

Aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

**Das passive Antikörpertransfermodell der Epidermolysis Bullosa
Acquisita: Die Produktion endogener Antikörper gegen injizierte
Fremdproteine und die Anwesenheit aktivierter T-Zellen in der Haut
führen zu verstärkter Blasenbildung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion der Naturwissenschaften -

vorgelegt von

Sebastian Christian Maass

aus Bad Oldesloe

Lübeck 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Westermann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Köhl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.12.2015

Jeder ist ein Genie. Doch wenn Du einen Fisch danach beurteilst, ob er auf einen Baum klettern kann, wird er sein ganzes Leben glauben, dass er dumm ist.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das angeborene und erworbene Immunsystem.....	1
1.2	Immunologie der EBA.....	8
1.3	Tiermodelle der EBA.....	9
1.4	Fragestellung	10
2.	Materialien und Methoden.....	12
2.1	Material	12
2.1.1	Mäuse.....	12
2.1.2	Chemikalien	12
2.1.3	Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien.....	14
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.5	Geräte.....	17
2.1.6	Software	18
2.1.7	Antikörper	18
2.1.8	Primer	19
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	21
2.2.2	Immunbiologische Methoden	23
2.2.3	Zellbiologische Methoden	24
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.2.5	Immunhistologische Methoden	25
2.2.6	Tierexperimentelle Methoden	30
2.2.7	Digitale Bildanalyse-Methoden	32
2.2.8	Statistische Auswertung	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Einfluss der endogenen Antikörper auf die Krankheitsentwicklung im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA	35
3.1.1	Injektionen von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs induzieren EBA-Wunden in Mäusen ..	35
3.1.2	Die Bildung von EBA-Wunden im passiven Antikörpertransfer-Modell ist von der Bindung der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an die DEJ abhängig	37
3.1.3	Murine IgGs sorgen für verlängerte und stärkere EBA-Erkrankung im passiven Antikörper-Transfermodell	40
3.2	Einfluss von T-Zellen in der Haut auf die Bildung von EBA-Wunden	49
3.2.1	Expressionsanalysen deuten auf eine erhöhte T-Zell-Zahl in läsionaler Haut hin	49

3.2.2 Eine verringerte T-Zell-Zahl führt zu einem milderen Krankheitsverlauf im Immunisierungsinduzierten EBA-Modell	51
3.2.3 Erhöhte Zahl an T-Zellen in periläsionaler Haut von EBA-betroffenen Mäusen	55
4. Diskussion.....	59
4.1 Die injizierten mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs allein sind nicht für den Krankheitsanstieg bis Tag 19 im Antikörpertransfer-Modell verantwortlich	60
4.2 Die Bildung von murinen IgGs führen zu einer verstärkten Bildung von EBA-Wunden im passiven Antikörper-Transfermodell.....	61
4.3 Effektor-T-Zellen in der Haut unterstützen die Bildung von EBA-Wunden.....	69
5. Zusammenfassung.....	74
6. Literatur.....	76
Abbildungsverzeichnis.....	83
Tabellenverzeichnis	85
Danksagung	86
Erklärung	87

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
a. dest.	destilliertes Wasser (aqua destillata)
AID	activation-induced cytidine deaminase
Alexa Fluor 468	mit Antikörper koppelbares Fluorophor
APAAP	Alkalische Phosphatase anti Alkalische Phosphatase
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
B220	B-Zell-spezifische Tyrosinphosphatase
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CCR5	Chemokine Receptor 5
CD19	Cluster of Differentiation 19, B-Zell-spezifisches Protein
CD40L	Cluster of Differentiation 40 Ligand auf T-Zellen
Col7	Kollagen Typ 7
C_T	Cycle of Threshold
CXCR3	CXC-Chemokin-Rezeptor 3
d	Tag
DEJ	dermo-epidermale Junctionszone
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Der.	Dermis
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure
Epi.	Epidermis
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FcγR	Fc-gamma-Rezeptor
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
g	Gramm
G	Gravitationskonstante
GC	Keimzentrum (germinal center)
Gr1	Granulozyten-spezifisches Antigen
GST	Glutathion-S-Transferase
H₂O	Wasser
IFN_γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin Typ G
IL-4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10

i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
Ki-67	Antigen spezifisch für proliferierende Zellen
Kn.	Knorpel
KO	knock out
l	Liter
L	Ligand
LK	Lymphknoten
mCol7	murines Kollagen Typ 7
MFI	mean fluorescence intensity (Mittlere Fluoreszenz-Intensität)
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mIgG	murines Immunglobulin Typ G
Min	Minute
μm	Mikrometer
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
nm	Nanometer
p	p-Wert: Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Gruppen in dem dargestellten Merkmal zufällig unterscheiden
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer Lösung
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoff-Spezies)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCRβ	T-Zell-Rezeptor beta-Kette
Th1	T-Helfer 1
ü.N.	über Nacht
w	Woche
wt	Wild-Typ

1. Einleitung

1.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem

Zur Verteidigung gegen von außen eindringende Pathogene oder entartete, körpereigene Zellen besitzt der menschliche Körper zwei Abwehrmechanismen: Das angeborene und das erworbene Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie in der Pathogenabwehr und besteht, genauso wie auch das erworbene Immunsystem, aus einer humoralen und einer zellulären Komponente. Den Hauptbestandteil der humoralen Komponente bildet das Komplementsystem, dessen Aktivierung über drei verschiedene Wege erfolgen kann, die jedoch alle die Entstehung einer C3-Konvertase bewirken: Der klassische Aktivierungsweg, der Lectin-Weg und der alternative Aktivierungsweg.

Nach Bildung der C3-Konvertase kommt es zu einer Enzymkaskade an dessen Ende ein sogenannter „Membrane Attack Complex“ entsteht der eine Pore in der Zellmembran des Pathogens bildet. Außerdem entstehen im Verlauf der Enzymkaskade lösliche Peptide, die weitere Immunzellen anlocken und auch Peptide, die an das Pathogen binden und diese für Immunzellen markieren (Kolev et al., 2014) .

Die angelockten Immunzellen sind vor allem Mastzellen, NK-Zellen, Makrophagen oder Granulozyten und bilden die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems. Sie haben unterschiedliche Funktionen und Wirkmechanismen. So schütten Mastzellen nach Aktivierung vorgeformte Granula mit pro-inflammatorischen Mediatoren aus, die andere Zellen aktivieren und weitere Immunzellen anlocken können. NK-Zellen wirken vor allem auf körpereigene Zellen und induzieren in diesen im Fall einer Infektion den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose. Die Aufgabe von Makrophagen ist es, markierte Pathogene zu phagozytieren und anschließend zu lysieren. Eine weitere Zellpopulation des angeborenen Immunsystems sind die Granulozyten, die sich in basophile, eosinophile sowie neutrophile Granulozyten aufteilen. Die Aufgabe von basophilen und eosinophilen Granulozyten besteht vor allem in der Bekämpfung von Parasiten, die zu groß sind, um phagozytiert zu werden, indem auch sie Granula mit zytotoxischen Peptiden ausschütten. Neutrophile Granulozyten sind die größte Granulozytenpopulation. Sie phagozytieren und verdauen Pathogene und

sekretieren darüber hinaus zytotoxische Stoffe, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, Gelatinasen oder Matrix-Metalloproteasen (Mantovani et al., 2011; Murphy et al., 2012).

Wenn das angeborene Immunsystem nicht ausreicht, um die Bedrohung abzuwehren, wird das erworbene Immunsystem aktiv. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist das erworbene Immunsystem in der Lage eine auf das Pathogen spezifisch angepasste Immunantwort zu induzieren und hat darüber hinaus die Möglichkeit, ein immunologisches Gedächtnis zu schaffen. Auch das erworbene Immunsystem besteht aus einer zellulären und einer humoralen Komponente.

Zu der zellulären Komponente gehören die T- und B-Zellen. Bei den T-Zellen kann weiterhin zwischen $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen unterschieden werden. $CD8^+$ T-Zellen suchen in der Peripherie nach von intrazellulären Pathogenen infizierten Körperzellen. Sie werden durch ein zu ihrem T-Zellrezeptor (TCR) passendes Antigen aktiviert, das von infizierten Körperzellen mittels des MHC Klasse I-Molekül (MHC: major histocompatibility complex) präsentiert wird. Nach Aktivierung schüttet die $CD8^+$ T-Zelle zytotoxische Peptide aus, die die Apoptose induzieren und so die Ausbreitung des Pathogens verhindern.

Die meisten der $CD4^+$ T-Zellen befinden sich in den sekundären lymphatischen Organen, wo ihnen das für sie spezifische Antigen präsentiert wird. Diese Aufgabe wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APC: antigen presenting cell) ausgeführt. Diese nehmen Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie mittels MHC Klasse II-Molekül den T-Zellen. Trägt eine T-Zelle den passenden TCR für den präsentierten Peptid-MHC Klasse II-Komplex, bindet sie mit dem TCR an den Peptid: MHC II-Komplex und wird durch zusätzliche co-stimulatorische Signale und durch ausgeschüttete Zytokine aktiviert.

Die sekretierten Zytokine entscheiden dabei, in welche Art von Effektorzelle sich die aktivierte T-Zelle differenziert. Ein Zytokinmilieu, das durch IL-12 und Interferon γ (IFN γ) geprägt ist, führt zu einer Differenzierung von T-Zellen hin zu T-Helfer-1-Zellen (Th1). Th1-Zellen wandern in die Peripherie und können dort Effektorfunktionen ausüben, indem sie z.B. Makrophagen aktivieren und damit deren Fähigkeit phagozytierte Pathogene zu lysieren zu verstärken. Zusätzlich zu diesen Effektorfunktionen in der Peripherie sind Th1-Zellen auch in der Lage in sekundären lymphatischen Organen B-Zell-Hilfe zu leisten und damit die Antikörperproduktion zu induzieren. Auch Th2-Zellen, die in einem IL-4-dominierten

Zytokinmilieu entstehen, leisten B-Zell-Hilfe. Während eine Sekretion von IL-10 (IL: Interleukin) eine Differenzierung zu anti-inflammatorisch, regulatorischen T-Zellen nach sich zieht, führt die Sekretion von TGF- β (TGF: transforming growth factor) und IL-6 zur Differenzierung zu Th17-Zellen, die in die Peripherie wandern und durch Sekretion von IL-17 pro-inflammatorisch wirken.

Die humorale Immunantwort des erworbenen Immunsystems wird durch die Th1- bzw. Th2-Zellen induziert und führt zur Produktion von Antikörpern. Zur Antikörperproduktion kommt es, wenn T-Zellen nach ihrer Aktivierung in sekundären lymphatischen Organen zur Grenze zwischen T- und B-Zellzone wandern und zeitgleich B-Zellen dasselbe Antigen mit ihrem dafür spezifischen B-Zellrezeptor aufnehmen, prozessieren, es auf das MHC Klasse II-Molekül auf der Zelloberfläche laden und dort präsentieren. So eine aktivierte B-Zelle wandert ebenfalls zur Grenze zwischen T- und B-Zellzone. Trifft dort nun eine T-Helferzelle dessen TCR spezifisch für ein auf einer B-Zelle präsentierten Peptid: MHC Klasse II-Komplex ist, wird die B-Zelle aktiviert. Dies geschieht durch die Interaktion des Peptid: MHC Klasse II-Komplexes mit dem passenden TCR und zusätzlichen co-stimulatorischen Molekülen sowie von T-Zellen sekretierten Zytokinen. Die aktivierte T- und B-Zelle wandern anschließend in die B-Zellzone und bilden dort ein Keimzentrum. In diesem kommt es zu einer starken Zellproliferation beider Zellen und zur Differenzierung der B-Zelle zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle. Weiterhin findet hier der Klassenwechsel der produzierten Immunglobuline von IgM z.B. zu IgG sowie die somatische Hypermutation statt, in dessen Zuge die Spezifität der produzierten Immunglobuline für das Antigen erhöht wird. Das vorherrschende Zytokinmilieu entscheidet dabei darüber, welche Subklassen von Immunglobulinen produziert werden. So sorgt ein durch Th2-Zellen bewirktes IL4-Milieu z.B. für eine Produktion von IgGs der Subklasse 1, während ein hoher IFN γ -Spiegel, von Th1-Zellen produziert, zu einer Produktion von IgG2b und IgG2c führt.

Immunglobuline besitzen einen variablen sowie einen konstanten Teil. Der variable Teil, auch F(ab)₂-Teil bezeichnet, besitzt zwei Antigenbindestellen und ist für die spezifische Erkennung und das Binden an das Antigen zuständig. Die Antigenbindestellen bestimmen die Antigenspezifität, die durch die somatische Hypermutation im Laufe einer humoralen Immunantwort immer weiter erhöht wird. Der konstante Teil, der sogenannte Fc-Teil, ist für die Aktivierung von Effektorfunktionen des Immunsystems verantwortlich. So bilden stetig

produzierte IgM-Antikörper nach Opsonierung von Fremdproteinen eine Plattform für Komplementfaktoren, die dann über den klassischen Aktivierungsweg die Komplementkaskade induzieren. Auch IgG-Antikörper können über ihren Fc-Teil das Komplementsystem aktivieren. Darüberhinaus besitzen einige Immunzellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten, Fc-Rezeptoren, mit denen Immunglobuline erkannt werden können. Der Fc-Teil unterscheidet sich je nach Klasse und hat somit unterschiedliche Funktionen. So aktivieren Immunglobuline der Klasse G nur solche Zellen, die Fc γ -Rezeptoren tragen, die pro- oder anti-inflammatorische Wirkungen haben können. Da sich die verschiedenen IgG-Subklassen in ihren Affinitäten zu den einzelnen Fc γ -Rezeptoren unterscheiden, hat auch die Subklasse eines Immunglobulins Auswirkung auf die Art der Immunantwort: So haben z.B. IgG1, IgG2b und IgG2c eine geringe Affinität zu dem anti-inflammatorischen Fc γ RIIB (Fc γ Rezeptor II B), während der pro-inflammatorische Fc γ RIV hochaffin an IgG2b und IgG2c bindet (Bruhns, 2012).

Im Zuge einer adaptiven Immunantwort differenzieren sich einige T- und auch B-Zellen zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei erneuter Infektion mit dem gleichen Pathogen für eine schnellere und stärkere Immunantwort sorgen. Da bei Gedächtnis-B-Zellen sowohl der Klassenwechsel als auch die somatische Hypermutation bereits geschehen ist, kommt es zu einer schnelleren Produktion von hochspezifischen Immunglobulinen (Abbas et al., 2012).

Damit die beschriebenen Effektorfunktionen nicht gegen körpereigene, gesunde Zellen eingesetzt werden, ist die Unterscheidung zwischen eigen/gesund und fremd oder entartet notwendig. Dies geschieht über den Mechanismus der Toleranz, im Zuge dessen in autoreaktiven Zellen die Apoptose ausgelöst wird (Hartley et al., 1993) oder die Zellen nicht mehr aktiviert werden können (Schwartz, 2003). Sind diese Mechanismen fehlerhaft und werden körpereigene Strukturen nicht mehr als solche erkannt, kann dies zur Produktion von gegen körpereigene Proteine gerichteten Autoantikörpern führen und es besteht die Gefahr der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Goodnow et al., 2005).

Die Auswertung von verschiedenen Studien zwischen 1988 und 2008 ergaben, dass durchschnittlich 7,5 - 9,5% der Bevölkerung von Autoimmunerkrankungen betroffen sind (Cooper et al., 2009). Auch Proteine in der Haut können Ziele von Autoantikörpern sein, deren Binden an dermale Proteine zur Bildung von Blasen führt. So wird die Inzidenz von blasenbildenden Autoimmunerkrankungen der Haut in Deutschland auf ungefähr 2000 neue

Diagnosen pro Jahr geschätzt. Die Prävalenz liegt mit insgesamt 12000 Patienten bei 0,01% der Bevölkerung (Schmidt und Zillikens, 2011).

