

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie

der

Medizinischen Hochschule Hannover

Die erhöhte Aktivität und Apoptose von eosinophilen  
Granulozyten in der Blasenflüssigkeit, Haut und dem  
peripherem Blut von Patienten mit bullösem Pemphigoid

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

in der

Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von Judith Engmann

aus Langenhagen

Hannover 2019

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 09.03.2020

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuung der Arbeit: Prof.´in Dr. med. Ulrike Raap

1. Referent/in: PD Dr. rer. nat. Matthias Lochner

2. Referent/in: PD Dr. med. Anna-Maria Dittrich

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2020

Prüfungsausschussmitglieder

Vorsitz: Prof. Dr. med. Arnold Ganser

1. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Anibh Das

2. Prüfer/in: Prof.´in Dr. med. Sibylle von Vietinghoff

Für meine Schwester

## Inhaltsverzeichnis

1	Dissertation .....	2
1.1	Originalpublikation .....	2
1.2	Angaben zum Eigenanteil an der Publikation .....	15
2	Zusammenfassung.....	15
2.1	Einleitung.....	15
2.2	Methoden .....	21
2.3	Ergebnisse .....	27
2.4	Diskussion .....	31
3	Kurzzusammenfassung.....	35
4	Abkürzungsverzeichnis .....	38
5	Literaturverzeichnis .....	39
6	Tabellen und Abbildungsverzeichnis.....	46
7	Lebenslauf .....	47
8	Erklärung.....	50
9	Danksagung.....	51

# 1 Dissertation

## 1.1 Originalpublikation

*Acta Dermato-Venereologica*, Volume 97, Number 4, April 2017, pp. 464-471(8)  
Medical Journals Limited  
DOI: <https://doi.org/10.2340/00015555-2581>

## Increased Activity and Apoptosis of Eosinophils in Blister Fluids, Skin and Peripheral Blood of Patients with Bullous Pemphigoid

Judith ENGMANN<sup>1</sup>, Urda RÜDRICH<sup>1</sup>, Georg BEHRENS<sup>2</sup>, Eleni PAPAKONSTANTINO<sup>1</sup>, Manuela GEHRING<sup>1</sup>, Alexander KAPP<sup>1</sup> and Ulrike RAAP<sup>3</sup>

*Departments of <sup>1</sup>Dermatology and Allergy and <sup>2</sup>Clinical Immunology and Rheumatology, Hannover Medical School, Hannover, and <sup>3</sup>University-Department of Dermatology and Allergy, Klinikum Oldenburg, Oldenburg, Germany Germany*

**Bullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering skin disease that is more common in elderly individuals.**

**The aim of this study was to determine the functional activity of eosinophils in patients with BP compared with healthy donors. Blood, skin and blisterderived eosinophils were strongly activated in patients with BP, seen by increased surface expression of CD69 compared with controls. CD11b was also increased in BP blood eosinophils, which may explain the striking accumulation of eosinophils in BP (1×10<sup>6</sup> per ml blister fluid). Furthermore, CCL26 was expressed by activated eosinophils in BP skin and in blister fluid. BP eosinophils also released IL-6, IL-8 and IL-1α in BP blister fluids. Apoptosis in cultivated BP eosinophils was increased and accompanied by enhanced surface externalization**

**of CD95. Caspase 3 positive eosinophils in lesional BP skin and blister fluid also showed the initiation of apoptosis. These results reveal novel pathophysiological aspects of BP, with a strong activation pattern and increased apoptosis of eosinophils in the peripheral blood, skin and blister fluids.**

*Key words:* apoptosis; bullous pemphigoid; CD69; eosinophils, eotaxin.

Accepted Nov 17, 2016; Epub ahead of print Nov 21, 2016 *Acta Derm Venereol* 2017; 97: 464–471.

*Corr:* Ulrike Raap, Director University-Department of Dermatology and Allergy, Klinikum Oldenburg, Rahel-Strauss-Str. 10, DE-26133 Oldenburg, Germany. E-mail: [Raap.ulrike@klinikum-oldenburg.de](mailto:Raap.ulrike@klinikum-oldenburg.de)

**B**ullous pemphigoid (BP) is an autoimmune blistering skin disease that more commonly affects individuals from the age of 60 years. In general, more women than men are affected by BP (1, 2). Clinically, the early phases of BP often show flares, and sometimes additionally wheals with strong pruritus, while in late phases flares are also accompanied by tense blisters (3). The diagnosis of BP is confirmed by positive direct immunofluorescence with linear expression of C3 and IgG at the dermoepidermal junction zone, as well as through positive indirect immunofluorescence with autoantibodies against the hemidesmosomal proteins BP180 and BP230. With

regard to the extracellular membrane of BP180, a genetic predisposition has been detected in HLA-DQB1\*0301 (4). Seventy percent of patients with untreated BP display elevated total IgE levels. In addition, specific IgE antibodies, reacting with the NC16A domain of BP180, have been described (5).

Due to the formation of antigen-antibody complexes a variety of different cytokines, such as IL-6 and IL-8, are released (6). Eotaxin is also secreted by epidermal keratinocytes (7), which has strong chemotactic effects on eosinophils. In patients with BP, characteristic findings are high rates of peripheral blood eosinophils, eosinophil-rich infiltrates in subepidermal blisters (8, 9), and increased numbers of tissue-resident eosinophils in skin lesions (10). This eosinophil accumulation is of particular interest, since eosinophils may contribute to the inflammation associated with BP through their release of chemokines, cytokines, and cytotoxic granule proteins. In other eosinophil-associated skin diseases, including atopic dermatitis and allergic contact eczema, the eosinophil-derived cytotoxic granule protein ECP correlates with disease severity (11–13). MCP-4, ECP, EPO and IL-5 (14, 15) have been detected in blister fluids of BP patients and support the inflammatory response. It has been demonstrated that MMP9 (16), which is released by eosinophils, plays a role in the detachment of the dermal–epidermal junction in BP (17, 18). This study assessed the activation pattern of eosinophils in patients with BP compared with controls.

Furthermore the study explored the cytokine profile of BP eosinophils and compared the apoptotic responses of BP eosinophils with those of healthy controls.

## METHODS

### *Subject groups and patient samples*

BP was defined by specific histopathological observation of subepidermal blistering, a positive indirect and direct immunofluorescence, and detection of specific auto-antibodies related to BP180 and/or BP230 (19). Patients with BP ( $n = 25$ , Table SI1) did not receive systemic immunosuppressive treatment with glucocorticosteroids or diaminodiphenylsulfone or local therapy with glucocorticosteroids for the preceding 4 weeks. Blisters of the skin from patients with BP were punctured immediately after admission, analysed for eosinophil counts (Neubauer chamber) and subsequently processed to perform cytopins ( $1 \times 10^5$  cells/spot). As controls, eosinophils were obtained from the peripheral blood of 10 healthy individuals who were not atopic and had normal total IgE levels and no allergen-specific IgE-antibodies against 10 common aeroallergens. Furthermore, control blister fluids of inpatients with diseases such as bullous erysipiel and phototoxic dermatitis were included (Table SII1). Serum and blister fluids were centrifuged and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Punch biopsies of 3-mm diameter were taken after local anaesthesia. These biopsies were embedded in Tissue-TEK® and frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . For subsequent studies, 5- $\mu\text{m}$  thick slices were placed onto object slides. The study was approved by the medical ethics committee of Hannover Medical School, Germany and patients gave written informed consent.

### *Isolation of peripheral blood eosinophils*

Peripheral blood eosinophils were obtained from heparin-anticoagulated venous blood and prepared following the protocol of Raap et al. (20). Briefly, blood was layered on a Ficoll density

gradient (Biochrom, Berlin, Germany). After discarding the supernatant, pellets were resuspended in lysis buffer. Eosinophils were isolated from the remaining cells by a negative immunomagnetic bead selection with CD16 microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), following the manufacturer's protocol. The purity of the eosinophils was > 98%, as assessed by fluorescenceactivated cell sorting (FACS) analysis (CD66b/CD16) and Kimura staining (21).

The viability was greater than 99%, as assessed by trypan blue dye exclusion. If not otherwise described,  $2 \times 10^5$  eosinophils/200  $\mu$ l were seeded into wells of 96 well plates and cultivated in RPMI 1640 with 10% heat inactivated foetal calf serum (FCS) including 2 mM L-glutamine, 10,000 U/ml penicillin, and 10 mg/ml streptomycin (all Seromed, Biochrom, Berlin, Germany) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### *Double immunofluorescence analysis*

Skin sections and cytopspins from blister fluids were stained following previously described protocols (22). To retrieve the antigen, slides were heated to 80°C in 0.01 M sodium citrate solution, pH 9.0, in a water bath for 30 min. Thereafter, non-specific binding sites were blocked using phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% Triton X-100 (Sigma), 0.02% sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany) and 5% normal goat or normal donkey serum for 1 h at room temperature (RT). Incubation with primary antibodies against targets, diluted in PBS containing 0.5% lambda-carrageenan (Sigma) and 0.02% sodium azide, was carried out at 4°C overnight. After washing in PBS, appropriate secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK) diluted 1:200 in PBS-

carrageenan solution were applied for 2h at RT. After subsequent washing in PBS, cell nuclei were stained for 10 min at RT with DAPI (Sigma) and sections were mounted in anti-quenching medium. To test the specificity of the staining, primary antibodies were replaced by an equivalent amount of non-immune IgG derived from the same species as the specific antibody (negative control). The following antibodies were used: goat polyclonal anti-mouse eotaxin 3/CCL26 antibody (ab83505, Abcam), rabbit polyclonal anti-human caspase 3 antibody (ab13847, Abcam), rabbit polyclonal anti-human major basic protein antibody (MBP, ab187523, Abcam), Mouse monoclonal anti-human CD69 antibody (Clone: FN50, ab51862, Abcam), the respective isotype controls and secondary antibodies. Nuclei staining was performed with DAPI (Abcam). Analysis was performed using an immunofluorescence microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany).

#### *Cytofluorometric analysis of eosinophil surface receptors*

Isolated eosinophils were incubated at 4°C with 100  $\mu$ l blocking buffer (heat inactivated human IgG, gelatin in PBS) for 15 min. Surface antibodies were added, using FITC-conjugated mouse anti-human monoclonal CD95 (clone: UB2, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany), PE-conjugated mouse anti-human monoclonal CD69 (clone: L78, BD Bioscience, San Jose, CA, USA), FITCconjugated anti-human monoclonal CD11b (clone: Bear1, Abcam, Cambridge, UK) and respective IgG1-FITC and IgG2b-PE isotype controls (Beckmann Coulter) in a concentration of 2 ng/ml each. After incubation for 1 h at 4°C, eosinophils were analysed with FACSCalibur (BD Bioscience).

### *Analysis of apoptosis of peripheral blood eosinophils*

Briefly, eosinophils were incubated with Annexin-V and propidium iodide at 4°C for 15 min (BD Bioscience Pharmingen) and analysed by flow cytometry.

### *Chemokine and cytokine measurement*

Using commercially available enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, ECP, CCL11 and CCL26 levels were analysed in blister fluids, serum, and in supernatants from cultivated eosinophils of patients with BP according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Abingdon, UK: CCL26, CCL11, IL-1 $\alpha$ , IL-8; eBioscience Inc., Headquarters, San Diego, CA, USA: IL-6, Thermo Fisher Scientific/Phadia, Freiburg Germany: ImmunoCAP ECP). CD95-ligand levels were analysed in blister fluids and in sera (Abcam). The analysis was performed by the FLUOstar OPTIMA Microplate Reader (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Germany). Detection levels were as follows: IL-6: 3.13–200 pg/ml; IL-1 $\alpha$ , CD95-ligand 1.37–1,000 pg/ml; CCL11: 15.6–1,000 pg/ml; IL-8: 31.25–2,000 pg/ml; CCL26: 62.5–4,000 pg/ml, ECP: 2–200  $\mu$ g/l.

### *Statistical analysis*

All data are presented as means  $\pm$  standard errors of the mean (SEM). Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5. Data were tested for their statistical distribution. Normally distributed data were analysed either with a Student's *t*-test or a one-way analysis of variance (ANOVA)

followed by a Tukey post-test. Non-parametric tests were used for non-normal data. For 2 groups the Wilcoxon rank-sum test or Mann-Whitney test were used, and for more than 2 groups of data the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-test was employed. Two-way ANOVA was used followed by a Bonferroni post-test. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

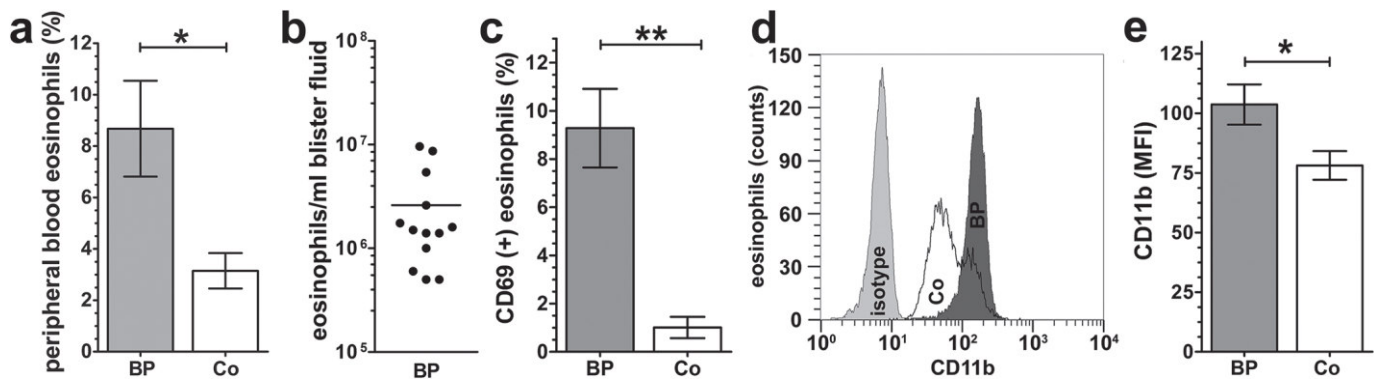
## **RESULTS**

### *Bullous pemphigoid is associated with blood eosinophilia and accumulation of eosinophils in blister fluids*

Eosinophilia has been described as a characteristic of BP (9). The current study confirmed a significant blood eosinophilia in patients with BP in comparison with healthy donors (**Fig. 1a**, *p* < 0.05). Furthermore, this study showed a strong accumulation of eosinophils in blister fluids of BP patients. The blister aspirates contained a striking number of  $2.6 \pm 0.8 \times 10^6$  eosinophils per ml blister fluid in patients with BP (**Fig. 1b**).

### *Increased activation of eosinophils in blood, blister fluid and skin of patients with bullous pemphigoid*

Activation levels of eosinophils from patients with BP were tested by analysing the expression of CD69, which is a well-established marker for eosinophil activation (23). Here, we observed significantly increased expression of CD69 in peripheral blood eosinophils of BP patients compared with healthy controls (**Fig. 1c**, *p* < 0.01).



**Fig. 1. Characterization of eosinophils from patients with bullous pemphigoid (BP).** (a) Human peripheral blood eosinophils from patients with BP (BP) and healthy donors (Co) were counted (BP:  $n = 18$ ; Co:  $n=21$ ; standard error of the mean (SEM); Mann-Whitney test,  $*p < 0.05$ ). (b) Eosinophils in blister fluids of patients with untreated BP were counted and displayed as eosinophils number/ ml blister fluid ( $n = 13$ ). (c) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of CD69-positive eosinophils from patients with BP and healthy donors, isolated from peripheral blood and stained as described in the methods (Mann-Whitney test, BP:  $n = 7$ ; Co:  $n = 9$ ; SEM;  $**p < 0.001$ ) (d–e) Peripheral blood eosinophils from BP and Co were stained with antibodies against CD11b and analysed by FACS. (d) Surface staining of CD11b on freshly isolated eosinophils displayed as a histogram (1 representative out of 6). (e) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD11b expression on eosinophils (Student's test,  $n=7$ ; SEM;  $*p < 0.05$ ).

