BSA/PBS-T bzw. 3% BSA/TBS-T für EPX. Der Vorgang war für die Verwendung der spezifischen Maus-Antikörper gegen die Leukozyten notwendig (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Reaktanten in Immunhistochemie.

Puffer	Zusammensetzung
3% bovines Serumalbumin (BSA)	50 ml PBS-T/TBS-T, 1,5 g Albumin Fraktion V
5% normales Eseserum (NES)	50 ml PBS-T/TBS-T, 2,5 ml NES
1x Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (PBS-T)	10xPBS: 5 l destilliertes Wasser, 450 g NaCl, 87 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 9 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 1 l 1xPBS-T: 100 ml 10xPBS, 900 ml destilliertes Wasser, pH 7,2, 0,5 ml Tween-20
3% BSA/PBS-T	3 g in 100 ml PBS-T
1x Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (TBS-T)	5xTBS: 1 l destilliertes Wasser, 12,1 g Tris-Base, 40 g NaCl, pH 7,5; 1xTBS-T: 200 ml 5xTBS, 800 ml destilliertes Wasser, 0,5 ml Tween-20
3% BSA/TBS-T	3 g in 100 ml PBS-T
Citratpuffer	1 l destilliertes Wasser, 2,94 g Tri-sodium citrate (dihydrate), pH 6,0, 0,5 ml Tween 20
Proteinase K (QIAGEN)	Lagerlösung → Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer): 3,05 g Tris base, 0,37 g EDTA, 2,5 ml Triton X-100, 500 ml destilliertes Wasser, pH 8, Verdünnung 1:1 mit Glycerol, Proteinase K 1:50, Lagerung bei -20°C Arbeitslösung: 1 ml Lagerlösung + 19 ml TE-CaCl ₂ Puffer (pH 8), Lagerung bei 4°C für 6 Monate
Pepsin (Thermo Fisher Scientific)	Fertigmischung

3.4.5 Erste Färbung

Nach dieser Vorarbeit konnte nun die Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen C5aR1 (polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1, Invitrogen) und dem jeweiligen Leukozytenmarker sowie C5aR2 (polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2, Invitrogen) und dem jeweiligen Leukozytenmarker mit der zugehörigen Isotyp-Kontrolle erfolgen (**Abbildung 10C**). Die jeweiligen Verdünnungen erfolgten in 3% BSA/PBS-T bzw. bei EPX in 3%BSA/TBS-T. Die jeweilige Herstellung ist in **Tabelle 5** beschrieben.

Tabelle 5: Beschreibung der Herstellung der Antikörperlösungen für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung und ihrer Isotyp-Kontrollen.

Tryptase	
Tryptase + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch Tryptase (Verdünnung 1:200, Dako) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:100, Invitrogen)
Tryptase + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch Tryptase (Verdünnung 1:200, Dako) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100, Invitrogen)
Isotyp-Kontrolle	Maus IgG1 (Verdünnung 1:200, BioLegend) + normales Kaninchen IgG (Verdünnung 1:100, Bio X Cell)
C5a/C5a des-Arg	
C5a/C5a des-Arg + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch C5a/C5a des-Arg (Verdünnung 1:50, Hycult Biotech) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:100, Invitrogen)
C5a/C5a des-Arg + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch C5a/C5a des-Arg (Verdünnung 1:50, Hycult Biotech) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:100, Invitrogen)
Isotyp-Kontrolle	Maus IgG2a (Verdünnung 1:200, BioLegend) + normales Kaninchen IgG (Verdünnung 50, Bio X Cell)
Myeloperoxidase (MPO)	
MPO + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch MPO (Verdünnung 1:100, R&D Systems) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
MPO + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch MPO (Verdünnung 1:100, R&D Systems) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
Isotyp-Kontrolle	Maus IgG2b (Verdünnung 1:100, BioLegend) + normales Kaninchen IgG (Verdünnung 1:50, Bio X Cell)
CD68	
CD68 + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch CD68 (Verdünnung 1:100, Dako) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
CD68 + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch CD68 (Verdünnung 1:100, Dako) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
Isotyp-Kontrolle	Maus IgG3 (Verdünnung 1:100, BioLegend) + normales Kaninchen IgG (Verdünnung 1:50, Bio X Cell)

CD3	
CD3 + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch CD3 (Verdünnung 1:50, Dako) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
CD3 + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch CD3 (Verdünnung 1:50, Dako) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
Isotyp-Kontrolle	Maus IgG2a (Verdünnung 1:200, BioLegend) + normales Kaninchen IgG (Verdünnung:1:50, Bio X Cell)
Eosinophile Peroxidase (EPX)	
EPX + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch EPX (Verdünnung 1:300, Mayo Clinic) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung:1:50, Invitrogen)
EPX + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch EPX (Verdünnung 1:300, Mayo Clinic) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung:1:50, Invitrogen)
Isotyp-Kontrolle	Maus IgG2a (Verdünnung 1:300, BioLegend) + normales Kaninchen IgG (Verdünnung 1:50, Bio X Cell)
Neuronales Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1)	
Antikörper A	
NCAM1 + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch NCAM1 (Verdünnung 1:50, Cell Signal) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
NCAM1 + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch NCAM1 (Verdünnung 1:50, Cell Signal) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
Antikörper B	
NCAM1 + C5aR1	monoklonal Maus-anti-Mensch NCAM1 (Verdünnung 1:50, Santa Cruz) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR1 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
NCAM2 + C5aR2	monoklonal Maus-anti-Mensch NCAM1 (Verdünnung 1:50, Santa Cruz) + polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:50, Invitrogen)
Isotyp-Kontrolle (für A und B)	Maus IgG1 (Verdünnung 1:50, BioLegend) + normales Kaninchen IgG (Verdünnung 1:50, Bio X Cell)

Nachdem die Antikörper aufgetragen wurden, wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.4.6 Zweite Färbung

Am nächsten Tag wurden die Proben 3 x 5 min in PBS-T bzw. bei EPX mit TBS-T gewaschen. Nun wurden die Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper simultan aufgetragen (**Abbildung 10E**). Für C5aR1 und C5aR2 wurden Alexa Fluor® 594 Esel-anti-Kaninchen IgG verwendet (Verdünnung: 1:500), die in 5% NDS/PBS bzw. für EPX 5% NDS/TBS gelöst wurden. Für die Leukozytenmarker-Antikörper wurden Alexa Fluor® 488 Ziege-anti-Maus IgG (Verdünnung 1:200) dazugemischt. Diese Proben wurden 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x 5 min in PBS-T bzw. bei EPX in TBS-T gewaschen. Für die Konservierung und Färbung der Zellkerne wurde DAPI auf die Proben aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. Die Proben waren nun für die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Keyence, BZ-9000) bereit.

3.4.7 Quantifizierung der immungefärbten Zellen

Die Quantifizierung der immungefärbten Zellen wurde manuell unter Verwendung eines Zählgitters durchgeführt, wie von Bologna-Molina und Kollegen beschrieben (Bologna-Molina et al. 2011). Es wurden jeweils pro Untersuchung fünf Bilder mit 400-facher Vergrößerung unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 der Firma Keyence aufgenommen. Für jede Probe wurden fünf Mikrofotografien aufgenommen. Jede Datei wurde mit Microsoft Office PowerPoint (Microsoft Corporation, USA) geöffnet. Es wurde mit Microsoft Office Word (Microsoft Corporation, USA) ein gleichmäßiges 6 x 8-Raster erstellt und dieses über das gesamte Bild gelegt. Das Zählraster ist in **Abbildung 12** dargestellt. Nun wurden die unterschiedlich gefärbten Zellen pro Zählquadrat ausgezählt und die Summe der verschiedenen Zellen ausgerechnet. Die verschiedenen Färbungen sind in **Tabelle 6** aufgelistet. Das gleiche Verfahren wurde für alle Hautproben der 9 BP-Patienten und Patienten der Kontroll-Gruppe angewendet. Von den 9 BP-Patienten wurde die Summe aller verschieden gefärbten Zellen notiert. Daraus erhielt man die Zellsummen von 9 BP-Patienten und 4 Kontroll-Patienten für die jeweiligen untersuchten Leukozyten in der C5aR1- und C5aR2-Untersuchung. Die Einzelsummen und die Quantifizierung sind in **Tabelle 7** aufgelistet.

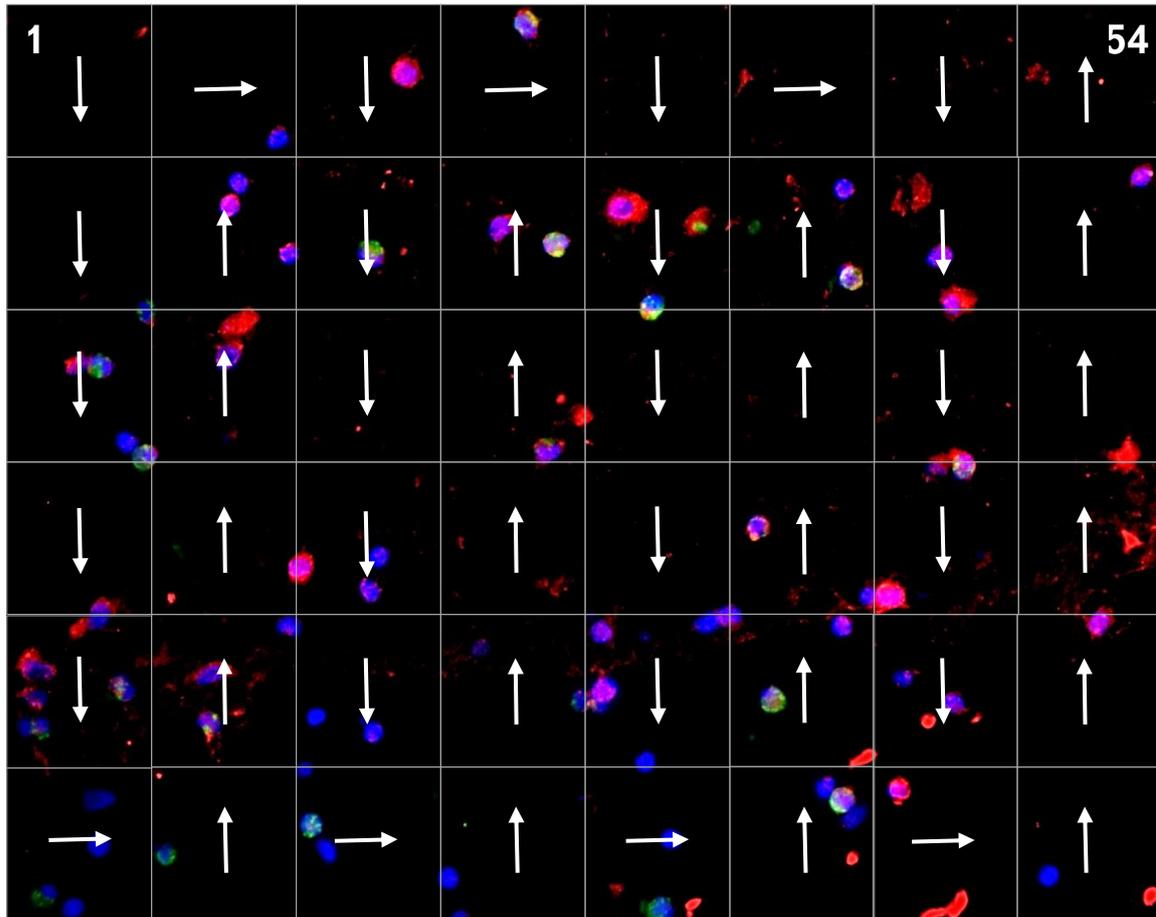


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zählung. Die Zellzählung begann in der oberen linken Ecke (Quadrat 1) und endete in der oberen rechten Ecke (Quadrat 54).

Tabelle 6: Beschreibung der verschiedenen Fluoreszenzfarben.

Farbe/ Fluoreszenz	Beschreibung	Beispiel
Blau	Zellkerne, diese wurde durch DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) fluoreszenzmarkiert, welches sich an die DNS anlagert.	
Rot	Zelle mit C5aR1- bzw. C5aR2-Expression	
Grün	Leukozyt, der durch spezifische Antikörper gekennzeichnet wurde, z.B. neutrophiler Granulozyt	
Gelb	Ergibt sich aus der Überlagerung der Farben rot und grün und beschreibt eine Doppelfärbung. Das bedeutet es handelt sich um den in dieser Reihe spezifisch angefärbten Leukozyten, der außerdem eine C5aR1- oder C5aR2-Expression aufweist.	

Tabelle 7: Quantifizierung der C5aR1-positiven Mastzellen in der periläsionalen Haut von BP-Patienten.

BP-Patient (P)	Doppelfärbung C5aR1+Tryptase	Einzelfärbung Tryptase	Einzelfärbung C5aR1	Keine Expression (DAPI)	Gesamtsumme
P1-P9	a	b	c	d	e
Summe	A	B	C	D	E

Für jeden der 9 BP-Patienten und 4 Kontroll-Patienten wurde von den jeweils fünf Mikrofotografien die Anzahl der gelben Doppelfärbungen (a), der grünen Einzelfärbungen (b), der roten Einzelfärbungen (c) und Zellen, die keine Expression hatten und nur die blaue Färbung durch DAPI zeigten, eingetragen. Erklärung der Farben in **Tabelle 6**. Von allen Patienten wurde die Summe der verschiedenen Färbungen ausgerechnet (A-E).

Wie in **Tabelle 7**, welche die Quantifizierung der Mastzellen mit C5aR1 darstellt, erklärt wird, erhielt man auch für die restlichen verschiedenen immunhistochemischen Färbungen (**Tabelle 4**) aller 9 BP- und 4 Kontroll-Patienten die einzelnen Gesamtsummen (**Tabelle 7 A-E**). Aus diesen Zahlen ließen sich sowohl die Mengen der unterschiedlichen Leukozyten mit C5aR1-/C5aR2-Expression (**Tabelle 7A**) und ohne C5aR1-/C5aR2-Expression (**Tabelle 7 B**) ableiten als auch der Anteil der verschiedenen Leukozyten an der C5aR1-/C5aR2-Expression in der Haut der BP- und Kontroll-Patienten errechnen. Der Anteil eines Leukozyten (am Beispiel von Mastzellen) an der C5aR1-/C5aR2- Expression wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{100\% \times \text{Mastzellen mit C5aR1/C5aR2-Expression (gelbe Zellen)}}{\text{Leukozyten (gesamt) mit C5aR1/C5aR2 (gelbe Zellen)}}$$

Die Anzahl aller Zellen mit C5aR1-/C5aR2-Expression ergibt sich aus der Summe der gezählten Leukozyten (Mastzellen, Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen, T-Zellen) mit C5aR1-/C5aR2-Expression (gelbe Zellen). Dies sind zusammen 100%. Nun wurde aus den 100% der Anteil der untersuchten Leukozyten mit C5aR1-/C5aR2-Expression berechnet.

Anschließend wurde die allgemeine C5aR⁺-Expression, die aus C5aR1- und C5aR2-Expression besteht, ausgerechnet. Der Anteil an der gemeinsamen Expression wurde wie folgt berechnet (am Beispiel von Mastzellen):

$$\frac{\text{Mastzellen mit C5aR1 (\%)} + \text{Mastzellen mit C5aR2 (\%)}}{2}$$

Die ermittelten Anteile eines Leukozyten an der C5aR1- und C5aR2-Expression wurden addiert und daraus der Mittelwert gebildet. Daraus ergibt sich der gemeinsame Anteil an der C5aR⁺-Expression.

3.4.8 Spezifität des C5aR2-Antikörpers

Um zu überprüfen, ob der in dieser Arbeit verwendete C5aR2-Antikörper spezifisch an sein Ziel bindet, wurde ein Peptid hergestellt, das die gleiche Aminosäurefrequenz wie die Aminosäurefrequenz des Epitops trägt. Die folgenden Vergleiche dienten der Überprüfung, dass der Antikörper nicht unspezifisch an andere Strukturen bindet, falsche Strukturen markiert und damit das Ergebnis verfälscht. Der verwendete C5aR2-Antikörper bindet an die sekundäre extrazelluläre Domäne des C5aR2-Rezeptors (labome.com/GPR77; uniprot.org/C5aR2). Die Aminosäurefrequenz lautet: RRLHQEHFPARLQCVDYGGSSSTEN (Aminosäuren-ein-Buchstaben-Code). Dieses Peptid ließ man von der peptides&elephants GmbH herstellen. Nun wurde dieses Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem C5aR2-Antikörper gemischt (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Herstellung der C5aR2-Antikörper-Peptid Lösung

Verdünnung	Herstellung
1	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100 (10 ng), Invitrogen) + Peptid (50 µg, peptides&elephants GmbH)
2	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100 (10 ng), Invitrogen) + Peptid (25 µg, peptides&elephants GmbH)
3	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100 (10 ng), Invitrogen) + Peptid (5 µg, peptides&elephants GmbH)
4	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100 (10 ng), Invitrogen) + Peptid (1 µg, peptides&elephants GmbH)
5	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100 (10 ng), Invitrogen) + Peptid (0,5 µg, peptides&elephants GmbH)
6	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100 (10 ng), Invitrogen) + Peptid (0,1 µg, peptides&elephants GmbH)
7	Positiv-Kontrolle: polyklonal Kaninchen-anti-Mensch C5aR2 (Verdünnung 1:100 (10 ng), Invitrogen)
8	Isotyp-Kontrolle: normales Kaninchen IgG (Verdünnung 1:100 (10 ng), Bio X Cell) + Peptid (50 µg, peptides&elephants GmbH)

Der C5aR2-Antikörper wurde mit 5% NDS/PBS-T 1:100 verdünnt. 10 ng der C5aR2-Antikörper-Lösung wurden mit sechs unterschiedlichen Peptidmengen gemischt und inkubiert. Verdünnung 7 war die Positiv-Kontrolle, die nicht mit der Peptidlösung gemischt wurde. Verdünnung 8 war die Isotyp-Kontrolle.

Diese Lösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Hintergrund dabei war, dass der C5aR2-Antikörper in der Mixtur an die vorhandenen Peptide bindet, die seiner Zielfrequenz entsprechen. Ist die Konzentration erreicht, bei der alle C5aR2-Antikörper an ein Peptid binden, steht kein C5aR2-Antikörper mehr zur Verfügung, der an vorliegende C5aR2-Rezeptoren in der Haut bindet. Damit lässt sich im Rahmen der Immunhistochemie kein Signal detektieren. Es wurde erwartet, je höher die Peptidkonzentration ist, desto mehr Antikörper binden an die vorliegenden Peptide und desto geringer ist das Immunfluoreszenzsignal.

Für diese Untersuchung wurden Hautproben von BP-Patienten wie beschrieben deparaffiniert (Kapitel 3.4.2), mittels Proteinase K eine Antigenrückgewinnung ermöglicht (Kapitel 3.4.3) und abschließend eine Blockierung durchgeführt (Kapitel 3.4.4). Nun wurden die Antikörper-Peptid-Lösungen und die Isotyp-Kontroll-Lösungen auf die Proben pipettiert. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 594 (Verdünnung 1:300 in 5% NDS/PBS-T) für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Proben mit DAPI eingedeckt und die Ergebnisse unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Doppelfärbungen waren bei allen Leukozyten nachzuweisen

Zunächst musste das Protokoll für die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen etabliert werden. Es wurden verschiedene Antikörper-Klone für die Verwendbarkeit in der Immunhistochemie getestet. Dabei konnten sowohl für C5aR1 und C5aR2 als auch für die gesuchten Leukozytenarten erfolgreich geeignete Antikörper und immunhistochemische Methoden gefunden werden, bei denen Einzel- und Doppelfärbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop ersichtlich wurden, und für den jeweiligen Leukozyten ein Protokoll angefertigt werden.

Im Folgenden sind die Beobachtungen zu den Mikroskopbildern der untersuchten Leukozyten bzw. C5a/C5a des-Arg und das Auftreten von C5aR1- und C5aR2-Expression beschrieben. Die dazugehörigen Mikroskopbilder folgen im Anschluss.

4.1.1 C5a/C5a des-Arg

C5a/C5a des-Arg war in dieser Arbeit auf Zellen in der Dermis nachzuweisen, die C5aR1 und C5aR2 exprimierten (**Abbildung 14**). Dies war an den fast ausschließlich auftretenden Doppelfärbungen bei BP-Patienten und Kontroll-Patienten zu erkennen.

4.1.2 Tryptase

Sowohl in der Haut von BP-Patienten als auch von Kontroll-Patienten konnten Mastzellen mit C5aR1- und C5aR2-Expression nachgewiesen werden (**Abbildung 15**).

4.1.3 Eosinophile Peroxidase

Während eosinophile Granulozyten mit C5aR1- und C5aR2-Expression in BP-Haut festgestellt wurden, waren in der Haut von Kontroll-Patienten nahezu keine Eosinophilen anzutreffen (**Abbildung 16**).

4.1.4 CD68

Makrophagen waren in BP-Haut nachweisbar und zeigten eine deutliche Doppelfärbung sowohl bei Färbung mit C5aR1- als auch C5aR2-Antikörpern (**Abbildung 17**). Bei Makrophagen in der Haut der Kontroll-Patienten dahingegen war eine C5aR1-Expression vermehrt, eine C5aR2-Expression jedoch deutlich weniger anzutreffen.

4.1.5 Myeloperoxidase

Neutrophile Granulozyten waren in der Haut der BP- und Kontroll-Patienten nachweisbar. Jedoch zeigten diese im Gegensatz zu einer deutlichen C5aR1-Expression nur eine geringere C5aR2-Expression, das besonders in der Haut der Kontroll-Patienten auffiel (**Abbildung 18**).

4.1.6 CD3

Bei T-Zellen war auffallend, dass diese nicht, wie bei den bisherigen Leukozyten, über die Dermis einzeln verteilt auftraten, sondern zusammenliegend und haufenweise in der Dermis zum Teil in großer Anzahl auftraten (**Abbildung 19**). Eine C5aR1-Expression war bei T-Zellen ausgeprägter festzustellen. Bei den Kontroll-Patienten war die Anzahl von T-Zellen deutlich geringer. Bei der Untersuchung der C5aR2-Expression von T-Zellen waren Doppelfärbungen kaum aufzufinden.

4.1.7 NCAM1

Für den Nachweis von NK-Zellen wurden zwei Antikörperklone (123C3 und ERIC1) mit unterschiedlichen immunhistochemischen Methoden getestet (**Kapitel 3.4.3**). Keine Methode konnte einen Nachweis von NK-Zellen erbringen (**Abbildung 20**). Zur weiteren Überprüfung wurde die Probe für einen chromogenen Nachweis von Eosinophilen ins Labor geschickt, bei dem die Signalerzeugung des Marker-gekoppelten sekundären Antikörpers enzymatisch generiert wird. Aufgrund der höheren Signalverstärkung bei diesem Verfahren ist der chromogene Nachweis empfindlicher als der Fluoreszenznachweis (abcam.com/chromogenic-detection). Dabei konnte eine sehr geringe Menge an NK-Zellen nachgewiesen werden, die jedoch vernachlässigbar war. Daher wurden weitere Versuche, NK-Zellen nachzuweisen, unterlassen. Aufgrund der begrenzten Auswahl chromogener Reagenzien sind fluoreszierende Marker für den Nachweis mehrerer Signale aus derselben Gewebeprobe überlegen (biossusa.com/chromogenic). Chromogene Marker wurden daher in dieser Arbeit nicht verwendet.

4.2 Überprüfung der Spezifität des verwendeten C5aR2-Antikörpers

Der in dieser Arbeit verwendete C5aR2-Antikörper sollte auf seine Spezifität überprüft werden. Dafür wurde das Peptid zusammen mit dem Antikörper auf das Hautpräparat pipettiert. Mit steigender Peptidkonzentration war ein schwächeres Immunfluoreszenzsignal zu sehen (**Abbildung 13**). Bei den höchsten Konzentrationen von 50 µg Peptid waren keine Immunfluoreszenzsignale mehr sichtbar.