Ein Vertreter dieser Autoimmunerkrankungen der Haut ist die Epidermolysis bullosa acquisita (EBA). Die EBA hat eine Inzidenz von 0,2 Neuerkrankungen pro 1 Million Einwohner im Jahr (Bertram et al., 2009). Von der EBA sind vor allem Personen mittleren bis hohen Alters betroffen. Dabei ist der Zeitpunkt der Diagnose von Population zu Population unterschiedlich: Während Afrikaner bei der Diagnose durchschnittlich 29 Jahre alt waren (Zumelzu et al., 2011), liegt die durchschnittliche Erstdiagnose für EBA in anderen Populationen bei 44 - 50 Jahren (Buijsrogge et al., 2011; Kim et al., 2011).

Epidermolysis bullosa acquisita gehört zu den autoimmunen bullösen Dermatosen, die sich in die Pemphigusgruppe und die Gruppe der Pemphigoiden unterteilen lässt (Hammers et al., 2014). Während sich in der Pemphigusgruppe die Autoantikörper gegen intraepidermale Proteine richten, sind die Autoantikörper in der Gruppe der Pemphigoiden gegen subepidermale Proteine gerichtet (Schmidt und Zillikens, 2013). EBA gehört in die Gruppe der Pemphigoiden und ist durch Antikörper charakterisiert, die gegen das Kollagen Typ 7 (Col7) gerichtet sind (Woodley et al., 1988).

Col7 ist ein ungefähr 290 kDa großes Protein und besteht aus einer Kollagen-Domäne, die von zwei nicht-kollagenösen Domänen, NC1 und NC2 (NC: non-collagenous), flankiert wird. Die NC1-Domäne besteht wiederum aus mehreren Domänen: Am N-Terminus liegt die CMP-Domäne (CMP: cartilage matrix protein), gefolgt von 9 Fibronectin-3-ähnlichen und einer von Willebrandt-Faktor-2A-ähnlichen Domäne. C-terminal ist die NC2-Domäne lokalisiert (Burgeson, 1993). Drei Col7-Proteine bilden ein Homotrimer, das sich mit einem weiteren Col7-Trimer an der NC2-Domäne antiparallel zusammenlagert. Solche über die NC2-Domäne miteinander verbundenen Col7-Trimere bilden einen wichtigen Bestandteil der Ankerfibrillen in der dermo-epidermalen Junctionszone (Morris et al., 1986). Die NC1-Domänen dieser Col7-Trimere binden jeweils Laminin 332, das wiederum mit in der Epidermis verankerten Strukturproteinen verbunden ist. Auf dermalen Seite sind Col7-Trimere über ihre Kollagen-Domänen mit anderen Kollagenen verbunden und sorgen so für die strukturelle Integrität der Haut (Abb. 1.1).

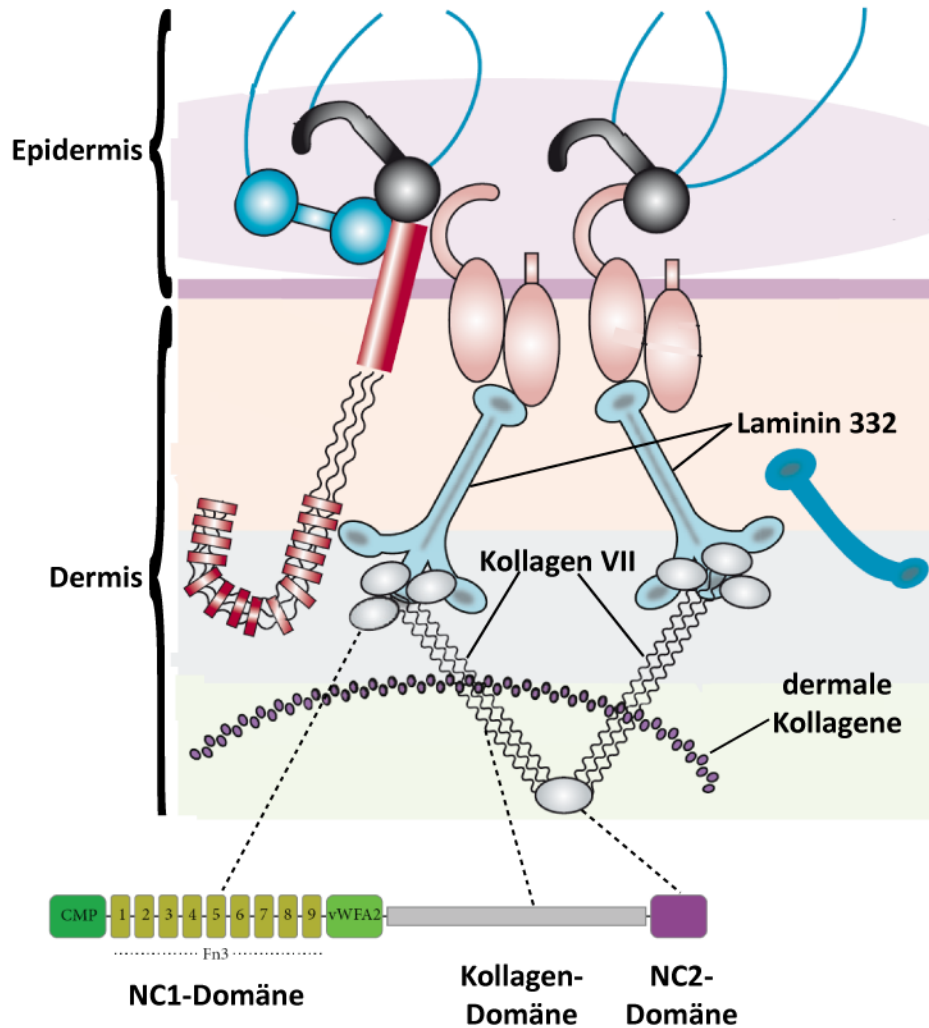


Abb. 1.1 Kollagen Typ 7 ist ein Bestandteil der dermo-epidermalen Junctionszone. Die dermo-epidermale Junctionszone (DEJ) verbindet durch Vernetzung zahlreicher Strukturproteine Dermis und Epidermis miteinander. Ein wichtiger Bestandteil ist dabei Col7. Die Kollagen-Domäne des Col7-Moleküls wird von 2 nicht-kollagenen Domänen flankiert. Die N-terminale NC1-Domäne besteht aus einer CMP-, 9 Fibronectin-3-ähnlichen Domänen sowie einer von Willebrandt-Faktor-A2-ähnlichen (vWFA2) Domäne. Die deutlich kürzere NC2-Domäne befindet sich am C-Terminus. Zwei Col7-Homotrimere lagern sich an der NC2-Domäne zusammen und bilden ein Col7-Molekül. Die N-Termini der beiden Col7-Trimere binden jeweils an Laminin 332 auf epidermaler Seite, während die Kollagen-Domänen der Col7-Moleküle sich mit dermalen Kollagenen verbinden. Grafik: (Ludwig, 2013; Schmidt und Zillikens, 2013), verändert nach (Kim und Kim, 2013)

Die meisten Epitope der Col7-spezifischen Antikörper liegen in der NC1-Domäne. So wurden Aminosäuresequenzen sowohl in der CMP-Domäne (Chen et al., 2007) als auch in der Fibronectin-3-ähnlichen- (Lapiere et al., 1993) und in der vWFA2- (Wegener et al., 2013) als Ziele für Autoantikörper identifiziert. Weniger Epitope findet man dagegen für Sequenzen in der NC2-Domäne (Ishii et al., 2004).

Phänotypisch lässt sich die EBA in zwei Typen unterscheiden. Der mechanobullöse, nicht-inflammatorische Typ, an dem etwa 1/3 aller EBA-Patienten leiden, geht mit der Bildung von nicht-entzündlichen Blasen vor allem an mechanisch belasteten Hautarealen, wie z.B.

Händen, Ellenbogen oder Knien, einher (Buijsrogge et al., 2011). Bei diesem Phänotyp wird angenommen, dass die an Col7 gebundenen Autoantikörper die Interaktion zwischen Col7 und anderen Proteinen der dermo-epidermalen Junctionszone stört und es dadurch zur Blasenbildung kommt (Remington et al., 2008). Beim inflammatorischen EBA-Typ, an dem etwa 2/3 der EBA-Patienten leiden, führt das Binden der Autoantikörper an Col7 zu Entzündungsprozessen und dadurch zur Bildung von Blasen, Krusten sowie Erosionen an der Haut und der Mukosa (Gammon et al., 1984b).

Die Diagnose der EBA kann mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz erfolgen. Dazu wird zunächst menschliche, gesunde Haut mit NaCl-Lösung behandelt, sodass es zur Spaltbildung zwischen Epidermis und Dermis kommt. Diese sogenannte „salt split skin“ wird anschließend mit Patientenserum und danach mit einem fluoreszenzmarkierten, gegen humane Immunglobuline gerichteten Antikörper inkubiert. Anhand des Orts der Deposition der Patientenantikörper kann der Typ der Autoimmundermatose eingegrenzt werden. So sind gegen Col7 gerichtete Antikörper auf der dermalen Seite zu finden, wohingegen Antikörper aus den Seren von Patienten mit anderen Pemphigoiderkrankungen auf der epidermalen Seite detektiert werden können (Gammon et al., 1984a; Woodley et al., 1983). Die Detektion von Col7-spezifischen Serum-IgGs erfolgt unter Zuhilfenahme der ELISA-Technik (Enzyme-linked Immunosorbent assay). Dabei werden rekombinant hergestellte NC1- und NC2-Domänen mit Patientenserum inkubiert und etwaige gebundene Antikörper detektiert (Saleh et al., 2011). Auch mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz (DIF)-Mikroskopie kann EBA diagnostiziert werden: In der DIF sind dabei lineare Ablagerungen von IgGs an der DEJ zu erkennen. Dabei zeigen Ablagerungen von Col7-spezifischen IgGs ein u-serriertes Muster (Buijsrogge et al., 2011; Vodegel et al., 2004).

Die Behandlung der EBA ist, wie bei vielen Autoimmunerkrankungen, unspezifisch und hat vor allem die Immunsuppression zum Ziel. Dabei wird insbesondere auf Kortikosteroide, wie z.B. Methylprednisolon (Hellberg et al., 2013; Ludwig, 2013), zurückgegriffen. Da Kortikosteroid-Behandlungen jedoch schwere Nebenwirkungen zur Folge haben, wird versucht alternative Behandlungsmethoden zu entwickeln. Dazu gehört z.B. die IVIG-Behandlung (IVIG: intravenous immunoglobulines), bei der hohe Dosen unspezifischer Immunglobuline appliziert werden, um eine Sättigung der neonatalen Fc-Rezeptoren zu erzielen und so die

Halbwertszeit der Autoantikörper zu verringern (Ahmed und Gurcan, 2012; Kim und Kim, 2013).

1.2 Immunologie der EBA

Weite Teile der EBA-Entstehung konnten noch nicht aufgeklärt werden. Klinische Studien konnten zeigen, dass es bei der Entstehung der EBA eine genetische Komponente gibt. So haben Träger des HLA-DRB*15:03-Haplotyps ein erhöhtes Risiko an EBA zu erkranken (Zumelzu et al., 2011). Auch T-Zellen haben einen entscheidenden Anteil an der Krankheitsentstehung. Experimente in Krankheitsmodellen haben gezeigt, dass bei T-Zell-defizienten Mäusen eine Induktion der EBA nicht möglich war.

So wird angenommen, dass in der afferenten Phase bei einer entzündeten Hautverletzung Teile des Col7-Moleküls von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und in einen Lymphknoten transportiert werden. In der T-Zell-Zone des Lymphknotens präsentiert die besagte Antigen-präsentierende Zelle das Col7-Peptid einer autoreaktiven Th1-Zelle (Hammers et al., 2011) per MHC Klasse II-Rezeptor, was zur MHC Klasse II-vermittelten Aktivierung der T-Zelle führt (Ludwig et al., 2011). Diese wandert danach zur Grenze zwischen T- und B-Zellzone und kann dort B-Zell-Hilfe leisten.

Außerdem können auch autoreaktive B-Zellen mit ihrem B-Zell-Rezeptor das Col7-Peptid auf dem MHC Klasse II-Rezeptor erkennen und hierdurch aktiviert werden. Die so aktivierte B-Zelle kann nun das Col7-Pepid über ihren B-Zell-Rezeptor aufnehmen und das Col7-Peptid über ihren eigenen MHC Klasse II-Rezeptor präsentieren. Die B-Zelle wandert daraufhin ebenfalls zur Grenze zwischen T- und B-Zell-Zone, wo sie auf die aktivierte T-Zelle trifft. Wird der zuvor aktivierten, für dieses Fragment spezifischen T-Zelle das Col7-Fragment von der B-Zelle durch die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und dem MHC Klasse II-Rezeptor erneut präsentiert, erfolgt die B-Zell-Hilfe durch die co-stimulatorische Interaktion des CD40-Rezeptors auf B-Zell-Seite mit dem CD40L-Ligand auf den T-Zellen sowie durch Ausschüttung der Zytokine Interleukin 12 und Interferon γ . Sowohl die autoreaktive B-Zelle als auch die T-Zelle wandern in die B-Zellzone. Dort entsteht durch die starke Proliferation der B-Zelle ein Keimzentrum, in dem der Klassenwechsel der B-Zellen zu IgG-produzierenden B-Zellen stattfindet.

Die Proliferation führt zu einer großen Zahl von wiederum stark proliferierenden, Zentroblasten genannten, B-Zellen, die in der sogenannten dunklen Zone des Keimzentrums zu finden sind. Die Zentroblasten differenzieren zu Zentrozyten und wandern in die helle Zone, wo durch die somatische Hypermutation die Affinität des B-Zellrezeptors für das Antigen erhöht wird und die Zentrozyten im Anschluss wieder zu Zentroblasten differenzieren und so noch Antigen-spezifischere B-Zellen hervorbringen. Weiterhin gehen aus den B-Zellen in der hellen Zone Gedächtnis-B-Zellen hervor, die in die Mantelzone wandern, welche die dunkle und helle Zone umgibt. Schließlich differenzieren die Zentrozyten zu Plasmazellen, die für die Produktion der Antikörper verantwortlich sind (Murphy et al., 2012).

In der effferenten Phase gelangen diese Col7-spezifischen Antikörper in die Haut und binden an ihr Antigen an der DEJ. An diese an der DEJ befindlichen Autoantikörper binden anschließend Faktoren des Komplementsystems. So konnte gezeigt werden, dass C5-defiziente Mäuse keine EBA entwickeln (Sitaru et al., 2005). Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt vor allem über den sogenannten alternativen Weg (Mihai et al., 2007). Das Binden der Autoantikörper an Col7 katalysiert die Spaltung von C3 und initialisiert dadurch die Komplementkaskade. Die Aktivierung der Komplementkaskade führt in einem nächsten Schritt zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten und deren FcγRIV-abhängigen Aktivierung (Kasperkiewicz et al., 2012). Die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (Chiriac et al., 2007), kurz ROS (reactive oxygen species), Gelatinasen sowie Matrix-Metalloproteinasen (Shimanovich et al., 2004) durch aktivierte neutrophile Granulozyten führt zu der Zerstörung der Col7-Fasern und dem daraus resultierenden Ablösen der Epidermis von der Dermis, das makroskopisch als Blase zu erkennen ist.

1.3 Tiermodelle der EBA

Die Untersuchung der EBA in Menschen ist durch die geringe Zahl an EBA-Patienten schwierig. Da jedoch Col7 als Antigen identifiziert ist, war es möglich die EBA-Erkrankung auf Mäuse zu übertragen und so verschiedene tierexperimentelle Modelle zu entwickeln, anhand derer unterschiedliche Fragestellungen untersucht werden konnten.