Furthermore, we investigated the activation pattern of eosinophils in lesional skin and blister fluids using immunofluorescence. To identify eosinophils in the lesional skin and in cytopins, eosinophils were stained with antibodies against MBP, which is a specific marker for eosinophils (24). Distinct expression of CD69 was observed on eosinophils from lesional skin (**Fig. 2a, b, d**) and in blister fluids of patients with BP (**Fig. 2e, g**), whereas isotype control staining was negative (data not shown). In contrast, blister fluids of control patients revealed no eosinophil accumulation and no CD69 positivity (data not shown).

Since eosinophils express at least one of the eotaxins in skin diseases (25) and given that the predominant immune response in BP is of Th2 type (26), we analysed the expression of CCL26 in CD69(+)/ MBP(+) eosinophils. We found CCL26 expression in activated eosinophils in BP lesional skin (**Fig. 3a**) as well as in the respective blister fluid (**Fig. 3b**).

#### *Increased expression of CD11b on peripheral blood eosinophils*

The expression levels of CD11b, a factor involved in the adhesion and transmigration of

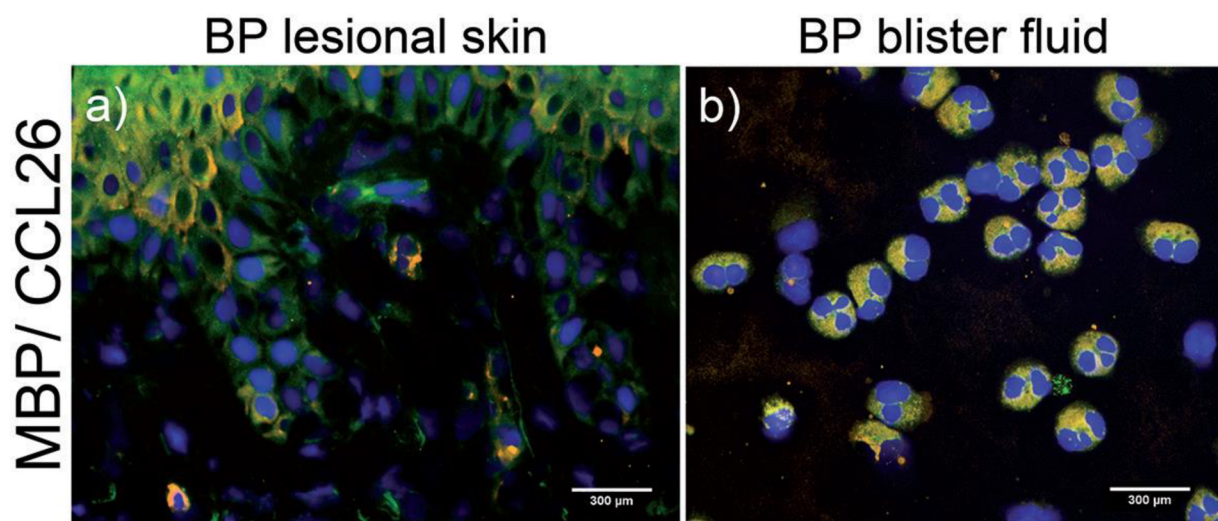
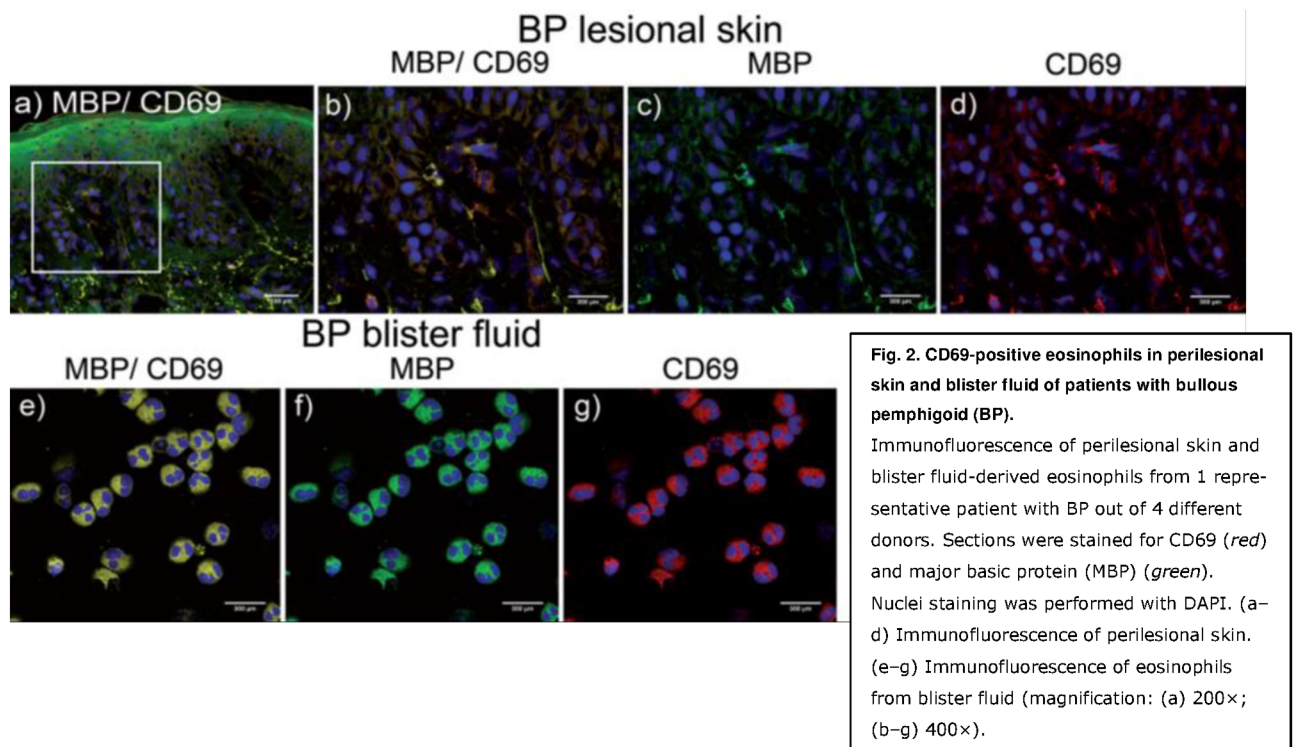
eosinophils (27), were tested to determine whether they were enhanced in eosinophils from BP lesional skin and blister fluids. Surface expression of CD11b was higher on BP eosinophils in comparison with eosinophils from healthy donors (**Fig. 1d–e**,  $p < 0.05$ ). A representative histogram from the FACS analysis is shown in **Fig. 1d**.

#### *High levels of chemokines and cytokines in blister fluids, sera and supernatants from cultured eosinophils in patients with bullous pemphigoid*

As shown above, we demonstrated that BP eosinophils are highly activated in the peripheral blood, skin and blister fluid of patients with BP and tissue-derived CD69- positive eosinophils express CCL26. Various chemokines and cytokines are elevated in blister fluid and sera of patients with BP (14). Therefore, we tested the levels of cytokines and chemokines in blister fluid and sera in comparison with those in the supernatant of cultivated peripheral blood eosinophils from patients with BP. We first cultured  $1 \times 10^6$  peripheral blood eosinophils per ml from patients with BP for 24 h and then analysed the supernatant for cytokine content by ELISA in parallel with cytokine levels in respective blister

and serum fluids. Here, elevated levels of IL-6 ( $p < 0.001$ ), IL-8 ( $p < 0.001$ ), IL-1 $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), CCL11 ( $p < 0.001$ ) and ECP ( $p < 0.05$ ) were detected in the blister fluids compared with sera (Fig. 4a–e). Similar observations were also made regarding CCL26 (Fig. 4f). Comparing blister fluids with supernatants, we found significantly higher levels of IL-6 ( $p < 0.01$ ), IL-8 ( $p < 0.01$ ) and CCL11 ( $p < 0.001$ ) in blister fluids (Fig. 4a,

b, e), whereas ECP levels were higher in supernatants compared with blister fluids ( $p < 0.01$ , Fig. 4d). Comparing sera with supernatants, increased levels of IL-6, IL-1 $\alpha$  and ECP were also found in supernatants, although this increase was not statistically significant (Fig. 4a, c, d.). IL-8 was not detectable in sera. CCL11 and CCL26 levels were both higher in sera than in supernatants (Fig. 4e, f,  $p < 0.05$ ).



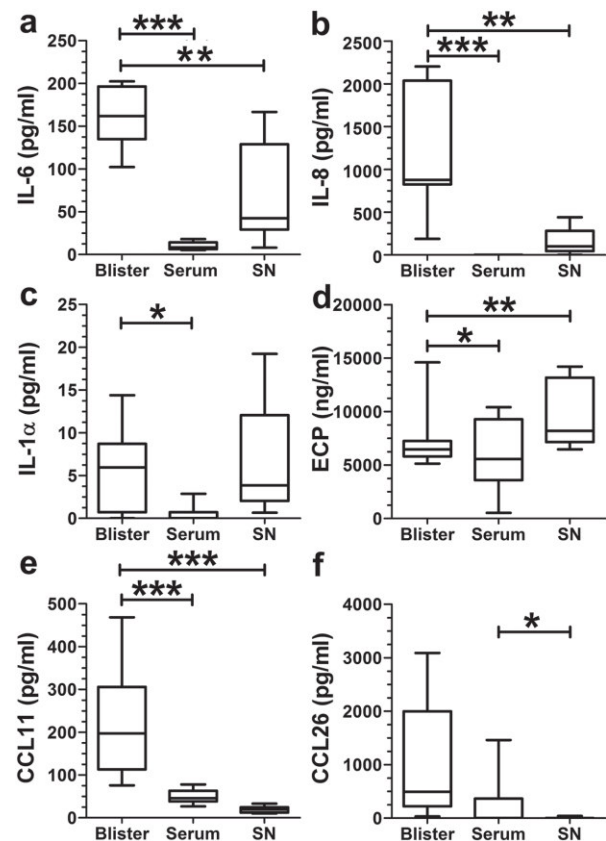
**Fig. 3. Major basic protein (MBP)-positive eosinophils in perilesional skin and blister fluid express CCL26.** Immunofluorescence (IF) of perilesional skin and blister fluid-derived eosinophils from the same patient with bullous pemphigoid in Fig. 2. Sections were stained for CCL26 (yellow) and MBP (green). Nuclei staining was performed with DAPI (blue). IF staining of (a) perilesional skin and (b) eosinophils from blister fluid (magnification: 400 $\times$ )

*Increased apoptosis of peripheral blood eosinophils in patients with bullous pemphigoid*

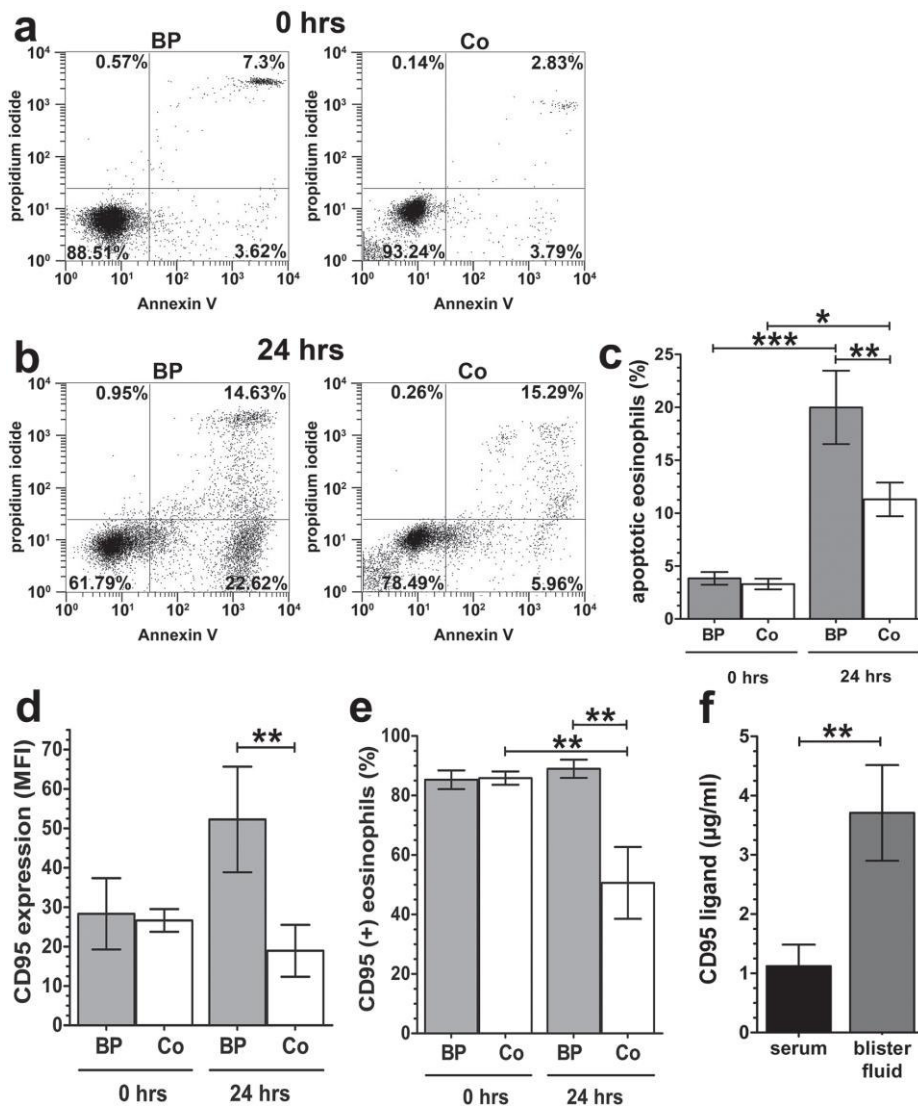
To determine whether the increased number of eosinophils in the peripheral blood of patients with BP display delayed apoptosis, similar to eosinophils from patients with atopic dermatitis (28), we determined the apoptosis of eosinophils from patients with BP in comparison with healthy controls. After 24 h of culture we observed a distinct increase in apoptotic eosinophils in patients with BP compared with healthy controls (Fig. 5b, c,  $p < 0.01$ ), while no significant difference between eosinophils from patients with BP and controls was seen directly after isolation (Fig. 5a, c). Since the CD95 surface receptor and CD95 ligand are members of the signal cascades leading to apoptosis, we investigated the expression of CD95 on peripheral blood eosinophils from patients with BP. We did not find any difference in the expression of CD95 on eosinophils from patients with BP compared with healthy controls directly after isolation, either in terms of mean fluorescence intensity (MFI, Fig. 5d) or in the percentage of CD95(+) eosinophils (Fig. 5e).

However, we did observe significantly higher surface expression of CD95 on blood eosinophils from patients with BP compared with healthy controls after 24 h of culture based on the MFI (Fig. 5d,  $p < 0.05$ ) as well as on the percentage of CD95(+) eosinophils (Fig. 5e). Because of these observations, we measured the concentration of CD95-ligand in blister fluids and sera of patients with BP and found that levels of this ligand were significantly higher in blister fluids in comparison with sera of patients with BP (Fig. 5f,  $p < 0.01$ ).

In contrast, CD95-ligand was not detectable in either control blister fluids or sera (data not shown). Because *in vitro* culture of eosinophils showed increased apoptosis we next analysed the state of apoptosis of eosinophils in BP skin and blister fluid. The expression of caspase 3 is an early sign of apoptosis (29). Therefore, skin biopsies and cytopins of blister fluids from patients with BP were stained with antibodies against MBP and caspase 3. Tissue-resident and blister fluid-derived MBP positive eosinophils were clearly positive for caspase 3 (Fig. 6a–f).