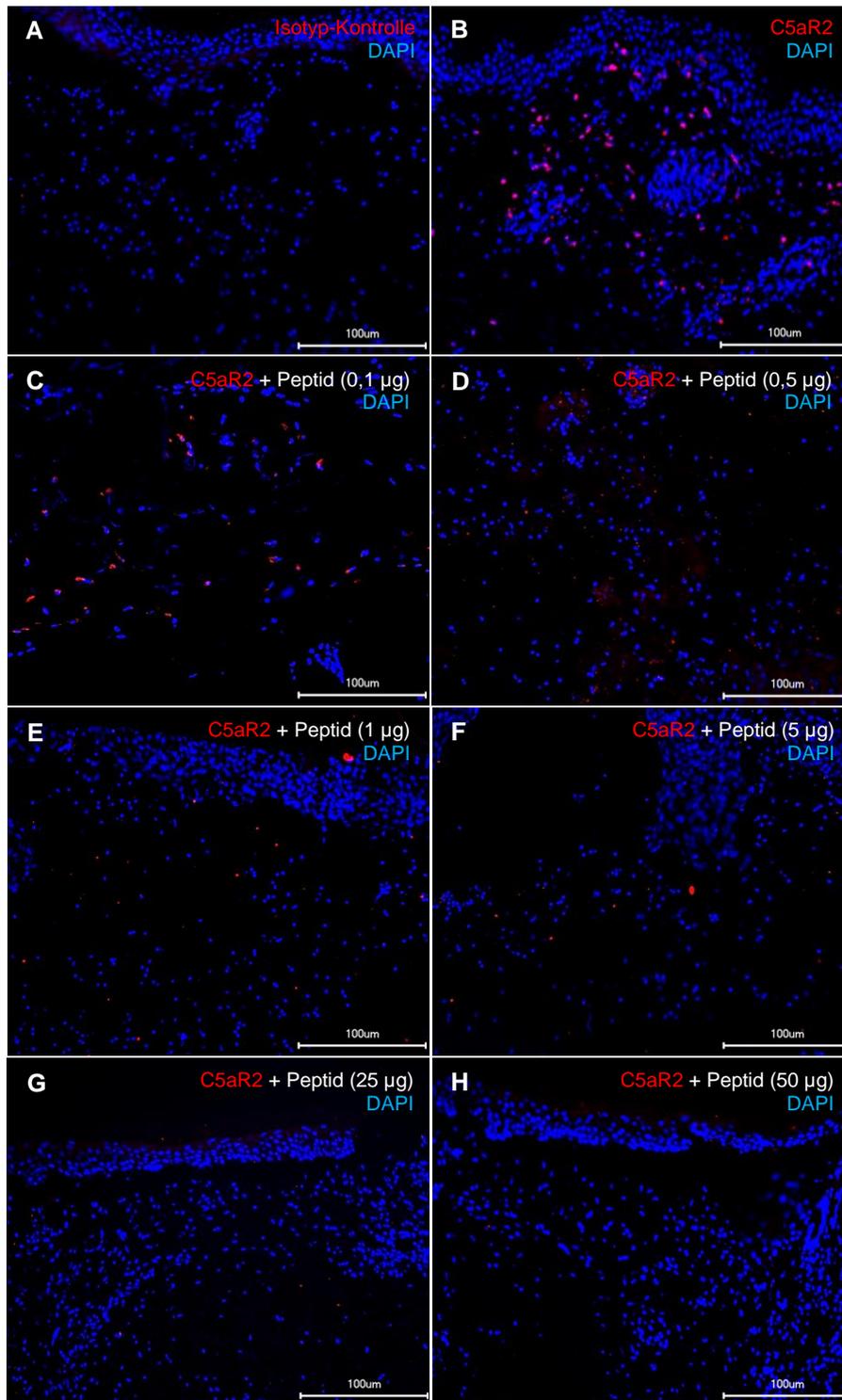


Abbildung 13: Spezifität des C5aR2-Antikörpers. (A) Isotyp-Kontrolle. (B) C5aR2 ohne Peptid (Positivkontrolle). Die C5aR2-Antikörper liegen ungebunden vor und binden an C5aR2-Rezeptoren in BP-Haut. Es ist eine Vielzahl von C5aR2-exprimierenden Zellen (rot) zu erkennen. (C-H) C5aR2-Antikörper (AK) wurden mit zunehmenden Peptidkonzentrationen gemischt. Man erkennt das abnehmende Immunfluoreszenzsignal von C zu H, das durch die abnehmende Zahl an C5aR2-AK (rot) bedingt ist, die wiederum zunehmend an Peptide gebunden sind und nicht mehr für die Bindung an C5aR2-Rezeptoren in BP-Haut zur Verfügung stehen. (C) 10 ng C5aR2-AK + 0,1 µg Peptid. (D) 10 ng C5aR2-AK + 0,5 µg Peptid. (E) 10 ng C5aR2-AK + 1 µg Peptid. (F) 10 ng C5aR2-AK + 5 µg Peptid. (G) 10 ng C5aR2-AK + 25 µg Peptid. (H) 10 ng C5aR2-AK + 50 µg Peptid. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung angefertigt. Die Messleiste hat eine Länge von 100 µm.

4.3 Immunhistochemie Bilder

Die verschiedenen Färbungen von C5aR1/C5aR2 zusammen mit den gesuchten Leukozyten sind in den **Abbildungen 18 bis 24** dargestellt. Auf der linken Seite befinden sich jeweils die immunhistochemischen Bilder von BP-Patienten und Kontroll-Patienten. Diesen gegenüber befinden sich die Isotyp-Kontrollen, die in allen Fällen negativ waren. Die spezifisch gefärbten Leukozyten sind mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet, Leukozyten mit C5aR1- oder C5aR2-Expression mit einem gelben Pfeil.

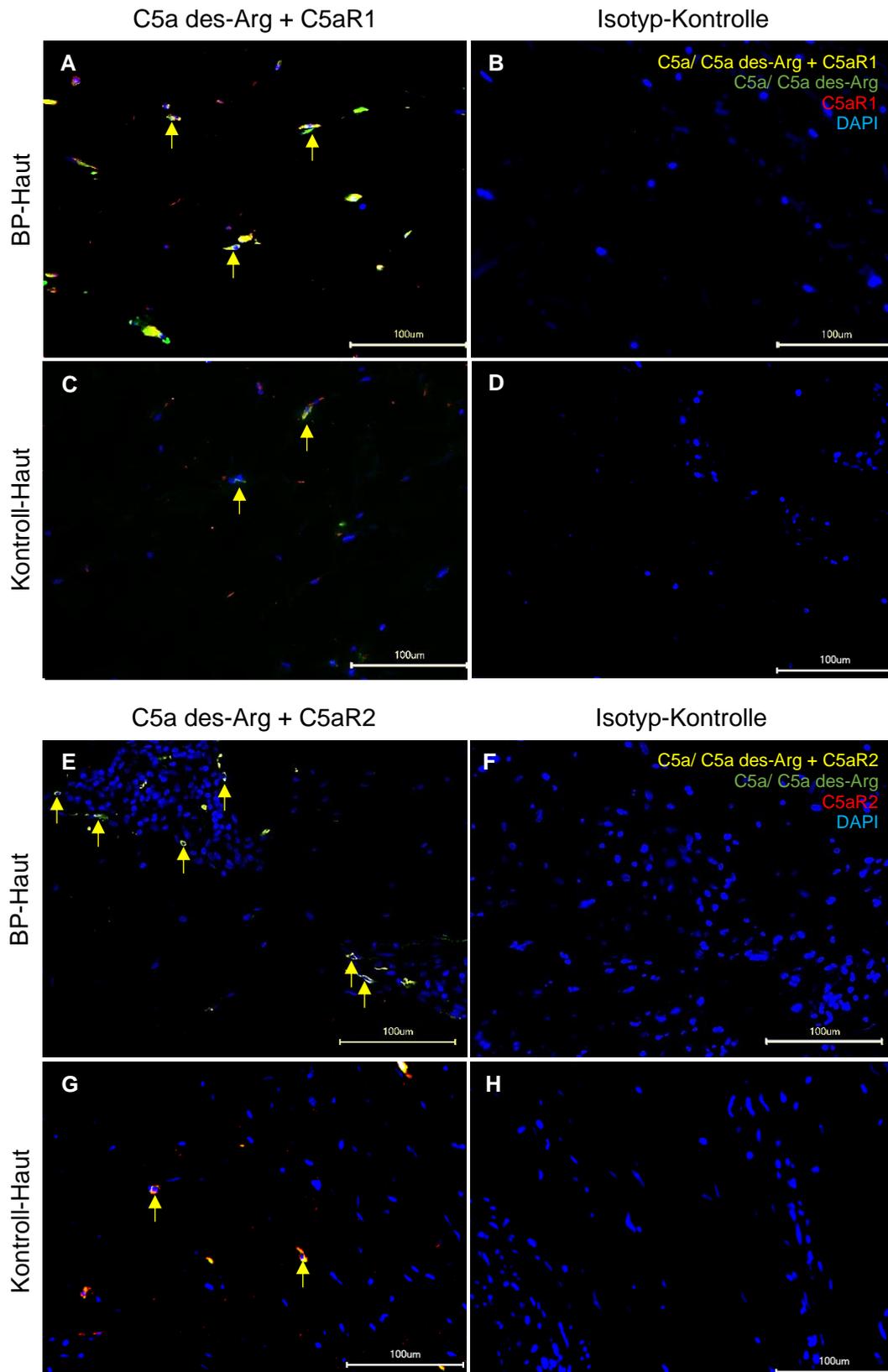


Abbildung 14: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und C5a/C5a des-Arg. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung angefertigt. Die Messleiste hat eine Länge von 100 μm. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Doppelfärbungen. Der grüne Pfeil kennzeichnet Zellen ohne C5aR1-/C5aR2-Expression. **(A,B,E,F)** BP-Haut. **(A)** C5aR1 und C5a/C5a des-Arg. **(B)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und C5a/C5a des-Arg. **(E)** C5aR2 und C5a/C5a des-Arg. **(F)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und C5a/C5a des-Arg. **(C,D,G,H)** Kontroll-Haut. **(C)** C5aR1 und C5a/C5a des-Arg. **(D)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und C5a/C5a des-Arg. **(G)** C5aR2 und C5a/C5a des-Arg. **(H)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und C5a/C5a des-Arg.

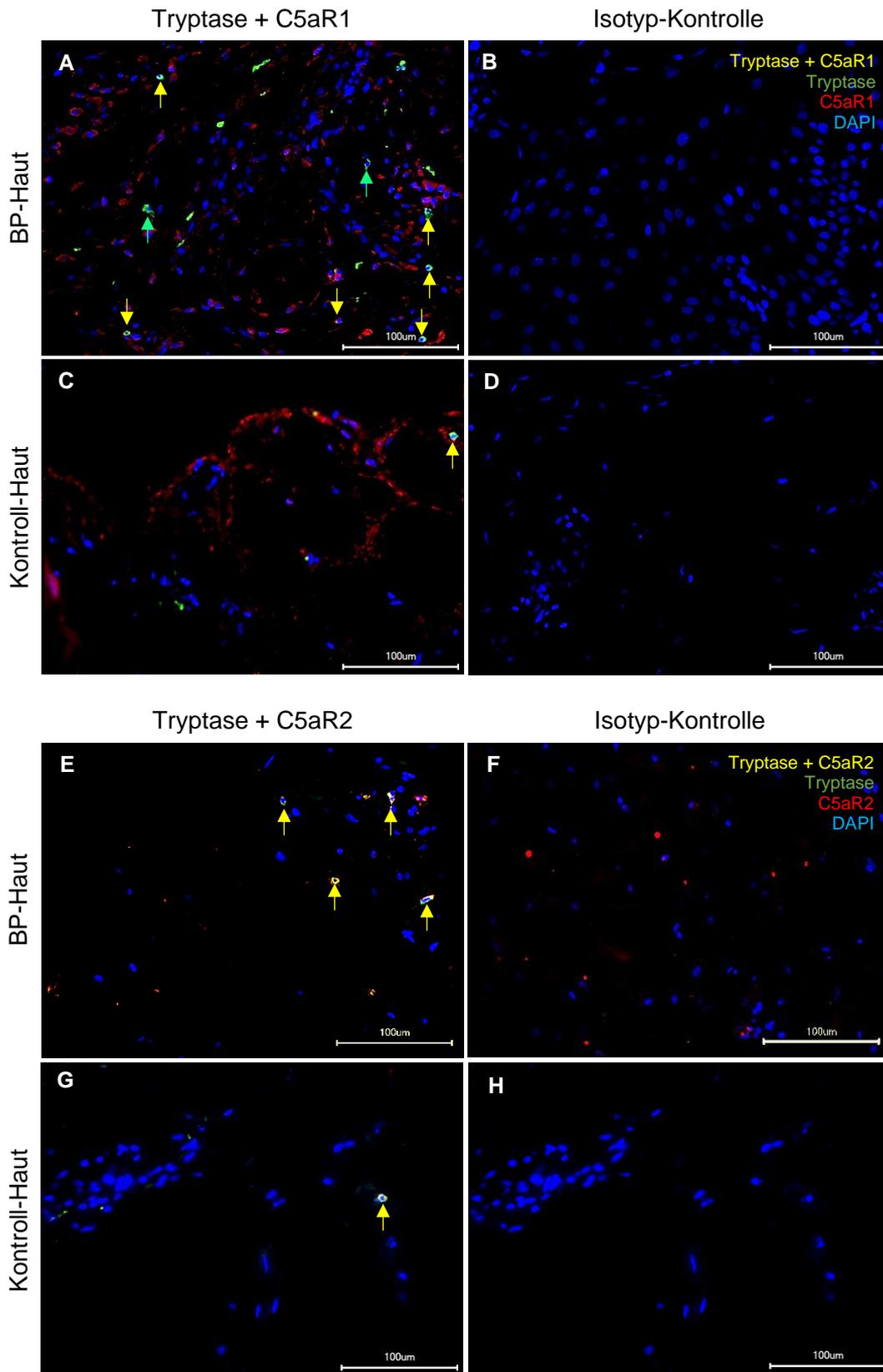


Abbildung 15: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und Tryptase. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung angefertigt. Die Messleiste hat eine Länge von 100 μm. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Doppelfärbungen. Der grüne Pfeil kennzeichnet Zellen ohne C5aR1-/C5aR2-Expression. **(A,B,E,F)** BP-Haut. **(A)** C5aR1 und Tryptase. **(B)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und Tryptase. **(E)** C5aR2 und Tryptase. **(F)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und Tryptase. **(C,D,G,H)** Kontroll-Haut. **(C)** C5aR1 und Tryptase. **(D)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und Tryptase. **(G)** C5aR2 und Tryptase. **(H)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und Tryptase.

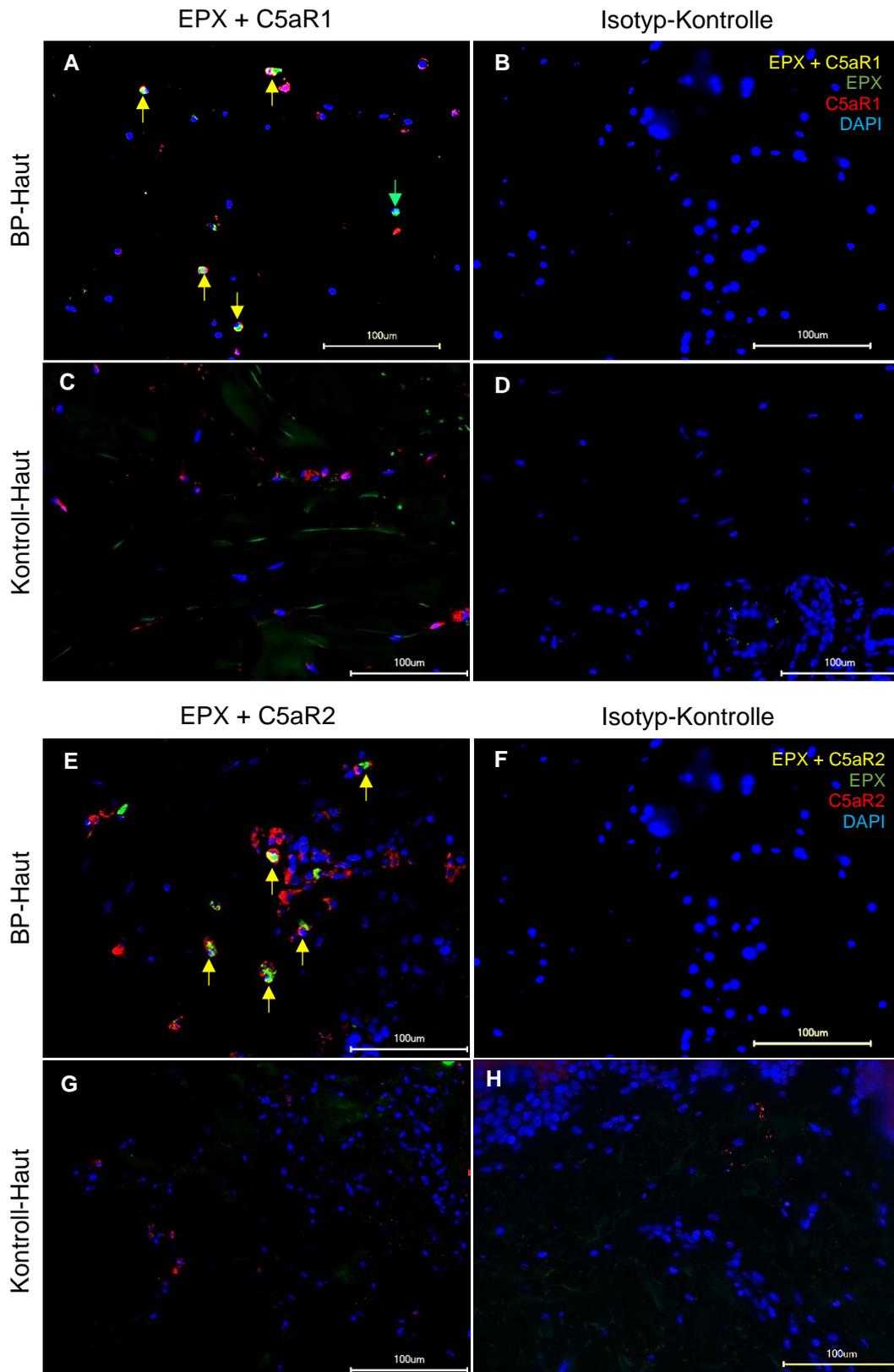


Abbildung 16: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und eosinophile Peroxidase (EPX). Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung angefertigt. Die Messleiste hat eine Länge von 100 μm. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Doppelfärbungen. Der grüne Pfeil kennzeichnet Zellen ohne C5aR1-/C5aR2-Expression. **(A,B,E,F)** BP-Haut. **(A)** C5aR1 und EPX. **(B)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und EPX. **(E)** C5aR2 und EPX. **(F)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und EPX. **(C,D,G,H)** Kontroll-Haut. **(C)** C5aR1 und EPX. **(D)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und EPX. **(G)** C5aR2 und EPX. **(H)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und EPX.

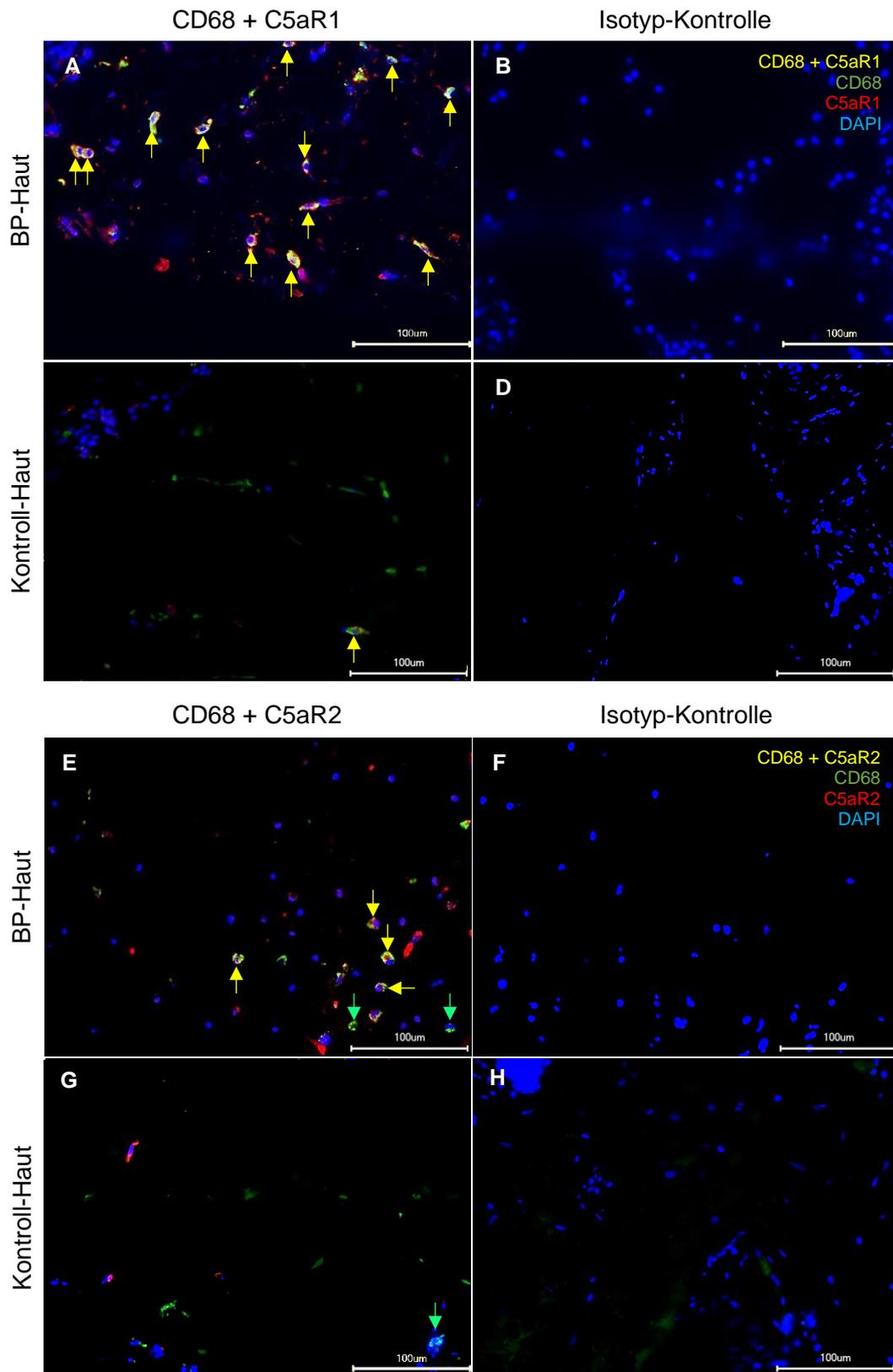


Abbildung 17: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und CD68. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung angefertigt. Die Messleiste hat eine Länge von 100 μm. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Doppelfärbungen. Der grüne Pfeil kennzeichnet Zellen ohne C5aR1-/C5aR2-Expression. **(A,B,E,F)** BP-Haut. **(A)** C5aR1 und CD68. **(B)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und CD68. **(E)** C5aR2 und CD68. **(F)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und CD68. **(C,D,G,H)** Kontroll-Haut. **(C)** C5aR1 und CD68. **(D)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und CD68. **(G)** C5aR2 und CD68. **(H)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und CD68.