Eines dieser Tiermodelle ist das passive Antikörpertransfer-Modell. Dieses eignet sich für Experimente, die Vorgänge in der Effektorphase aufklären sollen. In diesem Modell werden zunächst Kaninchen mit einem rekombinant hergestellten Peptid aus der NC1-Domäne des murinen Col7-Proteins (mCol7) immunisiert, um danach die IgGs aus dem Kaninchenserum zu

isolieren. Diese Kaninchen-IgGs, unter denen sich auch mCol7-spezifische IgGs befinden, können nun Mäusen subkutan injiziert werden, die daraufhin EBA-Wunden entwickeln (Sitaru et al., 2005). Die ersten EBA-Symptome sind im Kopfbereich und zusätzlich um die Einstichstelle herum zu finden.

Neben dem rekombinant hergestellten Peptid aus dem mCol7-Protein kann auch ein Peptid aus dem humanen Col7-Protein verwendet werden, um Kaninchen zu immunisieren. Auch die aus dem Serum dieser immunisierten Kaninchen isolierten IgGs können Mäusen injiziert werden und führen dort zur Bildung von EBA-Wunden (Woodley et al., 2005).

1.4 Fragestellung

Die Bildung von EBA-Wunden wird durch neutrophile Granulozyten induziert, die durch an die DEJ gebundene Immunkomplexe aktiviert werden. Die Umsetzung dieses Ablaufs in den Tiermodellen der EBA kann zum einen durch mehrmalige Injektionen von Kollagen 7-spezifischen Kaninchen-Antikörpern erfolgen (passives Antikörpertransfer-induziertes Modell) oder über den herbeigeführten Toleranzbruch gegenüber des Kollagen 7-Moleküls (Immunisierungs-induziertes Modell).

Im ersten Fall, dem passiven Antikörpertransfer-induzierten EBA-Modell, besteht die Möglichkeit, dass die injizierten mausfremden Kaninchen-IgGs eine Immunreaktion in der Maus auslösen. Im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA wurde das Phänomen der Xenoreaktivität bisher jedoch noch nicht untersucht. Daher war ein Ziel der Arbeit zu untersuchen, ob eine durch die Injektion von Kaninchen-IgGs ausgelöste Immunantwort den EBA-Verlauf im passiven Antikörpertransfer-Modell beeinflusst. Dazu wurde der Krankheitsverlauf von Mäusen im passiven Antikörpertransfer-Modell untersucht, die keine eigenen Antikörper produzieren können.

Im zweiten Fall, dem Immunisierungs-induzierten EBA-Modell, führt der Toleranzbruch gegenüber dem Kollagen 7 dazu, dass mauseigene B-Zellen Kollagen 7-spezifische Antikörper produzieren. Th1-Zellen sind hier für den Klassenwechsel hin zu IgG2 verantwortlich, die die Bildung der EBA-Wunden in der Haut induzieren. Von den Th1-Zellen ist auch bekannt, dass diese nicht nur B-Zellhilfe im Lymphknoten leisten, sondern auch in die Peripherie auswandern und dort Effektorfunktionen ausüben. Es wäre also möglich, dass dies auch in der EBA geschieht. Da darüber noch nichts bekannt ist, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu

untersuchen, ob T-Zellen in der EBA in der Haut zu finden sind und welche Auswirkungen das Fehlen von T-Zellen in der Peripherie auf den EBA-Verlauf hat. Dies wurde untersucht, indem T-Zellen im Laufe der EBA-Erkrankung daran gehindert wurden, die Lymphknoten zu verlassen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

Tab. 2.1: Verwendete Mausstämmen

C57BL/6NCrl	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld
CD40L-KO (C57BL/6)	eigene Zucht (Dr. Kalies, Universität zu Lübeck)
JHT (C57BL/6)	eigene Zucht (Dr. Kalies, Universität zu Lübeck)
SJL/JOrllcoCrl	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld

Die verwendeten Mäuse waren zu Versuchsbeginn zwischen 8 und 10 Wochen alt und wurden in der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck bei konstantem Hell-Dunkel-Rhythmus (jeweils 12 Stunden) und einer maximalen Gruppengröße von 6 Mäusen gehalten. Wasser und Standard-Pelletfutter waren zu jeder Zeit frei zugänglich.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende 2 Tierversuchsanträge vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein genehmigt:

V 312-72241.122-1 (104-10) „Einfluss einer mechanischen und chemischen Reizung der Haut auf die Entstehung von autoimmundinduzierten Blasen - Untersuchungen am aktiven Mausmodell der EBA“

V 312-72241.122-1 (105-10) „Modulation des Verlaufs einer Autoimmunerkrankung der Haut - Untersuchungen am passiven Mausmodell der EBA“

2.1.2 Chemikalien

Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampuwa Plastipur (a. dest., steril)	Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt

Materialien und Methoden

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform AnalaR Normapur	VWR International GmbH, Darmstadt
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Diaminobenzidin (DAB) Chromogen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Diaminobenzidin (DAB) Substrate Buffer	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dimethyl Formamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Entelan	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
Erythrocyte Lysis Buffer	Qiagen, Hilden
Ethanol ≥ 99,8%, Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FACS Clean	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FACS Flow (Sheathfluid)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Fastblue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fastred	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
FTY720 (Fingolimod)	Cayman Chemical Europe, Tallinn, Estland
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Jung Einbettmedium	Leica Microsystems Nussloch, Nussloch
Ketanest S	Phizer Pharma GmbH, Berlin
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lysispuffer, Lysis Solution RL	Analytik Jena AG, Jena
Mayers Hämalaun Lösung	Merck KGaA, Darmstadt

Materialien und Methoden

Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Naphtol-AS MX Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Normal Mouse-Serum	Caltag Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Rompun	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
RPMI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sybr Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, England
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, England
Titermax	CytRX Corporation, Los Angeles
Tris-Base	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypanblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Washing Solution HS	Analytik Jena AG, Jena
Washing Solution LS	Analytik Jena AG, Jena
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.3 Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien

Tab. 2.3: Verwendete Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien

APAAP-Substrat	20 mg Naphtol-AS MX Phosphat, 2 ml Dimethyl Formamid, 0,1 M Tris-Puffer pH 8,2, 100 µl 1 M Levamisol
DAB	1 ml DAB-Substrate Buffer + 1 Tropfen DAB-Chromogen
DEPC-Wasser (0,1%)	1 ml DEPC, auf 1000 ml mit a.dest. auffüllen, über Nacht unter dem Abzug rühren lassen, am nächsten Tag autoklavieren (280°C, 3 h)

Materialien und Methoden

DNase1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA, 0,2 mM	0,3 g auf 50 ml a.dest.
Elutionspuffer	924 mg reduziertes Glutathion in 150 ml PBS
70% EtOH für RNA-Extraktion	140 ml EtOH auf 60 ml DEPC-Wasser
FACS-Puffer	PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA
Fast Blue	4 mg Fast Blue in 4 ml APAAP-Substrat für 10 Min. inkubieren, vor Gebrauch filtrieren
Fast Red	2 mg Fast Red in 3 ml APAAP-Substrat für 10 Min. inkubieren
Glycin Puffer pH 2,8	0,1 M Glycin in A.dest
Hämalaun	40 ml Mayers Hämalaun-Lösung, 160 ml PBS pH 7,4
Moviol 4-88	12 g Moviol in 30 ml a.dest. lösen und unter rühren 60 ml Tris-HCl zugeben, über Nacht rühren, Lösung unter Rühren im Wasserbad auf 90°C erhitzen und 45 Min. rühren lassen, langsam auf 50°C abkühlen lassen und 24 ml fluoreszenzfreies Glycerin einrühren, mit 1M NaOH pH auf 8,5 einstellen
Narkose-Lösung (5 ml)	1750 µl Ketanest, 1000 µl Rompun, 2250 µl NaCl
Paraformaldehyd 4%	4 g auf 100 ml PBS für 60 Min. bei 60°C unter ständigem Rühren
PBS	9 g NaCl, 1,74 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 0,18 NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O in 1000 ml a. dest.
Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
5x Reverse Transkriptase-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq-/Sybr Green-Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt

Materialien und Methoden

TBS 0,1 M pH 8,2	242,28 g Tris, 344,4 g NaCl, auf 3,5 l mit a. dest. auffüllen, pH mit HCl auf 7,6 einstellen, danach auf 4 l auffüllen, bei 4°C lagern, vor Gebrauch filtrieren
TBS-Tween	100 ml TBS-Stammlösung, 10 ml Tween-Stammlösung, 890 ml a. dest.
Tris-Puffer 0,1 M pH 8,2	12,1 g Tris + 900 ml a. dest., pH mit HCl auf 8,2 einstellen, auf 1000 ml mit a. dest. auffüllen
Tween-Stammlösung (5%)	10 ml Tween auf 190 ml a. dest.
Washing Solution HS (Gebrauchslösung)	vor erstmaligem Gebrauch 70 ml EtOH für RNA-Extraktion in Flasche füllen
Washing Solution LS (Gebrauchslösung)	vor erstmaligem Gebrauch 160 ml EtOH für RNA-Extraktion in Flasche füllen

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch ZelluTrans 12,0	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glutathion-Sepharose	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Protein-G-Resin Protein-G- Agarose Fast Flow	Millipore/Merck KGaA, Darmstadt
RNA-Extraktions-Kit innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellsieb, EASYstrainer 70 µm	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugationsfilter Amicon- Ultra-15	Millipore, Bradford, USA

2.1.5 Geräte

Tab. 2.5: Verwendete Geräte

Durchflusszytometer FACScalibur	BD Biosciences, Heidelberg
elektrische Nagelfeile	Tchibo Certified Merchandise, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Fluoreszenzmikroskopie- Kamera Olympus DP72	Olympus, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0 R (Rotor: 75002704)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop Axiophot	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Lichtmikroskopiekamera AxioCamHR	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R (Rotor: F-45-30-11)	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer Zählkammer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
PCR-Cycler ABI7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR-Cycler ABI7900 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Serienschnittmikrotom Hyrax C50	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen
Tischzentrifuge Centrifuge 5702 (Rotor: A-4-38)	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Minispin (Rotor: F-45-12-11)	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumentrifuge: Concentrator 5301 (Rotor: F-45-48-11)	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.6 Software

Tab. 2.6: Verwendete Software

Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0.1	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Axio Vision 6.1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
BD cell Quest Pro 5.2.1	BD Biosciences, Heidelberg
cellSense standard 1.5	Olympus, Hamburg
GraphPad Prism 5.03	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
EndNote X6 (Bld 6348)	Thomson Reuters, Frankfurt am Main
ImageJ 1.48v	National Institutes of Health, USA
Microsoft Office Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Sequence Detection Software 1.2.3	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sequence Detection Software 2.2.2	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.7 Antikörper

Tab. 2.7: Verwendete Antikörper. Bei monoklonalen Antikörpern ist in Klammern die Klonnummer angegeben.

Antikörper	Hersteller
Extra Avidin Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ratte anti-Maus-B220 (RA3-6B2)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
FITC Ziege anti-Maus-C3	MP Biomedicals, Solon OH, USA
Alexa Fluor 647 Ratte anti-Maus-CD19 (1D3)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
PE Ratte anti-Maus-CD49b (DX5)	eBioscience, Frankfurt am Main
Dye Light 488 anti-Maus-Col7	Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA

Materialien und Methoden

Ratte anti-Maus-Gr1 (RB6-8C5)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Alexa Fluor 555 Ziege anti-Maus IgG1	Life Technologies GmbH, Darmstadt
FITC Ziege anti-Maus IgG2c	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
FITC Schwein anti-Kaninchen-IgG	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Biotin Kaninchen-anti-Ratte IgG	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Ratte anti-Maus-Ki-67 (B56)	BioLegend, London, England
Maus anti-Maus NK1.1 (PK136)	eBioscience, Frankfurt am Main
Biotin Hamster anti-Maus-TCR β -Kette (H57-597)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
PE Hamster anti-Maus TCR β -Kette (H57-597)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Die im passiven Antikörpertransfer-Modell verwendeten mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs wurden aus dem Serum von mit einem mCol7-Peptid immunisierten Kaninchen isoliert (s. Methoden).

2.1.8 Primer

Die unten aufgeführten Primer sowie die bei der cDNA-Synthese verwendeten Random-Primer wurden über folgende Firma bezogen:

biomers.net GmbH, Ulm

Materialien und Methoden

Tab. 2.8: Verwendete Primer. Dargestellt sind die Basensequenzen der Forward- (for) und Reverse-Primer (rev) sowie, falls verwendet, die der Sonden (probe), des Weiteren die Länge der jeweiligen PCR-Produkte in Basenpaaren (bp) und die Referenznummer der Vorlage, die zur Erstellung des Primers verwendet wurde (Gen Accession-Nummer).

Primer		Sequenz	Produkt-Länge [bp]	Gen Accession-Nummer (NCBI)
MLN51	for	5´-CCAAGCCAGCCTTCATTCTTG	134	NM_138660.2
	rev	5´-TAACGCTTAGCTCGACCACTCTG		
	probe	5´-CACGGGAACCTCGAGGTGTGCCTAAC		
AID	for	5´-CGTGGTGAAGAGGAGAGATAGTG	111	NM_009645.2
	rev	5´-CAGTCTGAGATGTAGCGTAGGAA		
CCR5	for	5´-CCCACTCTACTCCCTGGTATTC	140	NM_009917.5
	rev	5´-GCAGGAAGAGCAGGTCAGAG		
CXCR3	for	5´-TGTACCTTGAGGTTAGTGAACGTC	170	NM_009910.2
	rev	5´-GCTGGCAGGAAGNGTTCTGTCT		
FcγR4	for	5´-GAGGGCTCATTGGACACAAC	120	NM_144559.2
	rev	5´-GTCCTATCAGCAGGCAGAATG		
	probe	5´-CTAGGCGATCCAGGGTCTCCATC		
Gr1	for	5´-GCGTTGCTCTGGAGATAGAAG	128	XM_006543243.1
	rev	5´-CTTCACGTTGACAGCATTACC		
IFNγ	for	5´-GCAAGGCGAAAAAGGATG	98	NM_008337.3
	rev	5´-GACCACTCGGATGAGCTCATTG		
	probe	5´-TGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAG		
IL-1β	for	5´-CTTCCAGGATGAGGACATGAG	99	XM_006498795.1
	rev	5´-CACACCAGCAGGTTATCATC		
	probe	5´-CATCTTTGAAGAAGAGCCCATCCTCTGTGAC		
IL-4	for	5´-GAGACTCTTTCGGGCTTTTCG	96	NM_021283.2
	rev	5´-AGGCTTTCAGGAAGTCTTTCAG		
	probe	5´-CCTGGATTCATCGATAAGCTGCACCATG		
IL-10	for	5´-TCCCTGGGTGAGAAGCTGAAG	96	NM_010548.2
	rev	5´-CACCTGCTCCACTGCCTTG		
	probe	5´-CTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCCC		
TCRβ	for	5´-CAGAGGGCTCACCCAAACC	129	NC_000072.6
	rev	5´-AGTAGGATCTCATAGAGGATGGT		

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolierung/cDNA-Synthese

Zur Isolierung der RNA aus Haut- oder Lymphknotenschnitten wurden die Schnitte nach dem Schneiden mit dem Serienschmittmikrotom in 700 µl Lysispuffer aufgelöst. Nach einminütigem Vortexen und anschließendem Herunterzentrifugieren wurde der Lysispuffer 10-mal mit einer Spritze + Kanüle aufgezogen. Danach wurde 700 µl 70%-iger Ethanol für RNA-Extraktion hinzupipettiert und 10-mal auf- und abpipettiert. 700 µl dieses Gemisches wurden auf ein RNA-Extraktionssäulchen, das sich in einem dafür vorgesehenen Auffanggefäß befand, pipettiert und im Anschluss bei 7370 x G mit einer Tischzentrifuge (Minispin, Rotor: F-45-12-11) für 2 Min. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde danach dekantiert und die verbliebenen 700 µl des Lysispuffer-Ethanol-Gemisches auf das Säulchen pipettiert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation (7370 x G, 2 Min.) und dem Dekantieren des Durchflusses wurde zum Waschen der extrahierten RNA 500 µl der Washing Solution HS auf das Säulchen pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 7370 x G für 1 Min. und dem Dekantieren des Durchflusses wurden 700 µl der Washing Solution LS auf das Säulchen pipettiert und noch einmal bei 7370 x G für 1 Min. zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Durchflusses wurde das Säulchen zur Trocknung bei 7370 x G für 2 Min. zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Säulchen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert, dessen Deckel mit einer Kanüle 4-mal durchstochen wurde. Zur Eluierung wurden 60 µl RNase-freies DEPC-Wasser auf die Membran des Säulchens pipettiert und für 1 Min. inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (3280 x G, 1 Min.). der Durchfluss wurde zur Steigerung der Ausbeute nochmals auf die Membran des Säulchens pipettiert und nach einminütiger Inkubation wurde das Säulchen in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß abermals bei 3280 x G für 1 Min. zentrifugiert. Zur Aufkonzentration wurde der Durchfluss in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit dem durchlöcherten Deckel für 22 Min. in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Rotor: F-45-48-11) bei 60°C und 240 x G in einer Vakuumzentrifuge zentrifugiert.