**Fig. 4. Analysis of interleukins and chemokines in blister fluids, serum and supernatant of eosinophils derived from patients with bullous pemphigoid.** Blister fluids, serum samples and supernatants of unstimulated and isolated peripheral blood eosinophils ( $2 \times 10^5$ , 24 h) from untreated patients with BP ( $n = 6-15$ ) were analysed for IL-6 (a), IL-8 (b), IL-1 $\alpha$  (c), ECP (d), CCL11 (e) and CCL26 (f) (SN: supernatants; SEM; 1-way analysis of variance (ANOVA):  $F_{(2/15)} = 25.33$ ,  $p < 0.0001$  (IL-6),  $F_{(2/19)} = 15.50$ ,  $p = 0.0001$  (IL-8),  $F_{(2/16)} = 20.33$ ,  $p < 0.0001$  (CCL11), Tukey *post hoc*, Kruskal-Wallis test:  $p = 0.0151$  (IL-1 $\alpha$ ),  $p = 0.0014$  (ECP),  $p = 0.0129$  (CCL26), Dunn *post hoc*, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Fig. 5. Increased apoptosis in eosinophils from patients with bullous pemphigoid.** Analysis of apoptosis of peripheral blood eosinophils from BP patients (BP) and healthy donors (Co) after isolation (a, 0 h) and cultivation (b, 24 h). One FACS analysis representative for seven individual experiments is displayed. c) Combined results of the FACS analysis illustrating the mean percent of apoptotic eosinophils; BP:  $n = 7$ ; Co:  $n = 8$ ; SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). d) Analysis of CD95 displayed as MFI after isolation (0 h) and 24 h culture ( $n = 6$ ; SEM; \* $p < 0.05$ ). e) Analysis of CD95 expression regarding the percentage of positive eosinophils after isolation (0 h) and 24 h culture ( $n = 6$ ; SEM; \* $p < 0.01$ ). f) Measurement of the CD95 ligand in serum and blister fluids from BP patients ( $n = 14$ ; SEM; \*\* $p < 0.01$ ).

## DISCUSSION

This study shows, for the first time, that eosinophils in sera, blister fluids and the skin of patients with BP are highly activated, as demonstrated by the expression of the activation marker CD69. The study also shows that eosinophils accumulate strongly in blister fluids and that their numbers are increased in the peripheral blood accompanied by elevated CD11b expressions. In addition, tissue and blister eosinophils are positive for eotaxin. Further, increased levels of IL-6, IL-8 and IL-1 $\alpha$  were found in blister fluids of patients with BP. Interestingly, although patients with BP show a strong accumulation of eosinophils in the peripheral blood, skin and blister fluid, these

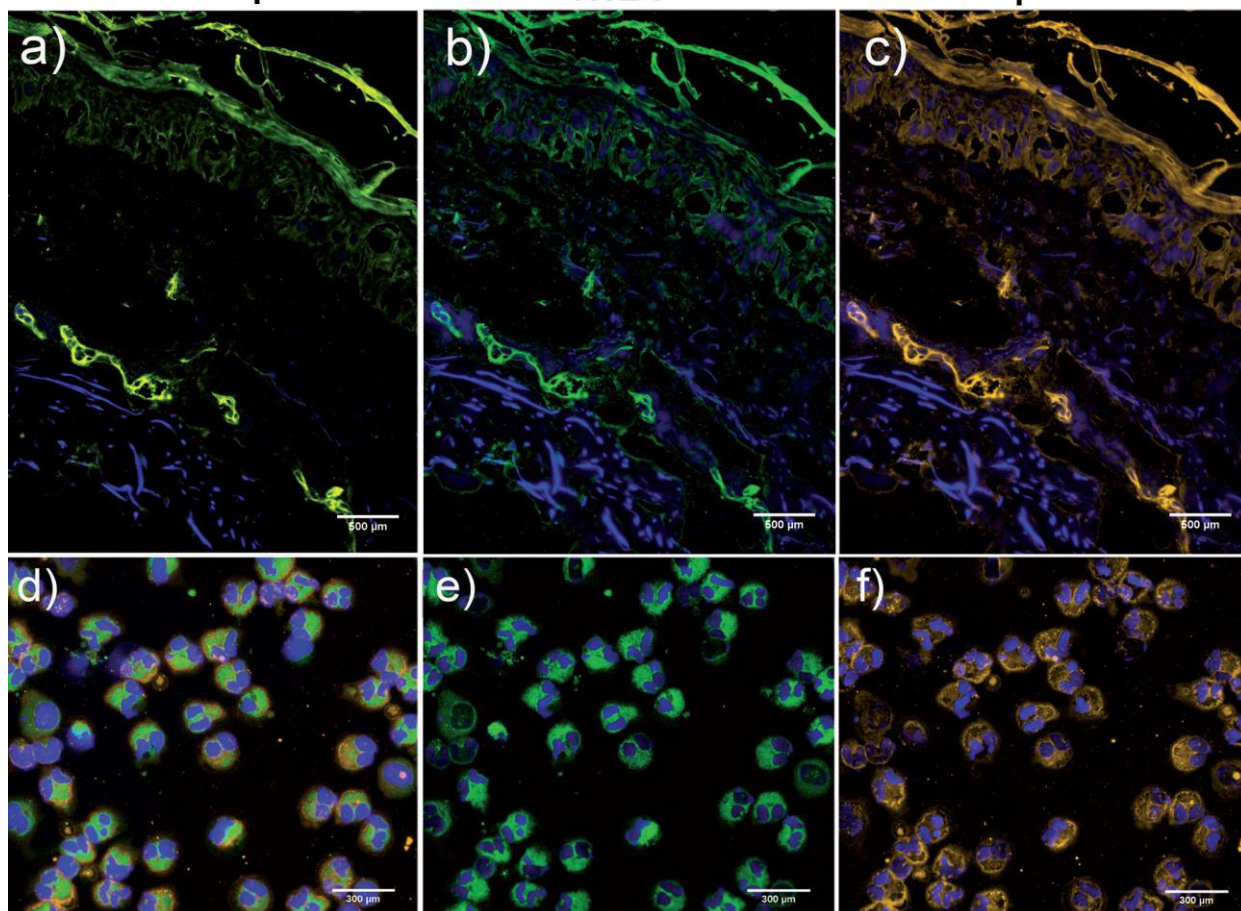
eosinophils display early signs of apoptosis in the skin and blister fluid, as seen by increased caspase 3 expression, as confirmed by externalization of CD95 and increased expression of Annexin V in peripheral blood eosinophils.

In our study we show that approximately 3 million eosinophils accumulate per ml blister fluid in patients with BP. Previously, increased eosinophils have been described only by histology but not by counting eosinophils in blister fluids directly (8). This extensive accumulation of eosinophils has great pathophysiological impact on the local skin inflammation in patients with BP and might be a key causative factor for localized itch.

MBP/ Caspase 3

MBP

Caspase 3



**Fig. 6. Caspase-3-positive eosinophils in perilesional skin (a–c) and blister fluid (d–f).** Immunofluorescence of perilesional skin and blister fluid-derived eosinophils from 1 representative BP patient out of 4 different donors. Sections were stained for Caspase 3 (orange) and MBP (green). Nuclei staining was performed with DAPI (magnification: (a–c) 200×; (d–f) 400×).

Given the accumulation of eosinophils at lesional sites it is interesting that strongly activated peripheral blood eosinophils of patients with BP show increased expression of CD11b, which is involved in the transmigration and adhesion of eosinophils (27). The novelty of the current study is that, in comparison with blister fluids and sera, we also analysed the supernatants of cultured eosinophils derived from the same donor as the blister fluid and sera for cytokine levels, including IL-6, IL-8, CCL11, and 26, ECP and IL-1 $\alpha$  of each patient with BP. We confirmed data by other groups (30, 31) showing high levels of IL-6 and IL-8 in blister fluid and sera of patients with BP. The increased levels of IL-6 and IL-8 in the supernatants of cultivated BP eosinophils show

that eosinophils, in addition to keratinocytes, may have a role in the production of these cytokines in the blister fluids. So far, IL-6 is known to influence the Th1/Th2 differentiation (32) as well as the induction of histamine production (33) and IL-8 is a chemoattractant for neutrophils (34).

The expression of these cytokines is interesting because the development of bullous lesions is dependent on the cutaneous infiltration of activated autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells, eosinophils and neutrophils (4, 35–37).

Our observations regarding increased levels of CCL11 and CCL26 in blister fluids and sera of patients with BP are consistent with other reports (7,38).

The expression of the eosinophil chemoattractants CCL11 by peripheral blood eosinophils and CCL26 by tissue-resident eosinophils seen in our study may explain not only the enhanced accumulation of eosinophils, but also of CD4<sup>+</sup> T cells and neutrophils, in the lesional skin. Since CCL26 blocks the recruitment of Th1 lymphocytes via CCR1 and CCR5, the expression of CCL26 by eosinophils may augment the Th2-immune response in BP (39). ECP is involved in pore formation in target cell membranes (40). Thus, high concentrations of ECP in BP blister fluids and in the BP eosinophil supernatants, as shown in our study, provide further evidence for a pivotal role of eosinophils in BP. In addition, we found low levels of IL-1 $\alpha$  in BP blister fluids, which is in accordance with previously published data (30). Although the concentration in blister fluid was low, the level of IL-1 $\alpha$  expressed by isolated peripheral eosinophils was approximately the same as in the blister fluids. This finding is may be highly relevant in terms of the severity of inflammation and blister formation in patients with BP, given the potent pro-inflammatory actions of IL-1 $\alpha$ , (41). IL-1  $\alpha$  activates gelatinase B (MMP9) (42), which is a critical component of blister formation in patients with BP (43, 44). Gelatinase B is expressed by neutrophils, but also eosinophils (44). Recently, the expression of gelatinase B by eosinophils was described in patients with squamous cell carcinoma, whereas eosinophils from healthy subjects express very low levels of this enzyme (45–47). Since migration to the basement membrane zone in an IgG-dependent manner without split formation was shown for the eosinophil cell line 15HL-60, it would be interesting to analyse gelatinase B expression as a possible causative factor for split

formation in eosinophils from patients with BP. Besides the activation of eosinophils and their cytokine profile, we showed that the number of peripheral blood eosinophils from patients with BP is substantially increased, but they also display higher levels of apoptosis than healthy donor eosinophils. Furthermore, BP peripheral blood eosinophils show an increased surface expression of the cell death receptor CD95 in comparison with healthy donor eosinophils. This finding is interesting, given the fact that in atopic diseases, such as atopic dermatitis, the peripheral blood eosinophilia is associated with an inhibition of apoptosis (48, 49).

This led us to hypothesize that CD95 ligand-mediated apoptosis may play a role in the regulation of eosinophil survival in patients with BP. The activation of the CD95/CD95L signalling cascade is specifically activated by the membrane-bound CD95-ligand (mCD95), which is expressed on cells such as T cells, neutrophils and monocytes (50, 51), but also by the soluble CD95-ligand (sCD95) (50, 52). The concentration of sCD95-ligand in the sera from patients with BP was elevated compared with control patients, providing an explanation for the increased apoptosis of peripheral blood eosinophils in patients with BP compared with controls. The enhanced apoptosis was further confirmed by the expression of caspase 3 in tissue-resident and blister fluid-derived eosinophils of patients with BP.

Eosinophils in sera, skin and blister fluids from patients with BP are highly activated and display increased apoptosis in both blister fluids and skin. Eosinophil accumulation in skin and blisters may be explained by an increased expression of CD11b on peripheral blood eosinophils.

Furthermore, BP eosinophils are able to secrete inflammatory cytokines and granule proteins, which, in turn, modulate the immune reaction in BP. It is notable that the accumulation of eosinophils in BP is not associated with an inhibition of apoptosis, as displayed in other inflammatory skin diseases, such as atopic dermatitis. For upcoming studies, the NC14A knockout mouse model (53), which develops a similar BP phenotype, may be employed to evaluate the modulation of the immune reaction by eosinophils in more detail. Together, the data from this study add novel aspects regarding the functional activity and role of eosinophils in patients with BP.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a DFG grant to Ulrike Raap RA 1026/1-2 as part of the KFO250. Judith Engmann was supported through funds of the Hannover Biomedical Research School DFG, GSC 108. The authors would like to thank S. W. Evers, (University of Oxford) and Professor B. F. Gibbs (University of Kent) for English proof-reading of the manuscript

## REFERENCES

1. Kibsgaard L, Bay B, Deleuran M, Vestergaard C. A retrospective consecutive case-series study on the effect of systemic treatment, length of admission time, and co-morbidities in 98 bullous pemphigoid patients admitted to a tertiary centre. *Acta Derm Venereol* 2015; 95: 307–311.
2. Gambichler T, Segert H, Hoxtermann S, Schmitz L, Altmeyer P, Teegen B. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid: clinical and experimental investigations. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 1758–1762.
3. Raap U, Werfel T. Images in clinical medicine. Bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 2015; 373: 1659.
4. Budinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H, et al. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 1998; 102: 2082–2089.
5. Dimson OG, Giudice GJ, Fu CL, Van den Bergh F, Warren SJ, Janson MM, et al. Identification of a potential effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 784–788.
6. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Brocker EB, Marinkovich MP, et al. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 842–848.
7. Gunther C, Wozel G, Meurer M, Pfeiffer C. Up-regulation of CCL11 and CCL26 is associated with activated eosinophils bullous pemphigoid. *Clin Exp Immunol* 2011; 166: 145–153.
8. Chan YC, Sun YJ, Ng PP, Tan SH. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28: 651–656.
9. Bushkell LL, Jordon RE. Bullous pemphigoid: a cause of peripheral blood eosinophilia. *J Am Acad Dermatol* 1983;8: 648–651.
10. Tsuda S, Miyasato M, Iryo K, Nakama T, Kato K, Sasai Y. Eosinophil phenotypes in bullous pemphigoid. *J Dermatol* 1992; 19: 270–279.
11. Morita H, Yamamoto K, Kitano Y. Elevation of serum major basic protein in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 1995; 9: 165–168.
12. Taniuchi S, Chihara J, Kojima T, Yamamoto A, Sasai M, Kobayashi Y. Serum eosinophil derived neurotoxin may reflect more strongly disease severity in childhood atopic dermatitis than eosinophil cationic protein. *J Dermatol Sci* 2001; 26: 79–82.
13. Czech W, Krutmann J, Schopf E, Kapp A. Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1992; 126: 351–355.
14. D’Auria L, Cordiali Fei P, Ameglio F. Cytokines and bullous pemphigoid. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 123–134.
15. D’Auria L, Pietravalle M, Mastroianni A, Ferraro C, Mussi A, Bonifati C, et al. IL-5 levels in the serum and blister fluid of patients with bullous pemphigoid: correlations with eosinophil cationic protein, RANTES, IgE and disease severity. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 25–27.
16. Stahle-Backdahl M, Inoue M, Guidice GJ, Parks WC. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994; 93: 2022–2030.
17. Briggaman RA, Schechter NM, Fraki J, Lazarus GS. Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1984; 160: 1027–1042.