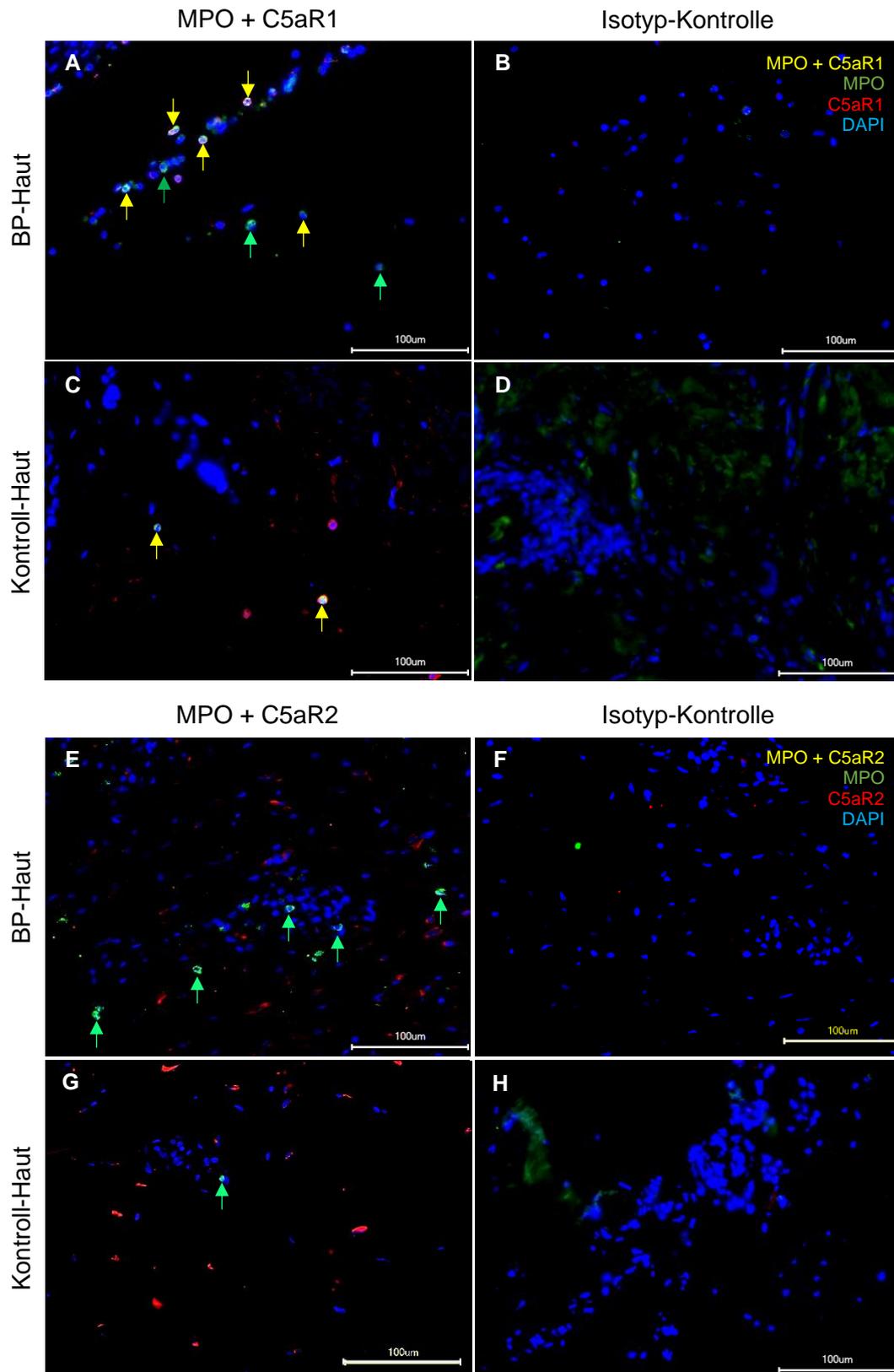


Abbildung 18: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und Myeloperoxidase (MPO). Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung angefertigt. Die Messleiste hat eine Länge von 100 μm. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Doppelfärbungen. Der grüne Pfeil kennzeichnet Zellen ohne C5aR1-/C5aR2-Expression. **(A,B,E,F)** BP-Haut. **(A)** C5aR1 und MPO. **(B)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und MPO. **(E)** C5aR2 und MPO. **(F)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und MPO. **(C,D,G,H)** Kontroll-Haut. **(C)** C5aR1 und MPO. **(D)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und MPO. **(G)** C5aR2 und MPO. **(H)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und MPO.

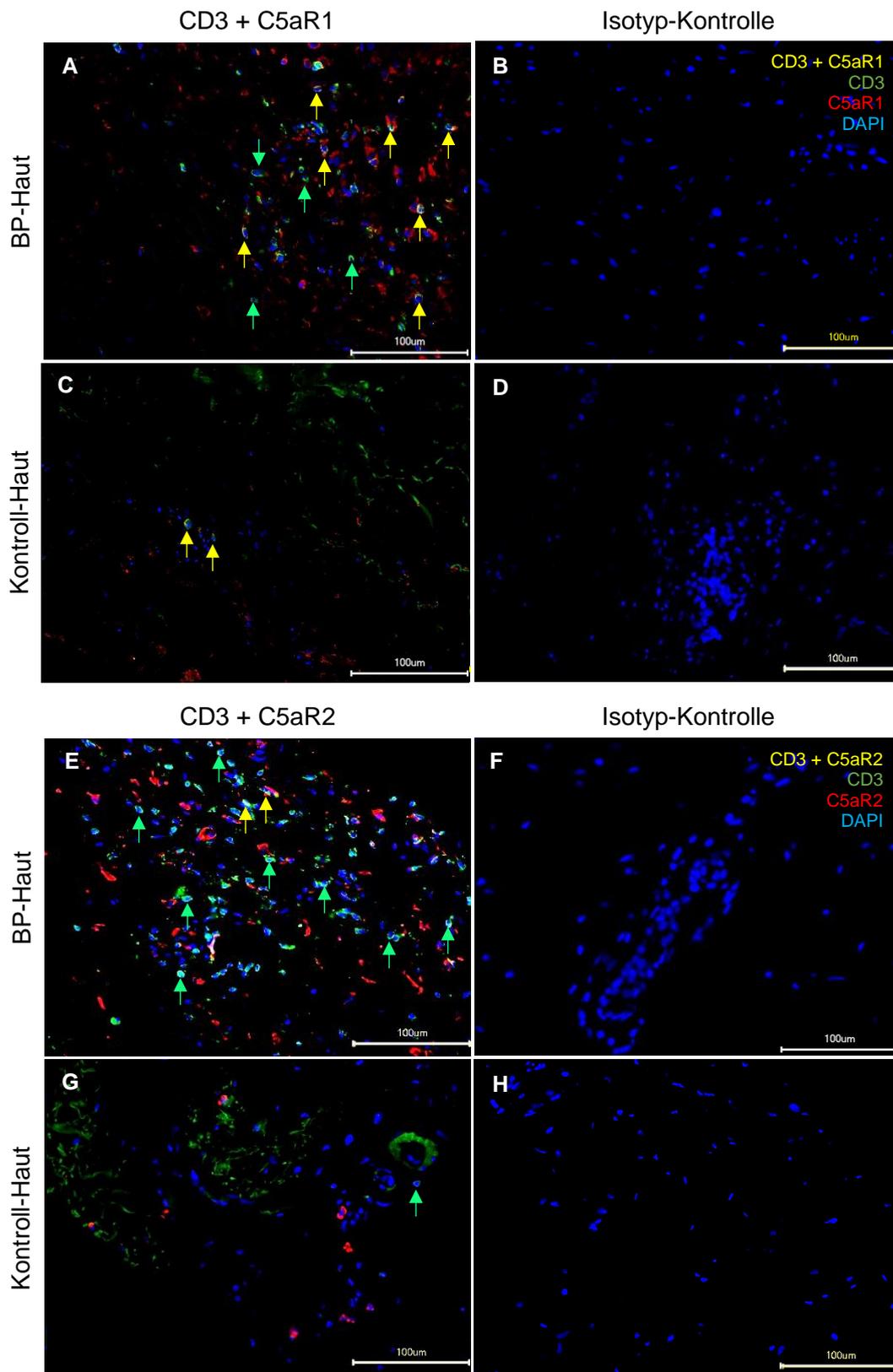


Abbildung 19: Immunhistochemie von C5aR1/C5aR2 und CD3. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung angefertigt. Die Messleiste hat eine Länge von 100 μm. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Doppelfärbungen. Der grüne Pfeil kennzeichnet Zellen ohne C5aR1-/C5aR2-Expression. **(A,B,E,F)** BP-Haut. **(A)** C5aR1 und CD3. **(B)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und CD3. **(E)** C5aR2 und CD3. **(F)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und CD3. **(C,D,G,H)** Kontroll-Haut. **(C)** C5aR1 und CD3. **(D)** Isotyp-Kontrolle für C5aR1 und CD3. **(G)** C5aR2 und CD3. **(H)** Isotyp-Kontrolle für C5aR2 und CD3.

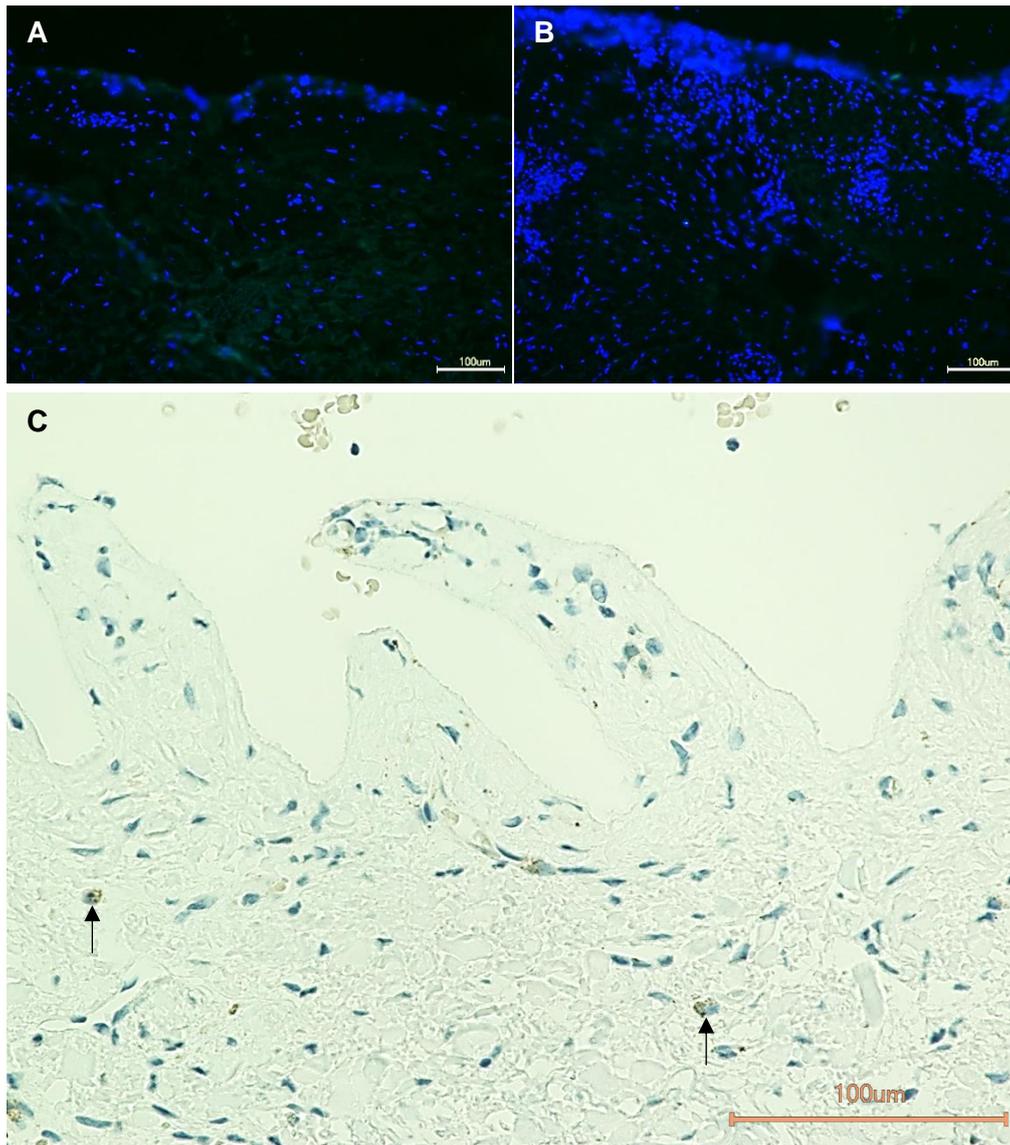


Abbildung 20: NK-Zellen in frühen BP-Läsionen. Die Aufnahmen sind in 200facher Vergrößerung und die Messleiste hat eine Länge von 100 μm . **(A)** Immunhistochemie mit NCAM Antikörper (Klon 123C3). **(B)** Immunhistochemie mit NCAM Antikörper (Klon: ERIC1). **(A,B)** Als Antigen Retrieval wurde hier, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, der vom Hersteller empfohlene Citratpuffer verwendet. Die immunhistochemischen Bilder mit Verwendung von Proteinase K und Pepsin beim Antigen Retrieval sind mit diesen Bildern vergleichbar und daher nicht aufgeführt. **(C)** Nachweis von Eosinophilen mittels chromogenen Marker (Pfeil).

4.4 T-Zellen sind die häufigsten Leukozyten in periläsionalen Hautläsionen von BP-Patienten

Untersuchung der quantitativen Verteilung der Zellen und der C5aR1-Expression

Bei der Zählung waren T-Zellen anzahlmäßig unter den Leukozyten am meisten vertreten (n=484) (**Abbildung 21A**), bei denen in etwa der Hälfte der Fälle (47,1%)* eine C5aR1-Expression vorlag. Am wenigsten wurden in BP-Haut Mastzellen (n=128) gezählt, bei denen auch die geringste Anzahl an Zellen mit einer C5aR1-Expression anzutreffen war (20,3%)*. Neutrophile (n=179) waren dicht gefolgt von Eosinophilen (n=177) am zweithäufigsten vertreten. Die Anzahl der C5aR1-exprimierenden Zellen war untereinander vergleichbar (MPO=39,7%, EPX=42,4%)*. Die Anzahl der Makrophagen (n=156) lag zwischen den Eosinophilen und Mastzellen. Makrophagen gehörte jedoch nach T-Zellen zu den Leukozyten, bei denen sich am meisten Zellen mit einer C5aR1-Expression (76,9%)* nachweisen ließen.

Sah man sich die Gesamtzahl der Leukozyten in der Haut von Kontroll-Patienten (**Abbildung 21C**) an, fiel auf, dass diese deutlich geringer war als in der Haut von BP-Patienten, die Anzahl C5aR1-exprimierender Zellen jedoch reichlich vertreten war. Die häufigste Zellart waren Mastzellen (n=62), die, im Gegensatz zu Mastzellen in BP-Haut, einen hohen Anteil C5aR1-exprimierender Zellen aufwiesen (66,1%)*. Die nächstgrößte Zellpopulation waren T-Zellen (n=42). Hier war der Anteil der C5aR1-Expression (64,3%)* bei T-Zellen größer als in BP-Haut, jedoch auch nahe der Hälfte. Danach folgten Neutrophile (n=23) und Makrophagen (n=22) mit einer vergleichbaren Anzahl. Bei Makrophagen (72,7%)* und Neutrophilen (60,9%)* wurden überwiegend Zellen mit einer C5aR1-Expression gezählt. Eosinophile (n=2) waren in der Haut von Kontroll-Patienten nahezu gar nicht anzutreffen.

4.4.1 T-Zellen haben die größte C5aR1-Expression in periläsionalen Hautläsionen von BP- Patienten

T-Zellen hatten mit 43,8% den größten Anteil an der C5aR1-Expression in BP-Haut, gefolgt von Makrophagen mit 23,2% (**Abbildung 21B**). Eosinophile (14,4%) und Neutrophile (13,6%) gehörten nicht zu den Hauptvertretern der C5aR1-Expression. Mastzellen hatten mit 5,0% den geringsten Anteil. So waren T-Zellen in BP-Haut, von der C5aR1-Expression und von der Anzahl her, die am meisten vertretenden Leukozyten, während Makrophagen

* Die Prozentangaben geben den Anteil an, bei wie viel Zellen innerhalb einer Leukozytenspezies (z.B. Mastzellen) eine C5aR1-/C5aR2-Expression gezählt wurde.

anzahlmäßig ungefähr auf einer Höhe mit Neutrophilen und Eosinophilen waren **(Abbildung 21A)**.

In der Haut der Kontroll-Patienten waren T-Zellen mit 27,0% am zweitmeisten an der C5aR1-Expression beteiligt **(Abbildung 21D)**. Mastzellen stellten bei den Kontroll-Patienten die Quelle mit der größten C5aR1-Expression (41,0%) dar, während diese bei den BP-Patienten den geringsten Anteil hatten. Damit waren Mastzellen bei den Kontroll-Patienten die Leukozyten mit der höchsten Anzahl und C5aR1-Expression. Makrophagen (16,0%) und Neutrophile (14,0%) waren an der C5aR1-Expression mit ähnlichen Anteilen, nach Eosinophilen, die mit 2,0% einen kaum zu berücksichtigen Anteil besaßen, am wenigsten beteiligt.

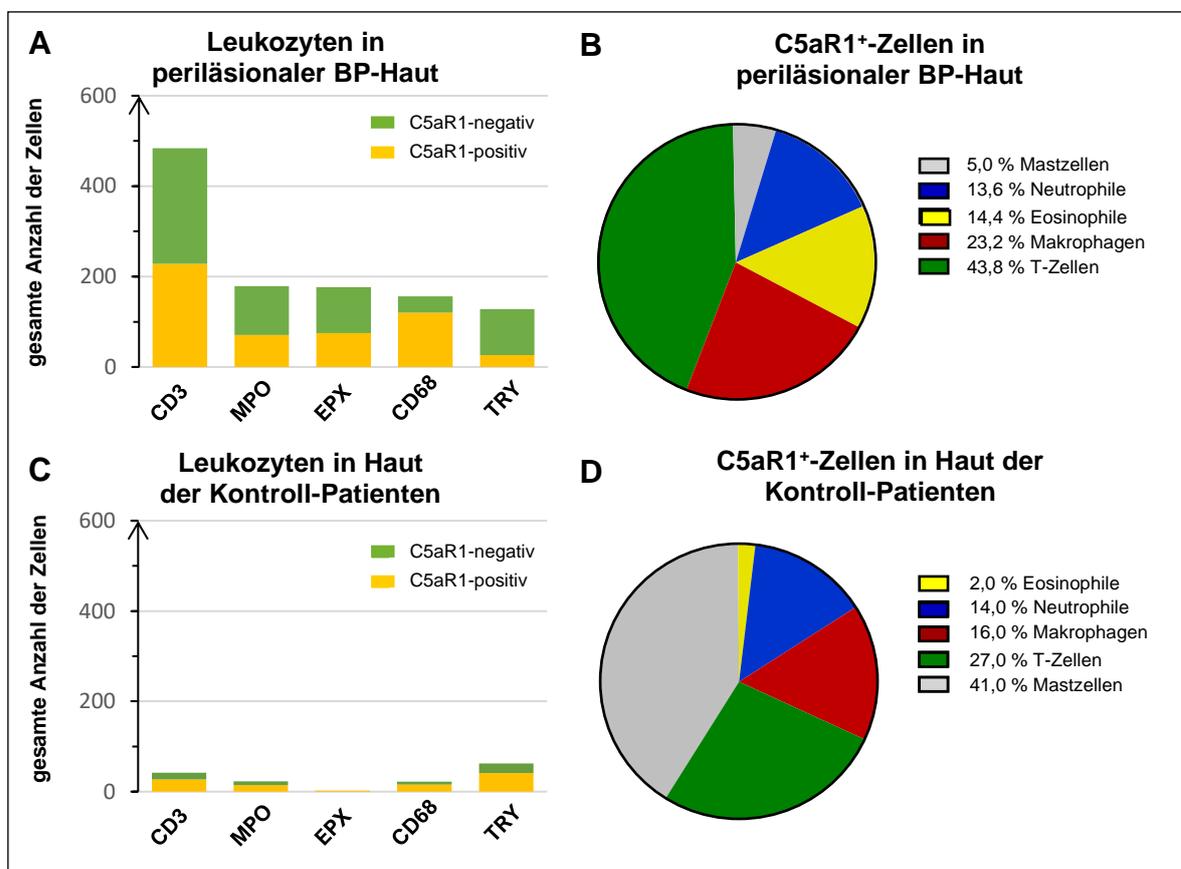


Abbildung 21: Anzahl von Leukozyten und C5aR1-Expression in Haut von BP- und Kontroll-Patienten. Die gezählten Leukozyten in der Haut der BP-Patienten **(A)** und Kontroll-Patienten **(B)** sind als Säulendiagramm dargestellt. Die Säulen sind unterteilt in Einzelfärbung (grün) und Doppelfärbung (gelb). Leukozyten ohne C5aR1-Expression zeigten eine Einzelfärbung mit dem jeweiligen Marker für die Leukozytenart. Leukozyten mit einer Doppelfärbung exprimierten zusätzlich C5aR1. Dem gegenüber ist der Anteil der Leukozyten an der C5aR1-Expression in der Haut der BP-Patienten **(C)** und Kontroll-Patienten **(D)** in Form eines Kreisdiagramms dargestellt. Abkürzungen: CD3= T-Zellen, CD68= Makrophagen, EPX= Eosinophile, MPO= Neutrophile, TRY= Mastzellen.

4.4.2 Die C5aR2-Expression unterscheidet sich von der C5aR1-Expression in frühen BP-Läsionen

Die Gesamtzahl der verschiedenen Leukozytenpopulationen bei der Analyse der C5aR2-Expression in BP-Haut entspricht erwartungsgemäß den Zahlen der C5aR1-Untersuchung (Kapitel 4.3) (**Abbildung 22A**). Bei den Färbungen zur C5aR2-Expression waren T-Zellen mengenmäßig am meisten vertreten (n=456), zeigten jedoch unter den untersuchten Leukozyten die geringste C5aR2-Expression (2,0%)*. Genauso waren auch Mastzellen von der Anzahl her am wenigsten nachzuweisen (n=137). Fast alle Mastzellen exprimierten C5aR2 (94,9%). Neutrophile waren wie in der C5aR1-Zählung die zweithäufigsten Leukozyten (n=195). Die nächsthäufigste Zellart waren ebenfalls Eosinophile (n=171) gefolgt von Makrophagen (n=155). Eosinophile waren nach Mastzellen die Leukozyten mit der häufigsten C5aR2-Expression (65,5%)*. Neutrophile mit einer C5aR2-Expression traten deutlich weniger (19,0%)* auf. Neutrophile und Makrophagen (26,5%)* gehörten neben T-Zellen zu den Zellen, bei denen am wenigsten Zellen mit einer C5aR2-Expression beobachtet wurden.

In der Haut der Kontroll-Patienten wurden wie erwartet bei der C5aR2-Expressionsanalyse ähnliche Zahlen an Leukozyten wie bei der C5aR1-Expressionanalyse gezählt. Mastzellen stellten auch hier die am meist vertretenden Leukozyten dar (n=60). Auffallend war, dass der Anteil an der C5aR2-Expression unter den untersuchten Leukozyten nahezu ausschließlich durch Mastzellen vertreten wurde (98,3%)*. Bei T-Zellen, welche die zweitmeiste Zellart darstellten (n=43), waren keine Zellen mit C5aR2-Expression nachzuweisen. In BP-Haut war es ein sehr geringer Anteil. Neutrophile (n=22) und Makrophagen (n=18) hielten sich von der Anzahl her, wie bei der C5aR1-Untersuchung, die Waage. C5aR2-exprimierende Makrophagen (16,7%)* und Neutrophile (9,1%)* waren selten anzutreffen. Eosinophile Granulozyten waren wie in der C5aR1-Untersuchung in der Haut der Kontroll-Patienten nahezu gar nicht nachweisbar.

4.4.3 Mastzellen sind die Leukozyten mit der höchsten C5aR2-Expression in periläsionaler Haut der BP-Patienten

Die größte C5aR2-Expression in der Haut von BP-Patienten fanden sich bei Mastzellen mit einem Anteil von 38,2%, gefolgt von eosinophilen Granulozyten mit 33,0% (**Abbildung 22B**). Einen geringeren Anteil besaßen Makrophagen (15,3%), gefolgt von Neutrophilen (10,6%) und T-Zellen mit dem geringsten Anteil von 2,6%. Vergleicht man die Zahlen mit

* Die Prozentangaben geben den Anteil an, bei wie viel Zellen innerhalb einer Leukozytenspezies (z.B. Mastzellen) eine C5aR1-/C5aR2-Expression gezählt wurde.

denen der C5aR1-Expression mit **Abbildung 22A**, erkennt man, dass T-Zellen, die höchste C5aR1-Expression jedoch bei geringster C5aR1-Expression aufwiesen. Dahingegen zeigten Mastzellen, die von der Anzahl am wenigsten vorkamen, die höchste C5aR2-Expression.