Das Gesamtvolumen des Konzentrats wurde zur cDNA-Synthese mit RNase-freiem DEPC-Wasser auf 8 µl aufgefüllt. Für den anschließenden Verdau der DNA wurden zur extrahierten RNA jeweils 1 µl 10x DNase-Puffer sowie DNase-I-Enzym hinzupipettiert, der Ansatz mit einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert und für 15 Min. bei RT inkubiert. Der DNA-Verdau

Materialien und Methoden

wurde durch Hinzupipettieren von 1,5 µl 15 mM EDTA, dem anschließenden Vortexen und der Inkubation des Ansatzes für 10 Min. bei 70°C abgestoppt. Nachdem der Ansatz danach sofort auf Eis gelagert und herunterzentrifugiert wurde, begann das Umschreiben der RNA in cDNA. Dazu wurde 1 µl der Random-Primer zum Umschreibensatz hinzupipettiert und für 5 Min. bei 65°C inkubiert. Als nächstes wurde der Reverse Transkriptase (RT) -Master-Mix, bestehend aus 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl dNTPs und 2 µl RNase-freiem Wasser, und zusätzlich 0,5 µl des RT-Enzyms hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der herunterzentrifugierte RT-Ansatz wurde nach 10-minütiger Inkubation bei RT für 60 Min. bei 42°C inkubiert. Eine anschließende Inkubation für 10 Min. bei 70°C führte zum Reaktionsstopp, sodass im Anschluss die cDNA bei -20°C eingefroren werden konnte.

PCR

In einer 96-Well-Platte wurden 2 µl des Primermixes aus Forward- und Reverse-Primer in der für den jeweiligen Primer optimalen Verdünnung und danach 18 µl des PCR-Mastermixes, bestehend aus 0,625 µl cDNA, je 10 µl des 2x SybrGreen- bzw. der Taqman- Polymerase und 7,4 µl a. dest. pro Well, zusammenpipettiert. Der PCR-Ansatz wurde dann in der 96-Well-Platte herunterzentrifugiert (Megafuge R 1.0, Rotor: 75002704) und war nun bereit zur PCR-Analyse. Die Temperaturschritte sowie Dauer und Anzahl der einzelnen Zyklen sind der untenstehenden Tabelle (Tab. 2.9) zu entnehmen

Tab. 2.9: Temperatur, Dauer und Zyklenzahl der einzelnen PCR-Schritte

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Erste Dissoziation	95°C	60 s	1 x
Dissoziation	95°C	45 s	50 x
Primeranlagerung/ Elongation	60°C	60 s	
Schmelzkurven-Bestimmung	95°C	15 s	1 x
(nur bei PCR-Analysen mit SybrGreen)	60°C - 95°C	15 s pro 0,5°C-Schritt	

Zur Quantifizierung der Expression des jeweiligen Gens wurde der durch die quantitative RT-PCR erhaltene C_T (Cycle of Threshold: Zyklus, bei dem die sich durch die DNA-Amplifikation erhöhende Fluoreszenzintensität einen festgesetzten Schwellenwert überschreitet) des zu

untersuchenden Gens ins Verhältnis zum C_T des Gens *MLN51* gesetzt, das in allen Zellen gleich stark exprimiert wird. Dazu wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{relative Expression Gen } x = 2^{([\text{Mittelwert CT MLN51}] - [\text{Mittelwert CT Gen } x])}$$

2.2.2 Immunbiologische Methoden

Durchflusszytometrische Auswertung von Lymphozyten im peripheren Blut

Zur Färbung von Zellen aus peripherem Blut für die Analyse per Durchflusszytometer, wurden 25 μl Blut aus der Schwanzvene der Mäuse in 25 μl EDTA 0,2 mM aufgenommen und auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Blut in 500 μl Erythrocyte Lysis Buffer (Qiagen) für 10 Min. bei RT inkubiert und im Anschluss mit einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417 R, Rotor: F-45-30-11) bei 210 x G und 4°C für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nach Resuspendierung des Pellets in 500 μl FACS-Puffer wurde erneut zentrifugiert (210 x G, 4°C, 5 Min.). Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet in 100 μl FACS-Puffer pro Färbeansatz resuspendiert und aliquotiert. Zu den Aliquots wurden die gewünschten Färbeantikörper in jeweiliger Verdünnung (Tab. 2.10) hinzupipettiert und der Färbeansatz für 30 Min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (210 x G, 4°C, 5 Min.), Verwerfen des Überstands und Resuspendierung in 1000 μl FACS-Puffer konnten die Proben gemessen werden. Sollte die durchflusszytometrische Messung nicht am selben Tag durchgeführt werden, so wurde das Pellet nach dem letzten Zentrifugationsschritt und Abnahme des Überstandes in 250 μl FACS-Puffer resuspendiert, der Ansatz zur Fixierung mit 250 μl 4%-ige PFA-Lösung vermischt und im Anschluss unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert. Vor Messung der fixierten Proben wurde der Ansatz zentrifugiert (210 x G, 4°C, 5 Min.), der Überstand abgenommen und das Pellet in 1000 μl FACS-Puffer resuspendiert.

Tab. 2.10: Antikörper-Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung
TCR β -PE	1:500
CD19-Alexa Fluor 647	1:1000

Die zu messenden Proben wurden in die dafür vorgesehenen Durchflusszytometer-Röhrchen überführt und vor Messung gevortext. Zur Auswertung wurde zunächst im Forward-

/Sideward-Scatter auf die Lymphozytenpopulation gegatet. Die Zellen aus dem Lymphozytengate wurden aufgetrennt nach der durch die jeweiligen Photomultiplier gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Dotplot dargestellt und die einzelnen Quadranten ausgewertet. Es wurden pro Probe 15000 Events gemessen.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Lymphozyten-Isolierung

Zur Isolierung der Lymphozyten wurden die entnommenen und in PBS aufbewahrten Lymphknoten zusammen mit etwas RPMI-Medium in eine Petrischale gegeben und unter sterilen Bedingungen zwischen zwei Objektträgern zerrieben. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in ein 70 µm Zellsieb gegeben und zur Erhöhung der Ausbeute mit dem Spritzenkolben durch das Sieb in ein 50 ml-Zentrifugationsgefäß, in das 1 ml RPMI-Medium vorgelegt worden war, gerieben, und anschließend das Sieb mit PBS über dem 50 ml-Zentrifugationsgefäß gespült. Das Zentrifugationsgefäß wurde im Anschluss auf 20 ml mit PBS aufgefüllt und bei 400 x G für 10 Min. in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5702, Rotor: A-4-38) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Lymphozytenkonzentration in der Zellsuspension wurden 10 µl der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 10 µl Trypanblau überführt. Nun konnte die Lymphozytenzahl bestimmt werden, indem 1 µl des Ansatzes mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurde. Es wurden 4 Eck-Quadrate ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und die Lymphozytenzahl mit folgender Formel bestimmt:

$$(\text{Mittelwert gezählte Zellen}) \times 5 \times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl in 5 ml}$$

Im Anschluss erfolgte die Einstellung der gewünschten Konzentration und des Volumens für den Injektionsansatz.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Herstellung der Protein G-Säule

Die Protein G-Agarose wurde komplett resuspendiert und 1 ml dieser Suspension in eine Säule gegeben, in die 1 ml Waschpuffer vorgelegt wurde. Nachdem die Agarose sedimentierte, wurde der Überstand abgelassen und weitere 5 ml des Waschpuffers auf die

Säule gegeben. Nach einem Waschschrift mit einem Säulenvolumen PBS, wurde die Säule geschlossen, ca. 5 ml 20 % EtOH eingefüllt und konnte anschließend bei 4°C gelagert werden.

IgG-Konzentration

Das aufgetaute und gevortexte Kaninchenserum wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Protein G-Säule gegeben und für mindestens 1 Stunde unter ständigem Schütteln bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Serum verworfen und die Säule mit PBS solange gewaschen, bis die meisten ungebundenen Proteine aus der Säule gewaschen waren und die optische Dichte (OD) bei 280 nm bei unter 0,05 lag. Als nächstes folgte die Eluierung mit Glycin-Puffer. Dabei wurde das Eluat in einem geeigneten Behältnis aufgefangen, in das 1-2 ml Tris-Base vorgelegt wurden. Der Proteingehalt des Eluats wurde dabei ständig überwacht und die Eluierung fortgeführt, bis die OD des Eluats bei unter 0,1 lag. Der pH-Wert des Eluats wurde im Anschluss mit Tris-Base auf 7,2 eingestellt. Zur Aufkonzentrierung wurde das Eluat in Zentrifugierfilter (Durchlassgröße bis 30 kDa) für 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, bei 3345 x G und 4°C für 40 Min. in einer Zentrifuge (Megafuge R 1.0, Rotor: 75002704) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis das Eluat auf das gewünschte Volumen eingestellt war. Zum Wechsel des Puffers wurde im Anschluss das Eluat erneut in die Zentrifugierfilter überführt und nochmals zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde, der Durchfluss verworfen und das fehlende Volumen mit PBS aufgefüllt. Nach zwei Wiederholungen dieses Schrittes konnte nun das Eluat sterilfiltriert und anschließend die IgG-Konzentration per Nanodrop (OD₂₈₀) bestimmt werden.

Heterologe Expression und Konzentration des mCol7C-GST-Peptids

Das zur Immunisierung von SJL-Mäusen im Immunisierungs-induzierten Mausmodell der EBA verwendete mCol7C-GST-Peptid wurde aus dem Institut für experimentelle Dermatologie bezogen, wo es, wie von (Sitaru et al., 2005) beschrieben, hergestellt wurde.

2.2.5 Immunhistologische Methoden

Schneiden/Färben von Kryoschnitten

Die gefrorenen Proben von Hautproben oder Lymphknoten wurden bei -20°C in Einbettmedium eingebettet, sodass nun mit dem Mikrotom 12 µm dicke Schnitte angefertigt

werden konnten. Diese wurden auf Objektträgern platziert und danach bei Raumtemperatur getrocknet.

HE-Färbung

Die Objektträger mit den Schnitten wurden zuerst für 10 Min. in ein Methanol-/Ethanolbad (1:1) bei -20°C gestellt und im Anschluss mit PBS (1M, pH 7,4) für 2 x 5 Min. gespült. Zur Kernfärbung kamen die Objektträger mit den Schnitten in ein Hämalaunbad (1:5 mit PBS pH 7,4 verdünnt) und wurde je nach gewünschter Intensität der Kernfärbung für 1 - 10 Min. inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Spülen mit PBS für jeweils 5 Min. und danach das 10-minütige Bläuen in PBS. Nach der Kernfärbung wurden die Schnitte kurz mit a. dest. gespült. Als nächstes folgte die Färbung mit 1 %-iger Eosinlösung für 1 -3 Min. und im Anschluss ein Spülschritt in a. dest.. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz in mehreren Bädern mit aufsteigender Ethanolkonzentration (70%, 80%, 90%, 96%, 2 x 100%) jeweils kurz gespült. Nach einem Bad für 3 x 2 Min. in Xylol, konnten die Proben mit Entelan eingedeckt werden.

TCR β -Färbung

Die getrockneten Schnitte wurden für 10 Min. bei -20°C in einem 1:1-Gemisch von Methanol und Aceton inkubiert und einmal kurz und danach für 10 Min. mit TBS-Tween gespült. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem biotinylierten TCR β -Antikörper (1:100) für 1 Stunde. Danach wurden die Schnitte wieder einmal kurz und dann für 10 Min. mit TBS-Tween gespült. und danach mit einem 1:100 verdünnten Avidin Peroxidase-Antikörper für 30 Min. inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt mit TBS-Tween (erst kurz, dann 10 Min.) erfolgte ein Bad in DAB für 5 Min., bevor erneut mit TBS-Tween gespült wurde. Für eine schwache Kernfärbung wurden die Schnitte für 30 s in Hämalaun inkubiert, danach einmal kurz und danach für 10 Min. mit PBS gespült und konnten dann mit Aquatex eingedeckt werden.

Gr1-Färbung

Nach einem Bad in einem 1:1-Methanol/Aceton-Gemisch bei -20°C für 10 Min. wurden die Schnitte einmal kurz und dann für 10 Min. mit TBS-Tween gespült. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem 1:10000 verdünnten Gr1-Antikörper für eine Stunde und einem anschließenden Spülschritt (s.o.) mit TBS-Tween. Es folgte die Inkubation mit einem biotinylierten Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (Verdünnung 1:500) + 5% Normal Mouse-

Serum (NM) für 30 Min.. Nach einem erneuten Spülschritt wurden die Schnitte mit Avidin-Antikörper (Verdünnung 1:100) für 30 Min. inkubiert und wiederum mit TBS-Tween gespült. Nach der Inkubation mit Fast Blue für 25 Min. erfolgte abermals ein Spülschritt mit TBS-Tween und im Anschluss die Inkubation in einer Hämalaun-Lösung für 30 s. Nach einem kurzen und danach 10-minütigen Spülschritt konnten die gefärbten Schnitte mit Aquatex eingedeckt werden.