18. Chorzelski TP, Cormane RH. The presence of complement "bound" in vivo in the skin of patients with pemphigoid. *Dermatologica* 1968; 137: 134–138.
19. Otten JV, Hashimoto T, Hertl M, Payne AS, Sitaru C. Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions. *Curr Mol Med* 2014; 14: 69–95.
20. Raap M, Rudrich U, Stander S, Gehring M, Kapp A, Raap U. Substance P activates human eosinophils. *Exp Dermatol* 2015; 24: 557–559.
21. Kimura I, Moritani Y, Tanizaki Y. Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin Allergy* 1973; 3: 195–202.
22. Guseva D, Angelov DN, Irintchev A, Schachner M. Ablation of adhesion molecule L1 in mice favours Schwann cell proliferation and functional recovery after peripheral nerve injury. *Brain* 2009; 132: 2180–2195.
23. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993; 80: 281–286.
24. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 147–174.
25. Roth N, Stadler S, Lemann M, Hosli S, Simon HU, Simon D. Distinct eosinophil cytokine expression patterns in skin diseases – the possible existence of functionally different eosinophil subpopulations. *Allergy* 2011; 66: 1477–1486.
26. Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 33: 67–77.
27. Jia GQ, Gonzalo JA, Hidalgo A, Wagner D, Cybulsky M, Gutierrez- Ramos JC. Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int Immunol* 1999; 11: 1–10.
28. Wedi B, Raap U, Kapp A. Significant delay of apoptosis and Fas resistance in eosinophils of subjects with intrinsic and extrinsic type of atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 234–235.
29. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99–104.
30. Sun CC, Wu J, Wong TT, Wang LF, Chuan MT. High levels of interleukin-8, soluble CD4 and soluble CD8 in bullous pemphigoid blister fluid. The relationship between local cytokine production and lesional T-cell activities. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1235–1240.
31. Ameglio F, D'Auria L, Bonifati C, Ferraro C, Mastroianni A, Giacalone B. Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationships with disease intensity. *Br J Dermatol* 1998; 138: 611–614.
32. Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002; 39: 531–536.
33. Conti P, Kempuraj D, Di Gioacchino M, Boucher W, Letourneau R, Kandere K, et al. Interleukin-6 and mast cells. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23: 331–335.
34. Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol* 1995 1; 155: 1428–1433.
35. Borrego L, Maynard B, Peterson EA, George T, Iglesias L, Peters MS, et al. Deposition of eosinophil granule proteins precedes blister formation in bullous pemphigoid. Comparison with neutrophil and mast cell granule proteins. *Am J Pathol* 1996; 148: 897–909.
36. Eming R, Budinger L, Riechers R, Christensen O, Bohlen H, Kalish R, et al. Frequency analysis of auto-reactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1279–1282.
37. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 664–671.
38. Kagami S, Kai H, Kakinuma T, Miyagaki T, Kamata M, Sugaya M, et al. High levels of CCL26 in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 249–251.
39. Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 1986; 321: 613–616.
40. Fang SL, Fan TC, Fu HW, Chen CJ, Hwang CS, Hung TJ, et al. A novel cell-penetrating peptide derived from human eosinophil cationic protein. *PLoS One* 2013; 8: e57318.
41. Han YP, Downey S, Garner WL. Interleukin-1alpha-induced proteolytic activation of metalloproteinase-9 by human skin. *Surgery* 2005; 138: 932–939.
42. Liu Z. Bullous pemphigoid: using animal models to study the immunopathology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004; 9: 41–46.
43. Sitaru C. Bullous pemphigoid: a prototypical antibody-mediated organ-specific autoimmune disease. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 822–824.
44. Stahle-Backdahl M, Parks WC. 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 142: 995–1000.
45. Herbert CA, Arthur MJ, Robinson C. Augmentation by eosinophils of gelatinase activity in the airway mucosa: Comparative effects as a putative mediator of epithelial injury. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 667–674.

46. Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M, et al. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 212–219.
47. Messingham KN, Wang JW, Holahan HM, Srikantha R, Aust SC, Fairley JA. Eosinophil localization to the basement membrane zone is autoantibody- and complement-dependent in a human cryosection model of bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 2016; 25: 50–55.
48. Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 536–543.
49. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 1996; 184: 429–440.
50. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 1995; 154: 3806–3813.
51. Serrao KL, Fortenberry JD, Owens ML, Harris FL, Brown LA. Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L298–305.
52. Song E, Chen J, Ouyang N, Su F, Wang M, Heemann U. Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1047–1054.
53. Hurskainen T, Kokkonen N, Sormunen R, Jackow J, Loffek S, Soininen R, et al. Deletion of the major bullous pemphigoid epitope region of collagen XVII induces blistering, autoimmunization, and itching in mice. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 1303–1310.

## **1.2 Angaben zum Eigenanteil an der Publikation**

Diese Arbeit habe ich nach bestem Gewissen und nach guter wissenschaftlicher Praxis und entsprechender Einarbeitung selbstständig durchgeführt. Das Konzept des Projektes wurde mir von Frau Prof. Dr. Ulrike Raap übergeben. Die Einarbeitung in die Methoden erfolgte über die technische Assistentin der AG Raap Frau Gehring. Im Rahmen des Strucmed-Programms habe ich in Vollzeit Versuchsreihen durchgeführt. Die gemeinsame regelmäßige Analyse und Überarbeitung des Versuchsaufbaus führte ich unter Mitbetreuung des Post-Docs Frau Dr. rer. nat. Urda Rüdric. Die Auswertung der Ergebnisse und schlussendlich die Publikation erfolgte als gleichwertige Erstautorin.

## **2 Zusammenfassung**

### **2.1 Einleitung**

Das bullöse Pemphigoid (BP) wurde 1953 erstmals von Lever beschrieben.<sup>(54)</sup> Es handelt sich dabei um eine blasenbildende Autoimmundermatose der Haut und Schleimhaut. Im Gegensatz zu anderen Autoimmundermatosen ist das bullöse Pemphigoid durch einen starken Pruritus, erythematöse Plaques und pralle Blasen charakterisiert. Es tritt meist erst nach Beginn der sechsten Dekade auf. In seltenen Fällen kann sie sich aber auch im Kindesalter manifestieren.<sup>(55)</sup>

Mit einer Inzidenz von 12 - 13,4/1 Mio. ist das bullöse Pemphigoid die häufigste blasenbildende Autoimmundermatose weltweit.<sup>(56,57)</sup>

Durchschnittlich sind mehr Frauen als Männer betroffen. In sehr hohem Alter gleicht sich das Geschlechterverhältnis jedoch an.<sup>(1,2,56)</sup> Oftmals findet sich eine Komorbidität mit anderen Autoimmunerkrankungen wie der Polymyositis oder der Colitis Ulcerosa. Die Mortalitätsrate im ersten Jahr nach Erstdiagnose, ohne Therapie, liegt zwischen 9 - 20 %. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass es sich meist um multimorbide Patienten handelt und nicht allein die Autoimmunerkrankung für die Höhe der Mortalitätsrate verantwortlich gemacht werden kann.<sup>(58)</sup>

Auslöser für das Auftreten des bullösen Pemphigoids können bestimmte Medikamente wie NSARs, ACE-Hemmer, Diuretika oder INHs sein.<sup>(59)</sup> Möglicherweise können sogar UV-Strahlen das bullöse Pemphigoid indizieren.<sup>(60)</sup> Das bullöse Pemphigoid kann auch als eine seltene Form des paraneoplastischen Syndroms auftreten.<sup>(61)</sup>

Eine Assoziation mit dem Haplotyp HLA-DQB1\*0301 für eine genetische Prädisposition konnte gefunden werden.<sup>(4)</sup> In vielen Fällen kommt es zu einem plötzlichen Auftreten der Erkrankung, bei dem keiner der oben genannten Auslöser anamnestisch zutrifft. Eine eindeutige Ursache für das bullöse Pemphigoid wurde bisher somit noch nicht nachgewiesen.

Klinisch zeigt sich eine rezidivierende Bildung praller, fester, mit Flüssigkeit gefüllter Blasen, die auf juckenden Erythemen lokalisiert sind.<sup>(3,62)</sup> Als Prädilektionsstellen lassen sich das untere Abdomen, die Oberschenkelinnenseiten, die Unterarminnenseiten und die Intertrigines nennen. Nach Platzen der Blasen bilden sich Krusten auf den verbleibenden Erosionen. Diese heilen ohne Narbenbildung ab. Zum Schleimhautbefall kommt es bei etwa 10 - 30 % der Patienten.<sup>(63)</sup> Hilfreich bei der Bestätigung der Verdachtsdiagnose sind die Nikolski-Phänomene I und II. Dabei ist ein positives erstes Phänomen beim bullösen Pemphigoid nur in Herdnähe zu beobachten. Ein positives zweites Phänomen tritt generalisiert auf. Auch auf bisher nicht betroffenen Hautarealen.<sup>(64)</sup>

Histologisch zeigt sich die subepidermale Blasenbildung mit Ablösung der Basalmembran und einem entzündlichen Infiltrat. Dabei finden sich am Blasengrund und im Blasenlumen zahlreiche Entzündungszellen. Eosinophile Granulozyten (Eos) machen mit über 50 % den Hauptanteil der Entzündungszellen aus.<sup>(65)</sup>

Als weitere Nachweismethoden wird die Immunfluoreszenz verwendet. Die direkte Immunfluoreszenz weist IgG und C3 mit fluoreszierenden spezifischen Antikörpern entlang der dermo-epidermalen Junctionszone bei 91 % der Patienten mit bullösem Pemphigoid nach. Bei der indirekten Immunfluoreszenz erfolgt der Nachweis von Antikörpern aus Blut, welche im Präparat an die Basalmembran binden. Diese Methode ist bei etwa 96 % der Patienten positiv.<sup>(65)</sup>

Auch Serumuntersuchungen wie der ELISA werden genutzt, um im Blut zirkulierende BP-Antikörper zu bestimmen. Bei etwa 92 % der Patienten mit bullösem Pemphigoid sind diese Tests positiv.<sup>(66)</sup>

Bei etwa 50 % der Patienten lässt sich zudem eine ausgeprägte Eosinophilie im peripheren Blut nachweisen.<sup>(67)</sup>

Der Pathomechanismus des bullösen Pemphigoids ist sehr komplex. Eine hohe Anzahl eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut, eosinophilenreiche Infiltrate in subepidermalen Blasen sowie eine erhöhte Anzahl ins Gewebe eingewanderter eosinophiler Granulozyten in betroffenen Hautarealen sind charakteristisch für das bullöse Pemphigoid.<sup>(8,9,10)</sup>

Bei der Befestigung der untersten Keratinozytenschicht der Epidermis an der Dermis sind die Hemidesmosomen beteiligt. Beim bullösen Pemphigoid kommt es zu einer Bildung von spezifischen IgG- und IgE-Autoantikörpern gegen die extrazelluläre, nichtkollagene Domäne NC16A des hemidesmosomalen, transmembranen Antigens BP 180 und gegen das intrazelluläre Antigen BP 230.<sup>(5, 68)</sup> Die Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes führt zur Ausschüttung von Zytokinen. Die chemotaktisch auf Entzündungszellen wirken.<sup>(6,69)</sup> Vorrangig neutrophile und eosinophile Granulozyten.<sup>(70)</sup> Diese wandern nun in das betroffene Hautareal ein und setzen Proteasen und Entzündungsmediatoren frei. Dies begünstigt die Ablösung der dermo-epidermalen Junctionszone und bedingt die Bildung praller, fester Blasen.<sup>(71)</sup>

Dabei wird auch das Komplementsystem über die Antikörperantigenkomplexe aktiviert. Der Komplementfaktor C3 lässt sich beim Bullösen Pemphigoid häufig in der Basalmembranzzone nachweisen.<sup>(72)</sup> Diese komplexe Entzündungsreaktion kann nur mit Hilfe verschiedenster Mediatoren erfolgen. Diese werden von den Entzündungszellen freigesetzt und lassen sich in Blasenflüssigkeit und im Serum nachweisen und werde

Die eosinophilen Granulozyten sind aufgrund ihrer Eigenschaften potente zytotoxische Zellen. Es sind Zellen der myeloiden Reihe die im Knochenmark ausreifen. Ihr Anteil im peripheren Blut beträgt nur 1 - 4%. Dieser kann aber bei bestimmten Erkrankungen signifikant erhöht sein und ist somit ein wichtiges diagnostisches Kriterium. Die Aufgabe der eosinophilen Granulozyten erklärt sich aus

ihrem hohen Potenzial zur Gewebeschädigung und besteht zu einem Großteil aus der Abwehr von Parasiten.

Eine besondere Bedeutung haben die Eosinophilen bei Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Sie interagieren mit IgE Immunglobulinen über hoch affine  $Fc_\epsilon$ -Rezeptoren. 70 % der Patienten mit unbehandeltem bullösem Pemphigoid zeigen deutlich erhöhte IgE Konzentrationen.<sup>(5)</sup>

Die eosinophilen Granulozyten sind etwa 12 - 15  $\mu\text{m}$  großen Zellen und angereichert mit unzähligen sekretorischen, azidophilen Granula und Lipidkörperchen.

Die Granula sind mit zytotoxischen Proteinen gefüllt. Diese rufen bei ihrer Freisetzung eine starke Zellschädigung hervor.

Eosinophile Granulozyten besitzen eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren, welche zur Interaktion mit Immunglobulinen, Komplementfaktoren, Lipidmediatoren und Adhärenzfaktoren zur Verfügung stehen. Nach der Zellaktivierung steigt der Anteil dieser Rezeptoren stark an.

Jedoch besitzen eosinophile Granulozyten nicht nur zellregulatorische Rezeptoren, sondern produzieren selbst einige Zytokine, meist mit inflammatorischen oder immunmodulatorischen Funktionen.<sup>(14)</sup>

**Tabelle E1:**

<i>Name des Zytokins</i>	<i>beim Bullösen Pemphigoid</i>
--------------------------	---------------------------------

***Zytokine und Rezeptoren: Vorkommen und Funktion beim bullösen Pemphigoid***

IL-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proinflammatorisch</li> </ul>
IL-1 $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• beteiligt an Antikörperproduktion<sup>(6)</sup></li> <li>• Anstoßen der inflammatorischen Signalkaskade<sup>(78)</sup></li> <li>• Korrelation mit Hautläsionen und TNF-alpha Konzentration<sup>(14)</sup></li> <li>• Reguliert die Synthese einiger Komplementfaktoren<sup>(79)</sup></li> <li>• essentiell für die Blasenbildung<sup>(42)</sup></li> </ul>
IL-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in Blasenflüssigkeit, autokrine Stimulation von T-Helferzellen<sup>(73)</sup></li> </ul>
IL-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• moduliert möglicherweise die BP Antigenexpression auf Keratinozyten<sup>(83)</sup></li> </ul>
IL-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• erhöht in Blasenflüssigkeit<sup>(14)</sup></li> <li>• stimuliert mit IL-4 und IL-5 die Proliferation der Eosinophilen<sup>(84)</sup></li> </ul>
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• erhöhte IgE Produktion<sup>(75)</sup></li> </ul>
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• wirkt chemotaktisch und angiogenetisch<sup>(80)</sup></li> <li>• autokrine positive Rückkopplung</li> <li>• korreliert mit Anzahl der Hautläsionen<sup>(31)</sup></li> </ul>
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Korrelation mit ECP in der BF und Hautläsionen<sup>(14)</sup></li> </ul>
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stimuliert Mast-Zell Wachstum<sup>(76)</sup></li> <li>• IgE Produktion</li> </ul>
IL-12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Initiation und Aufrechterhaltung der zur zellulären Abwehr gehörenden T-Helferzell-Immunantwort</li> </ul>
IL-13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anstieg der IgE und IgG4 Sekretion<sup>(77)</sup></li> </ul>
IL-15	<ul style="list-style-type: none"> <li>• transendothelial Migration von T-Zellen<sup>(14)</sup></li> <li>• induzieren eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine</li> </ul>
IL-16	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten<sup>(88)</sup></li> </ul>
IL-31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediator der Zellimmunität</li> <li>• Ausschüttung durch Eos beim bullösen Pemphigoid<sup>(87)</sup></li> </ul>
GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aktiviert Granulozyten in BF und Serum<sup>(6)</sup></li> </ul>
IFN- $\gamma$ (Interferon-gamma)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induziert CD54 Expression</li> <li>• IL-8 und TNF-alpha Rezeptoren werden Hochregulierung</li> <li>• Induziert Ausschüttung von IL-1<sup>(74)</sup></li> </ul>
MIP-1- $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• induzieren Migration und Aktivierung von Eosinophilen<sup>(86)</sup></li> </ul>
OSM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proinflammatorisch<sup>(14)</sup></li> </ul>
RANTES	<ul style="list-style-type: none"> <li>• chemoattraktiv und aktivierend für die Degranulation der eosinophilen Granulozyten<sup>(35)</sup></li> </ul>
TNF-alpha	<ul style="list-style-type: none"> <li>• synergistisch mit IL-5 zur Eosinophilen Rekrutierung und Aktivierung</li> <li>• Korrelation mit der Anzahl der Hautläsionen</li> <li>• verstärkt die Entzündungsreaktion<sup>(81)</sup></li> </ul>

TGF-beta 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• in BF erhöht<sup>(85)</sup></li> <li>• Korreliert signifikant mit IL-4 aus BF<sup>(14)</sup></li> </ul>
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• erhöht in Serum und BF<sup>(82)</sup></li> <li>• Korrelation mit Konzentration von IL-4 in BF<sup>(31)</sup></li> </ul>

Die eosinophilen Granulozyten spielen beim Pathomechanismus des bullösen Pemphigoids eine nicht unerhebliche Rolle. Sie werden anfangs von Keratinozyten in läsionaler Haut durch Eotaxin ins Gewebe gelockt.<sup>(7)</sup> Dieses Zytokin korreliert mit der Anzahl der infiltrierenden Eosinophilen in den betroffenen Hautarealen.