In der Haut der Kontroll-Patienten war die größte C5aR2-Expression ebenfalls bei Mastzellen (90,8%) festzustellen (**Abbildung 22D**). Diese war deutlich größer als bei den BP-Patienten. Danach folgten mit ähnlich geringen Anteilen Makrophagen (4,6%), Neutrophile (3,1%) und Eosinophile mit einem sehr geringen Anteil von 1,5%. Bei T-Zellen war keine C5aR2-Expression festzustellen.

Vergleicht man die Ergebnisse von BP-Patienten und Kontroll-Patienten, haben Mastzellen bei beiden Gruppen den größten Anteil an der C5aR2-Expression. Ein großer Unterschied besteht bei den Eosinophilen. Eosinophile besaßen bei BP-Patienten den zweitgrößten Anteil an der C5aR1-Expression, während diese mit 1,5% bei den Kontroll-Patienten nahezu gar nicht an der Expression beteiligt waren.

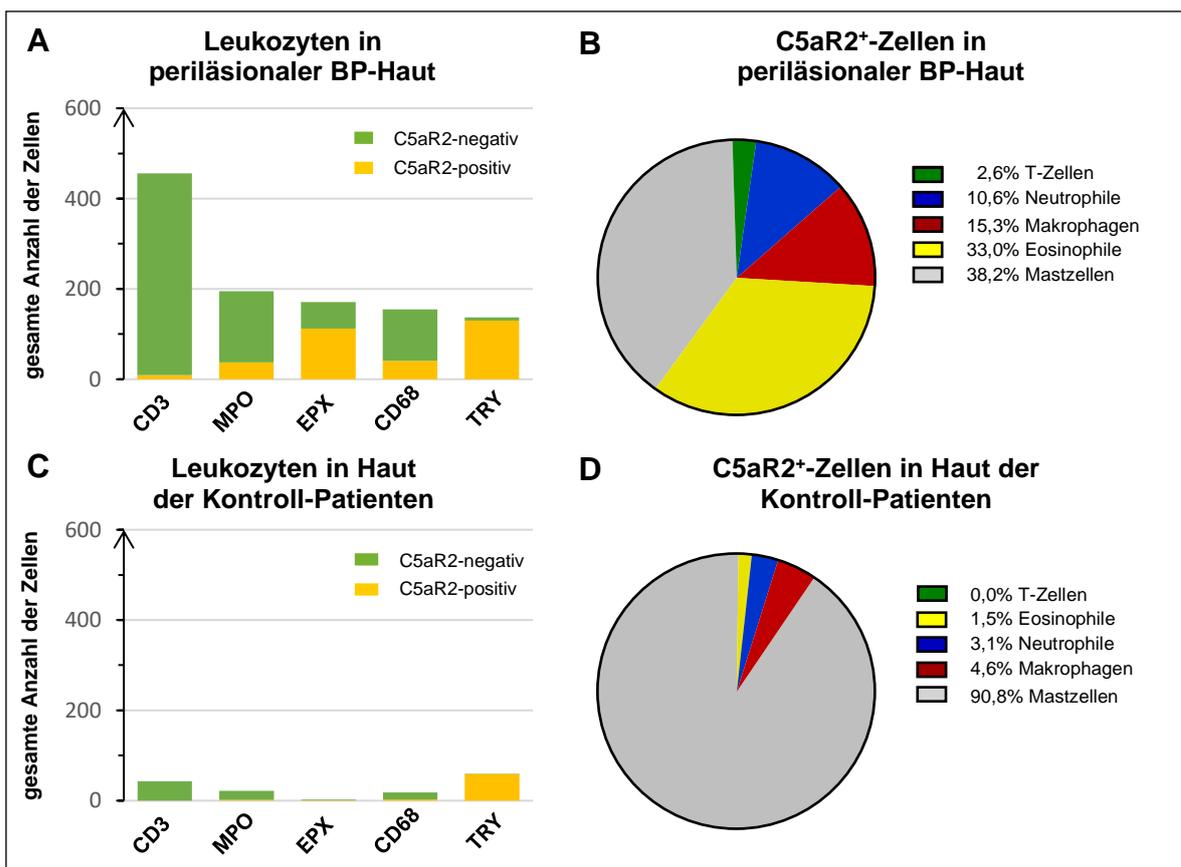


Abbildung 22: Anzahl von Leukozyten und C5aR2-Expression in Haut von BP- und Kontroll-Patienten. In der folgenden Tabelle sind die gezählten Leukozyten mit C5aR2 in der Haut der BP-Patienten (**A**) und Kontroll-Patienten (**B**) als Säulendiagramm dargestellt. Die Säulen sind unterteilt in Einzelfärbung (grün) und Doppelfärbung (gelb). Leukozyten ohne C5aR2-Expression zeigten eine Einzelfärbung mit dem jeweiligen Marker für die Leukozytenart. Leukozyten mit einer Doppelfärbung exprimierten zusätzlich C5aR2. Dem gegenüber ist der Anteil der Leukozyten an der C5aR2-Expression in der Haut der BP-Patienten (**C**) und Kontroll-Patienten (**D**) in Form eines Kreisdiagramms dargestellt. Abkürzungen: CD3= T-Zellen, CD68= Makrophagen, EPX= Eosinophile, MPO= Neutrophile, TRY= Mastzellen.

4.4.4 Eosinophile, Mastzellen und T-Zellen weisen die höchste Expression von C5aR in periläsionaler Haut der BP-Patienten auf

Nachdem die C5aR1- und C5aR2-Expression auf Leukozyten getrennt voneinander untersucht wurden war, wurde nun ermittelt, welcher Leukozyt bei der Expression von C5aR1 und C5aR2 gemeinsam am meisten beteiligt war. Diese Expression wird als C5aR⁺ gekennzeichnet (**Abbildung 23**). In der Haut der BP-Patienten waren mit ähnlichen Anteilen Eosinophile (24,2%), T-Zellen (23,3%) und Mastzellen (22,4%) am meisten (**Abbildung 23A**) an der C5aR⁺-Expression beteiligt, gefolgt von Makrophagen (17,8%). Neutrophile Granulozyten hatten mit 12,4% den geringsten Anteil an der C5aR⁺-Expression. Damit lässt sich keine eindeutige Zelle mit der höchsten C5aR⁺-Expression isolieren. In der Haut der Kontroll-Patienten gehörten Mastzellen zu den Zellen mit der höchsten C5aR⁺-Expression (65,9%) (**Abbildung 23B**). Danach folgten mit geringeren Anteilen T-Zellen (13,5%), Makrophagen (10,3%) und Neutrophile (8,5%). Eosinophile, die von der Anzahl her in der Haut der Kontroll-Patienten kaum vertreten waren, wiesen den geringsten Anteil auf (1,8%). Damit sind Mastzellen bei den Kontroll-Patienten deutlich die Zellen mit der größten C5aR⁺-Expression. In BP-Haut war die C5aR⁺-Expression der Mastzellen mit der C5aR⁺-Expression der Eosinophilen und T-Zellen vergleichbar.

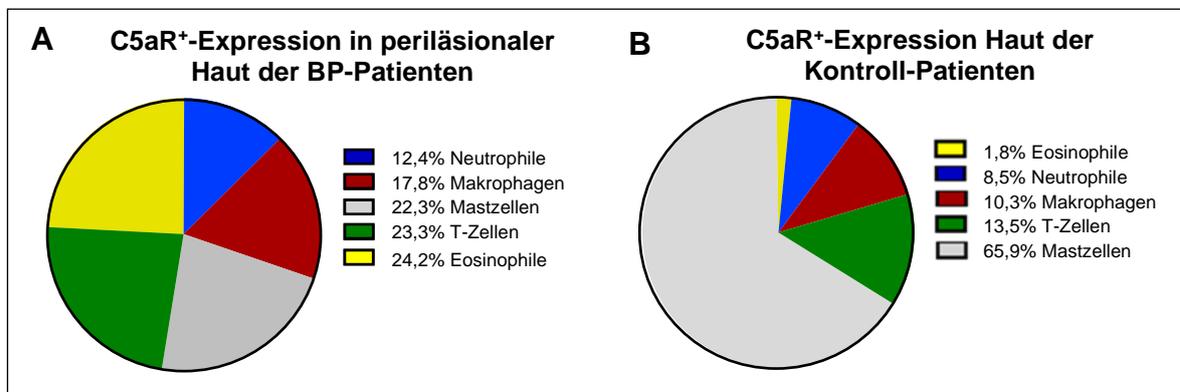


Abbildung 23: C5aR⁺-Expression. In dem Kreisdiagramm ist dargestellt, wie groß der prozentuale Anteil an der allgemeinen C5aR⁺(C5aR1 und C5aR2)-Expression auf Zellen in periläsionaler Haut der BP-Patienten (**A**) und Kontroll-Patienten (**B**) ist.

5 Diskussion

Diese Dissertation befasst sich mit der Untersuchung der C5aR1- und C5aR2-Expression auf verschiedenen Leukozyten in frühen Hautveränderungen von Patienten mit bullösem Pemphigoid (BP). In der vorliegenden Arbeit soll durch immunhistochemische Untersuchung der C5aR1- und C5aR2-Expression die Zellen in frühen Hautveränderungen identifiziert werden, welche die höchste Expression von C5aR1 und/oder C5aR2 besitzen. Dazu wurden periläsionale Hautbiopsien verwendet. Hierbei handelt es sich um Biopsien, die sich in unmittelbarer Nähe zur Blase befinden und noch keine Blasenbildung aufweisen, das der Histologie des frühen Stadiums des BP entspricht. Hierdurch werden wichtige Information gesammelt, die helfen können, neue und gezielte Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Dazu wurden T-Zellen, Eosinophile, Neutrophile, Mastzellen, Makrophagen und NK-Zellen auf eine Expression von C5aR1 und C5aR2 untersucht. Diese Arbeit soll einen Überblick über die Expression von C5aR1 und C5aR2 beim BP beim Menschen verschaffen. Dazu wurden periläsionale Hautproben von neun BP-Patienten untersucht. Als periläsionale Hautproben werden Proben bezeichnet, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer makroskopisch sichtbaren Blase liegen, aber selbst keine Blasenbildung aufweisen. Es ist somit anzunehmen, dass hier eine Entzündungsreaktion vorliegt, die unmittelbar zu einer Blasenbildung führen wird. Somit repräsentieren periläsionale Biopsien „frühe“ Hautläsionen im Gegensatz zu läsional entnommenen Biopsien, die eine vollentwickelte Blase zeigen. Es handelte sich hier um eine explorative und deskriptive Untersuchung, die als Grundlage für Folgeuntersuchungen von C5aR bei der Pathogenese des BP dienen könnte.

Um die C5aR1- und C5aR2-Expression auf Leukozyten zu analysieren, musste im Rahmen der Immunhistochemie eine Doppelfärbung durchgeführt werden, bei der mittels Antikörper die jeweiligen Zellpopulationen markiert wurden, bei denen eine C5aR1- oder C5aR2-Expression vorlag. Dies wurde durch bestimmte Antikörper ermöglicht, die an für die Zellart spezifische Strukturen banden. Der erste Teil dieser Arbeit basierte daher darauf, geeignete Antikörper und Methoden zu finden, die diese Zellen identifizieren und zugleich die Detektion einer C5aR1- oder C5aR2-Expression erlaubten. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD3 (T-Zellen), Tryptase (Mastzellen), CD68 (Makrophagen), Myeloperoxidase (Neutrophile), eosinophile Peroxidase (Eosinophile) und Neuronales Zelladhäsionsmolekül 1 (NK-Zellen) markiert. Bis auf NK-Zellen konnten Protokolle für Doppelfärbungen für alle erforderlichen Leukozyten etabliert werden und die Zellen auf das Expressionsverhalten von C5aR1 und C5aR2 untersucht werden. Die Resultate sind im Folgenden beschrieben und mit Beobachtungen aus anderen Arbeiten verglichen und diskutiert. Dabei wird auf das Auftreten der Leukozyten beim BP und auf das

Expressionsverhalten von C5aR1 und C5aR2 eingegangen. Im nachfolgenden Teil werden die wichtigsten Zellen mit einer C5aR1/C5aR2-Expression erörtert. Wie in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt, wurden in der Haut von Kontrollpatienten praktisch keine Entzündungszellen und damit auch praktisch keine Expression von C5aR1 und C5aR2 festgestellt.

Die immunhistochemische Färbung mit dem in dieser Arbeit verwendeten C5aR1-Antikörper wurde in unserem Labor bereits etabliert, sodass die Bindungsspezifität des C5aR1-Antikörpers nicht mehr überprüft werden musste. Die Immunfluoreszenz mit einem C5aR2-Antikörper war zuvor noch nicht durchgeführt worden, sodass ein neuer geeigneter Antikörper zur Markierung des C5aR2 gefunden werden musste. Um die Expression von C5aR2 auf Leukozyten zu untersuchen, musste zunächst überprüft werden, ob der verwendete C5aR2-Antikörper sein Epitop spezifisch bindet, damit die Ergebnisse nicht durch Bindung an andere Proteine in der Haut verfälscht wurden. Dazu wurde durch Kenntnis der Aminosäurefrequenz des Epitops das Peptid hergestellt. Dieses Peptid wurde in steigender Konzentration mit dem Antikörper inkubiert und anschließend auf das Hautpräparat gegeben. War die Peptidkonzentration erreicht, wo alle Antikörper eine Bindung mit ihrem Peptid eingegangen waren, stand kein Antikörper mehr zur Verfügung, um an im Hautpräparat exprimierte C5aR2 zu binden. Erwartungsgemäß war das Immunfluoreszenzsignal im Hautpräparat umso geringer, je höher die Peptidkonzentration war. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass der verwendete Antikörper spezifisch das gesuchte Peptid bindet und damit ebenfalls diese Aminosäurefrequenz von C5aR2 im Hautpräparat erkennt.

In verschiedenen Arbeiten wurde die intrazelluläre Expression von C5aR1 in humanen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen beschrieben (Arbore et al. 2016; Arbore et al. 2018; West et al. 2020). Die Aktivierung intrazellulärer C5aR1-Rezeptoren in menschlichen CD4⁺-T-Zellen stimulierte die Bildung von intrazellulären NLRP3-Inflammasomen, das zu einer Freisetzung von T_H1-Zytokinen wie IFN- γ führte. Inflammasomen sind an der Bildung proinflammatorischer Zytokine beteiligt (Arbore et al. 2018). Im Mausmodell zur Untersuchung der Psoriasis war durch eine Blockade von C5aR1 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Reduktion der IL-17-Produktion bewirkt worden, das zu einem Rückgang der Krankheitsaktivität führte. Die IL-23/IL-17-Achse spielt bei der Psoriasis eine entscheidende Rolle (Zheng et al. 2020). C5aR1 förderte bei Mäusen die Sekretion von Zytokinen wie IL-2, das auf Lymphozyten stimulierend wirkt, und des T_H1-Zytokins IFN- γ , welches die zelluläre Immunantwort stärkt (Strainic et al. 2008; Arbore et al. 2016). Daraus lässt sich eine proinflammatorische Funktion von C5aR1 bei T-Zellen ableiten. In der vorliegenden Arbeit konnte bei T-Zellen eine C5aR1-Expression in periläsionaler BP-Haut und zu einem sehr viel geringeren Teil in der Haut der Kontroll-Patienten bestätigt werden.

Bei der C5aR2-Expression auf T-Zellen variieren die Studien (Laumonier et al. 2017). Bei Mäusen, die zur Untersuchung der C5aR2-Expression auf verschiedenen Geweben entwickelt wurden und mit humanen Mustern vergleichbar waren, konnte keine C5aR2-Expression bei T-Zellen festgestellt werden (Karsten et al. 2017). Dies kann auf die schwächere C5aR2-Expression auf T-Zellen zurückzuführen sein (Li et al. 2019). Weiterhin konnte bei Mäusen eine C5aR2-Expression nur bei Aktivierung der T-Zellen beobachtet werden. Bei humanen T-Zellen wurde jedoch eine C5aR2-Expression sowohl bei ruhenden als auch bei aktivierten T-Zellen nachgewiesen (West et al. 2020). C5aR2 war sowohl intra- als auch extrazellulär auf humanen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen wurden (Arbore et al. 2016; Arbore et al. 2018; West et al. 2020). Extrazellulär exprimiertes C5aR2 übte eine negative Kontrolle auf die oben beschriebene IFN- γ -Produktion in Inflammasomen aus, möglicherweise durch Unterdrückung der intrazellulären C5aR1-Signale (Arbore et al. 2018). C5aR2 stellt demnach bei T-Zellen einen antiinflammatorischen Rezeptor dar. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine C5aR2-Expression in nur 2,0% der T-Zellen. Bei der vorliegenden hohen Anzahl an T-Zellen in der Haut der BP-Patienten bestand die Wahrscheinlichkeit, trotz der schwachen C5aR2-Expression vereinzelt T-Zellen mit C5aR2-Expression zu detektieren. Bei den Kontroll-Patienten war keine C5aR2-Expression detektierbar.

T-Zellen waren in dieser Arbeit in der Haut von BP-Patienten unter den Leukozyten mit Abstand am häufigsten gefunden wurden. Dagegen waren sie in der Haut der Kontroll-Patienten deutlich weniger nachzuweisen, jedoch nach Mastzellen die zweithäufigste Zellart. Dieser Befund ist mit vorhergehenden Untersuchungen vereinbar, wo T-Zellen in großer Zahl in BP-Läsionen gefunden wurden (Chakievska et al. 2019; Ernst et al. 2021). T-Lymphozyten-dominante Infiltrate wurden bei gut der Hälfte der BP-Patienten gefunden und wiesen eine erhöhte Krankheitsaktivität auf (Ständer et al. 2021). In einer anderen Arbeit waren mononukleäre Zellen in Läsionen von BP-Patienten zu einem hohen Prozentsatz nachweisbar (Michalaki et al. 1990). 60% des mononukleären Infiltrats beinhaltete CD3⁺-Zellen, während 25% Makrophagen waren (Ambach et al. 1992). Auch in der aktuellen Arbeit war der Anteil der T-Zellen mit 75,1% gegenüber den Makrophagen mit 24,9 % deutlich höher und entspricht ungefähr den Daten aus der vorgestellten Studie. In der Tat waren T-Zellen bei dieser Arbeit mit Abstand die dominierende Zellart.

Der Nachweis von T-Zellen durch den in dieser Arbeit verwendeten CD3-Antikörper bot keine Unterscheidung zwischen den T-Zell Subpopulationen. T-Zellen differenzieren sich während ihrer Reifung im Thymus entweder in CD4⁺- oder in CD8⁺-T-Zellen (Xiong und Bosselut 2012). Die Haut von Patienten mit BP enthielt eine signifikant erhöhte Anzahl von CD4⁺-T-Lymphozyten als in normale Haut (Nestor et al. 1987). Aktivierte CD4⁺-T-Zellen waren in läsionalen und periläsionalen Hautläsionen von BP-Patienten beobachtet wurden

(Michalaki et al. 1990). CD4⁺-T-Zellen lassen sich in die Subpopulationen T_H1-, T_H2-, T_H9-, T_H17-, T_H22- und regulatorische T-Zellen unterteilen, die sich anhand ihrer Zytokine, die sie freisetzen, definieren (Murphy und Weaver 2018; Mousset et al. 2019). Bei BP-Patienten wurden autoreaktive T-Zellen nachgewiesen, die T_H1- und T_H2-Zytokine sezernierten, wohingegen gesunde Personen mit dem gleichen MHC-Haplotyp nur autoreaktive T-Zellen, die nur T_H1-Zytokine freisetzten, besaßen. T_H2-Zytokine scheinen daher für BP eine entscheidende Rolle zu spielen (Büdinge et al. 1998). Erhöhte Konzentrationen von IFN- γ , das zu den T_H1-Zytokinen gehört, sowie die T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-6 waren in den Läsionen von BP-Patienten nachgewiesen wurden (Ameglio et al. 1998; Didona et al. 2021). Bei BP-Patienten wurden erhöhte Serumkonzentrationen von T_H1- und T_H2-Zytokinen festgestellt, welche mit der Krankheitsaktivität korrelierten (Echigo et al. 2006). Neben T_H1 und T_H2 waren erhöhte Konzentrationen von T_H17-Zellen sowie IL-17, welches unter anderem durch T_H17-Zellen sezerniert wird, in Läsionen von BP-Patienten nachgewiesen wurden und scheinen an der Pathogenese vom BP beteiligt zu sein (Arakawa et al. 2011). IL-17A ist an der Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Inflammation beteiligt. Mäuse, die kein IL-17A besaßen, waren vor einer Krankheitsauslösung geschützt (Chakievskaja et al. 2019). Außerdem korrelierte die IL-17A Serumkonzentration mit der Krankheitsaktivität. CD4⁺-T-Zellen gehörten zu den Hauptproduzenten der IL-17A-Produktion im Serum. In den Läsionen wurde als Hauptquelle für die IL-17-Produktion CD3⁺-T-Zellen identifiziert, wobei hier nicht weiter zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterschieden wurde (Chakievskaja et al. 2019). Es ließ sich eine genetische Disposition bezüglich des IL-23-Rezeptors für die Entstehung des BP nachweisen. IL-23 regulierte die T_H17-Zell-Bildung sowie die Produktion von IL-17A. Eine Fehlregulierung in der T_H17/IL-23-Achse scheint durch Stimulierung der T_H17-Zellen an der Auslösung des BP beteiligt zu sein (Tabatabaei-Panah et al. 2020).

Aktuelle Studien konzentrieren sich auf die Anzahl von CD8⁺-T-Zellen beim BP. Die Aussagen hierzu sind widersprüchlich, da sowohl erhöhte Zahlen als auch erniedrigte Zahlen von CD8⁺-T-Zellen im Blut von BP-Patienten beobachtet wurden (Fang et al. 2020). In der Haut von BP-Patienten waren CD8⁺-T-Zellen selten anzutreffen und die Anzahl von $\gamma\delta$ -T-Zellen war reduziert (Ambach et al. 1992; Oswald et al. 2009). Im peripheren Blut von BP-Patienten war die Anzahl von CD8⁺-T-Zellen verringert (Jouen-Beades et al. 1998). Dagegen zeigten sich bei BP-Patienten in einer anderen Studie in der Durchflusszytometrie zu Beginn und am Ende einer Therapie mit Glukokortikoiden erhöhte Zahlen von CD8⁺- und erniedrigte von CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut, jedoch signifikante erhöhte Zahlen von CD8⁺-T-Zellen und CD4⁺-T-Zellen in der Immunhistologie. Demnach spielten erhöhte Zahlen von CD4⁺- und CD8⁺- Zellen in Verlauf der Erkrankung eine Rolle (Gambichler et al. 2017).

Die Anzahl von Forkhead-box-P3-(FOXP3⁺)-T_{reg} war in lässionaler Haut reduziert (Arakawa et al. 2011; Antiga et al. 2014). FOXP3⁺-T_{reg} sind potente Zellen der Selbsttoleranz in der Peripherie und damit bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen wie dem bullösem Pemphigoid von zentraler Bedeutung (Sakaguchi et al. 2010; Antiga et al. 2014; Genovese et al. 2019). Ein Mangel an T_{Reg} beim BP in Mäusen zeigte eine übermäßige Induktion von Blasenbildung. T_{Reg} scheinen das Migrationsverhalten von myeloischen Zellen wie Granulozyten zu verhindern, jedoch nicht die Freisetzung von reaktiver Sauerstoffspezies (Bieber et al. 2017b). Daneben wurden jedoch auch erhöhte Konzentrationen von T_{Reg} im Serum von BP-Patienten beschrieben und diesen eine pathologische Rolle zugeschrieben (Gambichler et al. 2017; Ujiie 2019). Die Rolle der T_{Reg} beim BP bleibt umstritten. Möglicherweise führt eine Funktionsstörung der T_{Reg} zu einer Bildung von Autoantikörpern (Ujiie 2019).