B220/TCR β

Die Schnitte wurden in einem 1:1-Methanol/Aceton-Gemisch bei -20°C für 10 Min. inkubiert und anschließend einmal kurz und danach für 10 Min. mit TBS-Tween gespült, woraufhin sie mit einem biotinylierten TCR β -Antikörper (Verdünnung 1:100) für 1 Stunde inkubiert wurden. Nach einem anschließenden Spülschritt mit TBS-Tween wurden die Schnitte 30 Min. mit einem Avidin-Peroxidase-Antikörper (Verdünnung 1:100) inkubiert und danach mit TBS-Tween gespült. Es folgte eine Inkubation für 5 Min. in DAB und nach einem weiteren Spülschritt die einstündige Inkubation der Schnitte in einer Ratte-anti-B220-Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:100 in PBS + 1% BSA + 0,1% NaN₃). Die Schnitte wurden im Anschluss wieder mit TBS-Tween gespült und dann mit einem biotinylierten Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (Verdünnung 1:500 + 5% NM-Serum). Nach erneuter Spülung mit TBS-Tween erfolgten die Inkubation der Schnitte in einer Avidin-Alkalin-Lösung (1:100) für 30 Min., danach ein Spülschritt und die Färbung mit Fast Blue. Nach einer weiteren Spülung mit TBS-Tween wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

B220/Ki-67

Lymphknotenschnitte wurden jeweils für 10 Min. in ein Chloroform- und danach in ein Aceton-Bad gestellt. Nach kurzem und danach 10-minütigem Spülen mit TBS-Tween wurden die Schnitte bei 4°C in einer 4%-igen PFA-Lösung für 45 Min. fixiert. Es folgte ein Spülschritt mit TBS-Tween und im Anschluss die Färbung mit Ki-67 (Verdünnung 1:100 in PBS + 1% BSA, 0,1% NaN₃) ü. N.. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Spülschritt mit TBS-Tween und die anschließende Inkubation mit einem biotinylierten Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (Verdünnung 1:500 in PBS + 5% NM-Serum) für 30 Min.. Nach einem erneuten Spülschritt wurden die Schnitte mit einer Avidin-Alkalin-Antikörper-Lösung (Verdünnung 1:100 in PBS) für 30 Min. inkubiert, mit TBS-Tween gespült und anschließend mit einer Fast Red-Lösung für 25

Min. gefärbt und wieder mit TBS-Tween gespült. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem Ratte-anti-B220-Antikörper (Verdünnung 1:100 in PBS + 1% BSA + 0,1% NaN₃) und anschließendem Spülschritt mit TBS-Tween. Danach wurden die Schnitte mit einem biotinyliertem Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (Verdünnung 1:500 in PBS + 5% NM-Serum) für 30 Min. inkubiert. Nach einem Spülschritt erfolgte eine Inkubation mit einem Avidin-Alkalin-Antikörper (Verdünnung 1:100 in PBS), danach ein weiterer Spülschritt mit TBS-Tween und im Anschluss die Färbung mit Fast Blue für 25 Min.. Nach einem Spülschritt mit TBS-Tween konnten die Proben mit Aquatex eingedeckt werden.

rab-IgG-/mIgG1-/mIgG2c-/C3-Färbung

Zur immunhistochemischen Färbungen für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die getrockneten Schnitte für 10 Min. bei -20°C in ein Methanol/Aceton-Bad (1:1) gestellt und im Anschluss mit TBS-Tween einmal kurz und danach für 10 Min. gespült. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem jeweiligen FITC-markierten Antikörper in geeigneter Verdünnung (anti-Kaninchen-IgG: 1:100, anti-mIgG1: 1:400, anti-mIgG2c: 1:1000, anti-Maus-C3: 1:200). Nach einem weiteren kurzen und darauffolgenden 10-minütigen Spülschritt mit TBS-Tween unter Lichtausschluss wurden die Schnitte zur Kernfärbung mit Hoechst (Verdünnung 1:10000) für 10 Min. im Dunkeln inkubiert und danach einem weiteren Spülschritt unter Lichtausschluss unterzogen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Moviol eingedeckt und dunkel gelagert.

Überprüfung der Kreuzreaktivität zur Detektion von murinen Immunglobulinen im passiven Antikörpertransfer-induzierten EBA-Modell

Um zu testen, ob die gegen Maus-IgGs gerichteten Antikörper mit den Kaninchen-IgGs kreuzreagieren wurden Hautschnitte naiver C57BL/6-Mäuse, in denen keine murinen IgGs zu erwarten sind, mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs (Verdünnung 1:1000) für 30 Min. inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen folgte die Inkubation der Schnitte mit den jeweiligen Detektionsantikörpern für Kaninchen-IgGs (Negativ- und Positivkontrolle), mIgG1 und mIgG2c (s. Tab. 2.7).

Nach der Färbung konnten die Schnitte am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Es zeigte sich in der Positivkontrolle sowie bei mIgG1 und mIgG2c eine Bindung über die ganze Dermis, was darauf schließen lässt, dass trotz gründlichem Waschen geringe Konzentrationen

der Kaninchen-IgGs zurückgeblieben sind. Während bei mIgG1 auch eine etwas stärkere Bindung an der DEJ zu sehen war, war dies bei mIgG2c nicht der Fall. So kann eine Kreuzreaktivität gegen mIgG2c ausgeschlossen werden, nicht aber gegen IgG1. Daher wurde in der Arbeit nur die Deposition von mIgG2c untersucht.

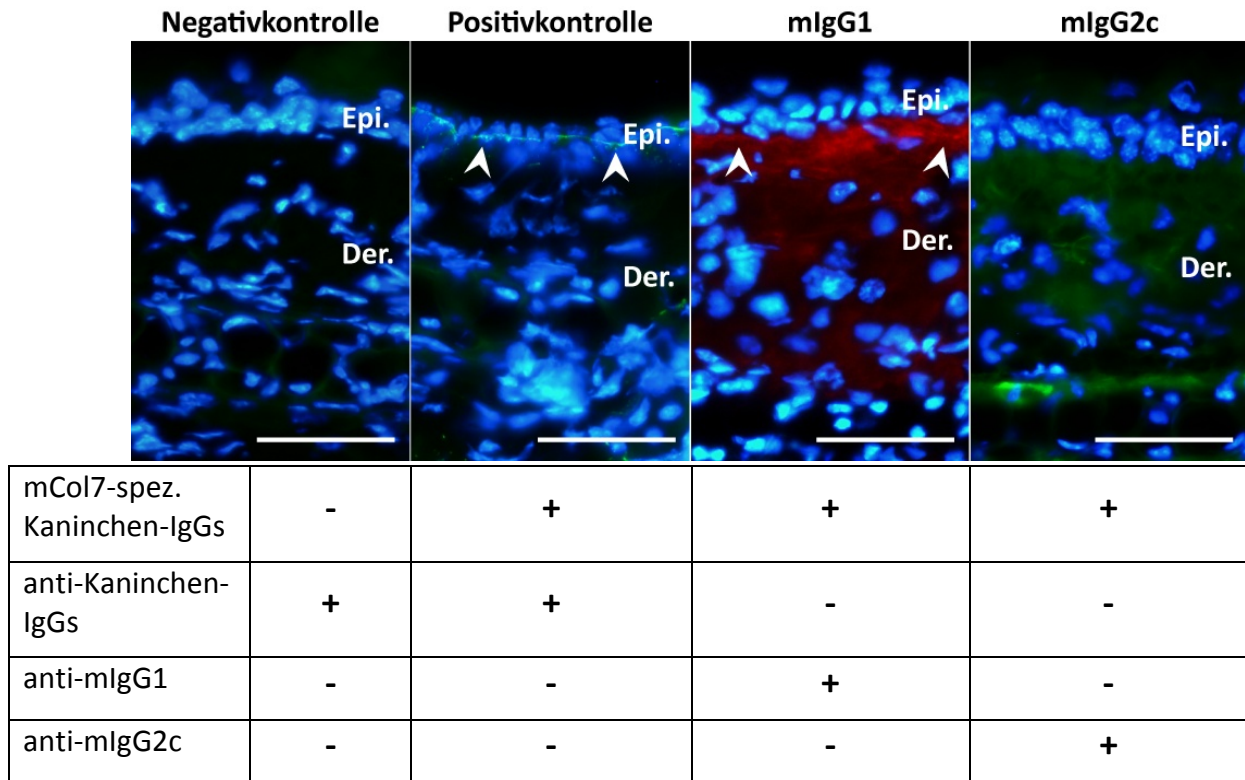


Abb. 2.1: Überprüfung der Kreuzreaktivität der verwendeten Fluoreszenzantikörper. Kryoschnitte naiver Mäuse wurden, ausgenommen der Negativkontrolle, die nur mit Puffer inkubiert wurde, mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs inkubiert. Anschließend erfolgte, im Falle der Negativ- und Positivkontrolle, die Detektion von Kaninchen-IgGs sowie die Detektion von mIgG1 und mIgG2c. Während sowohl in der Negativkontrolle als auch bei der Detektion von mIgG2c keine Antikörperablagerungen gefunden werden konnten, zeigten die Positivkontrolle und auch die Überprüfung von mIgG1 Depositionen von IgGs an der DEJ (weiße Pfeilspitzen). Epi.: Epidermis, Der.: Dermis. Größenstandard \cong 50 μ m. Die darunter stehende Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper für die einzelnen Gruppen.

Um sicher zu gehen, dass anti-mIgG2c nicht mit Kaninchen-IgGs kreuzreagieren, wurde auch Haut von B-Zell-defizienten JHT- und CD40L KO-Mäuse, die keine eigenen IgGs haben, analysiert. Hier zeigte sich klar, dass mIgG2c nicht an das Kaninchen-IgG an der DEJ binden.

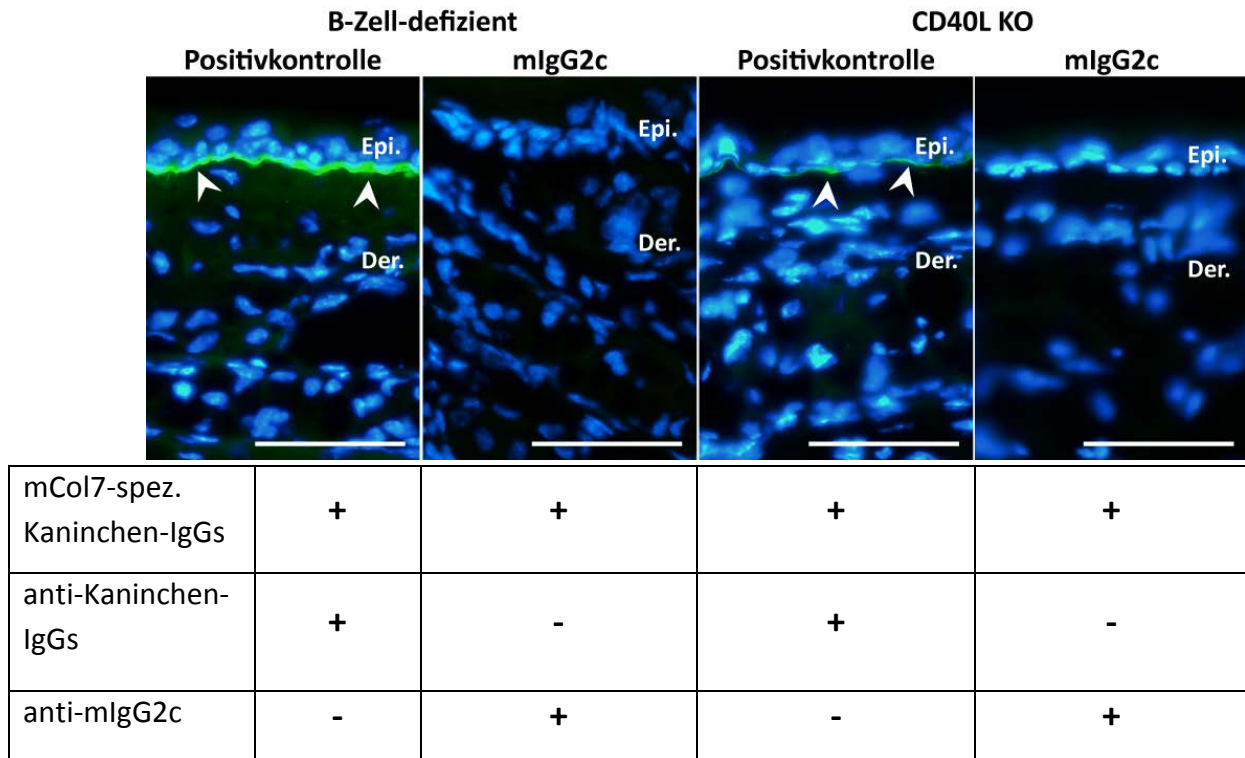


Abb. 2.2: Untersuchung der Kreuzreaktivität in B-Zell-defizienten JHT- und CD40L KO-Mäusen. Haut von naiven B-Zell-defizienten JHT- sowie CD40L KO-Mäusen wurde mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs inkubiert, anschließend gewaschen und danach mit gegen Kaninchen-IgGs bzw. mIgG2c gerichteten Antikörpern behandelt (s. Tabelle unterhalb der Abbildung). Während in den Positivkontrollen beider Gruppen Antikörper-Bindungen an die DEJ detektiert werden konnten (weiße Pfeilspitzen), war dies bei der Detektion der mIgG2c nicht der Fall. Größenstandard $\cong 50 \mu\text{m}$

2.2.6 Tierexperimentelle Methoden

Immunisierung der Mäuse zu Induktion von EBA Immunisierung-induzierten Modell

Zur Herstellung des Immunisierungsansatzes für eine Maus wurden $60 \mu\text{g}$ mCol7c-GST mit demselben Volumen des Adjuvans Titermax zusammenpipettiert und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von bis zu $50 \mu\text{l}$ eingestellt. Der Immunisierungsansatz wurde anschließend im Kühlraum bei 4°C RT für 30 Min. gevortext, der Ansatz im 1,5 ml Reaktionsgefäß heunterzentrifugiert und für weitere 15 Min. bei 4°C gevortext. Dies wurde solange wiederholt, bis eine einheitliche Emulsion entstanden ist. Der Immunisierungsansatz wurde dann in eine Spritze überführt und der narkotisierten Maus subkutan in die Sohle eines Hinterfußes injiziert.

Mechanische Irritation der Haut mit einer Nagelfeile

Die Außenseite des Ohres einer narkotisierten Maus wurde mit doppelseitigem Klebeband an der Außenseite einer Plastikröhre befestigt, sodass die Innenseite frei zugänglich war. Anschließend wurde die elektrische Nagelfeile für kurze Zeit leicht auf die Haut aufgesetzt, um so kontrolliert mechanische Irritationen zu setzen.

Injektionen von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs zur Induktion von EBA-Wunden

Zur Herstellung des Injektionsansatzes wurde das Volumen, das die zu injizierende Menge an mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs enthält, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit PBS das gewünschte Injektionsvolumen eingestellt. Dieses wurde im Anschluss in einer Spritze aufgezogen und der narkotisierten Maus in der Leistengegend subkutan injiziert.

Bestimmung der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche

Zur Quantifizierung des Ausmaßes der EBA-Erkrankung wurde die von EBA-Wunden betroffene Körperoberfläche bestimmt. Dazu wurden alle Körperteile der narkotisierten Mäuse auf Haarausfall, Blasen, Krusten oder Erosionen untersucht und der prozentuale Anteil der EBA-Wunden pro Körperteil festgehalten. Zur Ermittlung des Anteils der EBA-Wunden an der Gesamt-Körperoberfläche wurden die Anteile der einzelnen Körperteile mit einem Faktor, der der Tabelle 2.11 zu entnehmen ist, multipliziert. Die Summe dieser Produkte entspricht der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche.

Tab. 2.11: Anteil der einzelnen Körperteile an der Gesamt-Körperoberfläche

Körperteil	Faktor
rechtes Ohr	0,025
linkes Ohr	0,025
rechtes Auge	0,005
linkes Auge	0,005
Schnauze	0,025
Kopf + Hals	0,025
orale Mukosa	0,09
rechtes Vorderbein	0,05
linkes Vorderbein	0,05
rechtes Hinterbein	0,1
linkes Hinterbein	0,1
Schwanz	0,1
Torso	0,4

2.2.7 Digitale Bildanalyse-Methoden

Digitale Quantifizierung des Anteils der von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ

Nach immunhistologischer Färbung von Kryoschnitten von Ohrhaut mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper, wurden alle auszuwertenden Schnitte mit derselben Vergrößerung und Belichtungszeit nach Schwarzabgleich mit einem Fluoreszenzmikroskop digital fotografiert.

Zunächst wurde in einer Positivkontrolle bestimmt mit welcher Intensität spezifisch gebundene Antikörper an der DEJ fluoreszieren. Dazu wurden alle dunkleren Bereiche der Fotografien ausgeblendet und dann die Helligkeit der auszublenenden Bereiche immer weiter erhöht, bis kurz vor dem Zeitpunkt, an dem auch die Fluoreszenz der spezifisch gebundenen Immunglobuline ausgeblendet worden wären. So wurde alles was bei diesem Helligkeits-Ausschluss noch nicht ausgeblendet wurde, als spezifische Bindung angesehen.

Die zu untersuchenden Schnitte wurden anschließend mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Zunächst wurde mit dem Freehand-Tool die gesamte DEJ markiert. Über die Option „Measure“ konnte die Länge der Markierung bestimmt werden, die in der Spalte „Length“ der „Results“-Seite abzulesen war. Nun wurden auch hier alle Bereiche mit der zuvor in der Positivkontrolle bestimmten Helligkeit ausgeblendet und anschließend die Bereiche der DEJ mit dem „Freehand“-Tool markiert die noch angezeigt werden und damit spezifische IgG-Bindung aufwies. Nachdem auch die Länge der markierten spezifisch gebundenen DEJ-Teilstrecken bestimmt wurde, wurde die Summe dieser gebildet und durch die Gesamt-DEJ-Länge geteilt. Der erhaltene Quotient ist der Anteil der durch Kaninchen-IgGs spezifisch gebundenen DEJ. Für jede einzelne untersuchte Maus wurden dabei drei Schnitte ausgewertet.