Bei Kontakt mit IgE bzw. anti-IgE kommt es bei den eosinophilen Granulozyten zu einer Degranulation. Die dabei freiwerdenden Mediatoren unterstützen dabei die Blasenbildung in der präläsionalen Haut. Einer dieser Mediatoren ist unter anderem monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4).<sup>(14)</sup>

Beim bullösen Pemphigoid konnte MCP-4 in der Blasenflüssigkeit, in der Epidermis und in den Zellen des inflammatorischen Infiltrats nachgewiesen werden.<sup>(14,15)</sup> Auch ist die MCP-4 Konzentration im Blut beim bullösen Pemphigoid signifikant höher als bei gesunden Kontrollen. Damit erhöht sich die Anzahl der infiltrierenden Zellen deutlich und es kommt zur Aggravierung der Hautsymptomatik. Darüber hinaus wird IL-5 bei der Degranulation freigesetzt. IL-5 ist unter anderem zusammen mit IgE für die Degranulation verantwortlich. Somit regt die Degranulation eines eosinophilen Granulozyten die Degranulation vieler weiterer Eosinophiler an. IL-5 findet sich in besonders hohen Konzentrationen auch in der Blasenflüssigkeit.<sup>(14,15)</sup> Dort übt es einen starken chemoattraktiven Effekt auf Neutrophile, T-Zellen und Eosinophile aus. Als ein direkt zytotoxisches Protein, produzieren Eosinophile zudem ECP. Es wird ebenfalls bei der Degranulation freigesetzt.

Beim bullösen Pemphigoid sind besonders in der Blasenflüssigkeit die ECP Konzentrationen erhöht. In anderen mit eosinophilen Granulozyten assoziierten Hautkrankheiten, wie der atopischen Dermatitis und dem allergischen Kontaktekzem, korrelieren die ECP-Konzentration im Blut mit der Schwere der Erkrankung.<sup>(11-13)</sup>

Eine direkte Beteiligung der eosinophilen Granulozyten bei der Ablösung der dermal-epidermalen Junctionszone konnte mit dem von den Zellen freigesetzten MMP9 Protein gefunden werden.<sup>(16,17,18)</sup> Letztlich hängt somit die Chronifizierung der Erkrankung und das Auftreten der Hautläsionen vom Ausmaß der peripheren

Eosinophilie, der Anzahl der zirkulierenden IgE-Antikörper und der Aktivierung der regulierenden Th2-Zellen ab, welche durch IL-4 und IL-5 gesteuert werden kann.

Diese Studie bewertet die Aktivierungsmuster eosinophiler Granulozyten von Patienten mit bullösem Pemphigoid verglichen mit denen gesunder Kontrollpersonen. Des Weiteren untersuchten wir die Zytokin-Profile der eosinophilen Granulozyten von Patienten mit bullösem Pemphigoid und verglichen das Apoptoseverhalten mit den Eosinophilen gesunder Kontrollen.

## 2.2 Methoden

Die Bestätigung der Erkrankung am bullösen Pemphigoid wurde über die histopathologisch nachgewiesene spezifische subepidermale Blasenbildung, eine positive direkte und indirekte Immunfluoreszenz und die Detektion von spezifischen Autoantikörpern BP180 und/oder BP230 erbracht.<sup>(19)</sup>

Die Patienten mit bullösem Pemphigoid (n = 25) hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme in den vorangegangenen vier Wochen keine systemische immunsuppressive Therapie mit Glucocorticoiden oder Diaminodiphenylsulfon (Dapson) und ebenfalls keine Therapie mit topischen Glucocorticoiden erhalten.

### Tabelle SI1:

#### **Definitionscharakteristika der Patienten mit bullösem Pemphigoid**

Definitionscharakteristika für Patienten mit BP (n = 25). n.a.: nicht gemessen, neg.: negativ, DIF: direkte Immunfluoreszenz, IIF: indirekte Immunfluoreszenz, BF: Blasenflüssigkeit, lin.: linear, DEJ: Dermoepidermale Junktionszone, BM: Basalmembran.

Patient	Alter	Geschlecht	ELISA (U/ml)		Immunhistochemie		Eosinophile	
			BP180	BP230	DIF	IIF	In peripheren Blut(%)	x 10 <sup>6</sup> /ml BF
BP - 1	93	f	221	neg.	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	18.0	1.4
BP - 2	95	f	345	116	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	0.5	n.a.

BP - 3	79	m	267	148	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	11.3	1.1
BP - 5	82	f	121	70	IgG lin. at DEJ	n.a.	n.a.	5.4
BP - 6	93	m	801	80	IgG lin. at DEJ	n.a.	0.9	n.a.
BP - 7	83	f	13	132	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	5.0	0.6
BP - 8	82	f	115	23	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	4.6	0
BP - 9	78	f	3	9	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG + IgA lin. at BM	3.1	0.5
BP - 10	64	m	118	2	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	9.7	0.5
BP - 11	80	f	132	92	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	0.9	1.8
BP - 13	88	f	neg.	neg.	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	0.5	n.a.
BP - 14	71	m	65	27	IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	n.a.	8.7
BP - 15	81	f	37	84	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	7.3	n.a.
BP - 16	92	f	421	139	n.a.	neg.	0	1.4
BP - 17	93	f	201	466	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG+IgA lin. at BM	13.2	9.6
BP - 18	75	f	114	42	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	30.1	n.a.
BP - 19	61	f	174	79	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	11.0	n.a.
BP - 20	95	f	5	11	IgM lin. at DEJ	IgG lin. at BM	14.5	n.a.
BP - 21	73	f	129	4	n.a.	n.a.	16.1	n.a.
BP - 22	79	f	110	92	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	9.5	n.a.
BP - 23	88	f	36	0	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	10.4	2.6
BP - 24	86	m	196	96	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	19.0	1.5
BP - 25	63	m	79	4	C3c, IgG lin. at DEJ	IgG lin. at BM	4.8	n.a.

Die Blasen der Hautläsionen von BP Patienten wurden direkt nach ihrem Auftreten punktiert. Die Zählung der eosinophilen Granulozyten erfolgte mithilfe einer Neubauer Zählkammer. Im Anschluss wurden die Zellen für die Durchführung der Zytospins vorbereitet ( $1 \times 10^5$  Zellen).

Als Kontrollen wurden eosinophile Granulozyten aus peripherem Blut von gesunden Spendern extrahiert. Die Kontrollpersonen hatten keinerlei Vorerkrankungen aus

dem atopischen Formenkreis. Ebenfalls wiesen sie ein normwertiges Gesamt-IgE auf und zeigten keine allergenspezifischen IgE-Antikörper gegen zehn der gängigsten Aeroallergene.

**Tabelle SII2:**

***Definitionsscharkteristika der Kontrollen***

n.a.: nicht gemessen, neg.: negativ, DIF: direkte Immunfluoreszenz, IIF: indirekte Immunfluoreszenz, BF: Blasenflüssigkeit, lin.: linear, DEJ: Dermoepidermale Junktionszone, BM: Basalmembran.

Patient	Alter	Geschlecht	ELISA (U/ml)		Immunhistochemie		Eosinophile		Diagnose
			BP180	BP230	DIF	IIF	Im periphere n Blut(%)	x 10 <sup>6</sup> /ml BF	
K-1	82	f	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3	2	Phototoxische Dermatitis
K-2	43	m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7.2	0	Bullöses Erysipel
K-3	48	f	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.4	0	Bullöses Erysipel
K-4	53	f	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.3	0	Bullöses Erysipel

Als weitere Kontrollen wurden Blasenpunktate aus Blasen von Patienten mit Blasenbildenden Hauterkrankungen, wie dem bullösen Erysipel und der phototoxischen Dermatitis, verwendet.

Seren und Blasenflüssigkeiten wurden nach der Entnahme zentrifugiert und bei -80°C gelagert.

Stanzbiopsien von etwa 3mm Durchmesser wurden unter Lokalanästhesie aus betroffener Haut entnommen. Diese Biopsien wurden in Tissue-TEK® eingebettet und bei -20°C eingefroren. Für anschließende Untersuchungen wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte auf Objektträgern platziert.

Die Studie wurde durch das Komitee für Medizinethik der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigt. Die Patienten gaben, nach Aufklärung, ihre schriftliche Zustimmung.

### ***Isolation der eosinophilen Granulozyten aus peripherem Blut***

Die eosinophilen Granulozyten wurden aus heparinisierem venösem Vollblut gewonnen und nach einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll vorbereitet.<sup>(20)</sup> Das Vollblut wurde mit Hilfe eines Ficoll Dichtegradienten aufgetrennt (Biochrom, Berlin, Deutschland). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die entstandenen Zellpellets in Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und anschließend in PBS gewaschen.

Die eosinophilen Granulozyten wurden unter Verwendung von CD16 Microbeads (Miltenyi; Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), dem Herstellerprotokoll folgend, durch negative immunomagnetische Bead Selektion von den restlichen Zellen separiert. Nach der Separation wurde die Reinheit mit der Kimura-Färbung und der Fluoreszenz aktivierten Zellsortierung (FACS) mittels CD 66b/CD16 überprüft.<sup>(21)</sup> Bei den verwendeten eosinophilen Granulozyten betrug diese über 98 %.

Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung überprüft. Der Wert betrug 99 %.

Wenn im Einzelnen nicht anders beschrieben, wurden  $2 \times 10^5$  Eos/200  $\mu$ l in die Wells einer 96 Well Palette ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kalbsserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin (all Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### ***Doppelte Immunfluoreszenz Analyse***

Hautproben und Zytospins aus Blasenflüssigkeiten wurden nach den zuvor beschriebenen Protokollen gefärbt.<sup>(22)</sup>

Um das Antigen zu demaskieren, wurden die Gewebeschnitte mit einer 0,01 M Natriumzitat-Lösung mit pH 6.0 versetzt und in einem Wasserbad für 30 min bis auf 80 °C erhitzt.

Danach wurden die Bindungsstellen mit einer Phosphatpuffer-Kochsalzlösung (PBS), 0,2 % Triton X-100 n (Sigma), 0,02 % Natriumazid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5 % Ziegen- oder Eselserum blockiert. Dieser Vorgang benötigte 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT).

Eine Inkubation bei 4°C mit dem Primärantikörper gegen die Zielstruktur, gelöst in PBS, welches 0,5 % lambda-carrageenan (Sigma) und 0,02 % Natriumazid beinhaltet, wurde über Nacht durchgeführt. Nach dem Waschen mit PBS wurden ausgewählte Sekundärantikörper (JacksonImmunoResearchEurope, Suffolk, UK), im Verhältnis 1:200 in PBS-carrageenan Lösung gelöst, für zwei Stunden bei RT hinzugegeben. Nach einem anschließenden Waschvorgang mit PBS wurden die Zellkerne für zehn Minuten bei RT mit DAPI (Sigma) gefärbt und teilweise mit Anti-quenching Medium bedeckt. Um die Spezifität der Färbung zu testen, wurden die Primärantikörper mit einer äquivalenten Menge von nicht-immun IgG, gewonnen aus der gleichen Spezies wie der spezifische Antikörper (Negativkontrolle), ersetzt.

Folgende Antikörper wurden verwendet: Ziege polyklonal anti-Maus Eotaxin 3/CCL 26 Antikörper (ab83505, Abcam), Hase polyklonal anti-human Caspase 3 Antikörper (ab13847, Abcam), Hase polyklonal anti-human Major Basic Protein Antikörper (MBP, ab187523, Abcam), Maus monoklonal anti-human CD69 Antikörper (Klon: FN50, ab51862, Abcam), die jeweiligen Isotopenkontrollen und Sekundärantikörper.

Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI (Abcam) durchgeführt. Die Analyse wurde mit einem Immunfluoreszenzmikroskop durchgeführt (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany).

### ***Zytofluometrische Analyse von Oberflächenrezeptoren von Eosinophilen***

Isolierte eosinophile Granulozyten wurden für 15 Minuten mit 100 µl Blockpuffer (hitzeaktiviertes human IgG, Gelatine in PBS) bei 4 °C inkubiert.

Folgende Oberflächenantikörper wurden in einer Konzentration von 2 ng/ml hinzugefügt: FITC-konjugierter Maus anti-human monoklonal CD95 (Klon: UB2, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany), PE-konjugierter Maus anti-human monoklonal CD69 (Klon: L78, BD Bioscience, San Jose, CA, USA), FITC-konjugierter anti-human monoklonal CD11b (Klon: Bear1, Abcam, Cambridge, UK), und die jeweiligen IgG1-FITC und IgG2b-PE Isotypenkontrollen (Beckmann Coulter).

Nach der einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die Eosinophilen mit dem FACS-Calibur (BD Bioscience) analysiert.

### ***Analyse der Apoptose von Eosinophilen aus peripherem Blut***

Für etwa 15 Minuten wurden die eosinophilen Granulozyten mit Annexin-V und Propidiumiodid bei 4 °C inkubiert (BD Bioscience Pharmingen) und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### ***Chemokin und Zytokin Messung***

Hier wurden die kommerziell erwerblichen enzymgebundenen Immunoassay Kits (ELISA) verwendet. Mit diesen wurden die Level von IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, ECP, CCL-11 und CCL 26 in Blasenflüssigkeiten, Seren und Überständen von in Kultur befindlichen eosinophilen Granulozyten von Patienten mit BP, den Herstellerinstruktionen folgend, bestimmt (R&D Systems, Abingdon, UK: CCL 26, CCL 11, IL-1 $\alpha$ , IL-8; eBioscience Inc., Headquarters, San Diego, CA, USA: IL 6, Thermo Fisher Scientific/Phadia, Freiburg, Germany: Immuno (APEP).

Die 95-Ligand Konzentration wurden in Blasenflüssigkeiten und Seren bestimmt (Abcam).

Die Messung wurde mit dem Fluostar OPTIMA Microplate Reader (BMG Labtech GmbH, Ortenburg, Germany) durchgeführt.

Folgende Detektionslevel wurden verwendet: IL 6: 3,13 – 200 pg/ml; IL 1 $\alpha$ , CD 95-Ligand: 1,37- 1.000 pg/ml; CCL 11: 15,6-1.000 pg/ml; IL 8: 31,25-2.000 pg/ml; CCL 26: 62,5-4.000 pg/ml; ECP: 2-200  $\mu$ g/l.

### ***Statistische Analyse***

Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler vom Mittelwert dargestellt (SEM). Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Die Daten wurden auf ihre statistische Verteilung getestet. Normalverteilte Daten wurden entweder mit einem Student's t-test oder einer Einweganalyse der Varianz (ANOVA), gefolgt von einem Tukey Nachtest ausgewertet. Nichtparametrische Tests wurden für nicht normalverteilte Daten verwendet.

Zur Auswertung von zwei Datengruppen wurde der Wilcoxon Rangsummentest oder der Mann-Whitney Test verwendet. Für mehr als zwei Datengruppen nutzten wir den Muskal-Wallis Test, gefolgt vom Benferroni Nachtest. Ein p Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

## 2.3 Ergebnisse

Das bullöse Pemphigoid ist assoziiert mit eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut und mit der Ansammlung Eosinophiler in der Blasenflüssigkeit. Die Eosinophilie im Blut wurde bereits als charakteristisch für das bullöse Pemphigoid definiert.<sup>(9)</sup>

Diese Studie bestätigte, verglichen mit den gesunden Kontrollen, eine signifikante Eosinophilie im peripheren Blut bei Patienten mit BP ( $p < 0,05$ ).