Aus den hier angeführten Erkenntnissen lässt sich vermuten, dass es sich bei den vorliegenden T-Zellen wahrscheinlich um CD4⁺-T-Zellen handelte. Bei den CD4⁺-T-Zellen sollte es sich demnach um T_{H1}-, T_{H2}- und/oder T_{H17}-Zellen handeln, das weitere Untersuchungen erfordert. Aber auch CD8⁺-Zellen oder T_{Reg} könnten in der Haut der BP-Patienten eine Rolle spielen und sollten aufgrund der kontroversen Beobachtungen untersucht werden.

Ambach et al. berichteten, dass etwa ein Viertel der Immunzellen in BP-Läsionen Makrophagen waren (Ambach et al. 1992). Bei der Sklerodermie, eine weitere Autoimmunerkrankung der Haut, scheinen Makrophagen durch die Freisetzung von Fibrose-induzierenden Zytokinen eine entscheidende Rolle zu spielen (Higashi-Kuwata et al. 2010). Beim BP führte die Mastzelldegranulation im Tiermodell zur Aktivierung sowie zur Rekrutierung von Makrophagen. Die mastzellabhängige Infiltration von Neutrophilen wurde durch Makrophagen verstärkt (Chen et al. 2001). Makrophagen polarisieren sich durch spezifische Mediatoren in einen inflammatorischen M1-Typ oder einen antiinflammatorischen M2-Typ (Mosser und Edwards 2008). In Läsionen von BP-Patienten wurde eine erhöhte Anzahl Makrophagen vom M2-Typ nachgewiesen (Furudate et al. 2014; Tanita et al. 2018). Die antiinflammatorische Funktion wurde im späteren Stadium der Erkrankung im Rahmen der Hautregeneration wirksam (Riani et al. 2019). In der aktiven Phase der Erkrankung konnten jedoch erhöhte Konzentrationen von IL-10, die durch M2-Typ-Makrophagen sezerniert werden, in Blasen von BP-Patienten nachgewiesen werden. IL-10 verstärkt die IgE-vermittelte Mastzelldegranulation, die wiederum für die Neutrophilen-Rekrutierung eine entscheidende Rolle spielt. Die IL-10 Konzentration in der Blasenflüssigkeit korrelierte mit der Krankheitsaktivität (Riani et al. 2019). Neben Neutrophilen sind M2-Typ-Makrophagen an der Produktion von Matrixmetalloproteinase-(MMP)-9 beteiligt, die eine Spaltung der DEJ ermöglicht (Huang 2018; Riani et al. 2019).

Neben IL-10 ließ sich Leukotrien B₄ bei hautansässige Makrophagen als Hauptquelle identifizieren, welches an der Infiltration von Neutrophilen beteiligt war (Sadik und Schmidt 2019).

Das oben erwähnte für BP typische T_H2-Zytokinprofil, insbesondere die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13, sind an der Bildung von Makrophagen vom M2-Typ beteiligt. Dieses führt zu einer positiven Rückkopplung, da Makrophagen vom M2-Typ scheinbar u.a. durch Freisetzung von Zytokin CCL18, dessen Serumkonzentration mit der Krankheitsaktivität bei BP-Patienten korrelierte, zu einer weiteren Rekrutierung von T_H2-Zellen und der Aufrechterhaltung des T_H2-Zytokinprofils beim BP sorgen (Furudate et al. 2014). Es war daher mit einem Auftreten von Makrophagen in der Haut der BP-Patienten zu rechnen. Die Makrophagen waren nach Mastzellen am wenigsten vertreten. Auch in der Haut der Kontroll-Patienten waren in geringer Anzahl Makrophagen nachzuweisen, die am ehesten hautansässige Makrophagen sind. Die Rekrutierung von Makrophagen infolge der Mastzelldegranulation und T_H2-Zytokine ist am deutlichen Anstieg der Anzahl von Makrophagen in der Haut der BP-Patienten gegenüber den Kontroll-Patienten zu erkennen. Auf von-kultivierten-humanen-Monozyten-abstammenden-Makrophagen wurde C5aR1 extrazellulär entdeckt, während C5aR2 hauptsächlich intrazellulär exprimiert war (Zhang et al. 2017; Li et al. 2019). Auf humanen Makrophagen konnte durch Aktivierung des C5aR2 die durch C5aR1 und C3aR vermittelte ERK-Signalisierung signifikant gedämpft und funktionell die proinflammatorische Zytokinproduktion herunterreguliert werden (Li et al. 2020). C5aR1 übt bei Makrophagen somit eine proinflammatorische Funktion aus während die vom C5aR2 antiinflammatorisch zu sein scheint. Sowohl eine gut sichtbare C5aR1- als auch eine C5aR2-Expression ließ sich auf Makrophagen in der Haut der BP- und Kontroll-Patienten beobachten.

Mastzellen gelangen nach ihrer Bildung im Knochenmark über einem kurzen Aufenthalt im Blut oder Lymphsystem in das Gewebe, in dem sie sich zu geweberesidenten Mastzellen entwickeln (Stone et al. 2010). Sie sind an allergischen Reaktionen beteiligt, bei denen es nach Bindung von IgE an den von Mastzellen exprimierten hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) zur Degranulation und Freisetzung vasoaktiver und proinflammatorischer Mediatoren wie Histamin, IL-6 oder IL-8 kommt (Theoharides und Kalogeromitros 2006). Eine erhöhte Anzahl von Mastzellen sowie eine vermehrt nachgewiesene Degranulation von Mastzellen gehört zu den frühesten Veränderungen in Läsionen von BP-Patienten (Fang et al. 2018a). Im Rahmen der Degranulation wurde bei Mäusen neben dem Hauptbestandteil der Granula der Mastzellen, der Tryptase (Stone et al. 2010), die in vitro u.a. die Akkumulation inflammatorischer Zellen fördert, außerdem die Maus-MC-Protease-4 freigesetzt, welche die MMP-9 aktiviert (Tchougounova et al. 2005). Ebenso war in Läsionen von BP-Patienten eine erhöhte Anzahl von Zytokinen, die bekannt dafür sind,

Mastzellen zu rekrutieren und zu aktivieren, wie IL-1, IL-2, IL-5, IL-6 oder IL-8, nachgewiesen wurden. Die Zytokin-Konzentration korrelierte mit der Konzentration von Tryptase (Fang et al. 2018a). Die Serumkonzentration der Anti-BP180 Antikörper, die wiederum mit der Krankheitsaktivität korrelierte, korrelierte mit der Serumkonzentration von Tryptase (Bieber et al. 2017a). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass eine erhöhte Konzentration von Tryptase in BP-Läsionen und im Serum, die wiederum auf eine Aktivierung von Mastzellen hindeutet, mit der Krankheitsaktivität korreliert (Fang et al. 2018a). Bei Mäusen, die entweder keine Mastzellen besaßen oder die Mastzell-Degranulation inhibiert wurden war, war eine Entwicklung eines BP nicht bzw. mit einer reduzierten Krankheitsaktivität beobachtet wurden (Chen et al. 2001).

Mastzellen scheinen bei der Pathogenese des BP eine bedeutende Rolle zu spielen und waren in dieser Arbeit in der Haut der BP-Patienten nachzuweisen, jedoch waren diese unter den Leukozyten am wenigsten vertreten. In der Haut der Kontroll-Patienten waren Mastzellen am häufigsten anzutreffen. Hier handelt es sich am ehesten um hautansässige und nicht aktivierte Mastzellen.

C5aR1 war minimal auf der Zelloberfläche von Mastzellen exprimiert und wurde in intrazellulären Kompartimenten von humanen Mastzellen nachgewiesen (Jensen et al. 2014; Pundir et al. 2015). Verschiedene Mastzellen exprimieren C5aR1 unterschiedlich. Während Hautmastzellen C5aR1 exprimierten, fehlten Lungen- und Darmmastzellen C5aR1 (Pundir et al. 2015). Eine Interaktion von C5a mit auf Mastzellen exprimierten C5aR1 führte zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 oder IL-6 (Marshall 2004). C5aR2 wurde in kultivierten menschlichen Mastzelllinien sowohl extra- als auch intrazellulär entdeckt. Hier konnte nach Gabe von C5a eine verstärkte Adhäsion, Migration sowie eine erhöhte proinflammatorische Zytokin- und Chemokinproduktion nachgewiesen werden. Die C5aR2-Expression wurde durch IL-4 verstärkt, welches ein T_H2-Zytokin darstellt, die beim BP eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Pundir et al. 2015). C5aR2 scheint demnach eine proinflammatorische Funktion bei Mastzellen auszuüben. Neben C5a waren auch C5a des-Arg sowie C3a des-Arg in der Lage, Mastzellen über C5aR2 zu aktivieren (Pundir et al. 2015).

Tierexperimentelle Daten weisen darauf hin, dass die Krankheitsprogression beim BP maßgeblich durch C5a über C5aR1 auf Mastzellen gesteuert wird. C5aR1^{-/-} Mäuse waren nicht in der Lage, eine Mastzelldegranulation zu ermöglichen. Dadurch war eine Rekrutierung von Neutrophilen und Eosinophilen und eine daraus resultierende Blasenbildung verhindert (Heimbach et al. 2011; Edwards et al. 2019). Weiterhin konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass es nach Gabe von C5a über C5aR1 zu einer Aktivierung der p38-MAPK kam, welche zu einer Degranulation mit darauffolgender

Blasenbildung führte. Ein erhöhter Spiegel der p-38-MAPK-Aktivierung lag in Läsionen von BP-Patienten vor (Heimbach et al. 2011).

Eine Expression von C5aR1 und C5aR2 war auf Mastzellen daher zu erwarten und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Es ist daraufhinzuweisen, dass C5aR2 bei menschlichen Mastzellen die Produktion proinflammatorischer Mediatoren förderte und nicht wie in anderen Beobachtungen ein krankheitshemmender Effekt von C5aR2 ausgeht (Laumonier et al. 2017). C5aR1 und C5aR2 zeigen bei Mastzellen demnach eine proinflammatorische Funktion.

Eosinophile Granulozyten sind in der Haut bei allergischen oder parasitären Erkrankungen charakteristisch und zeigen eine wachsenden Evidenz bei Autoimmunerkrankungen wie dem BP (Long et al. 2016). Eosinophile werden beim BP häufig über die gesamte obere Dermis oder am Rand der DEJ aggregiert gefunden (Borrego et al. 1996). Ein inflammatorisches Infiltrat reich an Eosinophilen ist, abgesehen von der subepidermalen Blasenbildung, das histologische Hauptmerkmal des BP (van Beek et al. 2016). Eosinophil-reiche Infiltrate sind für die Pemphigoid-Gruppe charakteristisch. Ein eosinophil-reiches Infiltrat war neben 40% der BP-Patienten bei 54% der Patienten mit Pemphigoid gestationis nachgewiesen wurden (BinJadeed et al. 2018). In einer anderen Studie konnten bei 57% der BP-Patienten Eosinophil-dominante Hautinfiltrate festgestellt werden. Eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen in den Läsionen von BP-Patienten war mit einer erhöhten Seropositivität von BP180 NC16A IgG assoziiert sowie einer offensichtlichen subepidermalen Aufspaltung und zellreichen Infiltraten (Ständer et al. 2021). Andere subepidermale blasenbildende Autoimmunkrankheiten weisen weniger regelmäßig Eosinophile in der Haut auf (Baum et al. 2014). Eine Eosinophilie im Blut war bei 50-60% der BP-Patienten nachgewiesen wurden (van Beek et al. 2016). Das T_H2-Zytokin IL-5 spielt bei der Rekrutierung und Aktivierung der Eosinophilen eine wichtige Rolle und wird von T_H2-Zellen, Eosinophilen, Mastzellen und Monozyten gebildet. Erhöhte Konzentrationen von IL-5 wurden in Läsionen von BP-Patienten festgestellt und die Konzentration korrelierte mit der Krankheitsaktivität (Engineer et al. 2001; Lampinen et al. 2004). Zusammen mit der erhöhten IL-2- und IL-4-Konzentration in der Blasenflüssigkeit sowie der erhöhte Nachweis von CD30 deutet dies auf eine starke für BP typische Immunantwort von T_H2-Zellen hin (De Pitá et al. 1997; van Beek et al. 2016).

IL-5 ist an der Aktivierung von Eosinophilen beteiligt, trägt jedoch zu einer diffusen Schädigung der Dermis bei. Für eine Separation der DEJ sind Anti-BP180-IgG und Anti-BP230-IgG entscheidend, die über den Fc-Rezeptor FcγR, der durch IFN-γ stimuliert ausgeprägt auf der Oberfläche von humanen Eosinophilen exprimiert ist, zu einer Aktivierung von Eosinophilen beiträgt. Aus der Aktivierung folgt eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, Proteinen aus der Granula und eosinophilen extrazellulären

Traps, denen die Fähigkeit einer Zerstörung der DEJ nachgewiesen werden konnte (Graauw et al. 2017). Zu den Proteinen aus der Granula der Eosinophilen gehören das eosinophile kationische Protein, dessen Serumkonzentration mit der Krankheitsaktivität korrelierte (Giusti et al. 2017) und das Major Basic Protein, dem ein zytotoxischer Effekt auf kultivierte Keratinozyten nachgewiesen werden konnte (Amber et al. 2018b). Daneben wurden Eosinophile als Quelle der MMP-9 identifiziert (Amber et al. 2018b). MMP-9 führt indirekt durch Stimulation der neutrophilen Elastase zu einer Separation der DEJ, indem die Wirkung des α 1-Proteinase-Inhibitors, der wiederum der natürliche Inhibitor der Neutrophilen Elastase ist, gehemmt wird (Liu et al. 2005).

Im Mausmodell ließ sich nachweisen, dass eine Infiltration durch Eosinophile mit Expression des IgE-Rezeptors Fc ϵ RI für die Anti-BP180-IgE vermittelte Blasenbildung Voraussetzung sind. Es konnte dargestellt werden, dass eine Bindung von IgE an BP180 zu einer Infiltration von Eosinophilen führte und die Interaktion mit den Eosinophilen für eine Blasenbildung notwendig war (Lin et al. 2017). Eosinophile exprimieren normalerweise kein Fc ϵ RI (Messingham et al. 2019). Bei 70% der Haut-Eosinophilen war der IgE-Rezeptor Fc ϵ RI jedoch gefunden werden. Es wird vermutet, dass eine Bindung von Anti-BP180-IgE zu einer Degranulation führt (van Beek et al. 2016). Eine Degranulation der Eosinophilen geht der Blasenbildung voraus. Davon wird abgeleitet, dass die Infiltration der Eosinophilen zur Läsionsbildung beiträgt (Borrego et al. 1996).

Ein Hauptmechanismus der IgE-vermittelten Rekrutierung der Eosinophilen scheint die Aktivierung von Mastzellen über IgE zu sein, die eine Rekrutierung von Eosinophilen bewirken. Mastzellen exprimieren im hohen Ausmaß den IgE-Rezeptor Fc ϵ RI (Messingham et al. 2019). Die Serumkonzentration von IgE korrelierte mit dem Ausmaß der urtikariellen und erythematösen Hautveränderungen des BP, jedoch nicht mit dem Ausmaß der Blasenbildung. Im Gegensatz zu IgE korrelierte die Konzentration von Eosinophilen in den Läsionen sowie im Serum der BP-Patienten mit dem Ausmaß der Blasenbildung (Mori et al. 1994; van Beek et al. 2015).

Während in der Haut der Kontroll-Patienten wie zu erwarten keine Eosinophile nachzuweisen waren, da Eosinophile vor allem bei parasitären, allergischen oder autoimmunen Hauterkrankungen anzutreffen sind, konnte die typische Infiltration von Eosinophilen in der Haut der BP-Patienten gezeigt werden, die beim BP maßgeblich an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Bei den vorliegenden Hautpräparaten handelte es sich wie beschrieben jedoch um T-Zell-dominante Infiltrate, wie sie bei etwa 40-50% der Patienten zu finden sind (Ständer et al. 2021). Da jedoch Eosinophile nur in 40-57% der Infiltrate von BP-Patienten dominieren (BinJadeed et al. 2018; Ständer et al. 2021), ist das Ergebnis dieser Arbeit zu rechtfertigen.

C5aR1 befindet sich bei Eosinophilen extrazellulär, während C5aR2 intrazellulär exprimiert ist. Eosinophile haben auf mRNA-Ebene nach Neutrophilen die größte C5aR2-Expression (Bamberg et al. 2010). C5aR2 ließ sich bei Eosinophilen im Mausmodell nachweisen (Karsten et al. 2017). Bei humanen Eosinophilen ließ sich dies auf mRNA-Ebene bestätigen (Bamberg et al. 2010). Die Expression von C5aR1 und C5aR2 auf Eosinophilen wurde in der vorliegenden Arbeit durch deutliche Doppelfärbungen bestätigt.

Die Bindung der Antikörper an BP180 NC16A induzierte eine Komplementaktivierung und Degranulation von Mastzellen, was zu einer Rekrutierung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten führte (Fang et al. 2018b). Obwohl sich Neutrophile in experimentellen Mausmodellen als eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese des BP erwiesen haben, ist ihre Rolle beim humanen BP weniger klar definiert, da Neutrophile im Hautinfiltrat von BP-Patienten nur selten dominieren (Kasperkiewicz und Zillikens 2007; Ständer et al. 2021). In einer Studie mit 136 BP-Patienten dominierten in 3,7% der Hautinfiltrate Neutrophile, das mit einer niedrigeren Serumkonzentration von Anti-BP180 NC16A-IgG einherging sowie zellärmeren Infiltraten in der läsionalen Haut, jedoch höherem CRP (Ständer et al. 2021). Neutrophile gehören zusammen mit Eosinophilen zu den Leukozyten, die durch Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies und Proteinase wie der neutrophilen Elastase eine Zerstörung von Hemidesmosomen verursachen, das zu einer subepidermale Blasenbildung führt (Sadik und Schmidt 2019). Eosinophile setzten jedoch höhere Konzentrationen an Sauerstoffradikalen frei (Graauw et al. 2017). In BP-Blasenflüssigkeit wurde reichlich die Proteinase neutrophile Elastase nachgewiesen (Hiroyasu et al. 2019).

Neutrophile werden in normaler Haut selten beobachtet, werden aber nach einer Gewebeverletzung in großer Zahl rekrutiert. Sie sind die ersten zirkulierenden Entzündungszellen, die sich an die Stelle der Entzündung bewegen, was mit ihrer primären Rolle bei der Abwehr von Infektionen übereinstimmt (Wilgus et al. 2013). Neutrophile sind an der Pathogenese des BP beteiligt und machten in dieser Arbeit 16,7% der Entzündungszellen in der Haut der BP-Patienten aus. Die Anzahl der Neutrophilen war mit der Anzahl der Eosinophilen vergleichbar. In der Haut der Kontroll-Patienten waren wie erwartet deutlich weniger Neutrophile nachzuweisen.

Menschliche Neutrophile exprimierten C5aR2 überwiegend intrazellulär, C5aR1 hingegen auf der Plasmamembran (Bamberg et al. 2010). C5aR1 ist ein bekannter Regulator der Neutrophilen Regulation (Verschoor et al. 2016). Im Mausmodell für rheumatoide Arthritis führte C5aR1 zu einer Adhäsion von Neutrophilen am Gefäßendothel über β 2-Integrin und zur Freisetzung von Leukotrien B₄, das über eine autokrine/parakrine Wirkung über den von Neutrophilen exprimierten BLT1-Rezeptor zu einem Austritt aus dem Blutgefäßlumen ins Interstitium führte. Es wird vermutet, dass Neutrophile beim BP ebenfalls diesem Weg

folgen könnten (Sadik et al. 2018). Weiterhin konnte im Mausmodell bei Stimulation des C5aR1 auf Neutrophilen mit C5a eine Änderung der Zellform nachgewiesen werden. Die Zelle wurde in eine wandernde Form überführt, die ihr es ermöglicht, in entzündliches Gewebe zu gelangen. Bei C5aR2^{-/-} Mäusen kam es sowohl mit als auch ohne C5a-Stimulation zu einer Veränderung der Zellform der Neutrophilen. Dies deutet daraufhin, dass ein Fehlen von C5aR2 ein Modulator für eine proinflammatorische Reaktion darstellt und eine dauerhaft verstärkte proinflammatorische Signalübertragung über C5aR1 bewirkt (Denk et al. 2017). Bei einem anderen Mausmodell zur Untersuchung der Sepsis führte eine Hemmung von C5aR2 zu einer erhöhten Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 (Gao et al. 2005). C5aR1^{-/-} Neutrophile im BP-Mausmodell zeigten ein signifikant geringeres Migrationsverhalten als der Wildtyp. Bei C5aR2^{-/-} Mäusen war kein Unterschied im Migrationsverhalten zu erkennen (Karsten et al. 2018). In der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies war kein Unterschied bei C5aR1^{-/-} und C5aR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Diese wird am ehesten über den Fc-Rezeptor FcγR reguliert (Karsten et al. 2018). Dahingegen zeigte sich bei Neutrophilen von polytraumatisierten Patienten nach C5a-Stimulation eine Freisetzung von C5aR1-exprimierenden Mikrovesikeln, die in ruhenden Neutrophilen zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führte sowie zur Freisetzung von Myeloperoxidase (Karasu et al. 2020). Aus diesen Beobachtungen lässt sich zusammenfassen, dass C5aR1 auf Neutrophilen eine proinflammatorische Wirkung ausübt. Bei Mäusen mit BP war eine C5aR1-Expression von Neutrophilen an deren Rekrutierung in die Haut beteiligt, während C5aR2 keine Veränderungen bei Neutrophilen bewirkte (Karsten et al. 2018). In anderen Mausmodellen ließ sich jedoch eine antiinflammatorische Rolle von C5aR2 nachweisen (Gao et al. 2005; Denk et al. 2017). Den vorherigen Beobachtungen entsprechend waren in dieser Arbeit C5aR1 und C5aR2 auf Neutrophilen nachzuweisen.

Bisher war bei blasenbildenden Autoimmundermatosen ein direkter Einfluss auf den Krankheitsverlauf durch NK-Zellen nur beim Pemphigus vulgaris berichtet worden. Hier schienen sie die Funktion antigenpräsentierender Zellen gegenüber CD4⁺-T-Zellen zu übernehmen. Diese stimulierten B-Zellen, die daraufhin Anti-Desmoglein-3-Antikörper bildeten, wodurch es zum Ausbruch der Erkrankung kam (Stern et al. 2008). Über einen Einfluss durch NK-Zellen auf das BP ist in der Literatur wenig zu finden. CD4⁺-CD25^{bright}-FoxP3⁺-T_{Reg} exprimierten zytotoxisches-T-Lymphozyten-assoziiertes-Protein-4 (CTLA-4), CD25, CD39 und CD73 sowie Zytokine wie IL-10, die direkt eine Immunantwort von NK-Zellen unterdrückten. Die Anzahl dieser T_{Reg} war sowohl im Blut als auch in der Haut von BP-Patienten verringert (Cao et al. 2019). Beim BP bestand in der Serumkonzentration von NK-Zellen im Vergleich zu gesunden Menschen jedoch kein Unterschied (Oswald et al. 2009).

Auch in dieser Arbeit konnten trotz verschiedener immunhistochemischer Verfahren keine NK-Zellen nachgewiesen werden. Mittels chromogener Immunhistochemie konnten vereinzelt NK-Zellen nachgewiesen werden. Die Menge wurde aber als zu gering eingestuft, so dass weitere Versuche, Doppelfärbungen mit C5aR1 und C5aR2 zu etablieren, nicht fortgeführt wurden.