Digitale Quantifizierung der Konzentration der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ

Nach immunhistologischer Färbung von Kryoschnitten mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper, wurden alle auszuwertenden Schnitte mit derselben Belichtungszeit nach Schwarzabgleich mit einem Fluoreszenzmikroskop digital fotografiert. Die Dateien wurden mit dem Bildauswertungs-Programm ImageJ geladen. Mit Hilfe des Freehand-Tools wurde die gesamte DEJ umrahmt und die Fluoreszenzintensität der an diese gebundenen Antikörper gemessen. Anschließend wurde der restliche Hautbereich mit Hilfe des Werkzeugs „Freehand-Selection“ umrahmt und die Fluoreszenzintensität des Hintergrunds gemessen. Die Fluoreszenzintensität von DEJ und Hintergrund konnte im Fenster „Results“ in der Spalte „Mean“ abgelesen werden. Zur Ermittlung der Konzentration der detektierten Kaninchenantikörper an der DEJ wurde die gemessene Fluoreszenzintensität des Hintergrunds von der Fluoreszenzintensität der DEJ subtrahiert.

Bestimmung der Keimzentrums-Fläche

Die Bestimmung des Anteils der Keimzentrumsfläche an der Gesamtfläche des Lymphknotens wurde mit ImageJ berechnet. Nach immunhistologischer Färbung von Kryoschnitten der zu untersuchenden Lymphknoten mit B220/Ki-67 wurden die Schnitte digital fotografiert und mit ImageJ geöffnet. Mit dem Werkzeug „Freehand-Selection“ wurden die Keimzentren umrahmt und durch Drücken der Tastenkombination „Strg+M“ die Fläche, die im „Results“-Fenster in

der Spalte „Area“ abzulesen war, ermittelt. Im Anschluss konnte so auch die Gesamtfläche des Lymphknotens bestimmt werden. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der Keimzentrumsfläche wurde der Quotient aus der Summe aller Keimzentrumsflächen eines Schnittes und der Gesamt-Lymphknotenfläche gebildet.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe des Mittelwerts \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 durchgeführt. Zum statistischen Vergleich zweier Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Der Kruskal-Wallis-Test und a posteriori der Dunn's-Test wurden beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen herangezogen. Dabei gilt für p, sofern nicht angegeben: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der endogenen Antikörper auf die Krankheitsentwicklung im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA

3.1.1 Injektionen von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs induzieren EBA-Wunden in Mäusen

Zur Etablierung des passiven Antikörpertransfer-Modells wurden suszeptiblen C57BL/6-Mäusen viermalig an jedem zweiten Tag 5 mg Antikörper in die Leistengegend subkutan injiziert. Diese wurden aus dem Serum von Kaninchen gewonnen, welche mit dem rekombinant hergestellten mCol7C-Peptid immunisiert worden waren. Die injizierten mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs konnten mittels direkter Immunfluoreszenz (DIF) in Kryoschnitten der Haut wiedergefunden werden, wo sie an die dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) gebunden haben (Abb. 3.1A). Ebenfalls an der DEJ konnten auch Moleküle des Komplementfaktors 3 (C3) per DIF an der DEJ detektiert werden (Abb. 3.1B), was auf die Aktivierung des Komplementsystems hindeutet. Das Binden von C3-Molekülen hat das Einwandern von Granulozyten zur Folge: Die Analyse der Genexpression in Haut, die nicht von Blasen betroffen war, mittels quantitativer RT-PCR zeigte, dass dort das Granulozyten-spezifische Gen *Gr1* nicht exprimiert wurde. Dagegen konnte in läsionaler Haut eine signifikant höhere *Gr1*-Expression festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Immunhistologische Färbungen von Schnitten gesunder Haut zeigten keine Granulozyten, wohingegen in läsionaler Haut eine starke Einwanderung von $Gr1^+$ -Zellen zu erkennen war, die zur Separation der Epidermis von der Dermis führte (Abb. 3.1D). Die dermo-epidermale Separation war auch makroskopisch sichtbar: Mäuse, denen mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert wurden, entwickelten verschiedene Krankheitsmerkmale, wie Haarausfall (Abb. 3.1E, oben), Erosionen (Abb. 3.1E, unten links) und auch Blasen (Abb. 3.1E, unten rechts), die im Folgenden als „EBA-Wunden“ bezeichnet werden. Vor allem traten diese EBA-Wunden um die Injektionsstelle herum und im Kopfbereich auf. Auffällig dabei war, dass sich die EBA-Wunden scharf von gesunder Haut abgrenzten (Abb. 3.1E rechts, schwarzer Pfeil: gesunde Haut, weißer Pfeil: EBA-Blase).

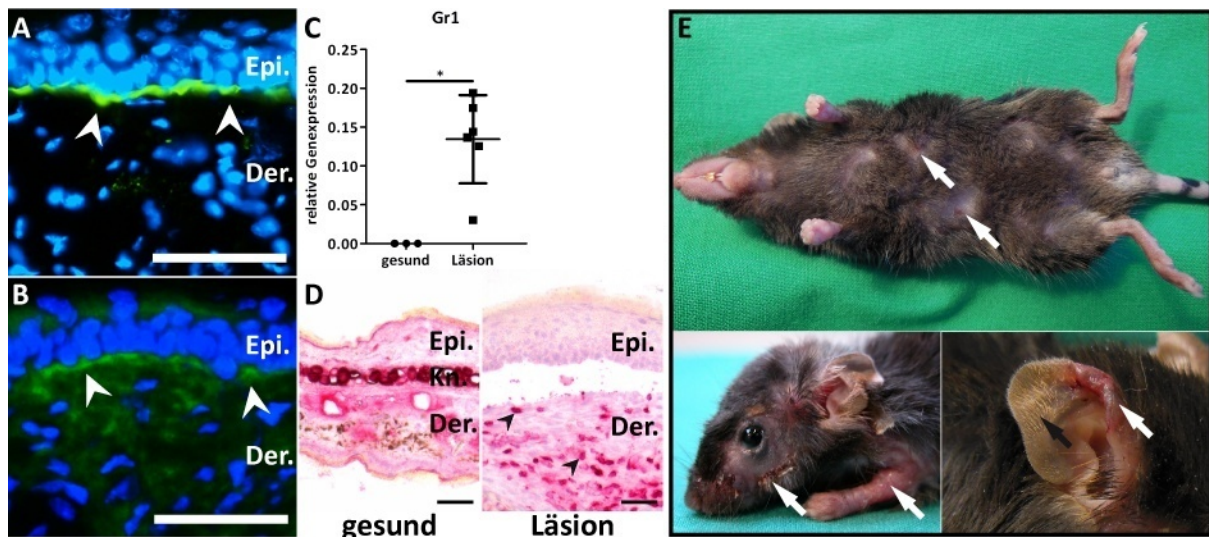


Abb. 3.1 Bindung von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs und C3 an die DEJ führt zu Einwanderung von Granulozyten und Blasenbildung. Kryoschnitte von Ohrhaut wurde mit einem fluoreszenzmarkierten (A) anti-Kaninchen-IgG- bzw. (B) C3-Antikörper (jeweils grün) gefärbt (blau: Zellkerne). Weiße Pfeilspitzen zeigen Deposition von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs bzw. C3-Molekülen. (C) Aus Kryoschnitten gesunder (n=3) und läsionaler Haut (n=6) wurde mRNA extrahiert. Die Analyse mittels quantitativer RT-PCR zeigte eine signifikant höhere relative Genexpression (Kopie/ Kopie MLN51) von Gr1 in läsionaler Haut. (D) Eine immunhistochemische Gr1-Färbung von Kryoschnitten gesunder (links) und läsionaler Haut (rechts) zeigte die Einwanderung von Granulozyten (schwarze Pfeilspitzen, rote Färbung) in läsionale Haut. (E) Die Einwanderung der Granulozyten führt zur Ausbildung von Haarausfall (oben, weiße Pfeile), Erosionen (links unten) und Blasen (rechts unten). Die betroffenen Hautareale sind dabei deutlich von gesunder Haut (schwarzer Pfeil) abgegrenzt. Gezeigt sind exemplarische Aufnahmen von EBA-Wunden an verschiedenen Mäusen. Mann-Whitney-U-test: * $p < 0,05$, Epi.: Epidermis, Der.: Dermis, Kn.: Knorpel, Größenstandard $\cong 50 \mu\text{m}$

Zur Quantifizierung des Ausmaßes der EBA-Erkrankung wurde die gesamte Körperoberfläche auf EBA-Wunden untersucht und der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche an der Gesamtkörperoberfläche berechnet. Dabei waren die ersten EBA-Wunden ab Tag 4 nach der ersten IgG-Injektion zu finden. Von diesem Zeitpunkt an nahm die betroffene Körperoberfläche kontinuierlich zu (Abb. 3.2). Auffällig ist, dass der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche bis zu Tag 19 stetig zunahm und sich erst danach wieder verringerte, obwohl nach Tag 0, 2, 4 und 6 (Pfeile, Abb. 3.2) keine weiteren mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs injiziert wurden.

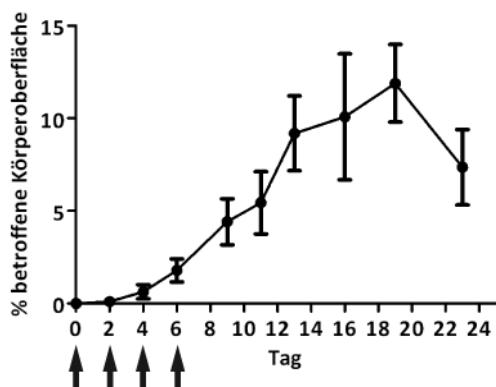


Abb. 3.2 Der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche steigt bis Tag 19 an. Zur Induktion von EBA-Wunden werden an Tag 0, 2, 4 und 6 (Pfeile) jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert und regelmäßig der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche evaluiert. Ab Tag 4 treten die ersten EBA-Wunden auf, die betroffene Körperoberfläche nimmt bis zum Maximum an Tag 19 zu und fällt danach wieder. Gezeigt ist hier der Mittelwert \pm Standardabweichung ($n=7-13$) aus einem repräsentativen Experiment, das 6-mal mit gleichem Verlauf wiederholt wurde.

3.1.2 Die Bildung von EBA-Wunden im passiven Antikörpertransfer-Modell ist von der Bindung der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an die DEJ abhängig

Zunächst wurde untersucht, ob der bis Tag 19 anhaltende Anstieg der betroffenen Körperoberfläche auf die injizierten mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs zurückzuführen ist. Sollte dies der Fall sein, so wäre zu erwarten, dass auch die Bindung von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs bis Tag 19 zunimmt. Die Zunahme der betroffenen Körperoberfläche könnte dann durch eine zunehmende Ablagerung der IgGs an der DEJ erklärt werden. Um die Ablagerung der IgGs zu bestimmen, wurden 2 Parameter untersucht: 1. die Verteilung der IgG-Ablagerung an der DEJ und 2. die Konzentration (Quantität) der IgGs. Um den ersten Sachverhalt zu überprüfen, wurde zunächst die Verteilung der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ eines Ausschnitts der Ohrhaut analysiert. Dazu wurden Kryoschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 3, 6 und 12 nach der ersten IgG-Injektion) mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper gefärbt und fotografiert (Abb. 3.3A). Als Kontrolle wurden Hautschnitte von Mäusen verwendet, denen an Tag 0, 2 und 4 Kaninchen-IgGs aus prä-Immunsersum injiziert wurden

Zur quantitativen Auswertung der Bindung der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ der Anteil der DEJ, an den die anti-Kaninchen-IgG-Antikörper spezifisch gebunden sind, bestimmt (Abb. 3.3B). An Tag 3 konnte eine IgG-Deposition nur an einem kleinen Bereich der DEJ festgestellt werden (Abb. 3.3A oben). Dies stimmt sehr gut mit dem EBA-Verlauf im Antikörper-Transfer-induzierten EBA-Modell überein, in dem an Tag 4 nur eine geringe Körperoberfläche von EBA-Wunden betroffen ist,

Ergebnisse

und deutet zudem darauf hin, dass die Menge an IgGs nach zweimaliger systemischer Injektion zu gering ist, um flächendeckend an die DEJ zu binden. Die IgG-Ablagerung nahm an Tag 6 deutlich zu (Abb. 3.3A mitte), sodass Kaninchen-IgGs an 44 % der DEJ zu finden waren. Von Tag 6 auf Tag 12 (Abb. 3.3A unten) konnte keine weitere Zunahme der IgG-Ablagerung festgestellt werden, was damit übereinstimmt, dass an Tag 6 die letzte Injektion von Kaninchen-IgGs erfolgte. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass zu allen drei Zeitpunkten eine ungleichmäßige Verteilung der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs zu beobachten war. So gibt es Stellen an der DEJ, an die die Kaninchen-IgGs bevorzugt binden (Pfeilspitzen). An anderen Stellen ist dagegen keine Bindung zu erkennen (Dreiecke).

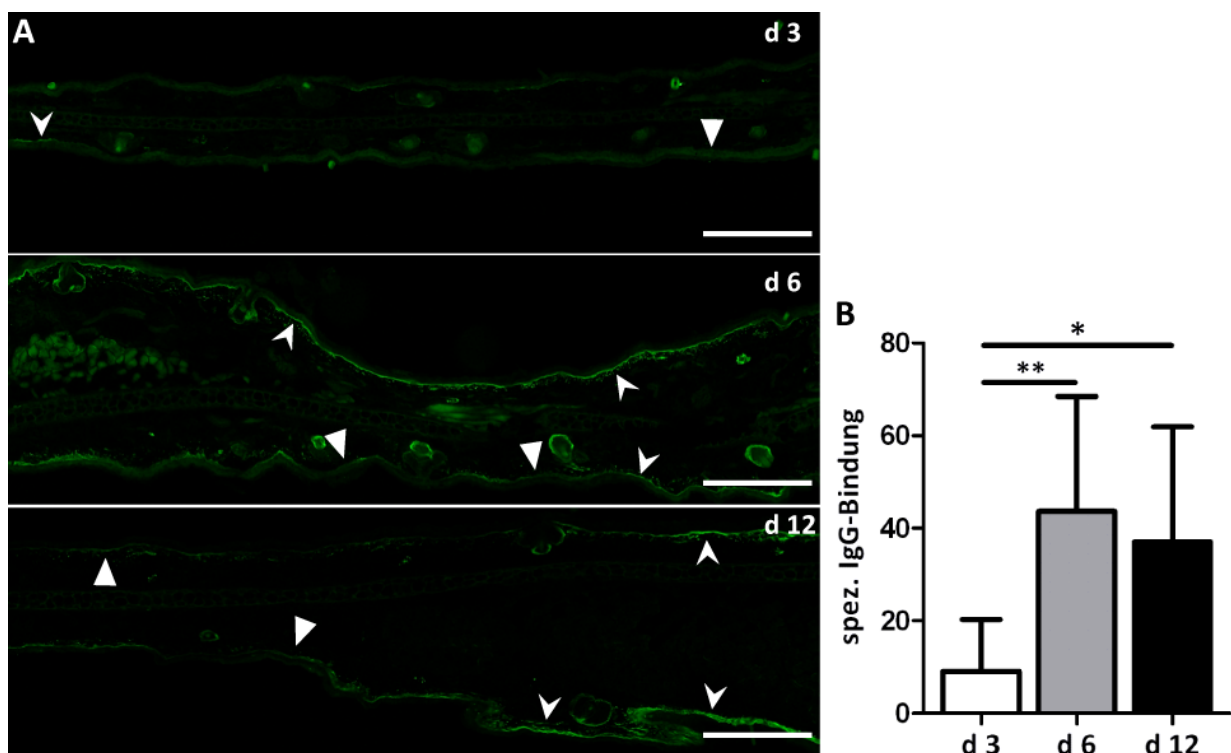


Abb. 3.3 Der Anteil der von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ nimmt nach Tag 6 nicht mehr zu. (A) Kryoschnitte der Ohrhaut von verschiedenen Zeitpunkten nach IgG-Injektion (d 3, d 6, d 12) wurden mit einem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper gefärbt und mit direkter Immunfluoreszenz auf spezifische Bindung von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs (weiße Pfeilspitzen) untersucht. Schwach fluoreszierende Stellen (weiße Dreiecke) zeigen unspezifische IgG-Bindung des Detektionsantikörpers. Größenstandard $\cong 50 \mu\text{m}$ (B) Der gemessene Hintergrund aus Hautschnitten von Mäusen denen Kaninchen-IgGs aus prä-Immunsereen injiziert ($n=4$) wurden, wurde jeweils von gemessenen Werten abgezogen. Der Anteil der von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ an Tag 6 ($n=10$) und 12 ($n=13$) war im Vergleich zu Tag 3 ($n=9$) signifikant erhöht. Es zeigte sich keine Zunahme von Tag 6 auf Tag 12. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem Experiment. Kruskal-Wallis-Test + Dunn's Post-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die Ergebnisse zeigen, dass nach Tag 6 der Anteil der von Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ nicht mehr zunimmt, sodass davon auszugehen ist, dass der bis Tag 19 anhaltende Anstieg der betroffenen Körperoberfläche eine andere Ursache hat. Eine weitere Möglichkeit ist ein Unterschied in der Konzentration der an die DEJ gebundenen Kaninchen-IgGs. Daher wurde