Des Weiteren konnte die Studie starke Ansammlungen von eosinophilen Granulozyten in den Blasenflüssigkeiten der BP Patienten bestätigen. Die Blasenpunktate enthielten eine auffällig hohe Anzahl von Eosinophilen, mit  $2,6 \pm 0,8 \times 10^6$  Zellen pro ml Blasenflüssigkeit.

### ***Vermehrte Zellaktivierung von eosinophilen Granulozyten im Blut, Blasenflüssigkeit und Haut von Patienten mit bullösem Pemphigoid***

Die Aktivierung der eosinophilen Granulozyten von Patienten mit bullösem Pemphigoid wurden durch die Expression von CD69 getestet. CD69 ist bereits ein gut etablierter Marker für die Aktivierung von Eosinophilen.<sup>(23)</sup>

Hiermit konnten wir eine signifikant erhöhte Expression von CD69 bei Eosinophilen aus dem peripheren Blut von Patienten mit BP, im Vergleich zu gesunden Kontrollen ( $p < 0,01$ ) feststellen.

Des Weiteren untersuchten wir die Aktivierungsmuster von eosinophilen Granulozyten in Hautläsionen und Blasenflüssigkeiten durch Immunfluoreszenz.

Um die Eosinophilen aus den Hautläsionen und den Zytospins zu identifizieren, wurden die Zellen mit Antikörpern gegen MBP gefärbt. Dieser Antikörper ist ein spezifischer Marker für eosinophile Granulozyten.<sup>(24)</sup>

Eine deutliche Expression von CD69 konnte bei Eosinophilen aus Hautläsionen beobachtet werden. Zudem bei den Zellen aus den Blasenpunktaten von Patienten mit bullösem Pemphigoid. Die Isotopenkontrollfärbung zeigte sich negativ.

Im Gegensatz dazu zeigten sich in den Blasenflüssigkeiten der gesunden Kontrollen keine Ansammlungen eosinophiler Granulozyten und keine CD69 Positivität.

Da Eosinophile Eotaxine freisetzen, welche in Hauterkrankungen auftreten und unter der Berücksichtigung das die hauptsächliche Immunantwort beim bullösen Pemphigoid von TH2 Lymphozyten vermittelt wird, haben wir die Expression von CCL26, CD69 und MBP positiven eosinophilen Granulozyten analysiert.<sup>(25,26)</sup>

Es zeigte sich eine Expression von CCL26 bei aktivierten Eosinophilen in vom bullösen Pemphigoid befallenen Hautarealen, ebenso wie in den entsprechenden Blasenflüssigkeiten.

### ***Erhöhte Expression von CD11b auf eosinophilen Granulozyten aus peripherem Blut***

CD11b ist bei der Zelladhäsion und -transmigration von Eosinophilen aus dem Blut ins Gewebe beteiligt.<sup>(27)</sup> Die Expressionsniveaus von CD11b wurden getestet, um zu bestimmen, ob die Transmigrationsfähigkeit bei eosinophilen Granulozyten von BP Patienten in Hautläsionen und Blasenflüssigkeiten verstärkt ist. Die Oberflächenexpression von CD11b zeigte sich bei Eosinophilen von BP Patienten höher als bei den eosinophilen Granulozyten gesunder Spender ( $p < 0,05$ ).

### ***Hohe Konzentrationen von Chemokinen und Zytokinen in Blasenflüssigkeiten, Seren und Überständen aus kultivierten eosinophilen Granulozyten von Patienten mit bullösem Pemphigoid***

Wie oben dargestellt konnten wir zeigen, dass Eosinophile aus peripherem Blut von BP Patienten hoch aktiviert sind. CD69 positive eosinophile Granulozyten aus der Haut und Blasenflüssigkeit von Patienten mit bullösem Pemphigoid exprimieren CCL26. Verschiedenste Chemokine und Zytokine finden sich vermehrt in Blasenflüssigkeiten und Seren von BP Patienten.

Auf die Ergebnisse gestützt, testeten wir die Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen in Blasenflüssigkeiten und Seren und verglichen die Ergebnisse mit denen aus den Überständen von kultivierten Eosinophilen aus dem peripheren Blut von BP Patienten.<sup>(14)</sup>

Zunächst wurden  $1 \times 10^6$  Eos von BP Patienten pro ml für 24 h in Medium kultiviert. Danach wurden die Überstände durch ELISA auf das Vorkommen von Zytokinen getestet. Parallel dazu wurden die entsprechenden Blasenflüssigkeiten und Seren analysiert.

In der Blasenflüssigkeit konnten deutlich höhere Konzentrationen von IL-6 ( $p < 0,001$ ), IL-8 ( $p < 0,001$ ), IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), CCL-11 ( $p < 0,001$ ) und ECP ( $p < 0,05$ ) als in den Seren gefunden werden. Ähnliche Beobachtungen konnten wir für CCL-26 machen.

Beim Vergleich der Überstände mit den Blasenflüssigkeiten fanden wir signifikant höhere Konzentrationen von IL-6 ( $p < 0,01$ ), IL-8 ( $p < 0,01$ ) und CCL-11 ( $p < 0,001$ ) in den Blasenflüssigkeiten. Hierbei zeigten sich jedoch die ECP-Konzentration in den Überständen höher als in der Blasenflüssigkeit ( $p < 0,01$ ).

Die Seren mit den Überständen vergleichend, zeigten sich höhere Konzentration von IL-6, IL-1 $\alpha$  und ECP in den Überständen. Diese Erhöhung war nicht statistisch signifikant. IL-8 konnte in den Seren nicht detektiert werden. CCL-11 und CCL-26 wiesen höhere Konzentrationen in den Seren als in den Überständen auf ( $p < 0,05$ ).

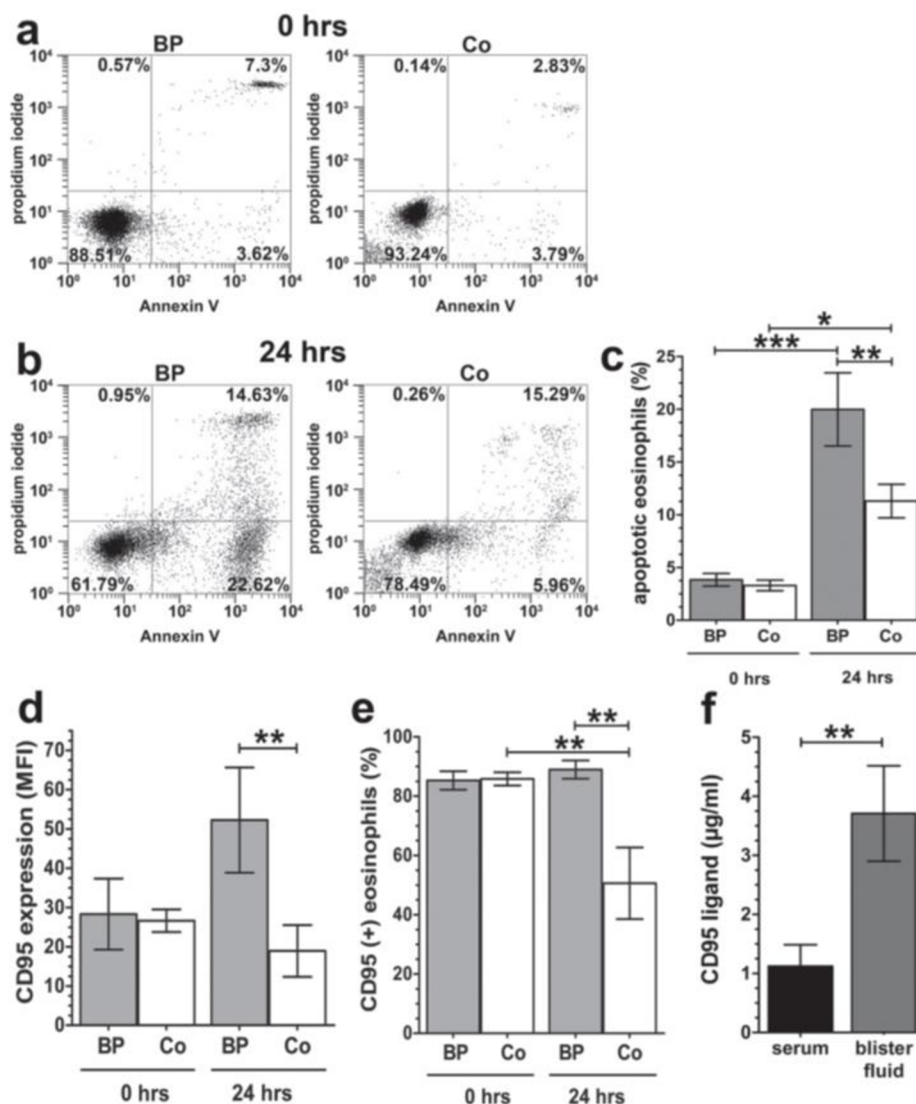
### ***Vermehrte Apoptose von eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit bullösem Pemphigoid***

Bei eosinophilen Granulozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis geht die Eosinophilie mit einer verzögerten Apoptose einher. Um herauszufinden, ob die erhöhte Eosinophilie im peripheren Blut von BP Patienten ebenfalls mit einer verspäteten Apoptose einhergeht, bestimmten wir die apoptotisch gewordenen Zellen von BP Patienten und verglichen diese mit den Eosinophilen von gesunden Kontrollen.<sup>(28)</sup>

Nach 24 h in Zellkultur konnten wir eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotisch gewordener eosinophiler Granulozyten von BP Patienten beobachten ( $p < 0,01$ ).

Direkt nach der Zellisolation zeigte sich zwischen den Proben der Patienten mit bullösem Pemphigoid und denen der gesunden Spender noch kein signifikanter Unterschied der in Apoptose befindlichen Zellen.

Der CD95 Oberflächenrezeptor und der CD95-Ligand leiten die Signalkaskade zur Zellapoptose ein. Deshalb untersuchten wir die Expression von CD95 auf eosinophilen Granulozyten aus dem Blut von BP Patienten. Direkt nach der Zellisolation konnten mittels FACS Analyse keine Unterschiede in der Expression von CD95 zwischen Eosinophilen von BP Patienten und Eosinophilen gesunder Kontrollen gefunden werden. Weder in Bezug auf die mittlere Fluoreszenzintensität, noch beim prozentualen Anteil der CD95 positiven Zellen.



**Abb. 1 Vermehrte Apoptose von eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit bullösem Pemphigoid.**

Analyse der Apoptose von eosinophilen Granulozyten aus peripherem Blut von BP Patienten (BP) und gesunden Kontrollen (Co) nach Isolation (a, 0 h) und Kultivierung (b, 24 h). Darstellung einer FACS Analyse, repräsentativ für sieben individuelle Experimente. c) Kombinierte Ergebnisse der FACS Analyse zur Illustration des mittleren prozentualen Anteils der apoptotischen Eosinophilen; (BP: n=7; Co: n=8; SEM; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). d) Analyse von CD95 dargestellt als MFI nach Isolation (0 h) und 24 h in Kultur; (n =6; SEM; \*p<0.05). e) Analyse von CD95 Expression bezüglich des prozentualen Anteils der dafür positiven eosinophilen Granulozyten nach Isolation (0 h) und 24 h Zellkultur (n=6; SEM; \*p<0.01). f) Messung des CD 95 Ligand in Serum und Blasenflüssigkeit von BP Patienten (n=14; SEM; \*\*p<0.01).

Gegenteilig dazu konnten wir nach 24 h Zellkultur eine signifikant höhere CD95 Expression bei eosinophilen Granulozyten von BP Patienten im Vergleich mit den Eosinophilen gesunder Kontrollen beobachten. Diese Beobachtung basierte ebenfalls auf der mittleren Fluoreszenzintensität ( $p < 0,05$ ) und dem prozentualen Anteil CD95 positiver Eosinophiler.

Aufgrund dieser Erkenntnis bestimmten wir die Konzentrationen des CD95-Liganden in Blasenflüssigkeiten und Seren von BP Patienten. Wir konnten nachweisen, dass der CD95-Ligand in den Blasenflüssigkeiten bei Patienten mit bullösem Pemphigoid signifikant höher vorhanden ist als in den Seren ( $p < 0,01$ ).

Im Gegensatz dazu konnte der CD95-Ligand weder in den Kontrollblasenflüssigkeiten noch in den Kontrollseren detektiert werden.

Da die Eosinophilen in vitro eine deutlich vermehrte Apoptose zeigten, analysierten wir den Apoptosestatus von eosinophilen Granulozyten aus Hautläsionen und Blasenflüssigkeiten von BP Patienten.

Die Expression von Kaspase 3 ist ein frühes Zeichen für die begonnene Apoptose.<sup>(29)</sup> Für diese Untersuchung wurden Hautbiopsien und Zytospins der Blasenflüssigkeiten von Patienten mit bullösem Pemphigoid mit Antikörpern gegen MBP und Kaspase 3 gefärbt. Sowohl die MBP positiven Eosinophilen, welche sich in den Hautbiopsien befanden, als auch die Eosinophilen, welche aus den Blasenflüssigkeiten gewonnen wurden, zeigten sich positiv für Kaspase 3.

## **2.4 Diskussion**

Diese Studie zeigt zum ersten Mal, dass eosinophile Granulozyten in Seren, Blasenflüssigkeiten und der Haut von Patienten mit bullösem Pemphigoid hochgradig aktiviert sind. Dies wird dargestellt über die Expression des Aktivierungsmarkers CD69.

Zudem zeigt die Studie, dass Eosinophile sich besonders in der Blasenflüssigkeiten von Patienten mit bullösem Pemphigoid sammeln und, dass ihre Anzahl, getriggert durch eine erhöhte CD11b Expression, im peripherem Blut ansteigt.

Ebenfalls zeigten sich gewebeständige Eosinophile aus dem Blut positiv für Eotaxin. Des Weiteren zeigten sich erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-8 und IL-1 $\alpha$  in den Blasenflüssigkeiten von Patienten mit bullösem Pemphigoid.

Interessanterweise zeigten die eosinophilen Granulozyten, welche sich besonders in Blut, Haut und Blasenflüssigkeit von Patienten mit bullösem Pemphigoid sammeln, frühe Anzeichen von Apoptose. Besonders die in Blasenflüssigkeit und Haut befindlichen Zellen zeigen dies mit einer erhöhten Kaspase 3 Expression. Dies wird durch die Externalisierung von CD95 und den Anstieg der Annexin Expression bei eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut bestätigt.

In unserer Studie zeigen wir, dass sich bis zu drei Millionen Eosinophile in einem ml Blasenflüssigkeit von Patienten mit bullösem Pemphigoid akkumulieren.

Bisher wurde die Ansammlung von Eosinophilen nur durch ihre Histologie beschrieben und nicht durch direkte Zellauszählung aus der Blasenflüssigkeit.<sup>(8)</sup>

Diese intensive Ansammlung von eosinophilen Granulozyten hat eine große pathophysiologische Auswirkung auf die lokale Entzündungsreaktion bei Patienten mit bullösem Pemphigoid und könnte eine wichtige Ursache für den lokalen Juckreiz darstellen.

Die Akkumulation von Eosinophilen in Hautläsionen berücksichtigend, ist die Beobachtung der hohen Aktivierung der Eosinophilen von BP Patienten in peripherem Blut besonders interessant. Ebenso wie die erhöhte Expression von CD11b, welches bei der Transmigration und Adhäsion von Eosinophilen Granulozyten involviert ist.<sup>(27)</sup>

Ein Novum dieser Studie ist der Vergleich von Blasenflüssigkeiten und Seren sowie die Analyse der Überstände von kultivierten Eosinophilen derselben Spender. Die Höhe der Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-8, CCL-11 und 26, ECP und IL-1 $\alpha$  wurden für jeden BP Patienten analysiert.<sup>(30,31)</sup>

Diese Daten konnten durch die Datenerhebung anderer bestätigt werden, die ebenfalls hohe Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in Blasenflüssigkeiten und Seren bei Patienten mit bullösem Pemphigoid zeigten.