Bei humanen NK-Zellen konnte eine Expression von C5aR1 detektiert werden. Ebenso wurde in humanen NK-Zellen C5aR2-mRNA nachgewiesen sowie eine intrazelluläre Expression von C5aR2 (Karsten et al. 2017). In einer Untersuchung zur *Escherichia coli*-induzierten Sepsis bei Mäusen waren sowohl C5aR2- als auch C5aR1-mRNA in NK-Zellen von nicht erkrankten Mäusen vorhanden, jedoch nicht das Protein, d.h. eine Expression. Erst nach Kontakt zu *Escherichia coli* kam es zu einer schnellen Expression von C5aR1. C5aR1^{-/-} Mäuse zeigten in dieser Studie eine geringere IFN- γ Produktion. Es konnte nur ein direkter Effekt über C5aR1 nachgewiesen werden (Fusakio et al. 2011). Dahingegen wurde in einem anderen Mausmodell im Rahmen einer Infektion durch *Toxoplasma gondii* nach Stimulation des C5aR2 mit C5a eine Unterdrückung der IL-12/IL-18-induzierten IFN- γ -Produktion ermöglicht. Eine C5aR1-Expression auf NK-Zellen konnte in diesem Mausmodell nicht beobachtet werden (Karsten et al. 2017). Die IFN- γ -Produktion war in dem Fall durch IL-12, zu dessen Hauptquelle dendritische Zellen nachgewiesen wurden, stimuliert wurden (Briukhovetska et al. 2020). Zu C5aR1 und C5aR2 gibt es demnach unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Aussagen. Die Expression von C5aR sollte weiter untersucht werden insbesondere auf humanen NK-Zellen. Aufgrund des Fehlens von NK-Zellen in der Haut der BP-Patienten in dieser Arbeit kann über eine C5aR1/C5aR2-Expression keine Aussage getroffen werden. Da jedoch den NK-Zellen bislang keine bedeutsame Rolle zugesprochen werden konnte, hat eine weitere Untersuchung der C5aR1/C5aR2-Expression bezüglich der Therapie für BP bis auf weiteres keinen Nutzen.

Den größten Anteil an der C5aR1-Expression unter den untersuchten Leukozyten in frühen BP-Läsionen machten mit 43,8% T-Zellen aus. Wie oben diskutiert, müsste es sich hierbei vor allem um CD4⁺-T-Zellen handeln. Aber auch CD8⁺-T-Zellen oder T_{Reg} könnten eine Rolle spielen. C5aR1 ließ sich als proinflammatorischer Rezeptor bei T-Zellen herauskristallisieren. Bei humanen T-Zellen förderte C5aR1 die Produktion von IFN- γ (Arbore et al. 2018). Das T_H1-Zytokin IFN- γ induziert die Bildung von IgG1. Zusammen mit den T_H2-Zytokinen wie IL-4 und IL-13 sind sie an der Bildung von autoreaktiven Antikörpern gegen BP180 und BP230 durch B-Zellen beim BP beteiligt (Büdinger et al. 1998; Kasperkiewicz und Zillikens 2007). BP zeichnet sich durch ein T_H1/T_H2-gemischtes Zytokinprofil aus (Büdinger et al. 1998). Während sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen NLRP3-Inflammasomen die T_H1-Aktivität regulieren, konnte bisher nur bei Mäusen

nachgewiesen werden, dass NLRP3-Inflammasomen auch die T_H2 -Aktivität unterstützen (Bruchard et al. 2015; Arbore et al. 2018). C5aR1 könnte dennoch über diesen Weg die Bildung von Antikörpern gegen BP180 und BP230 stimulieren. T-Zellen spielen insbesondere deswegen beim BP einen interessanten therapiespezifischen Ansatzpunkt, da sie die Bildung von Autoantikörpern gegen BP180 und BP230 durch eine Aktivierung von B-Zellen fördern (Genovese et al 2019). Außerdem korrelierte die Serumkonzentration von den T_H1 - und T_H2 -Zytokinen mit der Krankheitsaktivität des BP. Bei T-Zell-dominanten Infiltraten in der Haut von BP-Patienten konnte eine Verbindung mit einem schweren Phänotyp des BP beobachtet werden (Echigo et al 2006; Ständer 2021). Sollte die Expression von C5aR1 auf T-Zellen hierbei beteiligt sein, könnte dies eine wirksame Reduktion der Krankheitsaktivität beim BP ermöglichen. Die in dieser Arbeit dargestellte Dominanz an T-Zellen sowie ihr ausgeprägter Anteil an der C5aR1-Expression könnte im Zusammenhang mit der möglicherweise durch C5aR1 induzierten Regulierung der IgG1-Produktion bzw. der Antikörperbildung gegen BP180 und BP230 eine bedeutende Rolle beim BP spielen. Da in dieser Arbeit bei den frühen BP-Läsionen T-Zellen im Entzündungs-Infiltrat dominierten, sollte in Erwägung gezogen werden, das Patientenkollektiv auszuweiten und die Expression von C5aR1 und C5aR2 auch in Eosinophilen-reichen Infiltraten sowie Neutrophilen-reichen Infiltraten zu untersuchen und mit dieser Arbeit zu vergleichen.

Nach T-Zellen folgten Makrophagen mit einem Anteil von 23,2% als Quelle der C5aR1-Expression in der Haut von BP-Patienten. Unter den Makrophagen war der Anteil an C5aR1-exprimierenden Makrophagen mit 76,9% im Vergleich zu den anderen untersuchten Leukozyten am höchsten. C5aR1 konnte auf Makrophagen als proinflammatorischer Rezeptor identifiziert werden und die Zytokinproduktion stimulieren. Eine Hemmung von C5aR1 könnte auch die Sekretion des Zytokins IL-10, das im Mausmodell mit der Rekrutierung von Neutrophilen im Zusammenhang steht und bei BP-Patienten mit der Krankheitsaktivität korrelierte, sowie die Sekretion des Zytokins CCL18, welches die Rekrutierung von T_H2 -Zellen stimuliert und ebenfalls mit der Krankheitsaktivität korrelierte, hemmen und dadurch den Krankheitsverlauf des BP mildern.

In der Haut der Kontroll-Patienten waren T-Zellen mit einem Anteil von 27% an der C5aR1-Expression die zweithäufigste Zelle unter den Leukozyten während Makrophagen mit einem Anteil von 16% die dritthäufigste Zelle darstellten. Auffällig war unter den T-Zellen der Kontroll-Patienten ein höherer Anteil an der C5aR1-Expression (64,3%) als bei den BP-Patienten (47,1%). Dieser Befund lässt sich auf die Beobachtung zurückführen, dass die Expression von C5aR1-mRNA in ruhenden gegenüber aktivierten T-Zellen erhöht war (Hansen et al. 2019). Demgegenüber steht die Beobachtung, dass auf $CD8^+$ -Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten bei Mäusen und Menschen im Vergleich zur gesunden Gruppe

die C5aR1-Expression stark hochreguliert war (Wang et al. 2019). Eventuell ist dieses Phänomen nicht auf BP oder auf die beim BP möglicherweise vorliegenden CD4⁺-T-Zellen übertragbar. Insgesamt war jedoch die Anzahl der T-Zellen und Makrophagen im Rahmen des Entzündungsgeschehen deutlich hochreguliert. Somit könnte eine pharmakologische Beeinflussung von C5aR1 auf diesen Zellen eine zukünftige Therapiemöglichkeit darstellen.

Den geringsten Anteil an der C5aR1-Expression in der Haut der BP-Patienten hatten Mastzellen mit 5%, die in der Haut der Kontroll-Patienten mit 41% den größten Anteil besaßen. Die geringe C5aR1-Expression spricht gegen vorherige Untersuchungen, bei denen eine C5aR1-Expression auf Mastzellen im Mausmodell eine maßgebliche Rolle an der Ausbildung der Erkrankung ausübte (Heimbach et al. 2011). Zum einen wurde jedoch eine minimale C5aR1-Expression auf Mastzellen beschrieben (Pundir et al. 2015) und zum anderen ist es nicht genau bekannt, ob die Beobachtungen aus dem Tiermodell auf den Menschen übertragbar sind.

C5aR2 wies, basierend auf dem Nachweis von C5aR2-mRNA, in humanen Leukozyten eine vergleichbare Expression wie C5aR1 auf, jedoch in der Regel in einem niedrigeren Ausmaß (Bamberg et al. 2010). Dies könnte der Grund für das in dieser Arbeit beobachtete geringe Expressionsverhalten von C5aR2 bei den Leukozyten sein.

Nichtsdestotrotz gehörten Mastzellen in dieser Arbeit zu den Leukozyten mit dem größten Anteil an der C5aR2-Expression (38,2%) in der Haut von BP-Patienten. Nahezu bei allen Mastzellen (94,9%) war eine C5aR2-Expression zu erkennen. C5aR2 stellt sich bei Mastzellen als proinflammatorischer Rezeptor dar. Bei humanen Mastzellen in vitro konnte nach Gabe der T_H2-Zytokinen IL-4 und IL-5 eine Hochregulierung der C5aR2-Expression beobachtet werden (Pundir et al. 2015). IL-5 war in Blasen von BP-Patienten nachweisbar und korrelierte mit der Krankheitsaktivität. Daran war die Rekrutierung von Eosinophilen beteiligt (Engineer et al. 2001) jedoch möglicherweise auch die Aktivierung von Mastzellen. Die Aktivierung von C5aR2 führte bei humanen Mastzellen in vitro zu einem gesteigerten Migrationsverhalten und einer Stimulierung der Zytokinproduktion (Pundir 2015). Inwieweit diese Erkenntnisse auf den Krankheitsprogress beim BP übertragbar sind und ob C5aR2 beim BP ebenfalls eine proinflammatorische Funktion ausübt, sollte weiter untersucht werden.

Eosinophile gehörten in dieser Arbeit zu den Leukozyten, die mit 33% den zweitgrößten Anteil an der C5aR2-Expression aufwiesen. Es war deutlich zu erkennen, dass Eosinophile nur in der Haut von BP-Patienten nachzuweisen waren im Gegensatz zur Haut der Kontroll-Patienten. Dies weist auf die bedeutsame und charakteristische Rolle von Eosinophilen beim BP hin. Unter den gezählten Eosinophilen lag ein hoher Anteil an einer C5aR1-Expression von 42,4% und bei der C5aR2-Expression von 65,5% vor. C5a ist ein potentes

Chemokin und Aktivator für Eosinophile, das u.a. zu einer Freisetzung von reaktiver Sauerstoffspezies führt, die in der Lage sind, die DEJ zu spalten (Elsner et al. 1996; Graauw et al. 2017; Wiese et al. 2017). Die proinflammatorische Wirkung von C5a scheint über C5aR1 vermittelt zu werden, da die Expression von C5aR1 auf Eosinophilen von Mäusen bei allergischen Asthma erhöht war (Ender et al. 2017). Es wird vermutet, dass die Expression von C5aR1 auf Eosinophilen an der Entwicklung von schwerem Asthma beteiligt ist (Wiese et al. 2017). Dahingegen zeigte sich bei Mäusen, dass beim allergischen Asthma die Expression von C5aR2 unter Einfluss des proinflammatorischen Zytokin IL-33 bei pulmonalen Eosinophilen verringert war. Daraus lässt sich mutmaßen, dass C5aR2 die C5aR1-gesteuerte Zellaktivierung kontrollieren und ihr entgegenwirken kann (Karsten et al. 2017). Aus diesen Erkenntnissen kann geschlossen werden, dass eine Hemmung von C5aR1 das Krankheitsgeschehen vom BP lindern könnte und eine Stimulierung des C5aR2 die Wirkung von C5aR1 entgegenwirkt und ebenfalls ein therapeutischer Effekt resultieren könnte. Außerdem kann das charakteristische Auftreten von Eosinophilen in der Haut von BP-Patienten und ihre erhöhte Expression von C5aR1 und C5aR2 als ein möglicher Ansatz einer gezielten Therapiemöglichkeit von Nutzen sein. Durch die Untersuchung der mRNA-Expression von C5aR2 konnte bei humanen Neutrophilen die höchste C5aR2-Expression nachgewiesen werden, gefolgt von Eosinophilen und T-Gedächtniszellen (Bamberg et al. 2010). Neutrophile (10,6%) zeigten jedoch in dieser Arbeit zusammen mit CD3⁺-T-Zellen (2,6%) den geringsten Anteil an der C5aR2-Expression. Bei T-Zellen konnte eine schwache C5aR2-Expression beobachtet werden (Li et al. 2019). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann die C5aR2-Expression verändert sein. So zeigte sich bei Neutrophilen von Patienten mit familiärem Mittelmeerfieber eine geringere C5aR2-mRNA-Expression als bei gesunden Personen (Zhang et al. 2017). Dieses Phänomen könnte auch beim BP zutreffen.

Zu guter Letzt wurde untersucht, welche Leukozyten sowohl in der Haut von BP-Patienten sowohl die höchsten C5aR1- als auch C5aR2-Expression besaßen. Allgemein wurde dies als C5aR-Expression bezeichnet. Hier zeigten sich Eosinophile, T-Zellen und Mastzellen mit ähnlichen Anteilen. Der hohe Anteil an der C5aR-Expression von T-Zellen rührte von der hohen C5aR1-Expression und der hohen Zahl von T-Zellen in der BP-Haut, bei einem jedoch geringen Anteil an der C5aR2-Expression. Für den hohe Anteil der Mastzellen an der C5aR-Expression war wiederum der hohe Anteil an der C5aR2-Expression ursächlich, wohingegen die C5aR1-Expression nur mittelmäßig ausgeprägt war. Dagegen war bei den Eosinophilen sowohl der Anteil an der C5aR1- als auch an der C5aR2-Expression vergleichbar und an der C5aR-Expression beteiligt. Daraus folgt, dass Eosinophile die Leukozyten mit der höchsten C5aR-Expression in der periläsionalen Haut von BP-Patienten waren. In der Haut der Kontroll-Patienten waren Mastzellen deutlich mit einem hohen Anteil

an der C5aR1- und C5aR2-Expression die Leukozyten mit der höchsten C5aR2-Expression. Mit diesen Erkenntnissen sollte nun weiter untersucht werden, ob eine Hemmung des inflammatorischen C5aR1 oder eine Stimulierung des antiinflammatorischen C5aR2 eine größere Wirkung auf die Verringerung des Krankheitsverlaufs in der Therapie des BP bewirkt.

5.1 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war, das Entzündungsinfiltrat in frühen Hautläsionen von BP-Patienten hinsichtlich der Expression von C5aR1 und C5aR2 zu charakterisieren. Die Haut von vier gesunden Patienten wurde ebenfalls untersucht, um eine Expression von C5aR1 sowie von C5aR2 auszuschließen. Die Untersuchung der C5aR1- und C5aR2-Expression zeigte ein unterschiedliches Expressionsverhalten beim BP im Vergleich zu den Zellen in der Haut der Kontroll-Patienten. Vier Kontroll-Patienten wurden als ausreichend angesehen, da in gesunder Haut kein erhöhtes Vorkommen von Entzündungszellen zu erwarten war, was sich in der Untersuchung bestätigte. Die geringe Anzahl an Immunzellen in der Haut der Kontroll-Patienten schließt eine Expression von C5aR1 und C5aR2 praktisch aus im Gegensatz zur Haut der BP-Patienten, bei der sich im Entzündungsinfiltrat eine hohe C5aR1- und C5aR2-Expression erkennen ließ. Durch die hier durchgeführten Versuche wurden T-Zellen als die Zellen mit der höchsten C5aR1-Expression in der periläsionalen Haut bei BP-Patienten identifiziert. Um diese Kenntnisse zu evaluieren, sollten weitere Untersuchungen folgen, die den T-Zell-Subtyp identifizieren. Dies kann durch weitere immunhistochemische Färbungen erfolgen, die gegen spezifische Oberflächenmoleküle von T-Zellen gerichtet sind. Erhöhte Konzentrationen von T_H1 , T_H2 und T_H17 -Zytokinen wurden in den Blasen von BP-Patienten nachgewiesen (Ameglio et al. 1998; Arakawa et al. 2011; Didona et al. 2021). Über das Vorliegen von erhöhten Zahlen von $CD8^+$ -T-Zellen und T_{Reg} lassen sich widersprüchliche Angaben finden. Eine Expression von C5aR1 ist daher durch Doppelfärbungen sowohl für C5aR1 als auch für die jeweiligen $CD4^+$ -T-Zell-Subtypen T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zellen sowie $CD8^+$ -T-Zellen und T_{Reg} durchzuführen. Nach Kenntnis über den T-Zell-Subtyp mit der höchsten C5aR1-Expression sollte auch der Einfluss von C5aR1 eruiert werden. Dazu könnten Mäuse entwickelt werden, denen der C5aR1 auf den T-Zellen bzw. dem T-Zell-Subtyp fehlt oder der Rezeptor möglichst spezifisch medikamentös geblockt wird. Auf diese Weise können die von diesen Rezeptoren ausgehenden Effekte weiter evaluiert werden. Außerdem kann auf die Weise untersucht werden, ob eine Antagonisierung des proinflammatorischen C5aR1 eine therapeutische Wirkung erzielt. Ein weiterer Angriffspunkt für therapeutische Maßnahmen können Makrophagen sein, bei denen nach T-Zellen die höchste C5aR1-Expression im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung zu sehen war. In Läsionen von BP-

Patienten wurde eine erhöhte Anzahl Makrophagen vom M2-Typ nachgewiesen (Furudate et al. 2014; Tanita et al. 2018). Das gleiche Verfahren, wie bei T-Zellen beschrieben, könnte auch bei den Makrophagen durchgeführt und mit den Ergebnissen der T-Zellen verglichen werden. Somit lässt sich ermitteln, ob T-Zellen oder Makrophagen für eine therapeutische Option beim BP in Frage kämen.

Beim C5aR2 wurde im Tiermodell eine vorm BP schützende Funktion beobachtet (Karsten et al. 2018). Durch eine gezielte Stimulierung dieses Rezeptors könnte eine Behandlung vom BP ermöglicht werden. Mastzellen zeigten den größten Anteil an der C5aR2-Expression gefolgt von eosinophilen Granulozyten. Bei Mastzellen schien C5aR2 jedoch eine proinflammatorische Funktion auszuüben (Pundir et al. 2015). Ob diese Beobachtung beim BP ebenfalls zutrifft, muss untersucht werden. In diesem Fall sollte neben der Stimulierung von C5aR2 auch der Einsatz von C5aR2-Antagonisten getestet werden. Im Mausmodell war eine C5aR1-Expression bei Mastzellen für die Ausprägung der Erkrankung entscheidend (Chen et al. 2001). Es besteht die Frage, ob C5aR2 auf Mastzellen ebenfalls eine wichtige Funktion beim BP darstellt. Des Weiteren sollten Eosinophile untersucht werden, da Mastzellen ebenfalls in der Haut von Kontroll-Patienten den größten Anteil an der C5aR2-Expression innehatten und einen erheblichen Anteil an der C5aR2-Expression aufwiesen. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass C5aR2 auf Mastzellen als Therapieziel keine ausreichende Wirkung erzielt. Eosinophile waren dahingegen kaum in der Haut der Kontroll-Patienten nachzuweisen. Die gezielte Stimulierung des antiinflammatorischen C5aR2 auf Eosinophilen könnte daher einen wirksameren Effekt in der Behandlung des BP erbringen. Vielmehr stellen Eosinophile eine interessante Zielzelle für zukünftige Therapien dar, da beim BP ein eosinophiles Hautinfiltrat ein charakteristisches Bild ist und die Krankheitsaktivität mit der Anzahl von Eosinophilen korreliert (van Beek et al. 2015; van Beek et al. 2016). C5aR1 führte zu einer Aktivierung der Eosinophilen und war an der Freisetzung von Proteasen beteiligt, denen eine Rolle in der Separation der DEJ nachgesagt wird und in Blasen von BP-Patienten nachgewiesen wurden (Elsner et al. 1996; Graauw et al. 2017). Beim allergischen Asthma war eine Expression von C5aR2 auf Eosinophilen mit einer antiinflammatorischen Wirkung verbunden (Karsten et al. 2017). Daher könnte sich auch die Antagonisierung des C5aR1-Rezeptors sowie die Agonisierung von C5aR2 auf eosinophilen Granulozyten auch beim BP als effektiv erweisen. Kriterien wie die Krankheitsaktivität bzw. die Schwere der Erkrankung wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt und sind in darauffolgenden Arbeiten zu untersuchen, um außerdem zu ermitteln, ob die Krankheitsaktivität einen Einfluss auf die C5aR1- und C5aR2-Expression ausübt.

6 Zusammenfassung

Das bullöse Pemphigoid (BP) ist eine subepidermale blasenbildende Autoimmundermatose, welche durch eine Autoantikörper-gesteuerte Immunantwort gegen zwei Strukturproteine der dermoepidermalen Junktionszone (DEJ), die als BP180 (Typ XVII Kollagen) und BP230 bezeichnet werden, definiert ist. Die Komplementaktivierung an der DEJ ist ein immunopathologisches und diagnostisches Kennzeichen des BP. Ein Schlüsselement der Komplementantwort ist das Aktivierungsfragment C5a, das seine Effektorfunktionen durch Bindung an die Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 ausübt. Die proinflammatorischen Effektorfunktionen von C5aR1 bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen sind gut beschrieben. Die Rolle des zweiten C5a-Rezeptors, C5aR2, ist jedoch weniger klar definiert. Im Mausmodell des BP zeigten C5aR1^{-/-} Mäusen eine Abschwächung der Blasenbildung, während bei C5aR2^{-/-} Mäusen das Krankheitsbild mit einer ausgeprägteren Blasenbildung verstärkt war. Ebenso waren Mäuse, deren Mastzellen die Expression von C5aR1 fehlte, vor der Krankheitsentstehung des BP geschützt. Daraus lässt sich ableiten, dass C5aR1 beim BP eine proinflammatorische Rolle ausübt, während C5aR2 eine vor BP schützende Funktion aufweist. In dieser Studie wollten wir die Expression von C5aR1 und C5aR2 in frühen Hautläsionen bei Patienten mit BP untersuchen. Bei den Proben handelt es sich um perilesionale Biopsien. Diese weisen keine voll entwickelten Läsionen auf und spiegeln somit die frühe Phase der Gewebeerstörung wider. Für die Untersuchung wurde bei den Hautbiopsien von BP-Patienten doppelte Immunfluoreszenzfärbungen für C5aR1/C5aR2 und Zellmarker von Neutrophilen (Myeloperoxidase), Eosinophilen (eosinophile Peroxidase), Makrophagen (CD68), Mastzellen (Tryptase) und T-Zellen (CD3) durchgeführt. Als Kontrollen dienten Hautbiopsien von Patienten, die nicht an entzündlichen Dermatosen erkrankt waren. Es zeigte sich, dass die C5aR1-Expression überwiegend auf T-Zellen (43,8%) und Makrophagen (23,2%) nachweisbar war. Im Gegensatz dazu schienen Mastzellen (38,2%) und Eosinophile (33,0%) die Hauptzellquelle für C5aR2 in der BP-Haut zu sein, gefolgt von Makrophagen (15,3%), Neutrophilen (10,6%) und T-Zellen (2,6%). Diese Ergebnisse werden es uns ermöglichen, die wichtigsten C5aR1/C5aR2-exprimierenden Zellpopulationen als potenzielle Ziele für pharmakologische Interventionen weiter zu untersuchen und ihre funktionelle Relevanz beim BP zu definieren.

7 Summary

Bullous pemphigoid (BP) is a subepidermal blistering autoimmune disease defined by an autoantibody-driven immune response against two structural proteins of the dermo-epidermal junction (DEJ) called BP180 (type XVII collagen) and BP230. Complement activation at the DEJ is an immunopathological and diagnostic hallmark of BP. A key element of the complement response is the activation fragment C5a, which exerts its effector functions by binding to the receptors C5aR1 and C5aR2. The proinflammatory effector functions of C5aR1 in various autoimmune diseases are well described. However, the role of C5aR2 is less clearly defined. In the mouse model of BP, C5aR1^{-/-} mice showed attenuation of blister formation, while C5aR2^{-/-} mice revealed increased disease with more pronounced blister formation. Similarly, mice lacking C5aR1 expression in mast cells were protected from BP lesions. This suggests that C5aR1 has a proinflammatory role in BP, while C5aR2 has a protective role. In this study, we aimed to investigate the expression of C5aR1 and C5aR2 in early BP skin lesions or perilesional biopsies. These biopsies do not show fully developed lesions which reflect the early phase of tissue destruction. For this purpose, double immunofluorescence staining for C5aR1/C5aR2 and cell markers of neutrophils (myeloperoxidase), eosinophils (eosinophil peroxidase), macrophages (CD68), mast cells (tryptase) and T cells (CD3) were performed. Skin biopsies from patients who did not have inflammatory dermatoses served as controls. C5aR1 expression was predominantly found on T cells (43,8%) and macrophages (23,2%). In contrast, mast cells (38,2%) and eosinophils (33,0%) appeared to be the main cell source of C5aR2 in BP skin, followed by macrophages (15,3%), neutrophils (10,6%) and T cells (2,6%). These results will encourage us to further investigate the major C5aR1/C5aR2-expressing cell populations as potential targets for pharmacological intervention and define their functional relevance in BP.