untersucht, ob die Konzentration der an die DEJ gebundenen mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs und damit die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) über die Zeit zunimmt. Zur quantitativen Auswertung wurden daher Kryoschnitte gesunder Ohrhaut von verschiedenen Zeitpunkten (Tag 3, 6 und 12 nach der ersten IgG-Injektion) mit einem fluoreszenzmarkiertem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper gefärbt, fotografiert (Abb. 3.4A) und die MFI an der DEJ mit dem Programm ImageJ gemessen. Auch hier wurden Schnitte von Ohrhaut (Tag 6) von Mäusen als Kontrolle verwendet, denen an Tag 0, 2 und 4 Kaninchen-IgGs aus prä-Immunsereen injiziert wurden (Abb. 3.4A links). Der Mittelwert des in den Kontrollen gemessenen Hintergrunds wurde von den Werten an Tag 3, 6 und 12 abgezogen (Abb. 3.4B).

Auf den Fotografien ist zu erkennen, dass an Tag 3 noch eine sehr geringe MFI (weiße Pfeilspitzen) an der DEJ zu detektieren war. Am Tag 6 fand eine deutliche Zunahme der MFI statt, welche an Tag 12 wieder abnahm. Die quantitative Auswertung (Abb. 3.4B) ergab, dass sich von Tag 3 auf Tag 6 die MFI von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ signifikant erhöhte, nach Tag 6 jedoch kein weiterer Konzentrationsanstieg festzustellen war. So kann auch durch die Konzentration der Kaninchen-IgGs an der DEJ der Anstieg der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche bis Tag 19 im passiven Antikörpertransfer-Modell nicht erklärt werden.

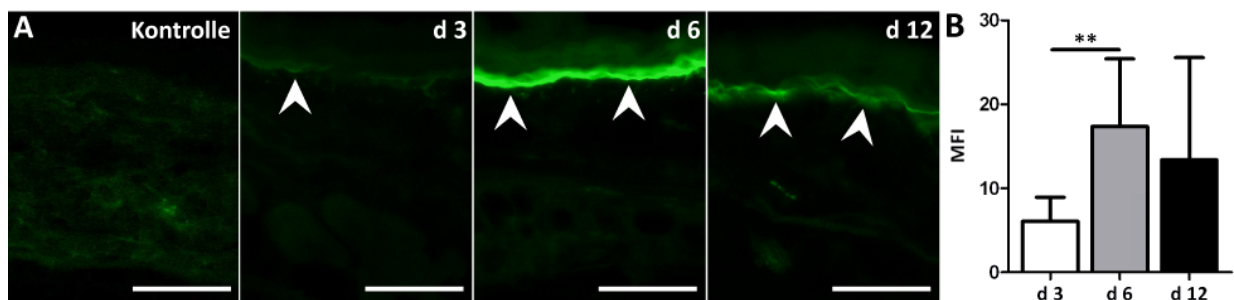


Abb. 3.4 Die MFI der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ nimmt nach Tag 6 nicht mehr zu. (A) Kryoschnitte wurden mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper gefärbt und im Anschluss fotografiert. DIF-Aufnahmen zeigen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität der an die DEJ gebundenen mCol7-spezifischen IgGs (weiße Pfeilspitzen) von Tag 3 (d 3) auf Tag 6 (d 6) und 12 (d 12). Als Kontrolle wurde Ohrhaut von mit Kaninchen prä-Immunsereen injizierten Mäusen verwendet. Größenstandard $\cong 50 \mu\text{m}$ (B) Der Mittelwert aus der in den Kontrollen gemessenen Hintergrund wurde von den Werten von d 3, d 6 und d 12 abgezogen. Die Auswertung der MFI an d 3, d 6 (jeweils n=10) und d 12 (n=13) zeigen eine signifikante Zunahme von d 3 auf d 6. Kruskal-Wallis-Test + Dunn's Post-Test: ** $p < 0,01$

Zusammenfassung I

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an die DEJ bis zu Tag 6 in Bezug auf sowohl den prozentualen Anteil der von mCol7-spezifischen

Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ als auch auf die mittlere Fluoreszenzintensität der an die DEJ gebundenen Kaninchen-IgGs anstieg. So waren $44\% \pm 25\%$ der DEJ durch mCol7-spezifische Antikörper gebunden und die MFI der Kaninchen-IgGs an der DEJ betrug 17 ± 8 . An Tag 12 konnte mit $37\% \pm 25\%$ gebundener DEJ und einer MFI von 13 ± 12 keine weitere Zunahme der Antikörper-Deposition an der DEJ, sondern eher eine geringe Abnahme festgestellt werden. Zusätzlich war eine ungleiche Verteilung der Kaninchen-IgGs an der DEJ zu erkennen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Bindung der Kaninchen-IgGs nicht der alleinige Grund für den beobachteten Anstieg der betroffenen Körperoberfläche bis Tag 19 sein kann.

3.1.3 Murine IgGs sorgen für verlängerte und stärkere EBA-Erkrankung im passiven Antikörper-Transfermodell

Da die injizierten IgGs aus dem Kaninchen stammen, stellen sie für das Immunsystem der Mäuse ein Fremdprotein dar. Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Injektion der Kaninchen-IgGs eine Immunreaktion in den Mäusen induziert, die Auswirkungen auf den EBA-Verlauf im passiven Antikörper-Transfermodell haben könnte. Dazu wurden die drainierenden Lymphknoten auf Bildung von Keimzentren untersucht, indem B220-/Ki-67-Doppelfärbungen von Kryoschnitten der inguinalen Lymphknoten angefertigt wurden. Es konnte festgestellt werden, dass naive Kontrolltiere, denen keine Kaninchen-IgGs injiziert wurden, keine Keimzentren gebildet hatten (Abb. 3.5A). Dagegen zeigten Lymphknoten von Mäusen, denen mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert wurden, eine deutliche Bildung von Keimzentren (Pfeilspitze, Abb. 3.5B). Zur quantitativen Auswertung der Keimzentrensbildung in den drainierenden Lymphknoten wurde mit Hilfe von ImageJ das Verhältnis der Fläche der Keimzentren zur Gesamtfläche des Lymphknotens berechnet (Abb. 3.5C). Hieraus wurde ersichtlich, dass Mäuse, denen mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs appliziert wurden, signifikant mehr Keimzentren bildeten als Mäuse, die keine Kaninchen-IgGs erhielten.

Ergebnisse

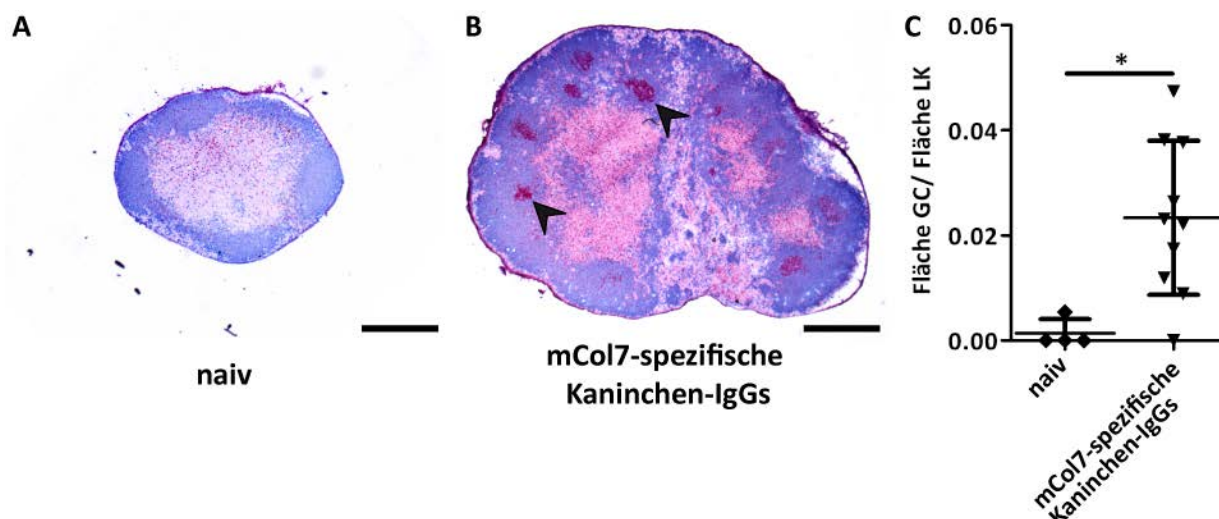


Abb. 3.5 Die Injektion von Kaninchen-IgGs führt zu einer Immunantwort in den drainierenden Lymphknoten. In Kryoschnitten inguinaler Lymphknoten wurden B-Zellen (B220: blau) und proliferierende Zellen (Ki-67: rot) immunhistochemisch gefärbt. Während bei naiven Kontrollen (A) kaum Keimzentren feststellbar waren, konnten in der Gruppe, der mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert wurden, (B) 12 Tage nach IgG-Injektion Keimzentren detektiert werden. Größenstandard $\cong 500 \mu\text{m}$ (C) Es wurde das Verhältnis der Keimzentrumsfläche (Fläche GC) zur Gesamtfläche des Lymphknotens (Fläche LK) berechnet und jeweils das Verhältnis Fläche GC/Fläche LK der mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs injizierten Gruppe (n=10) mit der naiven Kontrollen (n=4) verglichen. Die Injektion von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs führte zu einem signifikant erhöhten Fläche GC/Fläche LK-Verhältnis. Mann-Whitney-U-test: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$

Um zu untersuchen, ob die in mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs injizierten Mäusen gebildeten Keimzentren gegen die Kaninchen-IgGs gerichtet sind, wurden Hautschnitte immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen murine IgGs des Subtyps 2c (mIgG2c) gefärbt (Abb. 3.6). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die Deposition von mIgG2c an der DEJ.

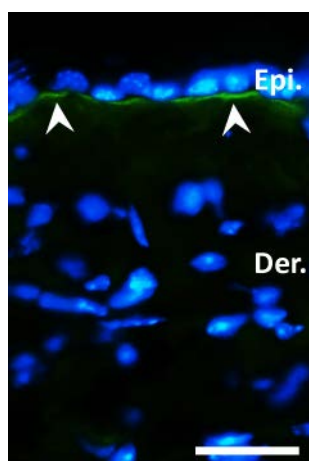


Abb. 3.6 Kaninchen-IgG-spezifische Maus-IgGs können an der DEJ nachgewiesen werden. Kryoschnitte von Ohrhaut mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs injizierter Mäuse wurden mit einem anti-mIgG2c-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Per DIF konnte die Deposition von mIgG2c (grün, weiße Pfeilspitzen; blau: Hoechst) an der DEJ nachgewiesen werden. Epi.: Epidermis, Der.: Dermis; Größenstandard $\cong 25 \mu\text{m}$

Da die Injektion von Kaninchen-IgGs eine Immunreaktion in den drainierenden Lymphknoten auslöst, die zu einer Produktion von endogenen IgGs führt, wurde als nächstes untersucht, ob diese endogen generierten IgGs Einfluss auf die Krankheitsentwicklung der EBA im passiven

Antikörpertransfer-Modell haben. Dazu wurden in diesem Versuch Mäuse verwendet, die selbst keine IgGs produzieren können - B-Zell-defiziente JHT-Mäuse. B-Zell-defizienten JHT- sowie wt-Mäusen wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert. An d 12 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und Kryoschnitte immunhistologisch gefärbt. B220/TCR β -Färbungen von Lymphknotenschnitten der wt-Gruppe zeigten sowohl T- als auch mit B-Zellen (Pfeile, Abb. 3.7A), dagegen bestand der Lymphknoten der B-Zell-defizienten JHT-Mäuse lediglich aus T-Zellen (Abb. 3.7B). Lymphknotenschnitte wurden ebenfalls mit B220/Ki-67 gefärbt, um die Bildung von Keimzentren zu untersuchen. Während einzelne Keimzentren in wt-Mäusen detektiert werden konnten (Dreiecke, Abb. 3.7C), fehlten diese in Lymphknoten B-Zell-defizienter JHT-Mäuse völlig (Abb. 3.7D).

Als zusätzliche Kontrolle wurde auch die Expression von AID bestimmt. AID ist ein Marker für aktivierte B-Zellen. Das AID-Enzym (activation-induced cytidine deaminase) deaminiert Desoxyzytidine in der Gensequenz, die die Antigenpezifität der Antikörper bestimmen. Die daraufhin aktivierten Reparaturmechanismen sind jedoch sehr fehleranfällig, sodass oftmals eine falsche Base eingebaut und somit die Gensequenz verändert wird, was zu einer Erhöhung der Antigenpezifität der in den B-Zellen produzierten Antikörper führen kann. Neben dieser sogenannten somatischen Hypermutation aktiviert AID darüber hinaus auch den Wechsel der produzierten Immunglobulin-Klassen. Da *AID* ausschließlich in Keimzentrums-B-Zellen exprimiert wird, eignet sich AID Marker für aktivierte B-Zellen. Die Auswertung mittels quantitativer RT-PCR zeigte keine Expression von *AID* in naiven Kontrollen. Während in wt-Lymphknoten dagegen *AID* signifikant stärker exprimiert wurde, zeigen auch die JHT-Mäuse keine *AID*-Expression (Abb. 3.7E).