Die erhöhten Konzentration von IL-6 und IL-8 in den Überständen kultivierter Eosinophiler von BP Patienten zeigen, dass Eosinophile zusammen mit den Keratinozyten möglicherweise eine Rolle in der Produktion und Freisetzung der in der Blasenflüssigkeit vorkommenden Zytokine spielen.

Bisher ist bekannt, dass IL-6 die Differenzierung von TH1 und TH2 Lymphozyten und die Induktion der Histaminproduktion beeinflusst.<sup>(32,33)</sup> Zudem wirkt IL-8 chemotaktisch auf neutrophilen Granulozyten.<sup>(34)</sup>

Die Expression dieser Zytokine ist interessant, da die Ausbildung der Blasen und Läsionen abhängig von der Infiltration autoreaktiver CD4+ T-Zellen, eosinophiler und neutrophiler Granulozyten in die Haut ist.<sup>(4,35-37)</sup>

Unsere Beobachtungen bezüglich der erhöhten Konzentrationen von CCL 11 und CCL 26 in den Blasenflüssigkeiten und Seren von Patienten mit bullösem Pemphigoid decken sich mit anderen Untersuchungen.<sup>(7,38)</sup>

Die Expression von Chemotaxinen wie CCL 11 durch Eosinophile aus dem peripheren Blut und CCL 26 von gewebständigen Eosinophilen, wie in unserer Studie dargestellt, könnte nicht nur die vermehrte Akkumulation von Eosinophilen erklären, sondern ebenso die Ansammlung CD4+ T-Zellen und neutrophilen Granulozyten in den Hautläsionen. Da CCL 26 die Rekrutierung von Th1

Lymphozyten über CCR 1 und CCR 5 blockiert, kann die Expression von CCL 26 durch die Eosinophilen die Th2 Immunantwort bei Patienten mit bullösem Pemphigoid verstärken.<sup>(39)</sup>

So können die hohen Konzentrationen von ECP in den Blasenflüssigkeiten von Patienten mit bullösem Pemphigoid und in den Überständen der kultivierten Eosinophilen einen Beweis für die entscheidende Rolle der Eosinophilen beim bullösen Pemphigoid liefern. Wie in unserer Studie gezeigt.<sup>(40)</sup>

Zusätzlich fanden wir niedrige Konzentrationen von IL-1 $\alpha$  in den Blasenflüssigkeiten von BP Patienten. Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein.<sup>(30)</sup>

Obwohl die Konzentration in den Blasenflüssigkeiten nur gering war, waren die exprimierten IL-1 $\alpha$  Konzentration von isolierten peripheren Eosinophilen etwa genauso hoch wie die Konzentration in den Blasenflüssigkeiten. Diese Entdeckung könnte, das hohe proinflammatorische Potenzial von IL-1 $\alpha$  berücksichtigend, für die Schwere der Blasenbildung und Inflammation bei Patienten mit Bullösem Pemphigoid von hoher Relevanz sein.<sup>(41)</sup>

IL-1 $\alpha$  aktiviert die Gelatinase B (MMP9), eine vermutliche Komponente bei der Blasenbildung in Patienten mit bullösem Pemphigoid.<sup>(42,43,44)</sup>

Gelatinase B wird sowohl von neutrophilen Granulozyten als auch von eosinophilen Granulozyten exprimiert.<sup>(44)</sup>

Die Expression von Gelatinase B durch eosinophile Granulozyten bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen wurde beschrieben, wohingegen Eosinophile von gesunden Spendern sehr geringe Mengen dieses Enzyms freisetzen.<sup>(45-47)</sup>

Da die Zellwanderung zur Basalmembran, wie in der Eosinophilen Zellreihe 15HL-60 dargestellt werden konnte, in IgG-Abhängigkeit ohne eine Spaltbildung erfolgt, wäre es interessant, die durch eosinophile Granulozyten freigesetzte Gelatinase B als möglichen kausalen Faktor für die Spaltbildung bei BP Patienten zu analysieren.

Neben der Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und ihrem Zytokinprofil, konnten wir zeigen, dass die Anzahl Eosinophiler im peripheren Blut von BP Patienten wesentlich erhöht ist. Zudem zeigen diese Zellen, verglichen mit den Zellen gesunder Spender, eine höhere Anzahl von apoptotischen Eosinophilen.

Des Weiteren zeigen Eosinophile von BP Patienten im Vergleich zu den eosinophilen Granulozyten gesunder Spender eine vermehrte Oberflächenexpression des Zelltodrezeptors CD95. Dieses Resultat ist sehr interessant, da bei atopischen

Krankheiten, wie z.B. der atopischen Dermatitis, die Ansammlung eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut mit der Inhibition der Apoptose einhergeht.<sup>(48,49)</sup>

Dieses Ergebnis ließ uns die Hypothese aufstellen, dass die durch den CD95-Liganden vermittelte Apoptose möglicherweise eine wichtige Rolle für das Überleben der eosinophilen Granulozyten von Patienten mit bullösem Pemphigoid spielt.

Die Aktivierung der CD95/CD 95-Ligand Signalkaskade wird über eine spezifische Bindung vermittelt. Diese Bindung kann sowohl durch den membranständigen CD95-Liganden (mCD95), welcher von T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird, als auch durch den löslichen CD95 Liganden (sCD95) vermittelt werden.<sup>(50,51,52)</sup>

Die Konzentration von sCD95-Liganden in den Seren der BP Patienten zeigte sich im Vergleich zu Seren gesunder Probanden deutlich erhöht. Dies erklärt die vermehrte Apoptose von eosinophilen Granulozyten im Blut von BP Patienten, verglichen mit den Eosinophilen gesunder Spender.

Die vermehrte Apoptose wurde zudem durch die Expression von Kaspase 3 durch gewebständige Eosinophile von BP Patienten und Eosinophilen aus den Blasenflüssigkeiten von BP Patienten bestätigt.

Zudem sind eosinophile Granulozyten in der Lage inflammatorische Zytokine und Granulaproteine freizusetzen, welche ihrerseits die Immunreaktion beim bullösen Pemphigoid modulieren.

Bemerkenswert ist, dass die Anhäufung der eosinophilen Granulozyten beim bullösen Pemphigoid nicht mit einer Inhibition der Apoptose einhergeht, wie es in anderen entzündlichen Hauterkrankungen, z.B. der atopischen Dermatitis, der Fall ist.<sup>(48)</sup>

In weiterführenden Studien könnte der Einsatz einer NC14A knockout-Maus, welche einen dem bullösen Pemphigoid ähnlichen Phänotyp entwickelt, erwägt werden. Damit könnte der Einfluss der Eosinophilen auf die Immunreaktion im Detail evaluiert werden.<sup>(53)</sup>

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie einen neuen Aspekt in Bezug auf die funktionelle Aktivität und Beteiligung der eosinophilen Granulozyten bei Patienten mit bullösem Pemphigoid.

### **3 Kurzzusammenfassung**

Das bullöse Pemphigoid ist eine akute, als auch chronische blasenbildende Autoimmunerkrankung der Haut, welche bei älteren Menschen ab der sechsten Lebensdekade deutlich häufiger vorkommt als bei Jüngeren.

Die Schwere der Erkrankungen und ihre Prognose hängen maßgeblich vom Therapieansprechen ab.

Der Pathomechanismus des bullösen Pemphigoids, als auch seine Ursachen sind noch nicht endgültig verstanden.

Ein häufiger Befund beim bullösen Pemphigoid ist eine ungewöhnlich hohe Anzahl eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut, die Eosinophilie.

Ob die eosinophilen Granulozyten einen Einfluss auf Schwere und Verlauf des bullösen Pemphigoids ausüben und in welcher Form sie zur Symptomentwicklung beitragen ist ebenfalls noch nicht endgültig erforscht.

Das Ziel dieser Dissertation war es die funktionelle Aktivität von eosinophilen Granulozyten bei Patienten mit bullösem Pemphigoid zu bestimmen und diese mit der Zellaktivität bei gesunden Spendern zu vergleichen.

Hierzu isolierten wir die eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut von 25 Patienten mit bullösem Pemphigoid und 10 gesunden Spendern.

Zudem untersuchten wir Seren und Blasenflüssigkeiten, ebenfalls BP Patienten und gesunde Spender vergleichend, auf Zytokine und Chemokine die eosinophile Granulozyten bei der Degranulation freisetzen.

Zur Komplettierung untersuchten wir Gefrierschnitte von Hautbiopsien von Patienten mit bullösem Pemphigoid.

Wir konnten zeigen das eosinophile Granulozyten in Blut, Haut und Blasenflüssigkeit bei Patienten mit bullösem Pemphigoid besonders stark aktiviert sind. Zudem konnte eine deutlich höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD69 von eosinophilen Granulozyten von BP Patienten als von eosinophilen Granulozyten von gesunden Kontrollen dargestellt werden.

Ferner zeigte sich das zur Zelladhäsion anregende CD11b deutlich erhöht bei eosinophilen Granulozyten aus dem Blut von BP Patienten.

Diese Tatsache kann möglicherweise die erhebliche Ansammlung von eosinophilen Granulozyten in Blasenflüssigkeit von BP Patienten ( $1 \times 10^6$  pro ml Blasenflüssigkeit) erklären.

Einen Hinweis auf die Auswirkung von eosinophilen Granulozyten auf die Ausprägung und den Verlauf des bullösen Pemphigoids konnten wir mit dem Nachweis von CCL 26 in Haut und Blasenflüssigkeit von BP Patienten liefern. CCL 26 wird von aktivierten eosinophilen Granulozyten exprimiert.

Zudem konnten wir zeigen das eosinophile Granulozyten von BP Patienten IL-6, IL-8 und IL-1 $\alpha$  in der Blasenflüssigkeit freisetzen. Diese tragen zum Erhalt der zellulären Entzündungsreaktion in der Haut von BP Patienten bei.

Zur Untersuchung der Apoptoseaktivität nutzten wir die Bestimmung des externalisierten CD95 und von Kaspase 3 Positivität. Hier zeigte sich die Apoptose von kultivierten Eosinophilen von BP Patienten deutlich erhöht. Zudem zeigten die Kaspase 3 positiven Eosinophilen in betroffener Haut von BP Patienten und zugehöriger Blasenflüssigkeit ebenfalls eine beginnende Apoptose.

Diese Ergebnisse liefern neue pathophysiologische Aspekte des bullösen Pemphigoids in Bezug auf ein starkes Aktivierungsmuster von eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut, der Haut und der Blasenflüssigkeit von BP Patienten.

Um den Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf die Immunreaktion bei BP Patienten exakt zu Verstehen und damit gegebenenfalls neue Angriffspunkte für Therapieansätze zu liefern, sind weitere Studien notwendig.



## 4 Abkürzungsverzeichnis

---

ACE	Angiotensin converting enzyme
BP	bullöses Pemphigoid
BF	Blasenflüssigkeit
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
Eos	eosinophile Granulozyten
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
INH	Isonicotinsäurehydrazid
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
RT	Raumtemperatur

---

## 5 Literaturverzeichnis

1. Kibsgaard L, Bay B, Deleuran M, Vestergaard C. A retrospective consecutive case-series study on the effect of systemic treatment, length of admission time, and comorbidities in 98 bullous pemphigoid patients admitted to a tertiary centre. *Acta Derm Venereol* 2015; 95: 307–311.
2. Gambichler T, Segert H, Hoxtermann S, Schmitz L, Altmeyer P, Teegen B. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid: clinical and experimental investigations. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 1758–1762.
3. Raap U, Werfel T. Images in clinical medicine. Bullous pemphigoid. *N Engl J Med* 2015; 373: 1659.
4. Budinger L, Borradori L, Yee C, Eming R, Ferencik S, Grosse-Wilde H, et al. Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls. *J Clin Invest* 1998; 102: 2082–2089.
5. Dimson OG, Giudice GJ, Fu CL, Van den Bergh F, Warren SJ, Janson MM, et al. Identification of a potential effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 784–788.
6. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Brocker EB, Marinkovich MP, et al. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 842–848.
7. Gunther C, Wozel G, Meurer M, Pfeiffer C. Up-regulation of CCL11 and CCL26 is associated with activated eosinophils bullous pemphigoid. *Clin Exp Immunol* 2011; 166: 145–153.
8. Chan YC, Sun YJ, Ng PP, Tan SH. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28: 651–656.
9. Bushkell LL, Jordon RE. Bullous pemphigoid: a cause of peripheral blood eosinophilia. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8: 648–651.
10. Tsuda S, Miyasato M, Iryo K, Nakama T, Kato K, Sasai Y. Eosinophil phenotypes in bullous pemphigoid. *J Dermatol* 1992; 19: 270–279.
11. Morita H, Yamamoto K, Kitano Y. Elevation of serum major basic protein in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 1995; 9: 165–168.

12. Taniuchi S, Chihara J, Kojima T, Yamamoto A, Sasai M, Kobayashi Y. Serum eosinophil derived neurotoxin may reflect more strongly disease severity in childhood atopic dermatitis than eosinophil cationic protein. *J Dermatol Sci* 2001; 26: 79–82.
13. Czech W, Krutmann J, Schopf E, Kapp A. Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1992; 126: 351–355.
14. D’Auria L, Cordiali Fei P, Ameglio F. Cytokines and bullous pemphigoid. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 123–134.
15. D’Auria L, Pietravallo M, Mastroianni A, Ferraro C, Mussi A, Bonifati C, et al. IL-5 levels in the serum and blister fluid of patients with bullous pemphigoid: correlations with eosinophil cationic protein, RANTES, IgE and disease severity. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 25–27.
16. Stahle-Backdahl M, Inoue M, Guidice GJ, Parks WC. 92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994; 93: 2022–2030.
17. Briggaman RA, Schechter NM, Fraki J, Lazarus GS. Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1984; 160: 1027–1042.
18. Chorzelski TP, Cormane RH. The presence of complement “bound” in vivo in the skin of patients with pemphigoid. *Dermatologica* 1968; 137: 134–138.
19. Otten JV, Hashimoto T, Hertl M, Payne AS, Sitaru C. Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions. *Curr Mol Med* 2014; 14: 69–95.
20. Raap M, Rudrich U, Stander S, Gehring M, Kapp A, Raap U. Substance P activates human eosinophils. *Exp Dermatol* 2015; 24: 557–559.
21. Kimura I, Moritani Y, Tanizaki Y. Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin Allergy* 1973; 3: 195–202.
22. Guseva D, Angelov DN, Irintchev A, Schachner M. Ablation of adhesion molecule L1 in mice favours Schwann cell proliferation and functional recovery after peripheral nerve injury. *Brain* 2009; 132: 2180–2195.
23. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993; 80: 281–286.
24. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 147–174.
25. Roth N, Stadler S, Lemann M, Hosli S, Simon HU, Simon D. Distinct eosinophil cytokine expression patterns in skin diseases – the possible existence of functionally different eosinophil subpopulations. *Allergy* 2011; 66: 1477–1486.

26. Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 33: 67–77.
27. Jia GQ, Gonzalo JA, Hidalgo A, Wagner D, Cybulsky M, Gutierrez- Ramos JC. Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int Immunol* 1999; 11: 1–10.
28. Wedi B, Raap U, Kapp A. Significant delay of apoptosis and Fas resistance in eosinophils of subjects with intrinsic and extrinsic type of atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 234–235.
29. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99–104.
30. Sun CC, Wu J, Wong TT, Wang LF, Chuan MT. High levels of interleukin-8, soluble CD4 and soluble CD8 in bullous pemphigoid blister fluid. The relationship between local cytokine production and lesional T-cell activities. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1235–1240.
31. Ameglio F, D’Auria L, Bonifati C, Ferraro C, Mastroianni A, Giacalone B. Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationships with disease intensity. *Br J Dermatol* 1998; 138: 611–614.
32. Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002; 39: 531–536.
33. Conti P, Kempuraj D, Di Gioacchino M, Boucher W, Letourneau R, Kandere K, et al. Interleukin-6 and mast cells. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23: 331–335.
34. Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol* 1995 1; 155: 1428–1433.
35. Borrego L, Maynard B, Peterson EA, George T, Iglesias L, Peters MS, et al. Deposition of eosinophil granule proteins precedes blister formation in bullous pemphigoid. Comparison with neutrophil and mast cell granule proteins. *Am J Pathol* 1996; 148: 897–909.
36. Eming R, Budinger L, Riechers R, Christensen O, Bohlen H, Kalish R, et al. Frequency analysis of autoreactive T-helper 1 and 2 cells in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1279–1282.
37. Sitaru C, Schmidt E, Petermann S, Munteanu LS, Brocker EB, Zillikens D. Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 664–671.

38. Kagami S, Kai H, Kakinuma T, Miyagaki T, Kamata M, Sugaya M, et al. High levels of CCL26 in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 249–251.
39. Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 1986; 321: 613–616.
40. Fang SL, Fan TC, Fu HW, Chen CJ, Hwang CS, Hung TJ, et al. A novel cell-penetrating peptide derived from human eosinophil cationic protein. *PLoS One* 2013; 8: e57318.
41. Han YP, Downey S, Garner WL. Interleukin-1alpha-induced proteolytic activation of metalloproteinase-9 by human skin. *Surgery* 2005; 138: 932–939.
42. Liu Z. Bullous pemphigoid: using animal models to study the immunopathology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004; 9: 41–46.
43. Sitaru C. Bullous pemphigoid: a prototypical antibody-mediated organ-specific autoimmune disease. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 822–824.
44. Stahle-Backdahl M, Parks WC. 92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 142: 995–1000.
45. Herbert CA, Arthur MJ, Robinson C. Augmentation by eosinophils of gelatinase activity in the airway mucosa: Comparative effects as a putative mediator of epithelial injury. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 667–674.
46. Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M, et al. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 212–219.
47. Messingham KN, Wang JW, Holahan HM, Srikantha R, Aust SC, Fairley JA. Eosinophil localization to the basement membrane zone is autoantibody- and complement-dependent in a human cryosection model of bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 2016; 25: 50–55.
48. Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 536–543.
49. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 1996; 184: 429–440.
50. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 1995; 154: 3806–3813.

51. Serrao KL, Fortenberry JD, Owens ML, Harris FL, Brown LA. Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L298–305.
52. Song E, Chen J, Ouyang N, Su F, Wang M, Heemann U. Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1047–1054.
53. Hurskainen T, Kokkonen N, Sormunen R, Jackow J, Loffek S, Soininen R, et al. Deletion of the major bullous pemphigoid epitope region of collagen XVII induces blistering, autoimmunization, and itching in mice. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 1303–1310.
54. Lever WF Pemphigus (1953) *Medicine* 32: 1- 123.
55. Santos AL1, Mota AV, Ramon J, Lopes JM, Azevedo F. An Infant with bullous pemphigoid. *Dermatol Online J.* 2007 Jul 13;13(3):17.
56. Marazza G1, 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 Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *Br J Dermatol.* 2009 Oct;161(4):861-8.
57. Jung M1, Kippes W, Messer G, Zillikens D, Rzany B. Increased risk of bullous pemphigoid in male and very old patients: A population-based study on incidence. *J Am Acad Dermatol.* 1999 Aug;41(2 Pt 1):266-8.
58. Cortés B1, Marazza G, Naldi L, Combescure C, Borradori L; Autoimmune Bullous Disease Swiss Study Group Mortality of bullous pemphigoid in Switzerland: a prospective study. *Br J Dermatol.* 2011 Aug;165(2):368-74.
59. Bastuji-Garin S1, Joly P, Picard-Dahan C, Bernard P, Vaillant L, Pauwels C, Salagnac V, Lok C, Roujeau JC Drugs associated with bullous pemphigoid. A case-control study. *Arch Dermatol.* 1996 Mar;132(3):272-6.
60. Rakvit P1, Kerr AC, Ibbotson SH Localized bullous pemphigoid induced by photodynamic therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2011 Oct;27(5):251-3 .
61. Klein T1, Rotterdam S, Noldus J, Hinkel A. Bullous pemphigoid is a rare paraneoplastic syndrome in patients with renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(4):334-6.
62. Di Zenzo G1, Marazza G, Borradori L. Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol.* 2007;23:257-88.
63. Kneisel A., Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 1: Clinical manifestations. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011 Oct;9(10):844-56.
64. Wolfram Sterry, Walter Burgdorf, Ralf Paus: Checkliste Dermatologie. 6. Auflage. Thieme, Stuttgart, New York 2010, ISBN 978-3-13-697006-5, S. 241.

65. Chan YC<sup>1</sup>, Sun YJ, Ng PP, Tan SH. Comparison of immunofluorescence microscopy, immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay methods in the laboratory diagnosis of bullous pemphigoid. *Clin Exp Dermatol*. 2003 Nov;**28**(6):651-6.
66. Barnadas MA<sup>1</sup>, Rubiales MV, González MJ, Puig L, García P, Baselga E, Pujol R, Alomar A, Gelpí C. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence testing in a bullous pemphigoid and pemphigoid gestationis. *Int J Dermatol*. 2008 Dec;**47**(12):1245-9.
67. Bushkell L.L., Jordon R.E. Bullous pemphigoid: a cause of peripheral blood eosinophilia. *J Am Acad Dermatol*. 1983 May;**8**(5):648-51.
68. Fairley JA<sup>1</sup>, Burnett CT, Fu CL, Larson DL, Fleming MG, Giudice GJ. A pathogenic role for IgE in autoimmunity: bullous pemphigoid IgE reproduces the early phase of lesion development in human skin grafted to nu/nu mice. *J Invest Dermatol*. 2007 Nov;**127**(11):2605-11.
69. Schmidt E<sup>1</sup>, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Bröcker EB, Marinkovich MP, Giudice GJ, Zillikens D. Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2000 Nov;**115**(5):842-8.
70. Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM, Sams WM Jr, Carlo JR, Wheeler CE Jr. An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes, and complement. *J Invest Dermatol*. 1982 Apr;**78**(4):285-90.
71. Briggaman RA, Schechter NM, Fraki J, Lazarus GS. Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 1984 Oct 1;**160**(4):1027-42.
72. Chorzelski TP, Cormane RH. The presence of complement "bound" in vivo in the skin of patients with pemphigoid. *Dermatologica*. 1968;**137**(3):134-8.
73. Schaller J<sup>1</sup>, Giese T, Ladusch M, Haustein UF. Interleukin-2 receptor expression and interleukin-2 production in bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res*. 1990;**282**(4):223-6.
74. Del Prete G<sup>1</sup>. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol*. 1998;**16**(3-4):427-55.
75. Asbrink E, Hovmark A. Serum IgE levels in patients with bullous pemphigoid and its correlation to the activity of the disease and anti-basement membrane zone antibodies. *Acta Derm Venereol*. 1984;**64**(3):243-6.

76. Rennick D1, Hunte B, Dang W, Thompson-Snipes L, Hudak S. Interleukin-10 promotes the growth of megakaryocyte, mast cell, and multilineage colonies: analysis with committed progenitors and Thy1loSca1+ stem cells. *Exp Hematol.* 1994 Feb;22(2):136-41.
77. Punnonen J1, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3730-4.
78. Delaporte E1, Bieber T, Viac J, Faure M, Nicolas JF. Epidermal cytokines and cutaneous inflammation. *Ann Dermatol Venereol.* 1994;121(11):836-43.
79. Scheurer B1, Rittner C, Schneider PM. Expression of the human complement C8 subunits is independently regulated by interleukin 1 beta, interleukin 6, and interferon gamma. *Immunopharmacology.* 1997 Dec;38(1-2):167-75.
80. Wells TN1, Lusti-Narasimhan M, Chung CW, Cooke R, Power CA, Peitsch MC, Proudfoot AE. The molecular basis of selectivity between CC and CXC chemokines: the possibility of chemokine antagonists as anti-inflammatory agents. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 31;796:245-56.
81. Aggarwal BB1, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw.* 1996 Apr-Jun;7(2):93-124.
82. Brown LF1, Harrist TJ, Yeo KT, Stähle-Bäckdahl M, Jackman RW, Berse B, Tognazzi K, Dvorak HF, Detmar M. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme. *J Invest Dermatol.* 1995 May;104(5):744-9.
83. Borger P1, Kauffman HF, Postma DS, Vellenga E. IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol.* 1996 Feb 15;156(4):1333-8.
84. Costello R1, Imbert J, Olive D. Interleukin-7, a major T-lymphocyte cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 1993 Jul-Aug;4(4):253-62.
85. Giacalone B1, D'Auria L, Bonifati C, Ferraro C, Riccardi E, Mussi A, D'Agosto G, Cordiali-Fei P, Ameglio F. Decreased interleukin-7 and transforming growth factor-beta1 levels in blister fluids as compared to the respective serum levels in patients with bullous pemphigoid. Opposite behavior of TNF-alpha, interleukin-4 and interleukin-10. *Exp Dermatol.* 1998 Aug;7(4):157-61.
86. Rot A1, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med.* 1992 Dec 1;176(6):1489-95.

87. Rüdrieh U1, Gehring M, Papakonstantinou E, Illerhaus A, Engmann J, Kapp A, Hartmann K, Meyer NH, Gibbs BF, Raap U. Eosinophils are a Major Source of Interleukin-31 in Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* 2018 Aug 29;98(8):766-771.
88. Frezzolini A1, Cianchini G, Ruffelli M, Cadoni S, Puddu P, De Pità O. Interleukin-16 expression and release in bullous pemphigoid. *Clin Exp Immunol.* 2004 Sep;137(3):595-600.

## **6 Tabellen und Abbildungsverzeichnis**

**Tabelle E1: *Zytokine und Rezeptoren: Vorkommen und Funktion beim bullösen Pemphigoid*** \_\_\_\_\_ Seite 18

**Tabelle SI1: *Definitionscharakteristika der Patienten mit bullösem Pemphigoid***  
\_\_\_\_\_ Seite 21

**Tabelle SII2: *Definitionscharakteristika der Kontrollen***  
\_\_\_\_\_ Seite 23

**Abbildung 1: *Vermehrte Apoptose von eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut bei Patienten mit bullösem Pemphigoid*** \_\_\_\_\_ Seite 28

## 7 Lebenslauf

---

Judith Engmann

Geboren am 11.09.1989

In Langenhagen

Eichstraße 29

30161 Hannover

Mobil: 0176-83077262

E-Mail: [judith.engmann@googlemail.com](mailto:judith.engmann@googlemail.com)

### Ausbildungsweg

---

August 2015- heute	Angestellt als Assistenzärztin im Klinikum Neustadt am Rübenberge in der Unfallchirurgie und Orthopädie derzeit im 4. Weiterbildungsjahr
4. Juli 2015	Approbation an der MHH
Mai 2014 - Juni 2015	Praktisches Jahr: 1. Tertial: Innere Medizin im KRH Lehrte 2. Tertial: Orthopädie im Annastift 3. Tertial: Chirurgie im KRH AKK Laatzen
Oktober 2008 - April 2014	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover, 2. Staatsexamen im April 2014

August 2011	Beginn der Promotionsarbeit im Rahmen des StrucMed-Programms in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der MHH, Erhalt eines Stipendiums der HBRS
Famulaturen	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der MHH</li> <li>2. Praxis für Kinder- und Jugendmedizin, Nünke und Piefke</li> <li>3. Praxis für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie-Implantologie und ästhetische Chirurgie, Redecker und Partner</li> <li>4. Klinik für Handchirurgie und Plastische Chirurgie, Klinikum Rechts der Isar, München</li> <li>5. Cirurgia da Mão e Microcirurgia reconstructiva (Hand- und Wiederherstellungschirurgie), Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brasilien</li> </ol>
Oktober 2008	Immatrikulation für Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover

## Publikationen

---

April 2017	<p><b>Increased Activity and Apoptosis of Eosinophils in Blister Fluids, Skin and Peripheral Blood of Patients with Bullous Pemphigoid.</b></p> <p>Engmann J, Rüdric U, Behrens G, Papakonstantinou E, Gehring M, Kapp A, Raap U.</p> <p>Acta Derm Venereol. 2017 Apr 6;97(4):464-471. Doi: 10.2340/00015555-2581.</p>
------------	--

Juli 2018

**Eosinophils are a Major Source of Interleukin-31  
in Bullous Pemphigoid.**

Rüdrich U, Gehring M, Papakonstantinou E, Illerhaus  
A, Engmann J, Kapp A, Hartmann K, Meyer NH,  
Gibbs BF, Raap U.

Acta Derm Venereol. 2018 Aug 29;98(8):766-771. Doi:  
10.2340/00015555-2951.

**Nebentätigkeiten**

---

April 2013 - April 2014

Studentische Aushilfe im OP im  
Annastift in Hannover (20 Std./Monat)

April 2010 - April 2013

Studentische Aushilfe in der Pflege im  
Diakoniekrankenhaus  
Henriettenstiftung in Hannover (20  
Std./Monat)

Hannover, den \_\_\_\_\_

## **8 Erklärung**

Nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich in der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

***“ Die Erhöhte Aktivität und Apoptose von eosinophlen Granulozyten in der Blasenflüssigkeit, Haut und dem peripherem Blut von Patienten mit bullösem Pemphigoid”***

aus der

**Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie  
der Medizinischen Hochschule Hannover**

unter der Betreuung von

**Frau Prof. Dr. med. Ulrike Raap**

und der Zweitbetreuung von

**Herrn Prof. Dr. med. Georg Behrens**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen Hilfsmittel verwendet habe.

Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, welche gegen Entgelt Betreuer oder Betreuerinnen für die Anfertigung einer Promotionsarbeit sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich vollständig oder teilweise erledigt. Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit vorgelegt.

Hannover, den \_\_\_\_\_

## 9 Danksagung

Ein großer Dank gilt meiner Erstbetreuerin, Frau Prof. Dr. med. Ulrike Raap für ihre fürsorgliche und geduldige, sowie herzliche Unterstützung dieser Dissertation. Ihr unermüdlicher positiver Zuspruch als auch ihre wertvolle Expertise haben mir sehr bei der Finalisierung dieser Arbeit geholfen.

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Urda Rüdric herzlichst bedanken. Bei der gemeinsamen Arbeit habe ich sehr von ihrer Erfahrung profitieren können. Das gemeinsame kontinuierliche Hinterfragen des Versuchsaufbaus, sowie anregende Diskussionen haben diese Arbeit geformt.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Manuela Gehring ohne deren professionelle Unterstützung und Anleitung bei der Durchführung der Methoden möglicherweise kein eosinophiler Granulozyt den Weg in den Brutschrank gefunden hätte.

Ebenfalls Danke ich dem Laborteam des Instituts für die geduldige Unterstützung und den regen fachlichen Austausch.

Ich danke ebenfalls meinen Freunden, die mir das gesamte Studium und mittlerweile weit darüber hinaus mit Rat und Tat zur Seite standen und stehen und mir in vielen Situationen besondere Vorbilder waren.

Großer Dank gilt meiner gesamten großen Familie die mich immer wieder mit Liebe und Zuspruch unterstützt und motiviert hat.

Hier im Besonderen meinen Eltern Jörg Engmann und Gabriele Engmann durch deren liebevolle Strenge, selbstlose Unterstützung und Liebe ich die Person geworden bin, die ich heute bin.

Und meiner außergewöhnlich starken kleinen Schwester Miriam Engmann die mir immer wieder auf verschiedenste Art und Weise zeigt, dass das Durchhalten und Weitermachen nach Rückschlägen sich immer lohnt.