8 Literaturverzeichnis

- Alcover A, Alarcón B, Di Bartolo V (2018): Cell biology of t cell receptor expression and regulation. *Annu Rev Immunol* 36, 103–125
- Ambach A, Zillikens D, Klingert B, Hartmann AA, Burg G (1992): Immune phenotyping of mononuclear infiltrate in bullous pemphigoid. *Hautarzt* 43, 81–85
- Amber KT, Murrell DF, Schmidt E, Joly P, Borradori L (2018a): Autoimmune subepidermal bullous diseases of the skin and mucosae: clinical features, diagnosis and management. *Clin Rev Allergy Immunol* 54, 26–51
- Amber KT, Valdebran M, Kridin K, Grando SA (2018b): The role of eosinophils in bullous pemphigoid: a developing model of eosinophil pathogenicity in mucocutaneous disease. *Front Med* 5: 201
- Ameaglio F, D’Auria L, Bonifati C, Ferraro C, Mastroianni A, Giacalone B (1998): Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationships with disease intensity. *Br J Dermatol* 138, 611–614
- Antiga E, Quaglino P, Volpi W, Pierini I, Del Bianco E, Bianchi B, Novelli M, Savoia P, Bernengo MG, Fabbri P, Caproni M (2014): Regulatory T cells in skin lesions and blood of patients with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28, 222–230
- Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, Hamada T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Tsuruta D, Hashimoto T (2011): Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 20, 1022–1024
- Aratani Y (2018): Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 640, 47–52
- Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, Dutow P, Woodruff TM, Yu ZX, O’Neill LA, Coll R, Sher A, Leonard W, Köhl J, Monk P, Cooper M, Arno M, Afzali B, Lachmann H, Cope A, Mayer-Barber K. D., Kemper C. (2016): T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4+ T cells. *Science* 352, 1210
- Arbore G, West EE, Rahman J, Le Friec G, Niyonzima N, Pirooznia M, Tunc I, Pavlidis P, Powell N, Li Y, Liu P, Servais, A, Couzi, L, Fremeaux-Bacchi V, Placais L, Ferraro A, Walsh PR, Kavanagh D, Afzali, Lavender P, Lachmann H, Kemper C (2018): Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8 + T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nat Commun* 9, 4186
- Bamberg CE, Mackay CR, Lee H, Zahra D, Jackson J, Lim YS, Whitfeld PL, Craig S, Corsini E, Lu B, Gerard C, Gerard NP (2010): The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 285, 7633–7644
- Basta M: Activation and Inhibition of Complement by Immunoglobulins. In: Szebeni J (Hrsg.): *The complement system: novel roles in health and disease*. Springer US, Boston, MA 2004, 517–529

- Baum S, Sakka N, Artsi O, Trau H, Barzilai A (2014): Diagnosis and classification of autoimmune blistering diseases. *Autoimmun Rev* 13, 482–489
- Bieber K, Ernst AL, Tukaj S, Holtsche MM, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig RJ, Kasperkiewicz M (2017a): Analysis of serum markers of cellular immune activation in patients with bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 26, 1248–1252
- Bieber K, Sun S, Witte M, Kasprick A, Beltsiou F, Behnen M, Laskay T, Schulze FS, Pipi E, Reichhelm N, Pagel R, Zillikens D, Schmidt E, Sparwasser T, Kalies K, Ludwig RJ (2017b): Regulatory T cells suppress inflammation and blistering in pemphigoid diseases. *Front Immunol* 8, 1628
- BinJadeed HF, Alyousef AM, Alsaif FM, Alhumidi AA, Alotaibi HO (2018): Histologic characterization of cellular infiltration in autoimmune subepidermal bullous diseases in a tertiary hospital in Saudi Arabia. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 11, 187–194
- Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N (2011): An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology* 59, 801–803
- Borelli V, Vita F, Shankar S, Soranzo MR, Banfi E, Scialino G, Brochetta C, Zabucchi G (2003): Human eosinophil peroxidase induces surface alteration, killing, and lysis of mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 71, 605–613
- Borradori L, Sonnenberg A (1999): Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 112, 411–418
- Borrego L, Maynard B, Peterson EA, George T, Iglesias L, Peters MS, Newman W, Gleich GJ, Leiferman KM (1996): Deposition of eosinophil granule proteins precedes blister formation in bullous pemphigoid. Comparison with neutrophil and mast cell granule proteins. *Am J Pathol* 148, 897–909
- Brandner JM, Houdek P, Moll I.: Keratinozyten in vitro — Einfluß der Applikation von Keratinozyten auf die Wundheilung in einem humanen Wundheilungsmodell. In: Plettenberg A, Meigel WN, Moll Ingrid (Hrsg.): *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend*. Springer, Berlin, Heidelberg 2000, 584–586
- Brick KE, Weaver CH, Lohse CM, Pittelkow MR, Lehman JS, Camilleri MJ, Al-Hashimi M, Wieland CN (2014): Incidence and mortality rates of bullous pemphigoid in olmsted county, minnesota, over 6 decades. *J Am Acad Dermatol* 71, 92–99
- Briukhovetska D, Ohm B, Mey FT, Aliberti J, Kleingarn M, Huber-Lang M, Karsten CM, Köhl J (2020): C5aR1 activation drives early IFN- γ production to control experimental toxoplasma gondii infection. *Front Immunol* 11
- Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW (2001): Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in kupffer cells of human liver. *Am J Pathol* 159, 2081–2088
- Bruchard M, Rebé C, Derangère V, Togbé D, Ryffel B, Boidot R, Humblin E, Hamman A, Chalmin F, Berger H, Chevriaux A, Limagne E, Apetoh L, Végran F, Ghiringhelli F (2015): The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of T H 2 differentiation. *Nat Immunol* 16, 859–870

- Büdinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Merk HF, Yancey K, Hertl M (1998): Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 102, 2082–2089
- Cain SA, Monk PN (2002): The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg. *J Biol Chem* 277, 7165–7169
- Cao T, Shao S, Fang H, Li B, Wang G (2019): Role of regulatory immune cells and molecules in autoimmune bullous dermatoses. *Front Immunol* 10, 1746
- Carvelli J, Demaria O, Vély F, Batista L, Chouaki Benmansour N, Fares J, Carpentier S, Thibault M-L, Morel A, Remark R, André P, Represa A, Piperoglou C, Cordier P, Dault E, Guervilly C, Simeone P, Gainnier M, Morel Y, Ebbo M, Schleinitz N, Vivier E (2020): Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a–C5aR1 axis. *Nature* 588, 146–150
- Chakievska L, Holtsche MM, Künstner A, Goletz S, Petersen B-S, Thaci D, Ibrahim SM, Ludwig RJ, Franke A, Sadik CD, Zillikens D, Hölscher C, Busch B, Schmidt E (2019): IL-17A is functionally relevant and a potential therapeutic target in bullous pemphigoid. *J Autoimmun* 96, 104–112
- Chen R, Ning G, Zhao M-L, Fleming MG, Diaz LA, Werb Z, Liu Z (2001): Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 108, 1151–1158
- Chen X, Zhang Y, Luo Z, Wu Y, Niu T, Zheng J, Xie Y (2022): Prognostic factors for mortality in bullous pemphigoid: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 17, e0264705
- Cheng M, Anderson MS (2018): Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. *Nat Immunol* 19, 659–664
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV (2017): CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97, 4–13
- Choudhry N, Li K, Zhang T, Wu K-Y, Song Y, Farrar CA, Wang N, Liu C-F, Peng Q, Wu W, Sacks SH, Zhou W (2016): The complement factor 5a receptor 1 has a pathogenic role in chronic inflammation and renal fibrosis in a murine model of chronic pyelonephritis. *Kidney Int* 90, 540–554
- Colley CS, Popovic B, Sridharan S, Debreczeni JE, Hargeaves D, Fung M, An L-L, Edwards B, Arnold J, England E, Eghobamien L, Sivars U, Flavell L, Renshaw J, Wickson K, Warrenner P, Zha J, Bonnell J, Woods R, Wilkinson T, Dobson C, Vaughan T (2018): Structure and characterization of a high affinity C5a monoclonal antibody that blocks binding to C5aR1 and C5aR2 receptors. *MAbs* 10, 104–117
- De Pitá O, Frezzolini A, Cianchini G, Ruffelli M, Teofoli P, Puddu P (1997): T-helper 2 involvement in the pathogenesis of bullous pemphigoid: role of soluble CD30 (sCD30). *Arch Dermatol Res* 289, 667–670
- Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L (2018): HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol* 18, 325–339

- Denk S, Taylor RP, Wiegner R, Cook EM, Lindorfer MA, Pfeiffer K, Paschke S, Eiseler T, Weiss M, Barth E, Lambris JD, Kalbitz M, Martin T, Barth H, Messerer D, Gebhard F, Huber-Lang M (2017): Complement C5a-induced changes in neutrophil morphology during inflammation. *Scand J Immunol* 86, 143–155
- Di Zenzo G, Thoma-Uszynski S, Calabresi V, Fontao L, Hofmann SC, Lacour J-P, Sera F, Bruckner-Tuderman L, Zambruno G, Borradori L, Hertl M (2011): Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol* 131, 2271–2280
- Didona D, Scarsella L, Fehrest M, Solimani F, Juratli HA, Göbel M, Mühlenbein S, Holiangu L, Pieper J, Korff V, Schmidt T, Sitaru C, Eming R, Hertl M, Pollmann R (2021): Autoreactive peripheral blood T helper cell responses in bullous pemphigoid and elderly patients with pruritic disorders. *Front Immunol* 12, 569287
- Ding P, Li Ling, Li Luying, Lv X, Zhou D, Wang Qingkai, Chen J, Yang C, Xu E, Dai W, Zhang X, Wang N, Wang Q, Zhang W, Zhang L, Zhou Y, Gu H, Lei Q, Zhou X, Hu W (2020): C5aR1 is a master regulator in colorectal tumorigenesis via Immune modulation. *Theranostics* 10, 8619–8632
- Dominguez-Villar M, Hafler DA (2018): Regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nat Immunol* 19, 665
- Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Sato S (2006): Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases. *Arch Dermatol Res* 298, 38–45
- Edwards G, Diercks GFH, Seelen MAJ, Horvath B, van Doorn MBA, Damman J (2019): Complement Activation in Autoimmune Bullous Dermatoses: A Comprehensive Review. *Front Immunol* 10, 1477
- Egami S, Yamagami J, Amagai M (2020): Autoimmune bullous skin diseases, pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immunol* 145(4):1031-1047
- Elsner J, Oppermann M, Kapp A (1996): Detection of C5a receptors on human eosinophils and inhibition of eosinophil effector functions by anti-C5a receptor (CD88) antibodies. *Eur J Immunol* 26, 1560–1564
- Ender F, Wiese AV, Schmutde I, Sun J, Vollbrandt T, König P, Laumonier Y, Köhl J (2017): Differential regulation of C5a receptor 1 in innate immune cells during the allergic asthma effector phase. *PLoS One* 12, e0172446
- Engineer L, Bhol K, Kumari S, Razzaque Ahmed A (2001): Bullous pemphigoid: interaction of interleukin 5, anti-basement membrane zone antibodies and eosinophils. A preliminary observation. *Cytokine* 13, 32–38
- Ernst N, Friedrich M, Bieber K, Kasperkiewicz M, Gross N, Sadik CD, Zillikens D, Schmidt E, Ludwig RJ, Hartmann K (2021): Expression of PD-1 and Tim-3 is increased in skin of patients with bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 35, 486–492
- Fang H, Zhang Y, Li N, Wang G, Liu Z (2018a): The Autoimmune Skin Disease Bullous Pemphigoid: The role of mast cells in autoantibody-induced tissue injury. *Front Immunol* 9, 1–9

- Fang H, Zhang Y, Li N, Wang G, Liu Z (2018b): The autoimmune skin disease bullous pemphigoid: the role of mast cells in autoantibody-induced tissue injury. *Front Immunol* 9, 407
- Fang H, Li Q, Wang G (2020): The role of T cells in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Autoimmun Rev* 19, 102661
- Fritsch P, Schwarz T: *Dermatologie Venerologie*. 3. Auflage; 7-12, 502-505, 517-521, Springer 2018
- Furudate S, Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Aiba S (2014): Comparison of CD163+ CD206+ M2 macrophages in the lesional skin of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris: the possible pathogenesis of bullous pemphigoid. *Dermatology* 229, 369–378
- Fusakio ME, Mohammed JP, Laumonier Y, Hoebe K, Köhl J, Mattner J (2011): C5a regulates NKT and NK cell functions in sepsis. *J Immunol* 187, 5805–5812
- Gambichler T, Tsitlakidon A, Skrygan M, Höxtermann S, Susok L, Hessem S (2017): T regulatory cells and other lymphocyte subsets in patients with bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol* 42, 632–637
- Gao H, Neff TA, Guo R-F, Speyer CL, Sarma JV, Tomlins S, Man Y, Riedemann NC, Hoesel LM, Younkin E, Zetoune FS, Ward PA (2005): Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. *FASEB J* 19, 1003–1005
- Genovese G, Di Zenzo G, Cozzani E, Berti E, Cugno M, Marzano AV (2019): New insights into the pathogenesis of bullous pemphigoid: 2019 update. *Front Immunol* 10, 1506
- Giang J, Seelen MAJ, van Doorn MBA, Rissmann R, Prens EP, Damman J (2018): Complement activation in inflammatory skin diseases. *Front Immunol* 9, 639
- Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA (1993): Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 151, 5742–5750
- Giusti D, Gatouillat G, Le Jan S, Plée J, Bernard P, Antonicelli F, Pham BN (2017): Eosinophil cationic protein (ECP), a predictive marker of bullous pemphigoid severity and outcome. *Sci Rep* 7, 4833
- Goletz S, Zillikens D, Schmidt E (2017): Structural proteins of the dermal-epidermal junction targeted by autoantibodies in pemphigoid diseases. *Exp Dermatol* 26, 1154–1162
- Graauw E de, Sitaru C, Horn M, Borradori L, Yousefi S, Simon H-U, Simon D (2017): Evidence for a role of eosinophils in blister formation in bullous pemphigoid. *Allergy* 72, 1105–1113
- Griffiths C, Barker J, Bleiker T, Chalmers R, Creamer D: *Rook's textbook of dermatology*. Band 2. 9. Auflage; 50.17, Wiley Blackwell 2016
- Haeberle S, Wei X, Bieber K, Goletz S, Ludwig RJ, Schmidt E, Enk AH, Hadaschik EN (2018): Regulatory T-cell deficiency leads to pathogenic bullous pemphigoid antigen 230 autoantibody and autoimmune bullous disease. *J Allergy Clin Immunol* 142, 1831-1842.e7

- Hansen CB, Willer A, Bayarri-Olmos R, Kemper C, Garred P (2019): Expression of complement C3, C5, C3aR and C5aR1 genes in resting and activated CD4+ T cells. *Immunobiology* 224, 307–315
- Heimbach L, Li Z, Berkowitz P, Zhao M, Li N, Rubenstein DS, Diaz LA, Liu Z (2011): The C5a receptor on mast cells is critical for the autoimmune skin-blistering disease bullous pemphigoid. *J Biol Chem* 286, 15003–15009
- Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, Yonemura Y, Komohara Y, Takeya M, Mitsuya H, Ihn H (2010): Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 12, R128
- Hiroyasu S, Turner CT, Richardson KC, Granville DJ (2019): Proteases in pemphigoid diseases. *Front Immunol* 10, 1454
- Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ (2004): Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol* 65, 282–290
- Horst SA, Itzek A, Klos A, Beineke A, Medina E (2015): Differential contributions of the complement anaphylotoxin receptors C5aR1 and C5aR2 to the early innate immune response against staphylococcus aureus infection. *Pathogens* 4, 722–738
- Huang H (2018): Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances. *Sensors (Basel)* 18, 3249
- Imafuku K, Iwata H, Kamaguchi M, Izumi K, Natsuga K, Ujiie H, Nishie W, Shimizu H (2017): Autoantibodies of non-inflammatory bullous pemphigoid hardly deplete type XVII collagen of keratinocytes. *Exp Dermatol* 26, 1171–1174
- Inaoki M, Takehara K (1998): Increased serum levels of interleukin (IL)-5, IL-6 and IL-8 in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 16, 152–157
- Jensen BM, Frandsen PM, Raaby EM, Schiøtz PO, Skov PS, Poulsen LK (2014): Molecular and stimulus-response profiles illustrate heterogeneity between peripheral and cord blood-derived human mast cells. *J Leukoc Biol* 95, 893–901
- Joly P, Roujeau J-C, Benichou J, Picard C, Dreno B, Delaporte E, Vaillant L, D’Incan M, Plantin P, Bedane C, Young P, Bernard P, Bullous Diseases French Study Group (2002): A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 346, 321–327
- Joly P, Baricault S, Sparsa A, Bernard P, Bédane C, Duvert-Lehembre S, Courville P, Bravard P, Rémond B, Doffoel-Hantz V, Bénichou J (2012): Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *J Invest Dermatol* 132, 1998–2004
- Jouen-Beades F, Joly P, Héron F, Paris E, Lauret P, Tron F (1998): Flow cytometry analysis of peripheral blood lymphocytes from patients with bullous pemphigoid. *Dermatology* 197, 137–140
- Kanitakis J (2002): Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12, 390–399

- Karasu E, Demmelmaier J, Kellermann S, Holzmann K, Köhl J, Schmidt CQ, Kalbitz M, Gebhard F, Huber-Lang MS, Halbgebauer R (2020): Complement C5a induces pro-inflammatory microvesicle shedding in severely injured patients. *Front Immunol* 11, 1789
- Karsten CM, Wiese AV, Mey F, Figge J, Woodruff TM, Reuter T, Scurtu O, Kordowski A, Almeida LN, Briukhovetska D, Quell K, Sun J, Ender F, Schmudde I, Vollbrandt T, Laumonier Y, Köhl J (2017): Monitoring C5aR2 expression using a floxed td-tomato-C5aR2 knock-in mouse. *J Immunol* 199, 3234–3248
- Karsten CM, Beckmann T, Holtsche MM, Tillmann J, Tofern S, Schulze FS, Heppe EN, Ludwig RJ, Zillikens D, König IR, Köhl J, Schmidt E (2018): Tissue destruction in bullous pemphigoid can be complement independent and may be mitigated by C5aR2. *Front Immunol* 9, 488
- Kasperkiewicz M, Zillikens D (2007): The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clin Rev Allergy Immunol* 33, 67–77
- Kato Y (2016): Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J Clin Biochem Nutr* 58, 99–104
- Kemper C, Le Friec G (2009): Complement: coming full circle. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57, 393–407
- Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE (2010): Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* 28, 131–155
- Kemper C, West E, Kolev M (2018): Complement and the regulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 36, 309–338
- Kligman AM (2002): What is the 'true' function of skin? *Exp Dermatol* 11, 159–187
- Köhl J (2006): The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 34, 157–176
- Kovtun A, Bergdolt S, Hägele Y, Matthes R, Lambris JD, Huber-Lang M, Ignatius A (2017): Complement receptors C5aR1 and C5aR2 act differentially during the early immune response after bone fracture but are similarly involved in bone repair. *Sci Rep* 7, 14061
- Kridin K, Ludwig RJ (2018): The growing incidence of bullous pemphigoid: overview and potential explanations. *Front Med* 5
- Kridin K, Schwartz N, Cohen AD, Zelber-Sagi S (2018): Mortality in bullous pemphigoid: A systematic review and meta-analysis of standardized mortality ratios. *J Dermatol* 45, 1094–1100
- Kromminga A, Scheckenbach C, Georgi M, Hagel C, Arndt R, Christophers E, Bröcker EB, Zillikens D (2000): Patients with bullous pemphigoid and linear IgA disease show a dual IgA and IgG autoimmune response to BP180. *J Autoimmun* 15, 293–300
- Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P (2004): Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 59, 793–805

- Langan SM, Smeeth L, Hubbard R, Fleming KM, Smith CJP, West J (2008): Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris—incidence and mortality in the UK: population based cohort study. *BMJ* 337, 160–163
- Laumonnier Y, Köhl J, Karsten CM (2017): Novel insights into the expression pattern of anaphylatoxin receptors in mice and men. *Mol Immunol* 89, 44–58
- Lee JJ, Rosenberg HF (Hrsg.): Chapter 13 - Eosinophils in Human Disease. In: *Eosinophils in Health and Disease*. Academic Press, Boston 2013, 431–536
- Li XX, Lee JD, Kemper C, Woodruff TM (2019): The complement receptor C5aR2: a powerful modulator of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 202, 3339–3348
- Li XX, Clark RJ, Woodruff TM (2020): C5aR2 activation broadly modulates the signaling and function of primary human macrophages. *J Immunol* 205, 1102–1112
- Lin L, Hwang B-J, Culton D, Li N, Burette S, Koller B, Messingham K, Fairley J, Lee J, Hall R, An L, Diaz LA, Liu Z (2017): Eosinophils mediate tissue injury in autoimmune skin disease bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 138, 1032–1043
- Liu S-D, Chen W-T, Chi C-C (2020): Association between medication use and bullous pemphigoid: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatol* 156, 891–900
- Liu Y, Li L, Xia Y (2017): BP180 Is critical in the autoimmunity of bullous pemphigoid. *Front Immunol* 8, 1752
- Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, Fairley JA, Till GO, Troy JL, Diaz LA (1995): The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 95, 1539–1544
- Liu Z, Li N, Diaz LA, Shipley M, Senior RM, Werb Z (2005): Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease. *J Clin Invest* 115, 879–887
- Long H, Zhang G, Wang L, Lu Q (2016): Eosinophilic skin diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 50, 189–213
- Ludwig RJ (2019): Bullous pemphigoid: more than one disease? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 33, 459–460
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: *Der Experimentator: Immunologie (Experimentator)*. 4. Auflage; 163-174, Springer Spektrum 2014
- Marazza G, Pham HC, Schärer L, Pedrazzetti PP, Hunziker T, Trüeb RM, Hohl D, Itin P, Lautenschlager S, Naldi L, Borradori L, Autoimmune bullous disease Swiss study group (2009): Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol* 161, 861–868
- Marshall JS (2004): Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 787–799
- Messingham KN, Crowe TP, Fairley JA (2019): The intersection of IgE autoantibodies and eosinophilia in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *Front Immunol* 10, 2331
- Michalaki H, Nicolas JF, Kanitakis J, Machado P, Roche P, Thivolet J (1990): T cells in bullous pemphigoid. Presence of activated CD4+ T cells at the basement membrane zone in pre- and peri-bullous skin. *Reg Immunol* 3, 151–155

- Mihai S, Chiriac MT, Herrero-González JE, Goodall M, Jefferis R, Savage COS, Zillikens D, Sitaru C (2007): IgG4 autoantibodies induce dermal–epidermal separation. *J Cell Mol Med* 11, 1117–1128
- Monk PN, Scola A-M, Madala P, Fairlie DP (2007): Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 152, 429–448
- Mori O, Hachisuka H, Kusuvara M, Sasai Y, Fujiwara S (1994): Bullous pemphigoid in a 19-year-old woman. A case with unusual target antigens. *Br J Dermatol* 130, 241–245
- Mortier E, Ma A, Malynn BA, Neurath MF (2020): Editorial: modulating cytokines as treatment for autoimmune diseases and cancer. *Front Immunol* 11, 608636
- Mosser DM, Edwards JP (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969
- Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB (2019): Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry. *Cytometry A* 95, 647–654
- Murphy KM, Weaver C: *Janeway Immunologie*. 9. Auflage; 7-22, 60-87, 479-488; Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2018
- Nelson KC, Zhao M, Schroeder PR, Li N, Wetsel RA, Diaz LA, Liu Z (2006): Role of different pathways of the complement cascade in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 116, 2892–2900
- Nestor MS, Cochran AJ, Ahmed AR (1987): Mononuclear cell infiltrates in bullous disease. *J Invest Dermatol* 88, 172–175
- O’Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A, Li B, Kampf C, Pontén F, Gallagher WM, Lindskog C (2014): Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol* 8, 783–798
- Orakpoghenor O, Avazi DO, Markus TP, Olaolu OS (2018): A short review of immunochemistry. *Immunogenet* 3, 1000122
- Oswald E, Fisch P, Jakob T, Bruckner-Tuderman L, Martin SF, Rensing-Ehl A (2009): Reduced numbers of circulating $\gamma\delta$ T cells in patients with bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 18, 991–993
- Payne V, Kam PCA (2004): Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 59, 695–703
- Persson MSM, Begum N, Grainge MJ, Harman KE, Grindlay D, Gran S (2022): The global incidence of bullous pemphigoid: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol* 186, 414–425
- Porro AM, Seque CA, Ferreira MCC, Enokihara MMSES (2019): Pemphigus vulgaris. *An Bras Dermatol* 94, 264–278
- Pundir P, MacDonald CA, Kulka M (2015): The novel receptor C5aR2 is required for C5a-mediated human mast cell adhesion, migration and proinflammatory mediator production. *J Immunol* 195, 2774–2787

- Rehg JE, Bush D, Ward JM (2012): The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicol Pathol* 40, 345–374
- Riani M, Muller C, Bour C, Bernard P, Antonicelli F, Le Jan S (2019): Blister fluid induces MMP-9-associated M2-type macrophages in bullous pemphigoid. *Front Immunol* 10, 1858
- Rink L, Kruse A, Haase H: *Immunologie für Einsteiger*. 2. Auflage; 26, 35-37, 142-148, 242; Springer Spektrum 2015
- Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Köhl J, Gerard C, Sarma JV, Ward PA (2008): Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 14, 551–557
- Romeijn TR, Jonkman MF, Knoppers C, Pas HH, Diercks GFH (2017): Complement in bullous pemphigoid: results from a large observational study. *Br J Dermatol* 176, 517–519
- Sadik CD, Schmidt E (2019): Resolution in bullous pemphigoid. *Semin Immunopathol* 41, 645–654
- Sadik CD, Miyabe Y, Sezin T, Luster AD (2018): The critical role of C5a as an initiator of neutrophil-mediated autoimmune inflammation of the joint and skin. *Semin Immunol* 37, 21–29
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010): FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 490–500
- Samavedam UKSRL, Kalies K, Scheller J, Sadeghi H, Gupta Y, Jonkman MF, Schmidt E, Westermann J, Zillikens D, Rose-John S, Ludwig RJ (2013): 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
- Saschenbrecker S, Karl I, Komorowski L, Probst C, Dähnrich C, Fechner K, Stöcker W, Schlumberger W (2019): Serological Diagnosis of Autoimmune Bullous Skin Diseases. *Front Immunol* 10, 1974
- Schiebler TH, Korf H-W: *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflage; 213-217; Steinkopff-Verlag Heidelberg 2007
- Schmidt E, Zillikens D (2011): The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Blistering Skin Diseases. *Dtsch Arztebl Int* 108, 399–405
- Schmidt E, Zillikens D (2013): Pemphigoid diseases. *Lancet* 381, 320–332
- Schmidt E, Zillikens D: Immunfluoreszenztechniken. In: Cerroni L, Garbe C, Metzger D, Kutzner H, Kerl H (Hrsg.): *Histopathologie der Haut* (Springer Reference Medizin). 2. Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2016, 37–49
- Schmidt E, Bastian B, Dummer R, Tony HP, Bröcker EB, Zillikens D (1996a): Detection of elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 288, 353–357

- Schmidt E, Ambach A, Bastian B, Bröcker EB, Zillikens D (1996b): Elevated levels of interleukin-8 in blister fluid of bullous pemphigoid compared with suction blisters of healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 34, 310–312
- Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Bröcker EB, Marinkovich MP, Giudice GJ, Zillikens D (2000a): Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 115, 842–848
- Schmidt E, Obe K, Bröcker EB, Zillikens D (2000b): Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 136, 174–178
- Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Bröcker EB, Zillikens D (2001): The IL-8 release from cultured human keratinocytes, mediated by antibodies to bullous pemphigoid autoantigen 180, is inhibited by dapsone. *Clin Exp Immunol* 124, 157–162
- Schmidt E, della Torre R, Borradori L (2011): Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatol Clin* 29, 427–438, viii–ix
- Schmidt E, Sticherling M, Sárdy M, Eming R, Goebeler M, Hertl M, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Nast A, Orzechowski HD, Pfeiffer C, Schuster V, Sitaru C, Zidane M, Zillikens D, Worm M (2020): S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid: 2019 update. *J Dtsch Dermatol Ges* 18, 516–526
- Schwarm C, Gola D, Holtsche MM, Dieterich A, Bhandari A, Freitag M, Nürnberg P, Toliat M, Lieb W, Wittig M, Franke A, Worm M, Sticherling M, Ehrchen J, Günther C, Gläser R, Peitsch W, Sárdy M, Eming R, Hertl M, Benoit S, Goebeler M, Pföhler C, Kunz M, Kreuter A, van Beek N, Erdmann J, Busch H, Zillikens D, Sadik C, Hirose M, König IR, Schmidt E, Ibrahim SM, German AIBD Study Group (2021): Identification of two novel bullous pemphigoid-associated alleles, HLA-DQA1*05:05 and -DRB1*07:01, in Germans. *Orphanet J Rare Dis* 16, 228
- Seiler DL, Kleingarn M, Kähler KH, Gruner C, Schanzenbacher J, Ehlers-Jeske E, Kenno S, Sadik CD, Schmidt E, Bieber K, Köhl J, Ludwig R, Karsten C (2022): C5aR2 deficiency ameliorates inflammation in murine epidermolysis bullosa acquisita by regulating FcγRIIb expression on neutrophils. *J Invest Dermatol* S0022-202X(22)00001-X
- Sitaru C, Mihai S, Zillikens D (2007): The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Arch Dermatol Res* 299, 1–8
- Ständer S, Hammers CM, Vorobyev A, Schmidt E, Zillikens D, Ghorbanalipour S, Bieber K, Ludwig RJ, Kridin K (2021): The impact of lesional inflammatory cellular infiltrate on the phenotype of bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 35, 1702–1711
- Stern JNH, Keskin DB, Barteneva N, Zuniga J, Yunis EJ, Ahmed AR (2008): Possible role of natural killer cells in pemphigus vulgaris – preliminary observations. *Clin Exp Immunol* 152, 472
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD (2010): IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125, S73–S80

- Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, Shapiro VS, Dubyak GR, Heeger PS, Medof ME (2008): Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* 28, 425–435
- Tabatabaei-Panah P, Moravvej H, Aghaei S, Akbari M, Rajabi S, Kia A, Ebrahimi E, Sadaf Z, Atoon A, Behraves N, Ludwig R, Akbarzadeh R (2020): TH17/IL23 cytokine gene polymorphisms in bullous pemphigoid. *Mol Genet Genomic Med* 8, e1519
- Tanita K, Fujimura T, Sato Y, Lyu C, Aiba S (2018): Minocycline decreases Th2 chemokines from M2 macrophages: possible mechanisms for the suppression of bullous pemphigoid by traditional bullous disease drugs. *Exp Dermatol* 27, 1268–1272
- Tchougounova E, Lundequist A, Fajardo I, Winberg J-O, Abrink M, Pejler G (2005): A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 280, 9291–9296
- Theoharides C, Kalogeromitros D (2006): The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1088, 78–99
- Ujiie H (2019): Regulatory T cells in autoimmune skin diseases. *Exp Dermatol* 28, 642–646
- Ujiie H, Sasaoka T, Izumi K, Nishie W, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Shibaki A, Shimizu H (2014): Bullous pemphigoid autoantibodies directly induce blister formation without complement activation. *J Immunol* 193, 4415–4428
- Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF (2017): CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol* 8, 892
- van Beek, Zillikens D, Schmidt E (2021a): Bullous autoimmune dermatoses—clinical features, diagnostic evaluation, and treatment options. *Dtsch Arztebl Int* 118, 413–420
- van Beek N., Weidinger A, Schneider S w., Kleinheinz A, Gläser R, Holtsche M m., von Georg A, Hammers C m., Hübner F, Lima A-L, Gola D, Sadik C, Zillikens D, Katalinic A, Schmidt E, König IR (2021b): Incidence of pemphigoid diseases in northern germany in 2016 - first data from the Schleswig-Holstein registry of autoimmune bullous diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 35, 1197–1202
- van Beek N, Schwemm N, Schulze F, Recke A, Zillikens D, Schmidt E (2015): Die Serumspiegel von IgE-Antikörpern gegen die immunodominante BP180-NC16A Domäne korrelieren mit der Krankheitsaktivität von Patienten mit bullösem Pemphigoid. *J Dtsch Dermatol Ges* 13, 69–110
- van Beek N, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E (2016): IgE-mediated mechanisms in bullous pemphigoid and other autoimmune bullous diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 12, 267–277
- van Beek N., Lüttmann N, Huebner F, Recke A, Karl I, Schulze FS, Zillikens D, Schmidt E (2017): Correlation of serum levels of IgE autoantibodies against BP180 with bullous pemphigoid disease activity. *JAMA Dermatol* 153, 30–38

- van Beek N, Dähnrich C, Johannsen N, Lemcke S, Goletz S, Hübner F, Di Zenzo G, Dmochowski M, Drenovska K, Geller S, Horn M, Kowalewski C, Medenica L, Murrell DF, Patsatsi A, Uzun S, Vassileva S, Zillikens D, Schlumberger W, Schmidt E (2017): Prospective studies on the routine use of a novel multivariant enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Am Acad Dermatol* 76, 889-894.e5
- van Beek N, Schumacher N, Rose C, Schmidt E, Zillikens D (2020): Moderne Diagnostik bullöser Autoimmundermatosen. *Pathologe* 41, 317–325
- Verghese DA, Demir M, Chun N, Fribourg M, Cravedi P, Llaudo I, Woodruff TM, Yadav P, Lira SA, Medof ME, Heeger PS (2018): T cell expression of C5a receptor 2 augments murine regulatory T cell (TREG) generation and TREG-dependent cardiac allograft survival. *J Immunol* 200, 2186–2198
- Verschoor A, Karsten CM, Broadley SP, Laumonnier Y, Köhl J (2016): Old dogs-new tricks: immunoregulatory properties of C3 and C5 cleavage fragments. *Immunol Rev* 274, 112–126
- Wang L, Wang F-S, Gershwin ME (2015): Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* 278, 369–395
- Wang Y, Zhang H, He Y-W (2019): The complement receptors C3aR and C5aR are a new class of immune checkpoint receptor in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 10, 1574
- Weis WI, Kobilka BK (2018): The molecular basis of G protein-coupled receptor activation. *Annu Rev Biochem* 87, 897–919
- West EE, Kunz N, Kemper C (2020): Complement and human T cell metabolism: location, location, location. *Immunol Rev* 295, 68–81
- Wiese AV, Ender F, Quell KM, Antoniou K, Vollbrandt T, König P, Köhl J, Laumonnier Y (2017): The C5a/C5aR1 axis controls the development of experimental allergic asthma independent of LysM-expressing pulmonary immune cells. *PLoS One* 12, e0184956
- Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC (2013): Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care* 2, 379–388
- Witte M, Zillikens D, Schmidt E (2018): Diagnosis of autoimmune blistering diseases. *Front Med* 5, 296
- Xiong Y, Bosselut R (2012): CD4-CD8 differentiation in the thymus: connecting circuits and building memories. *Curr Opin Immunol* 24, 139–145
- Zhang T, Garstka MA, Li K (2017): The controversial C5a receptor C5aR2: its role in health and disease. *J Immunol Res* 2017, 1–16
- Zhang X, Schmutte I, Laumonnier Y, Pandey MK, Clark JR, König P, Gerard NP, Gerard C, Wills-Karp M, Köhl J (2010): A critical role for C5L2 in the pathogenesis of experimental allergic asthma. *J Immunol* 185, 6741–6752
- Zheng Q, Liang S, Xu F, Li G, Luo N, Wu S, Li Y, Tang M, Zhong Y, Chen J, Yang D, Sun DD, Zhang KQ, Xu GI (2019): C5a/C5aR1 pathway is critical for the pathogenesis of psoriasis. *Front Immunol* 10, 1866

Zheng Q, Xu F, Yang Y, Sun D, Zhong Y, Wu S, Li G, Gao W, Wang T, Xu G, Liang S (2020): C5a/C5aR1 mediates IMQ-induced psoriasiform skin inflammation by promoting IL-17A production from $\gamma\delta$ -T cells. *FASEB J* 34, 10590–10604

Zhou X-P, Liu B, Xu Q, Yang Y, He C-X, Zuo Y-G, Liu Y-H (2016): Serum levels of immunoglobulins G1 and G4 targeting the non-collagenous 16A domain of BP180 reflect bullous pemphigoid activity and predict bad prognosis. *J Dermatol* 43, 141–148

Internet-Quellen:

abcam.com/blocking-for-ihc. <https://www.abcam.com/kits/blocking-for-ihc>; abgerufen am 06.10.2020

abcam.com/chromogenic-detection. <https://www.abcam.com/kits/chromogenic-detection-in-ihc>; abgerufen am 07.10.2020

antikoerper-online.de/1223. <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1223/isotyp-kontrollantikoerper/>; abgerufen am 08.10.2020

bioassusa.com/chromogenic. <https://blog.bioassusa.com/blogs/iggy-the-bioass-dragon/fluorescent-vs-chromogenic-detection-ihc>; abgerufen am 07.10.2020

dianova.com/fab-fragmente. <https://www.dianova.com/faq/affinitaetsgereinigte-monovalente-fab-fragmente/>; abgerufen am 04.11.2020

dianova.com/immunhistochemische-faerbung. <https://www.dianova.com/faq/immunhistochemische-faerbung-von-mausantikoerpern-auf-mausgewebe/>; abgerufen am 04.11.2020

labclinics.com/immunohistochemistry. <https://www.labclinics.com/en/beginners-guide-immunohistochemistry/>; abgerufen am 06.11.2020

labome.com/GPR77. <https://www.labome.com/product/Invitrogen/PA5-33374.html>; abgerufen am 23.11.2020

ptglab.com/ihc-blockierung. <https://www.ptglab.com/de/support/immunohistochemie-protokoll/ihc-blockierung/>; abgerufen am 06.10.2020

rndsystems.com/cell-markers. <https://www.rndsystems.com/resources/cell-markers/immune-cells/granulocytes/neutrophil-cell-markers>; abgerufen am 06.08.2020

9 Materialien

Tabelle 9: Antikörper

Antikörper	Klon	Artikelnummer	Hersteller
Antikörper für Immunfluoreszenz			
polyclonal rabbit anti-human C5aR1	Polyclonal	PA5-33372	Invitrogen, Carlsbad, USA
polyclonal rabbit anti-human C5aR2	Polyclonal	PA5-33374	Invitrogen, Carlsbad, USA
monoclonal mouse anti-human C5/C5a des-Arg	2942	HM2078	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
monoclonal mouse anti-human Myeloperoxidase	392105	MAB3174	R&D Systems, Minneapolis, USA
monoclonal mouse anti-human Tryptase	AA1	M7052	Dako, Glostrup, Dänemark
monoclonal mouse anti-human CD3	F7.2.38	M7254	Dako, Glostrup, Dänemark
monoclonal mouse anti-human CD68	PG-M1	M0876	Dako, Glostrup, Dänemark
monoclonal mouse anti-human Eosinophil Peroxidase	MM25-82.2		Mayo Clinic, Rochester, USA
monoclonal mouse anti human NCAM (CD56)	123C3	3576S	Cell Signal Technology, Danvers, USA
Monoclonal mouse anti human NCAM (CD56)	ERIC1	sc-106	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Sekundäre Antikörper			
Alexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG	-	711-585-152	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse	-	A32723	Thermo Fisher, Waltham, USA
Isotyp-Kontrollen			
normal rabbit IgG	Polyclonal	BE0095	Bio X Cell, Lebanon, USA
mouse IgG1, κ	MG1-45	401401	BioLegend, San Diego, USA
mouse IgG2a, κ	MOPC-173	400201	BioLegend, San Diego, USA
mouse IgG2b	MG2b-57	401201	BioLegend, San Diego, USA
mouse IgG3	MG3-35	401301	BioLegend, San Diego, USA
Weitere Antikörper			
F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG	-	709-006-149	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

Tabelle 10: Chemikalien und Reagenzien

Name	Artikelnummer	Hersteller
Albumin Fraktion V	8076.2	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI Fluoromount -G®	0100-20	SouthernBiotec, Birmingham, USA
EDTA	X986.2	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70%	T913.4	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96%	T171.6	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99,8%	K928.4	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	3783.1	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
HCl	T134.1	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
HCl 32%	1.00313.2500	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	K.300.2	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	9265.1	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4984.1	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Normal donkey serum (NDS)	017-000-121	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Pepsin	003009	TermoFisher, Waltham, USA
Peptid RRLHQEHFPARLQCVVDYGGSSSTEN	-	peptides & elephants GmbH, Hennigsdorf, Deutschland
Proteinase K	1014023	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Roti® Histol	6640.5	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
CaCl ₂	5239.1	ROTH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	C190625	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tri-sodium citrate (dihydrate)	BCBH7324V	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA
Triton X-100	11869.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	MKBQ9465V	Sigma-Aldrich, St- Louis, USA

Tabelle 11: Laborgeräte

Name	Hersteller
10l Messbecher	VITLAB, Grossostheim, Deutschland
-20°C Kühlschrank	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
4°C Kältekammer	Viessmann, Allendorf, Deutschland
4°C Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
-80° C Kühlschrank	TermoFisher, Waltham, USA
Abzug	Erlab, Val-de-Reuil, Frankreich
Dako-pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Dampfgarer HD9140/91	Philips, Amsterdam, Niederlande
Deckgläser 23 x 32 mm	Marienfeld-superior, Lauda Königshofen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Ōsaka, Japan
Heizplatte MR3002	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Magnetrührer	Cole-Parmer, Vernon Hills, USA
Mikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
pH Sonde pH526	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagenzgefäß Safe Seal 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schnellkochtopf 6 l 99276	Elo, Spabrücken, Deutschland
Schraubröhre Reagenz 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thermo Scientific™ SuperFrostPlus™ Adhäsionsobjekträger	ThermoFisher, Waltham, USA
Transferpipetten 1ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Wippschüttler	IKA, Staufen, Deutschland

10 Eigene Veröffentlichungen

- Stahlkopf R:** MD TP64: Investigation of cellular expression of complement receptors C5aR1 and C5aR2 in skin biopsies from patients with bullous pemphigoid. Autumn Retreat des Graduiertenkollegs 1727, 2019.
- Emtenani S, **Stahlkopf R**, Zillikens D, Karsten C, Schmidt E: Cellular expression of complement receptors C5aR1 and C5aR2 in pemphigoid diseases. 47. Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), 4.-6. März 2021.
- Emtenani S, **Stahlkopf R**, Holtsche M, Köhl J, Zillikens D, Karsten C, Schmidt E. Detailed evaluation of complement activation in the skin and blood of patients with pemphigoid diseases. IPPF-Meeting of the International Pemphigus & Pemphigoid Foundation. 19.-21. September 2021.
- Emtenani S, Holtsche M, **Stahlkopf R**, Seiler D, Burn T, Zillikens D, Karsten C, Köhl J, Schmidt E: The C5a/C5a receptor axis as a potential target in bullous pemphigoid. 48. Jahrestreffen der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF). 23.- 26. Februar 2022.
- Emtenani S, Holtsche M, **Stahlkopf R**, Seiler D, Burn T, Liu H, Parker M, Yilmaz K, Dikmen H, Huber Lang M, Zillikens D, Sadik C, Karsten C, van Beek N, Ludwig R, Köhl J, Schmidt E (2022): Differential expression of C5aR1 and C5aR2 in innate and adaptive immune cells located in early skin lesions of bullous pemphigoid patients. *Front Immunol* 13:942493.

11 Danksagungen

Ich danke meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt**, der mir diese Arbeit ermöglicht hat und mich bei der Ausarbeitung unterstützt hatte. Bei den Besprechungen in der Arbeitsgruppe, zu denen ich herzlich eingeladen war, konnte ich das Vortragen wissenschaftlicher Ergebnisse lernen und mein englisches Ausdrucksvermögen trainieren. Bei Problemen und Fragestellungen war mir Prof. Schmidt jederzeit eine Hilfe und konnte mir wertvolle Ratschläge mit auf den Weg geben. Trotz Schwierigkeiten am Anfang wie bei der zunächst schwierigen Suche nach verwendbaren Antikörpern oder nachdem meine erste Mentorin die Arbeitsgruppe nach kurzer Zeit verließ, blieb Prof. Schmidt optimistisch und ermöglichte mir weiterhin die Ausarbeitung meiner Arbeit. Dafür möchte ich mich wiederholt bedanken. Ich habe mich während dieser Zeit gut betreut und unterstützt gefühlt und fühlte mich niemals bei auftretenden Problemen allein. Meiner Mentoren **Dr. rer. nat. Shirin Emtenani** danke ich sehr für die sehr hilfreiche Unterstützung, das nützliche Feedback und stets für mich für Rat und Tat verfügbar zu sein. Sie übernahm mit großer Einsatzbereitschaft die Rolle meiner vorhergehenden Mentorin. Zusammen mit ihr gelang es mir, meine Arbeit in großen Schritten voranzutreiben. Danke Shirin, durch dich verlor mich nicht der Optimismus und das Durchhaltevermögen. Bei **Prof. Dr. rer. nat. Christian Karsten** (ISEF) möchte ich mich für seine Vorarbeit bedanken, auf dessen Erkenntnisse ich aufbauen durfte und der mir bei den Labortreffen wertvolle Ratschläge für meine Arbeit auf den Weg gab. Aus den Arbeiten von **Dr. rer. nat. Lenche Chakievska** und **Dr. rer. nat. Tanya Sezin** konnte ich mir Informationen zum Erlernen und Entwickeln meiner Methodiken beziehen, wofür ich sehr dankbar bin. Bei **Dr. med. Nina van Beek** möchte ich mich herzlich bedanken, die mir durch ihre Recherche geeignete Patientenproben ausgewählt hat, um mein Forschungsziel zu erreichen. Außerdem möchte ich mich bei **Dr. med. Maike Holtsche** herzlich bedanken, die mir eine hilfreiche Ansprechpartnerin und Unterstützung war. Auch **Dr. med. Dr. rer. nat. Christoph Hammers** und **Dr. med. Sascha Ständer** standen für mich immer als Ansprechpartner dankenswerter Weise zur Verfügung. Zum anderen möchte ich mich am gesamten **Team** aus **Haus B9** und **Haus 32** bedanken, die für eine gute und nette Arbeitsatmosphäre sorgten und für meine Freude an der Arbeit beitrugen- es war eine Freude mit euch gemeinsam die Zeit im Labor zu verbringen. Ich möchte auch den Patienten danken, durch deren Einverständnis zur Weiterverwendung ihrer Hautbiopsien, die für die Diagnose ihrer Erkrankung notwendig waren, meine Forschung erst möglich wurde, sowie dem Team aus dem Autoimmunlabor, die sehr hilfsbereit waren und mir bei der Anfertigung meiner Proben geholfen haben. Hier möchte ich auch **Ingeborg Atefi** danken, die mir bei der Auswahl von Bildern für meine Arbeit eine große Unterstützung war. Dass ich meine Forschung

sorgenfrei durchführen konnte, verdanke ich u.a. dem Stipendium durch das **Graduiertenkolleg 1727** unter Leitung von **Prof. Dr. med. Detlef Zillikens** und Management durch **Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt**. Das umfassende Programm dieses Kollegs bot einen Blick über den Tellerrand in andere interessante Forschungsarbeiten und gab mir die Gelegenheit, die Kollegen besser kennenzulernen und eindruckliche Nachmittage und Wochenenden im Rahmen des Kollegs zu verbringen. Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meiner Freundin, die mir verständnisvoll die Zeit für die Ausarbeitung dieser Arbeit gaben und mich in meinem Vorhaben bestärkt haben.