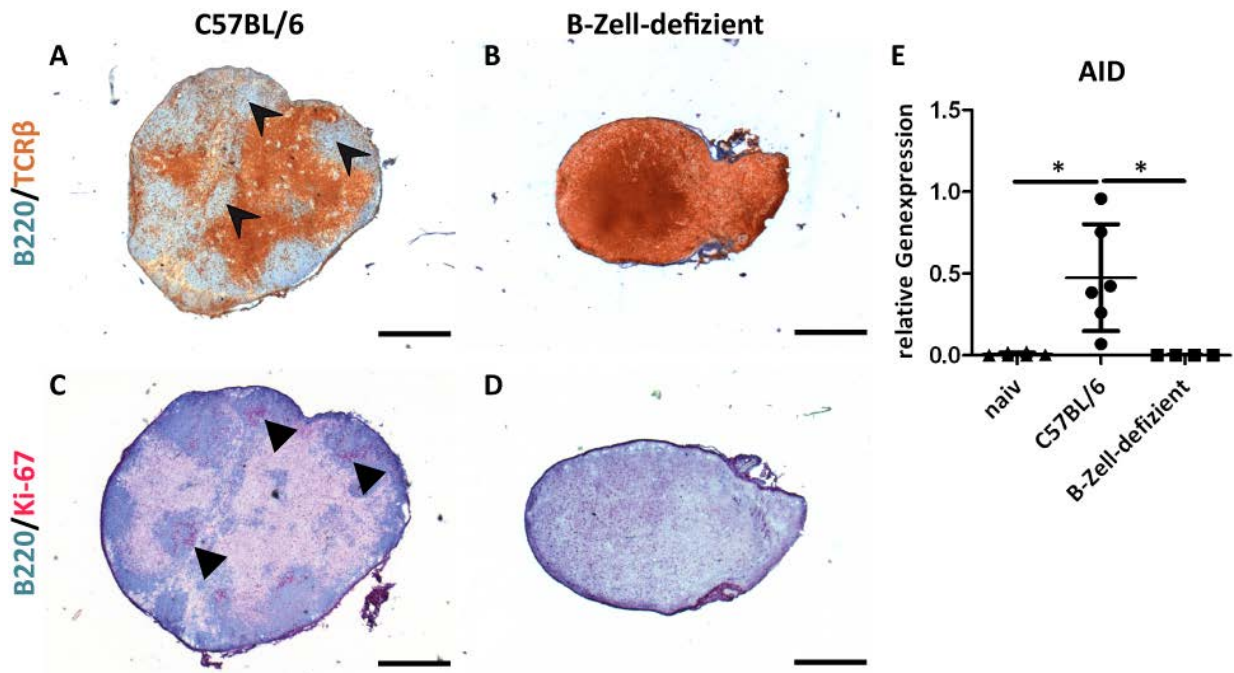


Abb. 3.7 In B-Zell-defizienten JHT-Mäusen werden keine Keimzentren gebildet. Wt- und B-Zell-defizienten JHT-Mäusen wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs appliziert und nach Versuchsende die inguinalen Lymphknoten entnommen (A - D) Kryoschnitte der Lymphknoten von wt- (C57BL/6) und B-Zell-defizienten JHT-Mäusen wurden gegen B220 (blau)/ TCRβ (braun) bzw. gegen B220 (blau)/ Ki-67 (rot) gefärbt. (A) In wt-Mäusen konnten B-Zellzonen (Pfeilspitzen) festgestellt werden, (B) in B-Zell-defizienten JHT-Mäusen dagegen nicht. (C) Auch Keimzentren (Dreiecke) waren in wt-Lymphknoten, (D) nicht aber in denen von JHT-Mäusen vorhanden. Größenstandard $\cong 500 \mu\text{m}$ (E) Aus Kryoschnitten der Lymphknoten wurde die mRNA extrahiert und zur Genexpressionsanalyse in cDNA umgeschrieben. Die quantitative RT-PCR zeigte die Expression von *AID* in Lymphknoten von wt-Mäusen (n=6). Dagegen wurde *AID* weder in naiven (n=5) noch in B-Zell-defizienten JHT-Mäusen (n=4) exprimiert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem Experiment. Kruskal-Wallis-Test + Dunn's Post-Test: * p < 0,05

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich das Fehlen der Keimzentren auf die Bildung von murinen IgGs gegen mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs auswirkt. Deshalb wurden zur Detektion von sowohl Kaninchen- als auch murinen IgGs Hautproben von wt- und B-Zell-defizienten JHT-Mäusen 14 Tage nach der ersten Injektion von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs entnommen, Kryoschnitte angefertigt und diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern entweder gegen Kaninchen-IgGs oder gegen mIgG2c gefärbt. Es zeigte sich, dass bei wt-Mäusen sowohl Kaninchen-IgGs als auch mIgG2c an der DEJ gebunden haben (Abb. 3.8A). Bei den B-Zell-defizienten JHT-Mäusen waren ebenfalls Kaninchen-IgGs an der DEJ zu finden, jedoch konnten keine mIgG2c an der DEJ nachgewiesen werden (Abb. 3.8B).

Ergebnisse

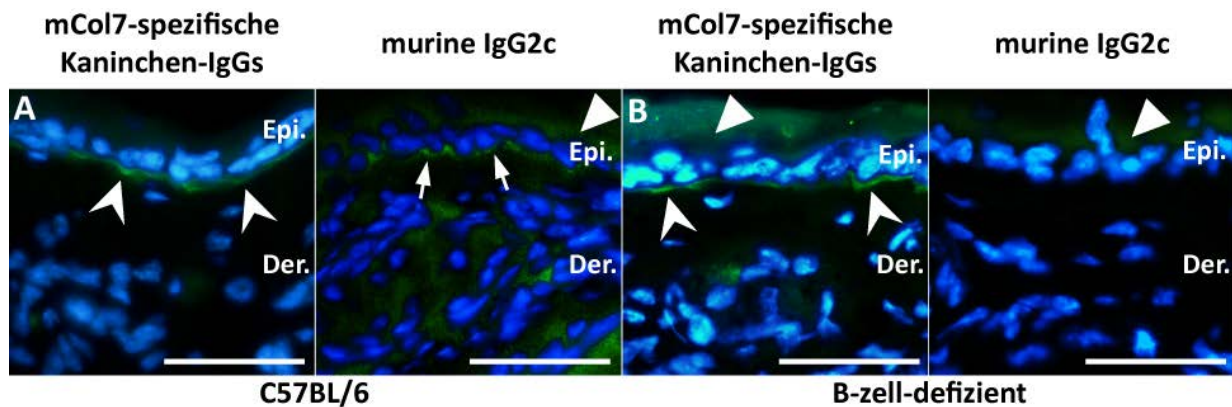


Abb. 3.8 Keine Bindung von mIgG2c an der DEJ von B-Zell-defizienten JHT-Mäusen. wt- und B-Zell-defizienten JHT-Mäusen wurden mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs an Tag 0, 2, 4 und 6 injiziert. An Tag 14 wurden Hautproben entnommen und Kryoschnitte von diesen mit anti-Kaninchen-IgG- oder anti-mIgG2c-Antikörpern gefärbt. (A) Mittels DIF konnten an der DEJ von wt-Mäusen sowohl mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs (links, Pfeilspitzen), als auch murines IgG2c (Pfeile) nachgewiesen werden. Die grünen Fluoreszenzsignale oberhalb der Epidermis stammen von unspezifischen Antikörperauflagerungen (weiße Dreiecke). (B) Auch in B-Zell-defizienten JHT-Mäusen zeigte sich die Bindung von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ (links). Murines IgG2c konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (rechts). Auch bei den B-Zell-defizienten JHT-Mäusen sind unspezifische Antikörperauflagerungen oberhalb der Epidermis zu beobachten. Epi.: Epidermis, Der.: Dermis, Größenstandard $\cong 50 \mu\text{m}$

Um zu untersuchen, ob das Fehlen der endogenen Immunglobuline an der DEJ einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA haben, wurden einer Gruppe B-Zell-defizienter JHT-Mäuse sowie einer Gruppe wt-C57BL/6-Mäuse an Tag 0, 2, 4 und 6 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert. Die Mäuse wurden regelmäßig auf EBA-Symptome untersucht und der Anteil der betroffenen Körperoberfläche beider Gruppen miteinander verglichen (Abb. 3.9A+B). Wie der *area under the curve* (Abb. 3.9A) von Tag 0 bis 27 zu entnehmen ist, waren die B-Zell-defizienten JHT-Mäuse insgesamt weniger stark von EBA-Wunden betroffen als die Kontrollmäuse. Bei der Betrachtung des Verlaufs der EBA-Wundentstehung fällt auf, dass in der frühen Phase des Experiments beide Gruppen gleich stark von EBA-Wunden betroffen waren. Ab Tag 12 jedoch zeigten die B-Zell-defizienten JHT-Mäuse einen weniger starken Anstieg der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche als die Kontrollen. Dies konnte auch nach Tag 12 beobachtet werden, sodass an Tag 16 sowie an Tag 22 die B-Zell-defizienten Mäuse eine signifikant geringere betroffene Körperoberfläche aufwiesen als die Kontrollmäuse. Um sicherzustellen, dass der beobachtete, mildere Krankheitsverlauf in der Gruppe der B-Zell-defizienten Mäuse auf die fehlende Produktion von murinen IgGs zurückzuführen ist, wurden Lymphozyten in B-Zell-defiziente Mäuse transferiert. Dazu wurden sowohl wt- als auch B-Zell-defizienten JHT-Mäusen an Tag 0, 2 und 4 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert. An Tag 6 wurden einem Teil der wt-Gruppe die inguinalen und auch die poplitealen Lymphknoten

Ergebnisse

entnommen, aus diesen die Lymphozyten isoliert und den B-Zell-defizienten Mäusen jeweils 5×10^7 Lymphozyten intravenös appliziert. Den verbliebenen wt-Mäusen, wie auch den B-Zell-defizienten Mäusen wurden an Tag 6 noch einmal 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert. Die regelmäßige Evaluierung der betroffenen Körperoberfläche in B-Zell-defizienten und wt-Mäusen zeigte, dass sich beide Gruppen nicht voneinander unterschieden. Sowohl die *area under the curve* des gesamten Beobachtungszeitraums (Abb. 3.9C) als auch die Betrachtung des zeitlichen Ablaufs der EBA-Erkrankung (Abb. 3.9D) ließen keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennen.

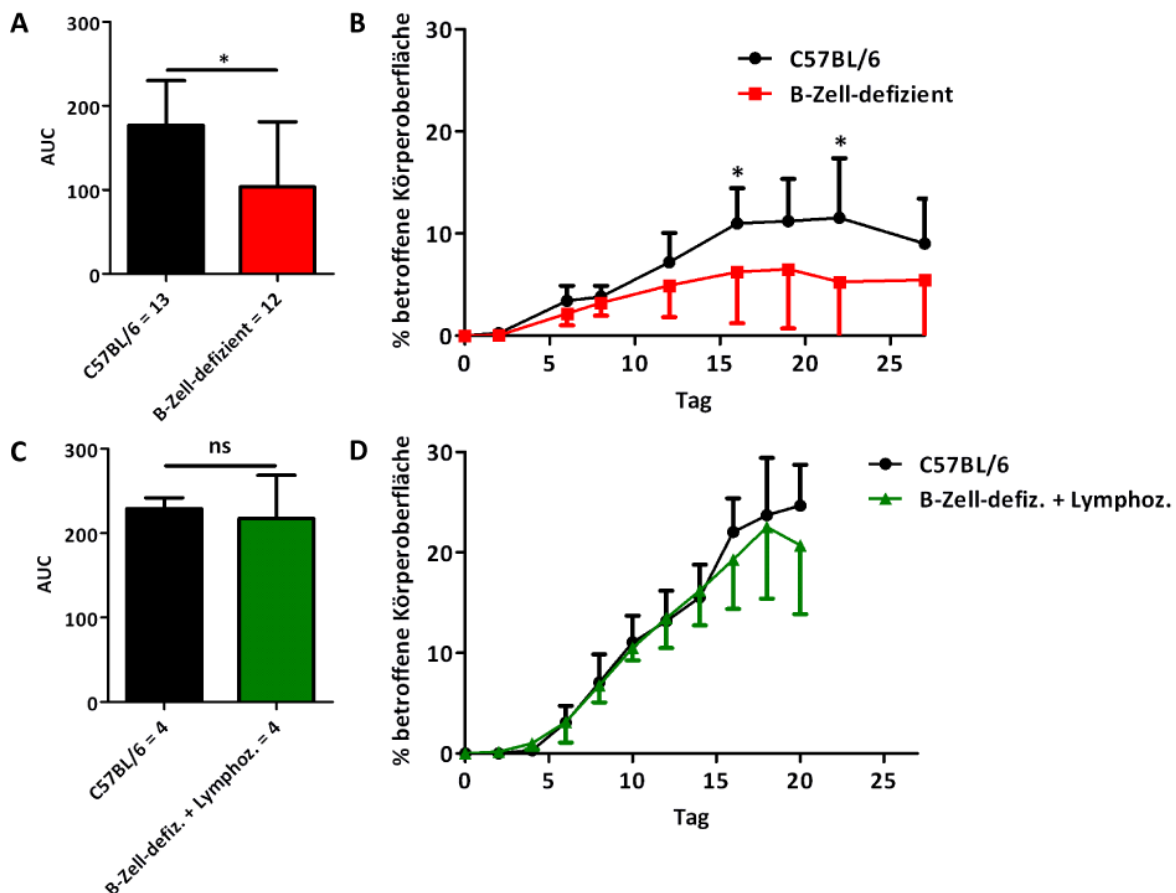


Abb. 3.9 Das Fehlen von B-Zellen führt zu einem milderem EBA-Verlauf im passiven Antikörpertransfer-Modell. Wt-Mäusen (C57BL/6) sowie B-Zell-defizienten JHT-Mäusen wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert und anschließend regelmäßig auf EBA-Wunden untersucht. (A) Der Gesamt-EBA-Verlauf innerhalb des Beobachtungszeitraums, dargestellt als *area under the curve* (AUC) zeigte einen milderem Krankheitsverlauf in der Gruppe der B-Zell-defizienten JHT-Mäuse (rot, n=12) im Vergleich zu der wt-Gruppe (schwarz, n=13). (B) Der Verlauf der EBA-Erkrankung zeigte in einer frühen Phase des Experiments keinen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Ab Tag 12 war der Anstieg der betroffenen Körperoberfläche bei den B-Zell-defizienten Mäusen weniger stark als in der wt-Gruppe, sodass dieser an Tag 16 und 22 signifikant geringer war. (C+D) wt- und B-Zell-defizienten JHT-Mäusen wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert. Den B-Zell-defizienten JHT-Mäusen wurden zusätzlich an Tag 6 jeweils 5×10^7 Lymphozyten verabreicht, die aus wt-Mäusen gewonnen wurden, die an Tag 0, 2 und 4 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs erhielten. Die Körperoberfläche beider Gruppen (jeweils n=4) wurde regelmäßig auf EBA-Wunden untersucht. Die Untersuchungen der (C) Gesamt-EBA-Erkrankungen, als *area under the curve* dargestellt, und auch die (D) des zeitlichen Verlaufs ergaben keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney-U-test: * $p < 0,05$

Ergebnisse

Um die erhaltenen Ergebnisse aus den Versuchen mit den B-Zell-defizienten JHT-Mäusen, dass im passiven Antikörpertransfer-Modell ein Fehlen der murinen IgGs zu einem milderem EBA-Verlauf führt, in einem anderen Mausstamm zu bestätigen, der zwar B-Zellen hat, aber keine Keimzentren und keine IgGs produzieren kann, wurde der Versuch zusätzlich mit CD40L-KO-Mäusen durchgeführt. Das Fehlen des CD40-Liganden in diesen Mäusen führt dazu, dass die T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung nicht möglich ist. Da diese Voraussetzung für einen Klassenwechsel der B-Zellen zur Produktion von komplementaktivierenden, die Blasenbildung induzierenden mIgG2c ist, bieten CD40L-KO-Mäuse eine physiologischere Möglichkeit, die Auswirkungen der fehlenden murinen IgGs auf den EBA-Verlauf zu untersuchen.

Dazu wurden wt- und CD40L-KO-Mäusen an Tag 0, 2, 4 und 6 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert. Nach Versuchsende wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen. Immunhistologische Auswertungen von Kryoschnitten der Lymphknoten zeigten, dass CD40L-KO-Mäuse, genauso wie wt-Mäuse (Abb. 3.10A), zwar B-Zellen haben (Abb. 3.10B, Pfeilspitzen), jedoch keine Keimzentren bilden (Abb. 3.10D), wie sie in wt-Mäusen zu finden sind (Abb. 3.10C, Dreiecke). Darüber hinaus wurde die Expression von *AID* mittels quantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 3.10E). Während in naiven Kontrollen keine Expression von *AID* festzustellen war, zeigten wt-Mäuse eine signifikant stärkere *AID*-Expression. Dagegen wurde *AID* in CD40L-KO-Mäusen nicht exprimiert.

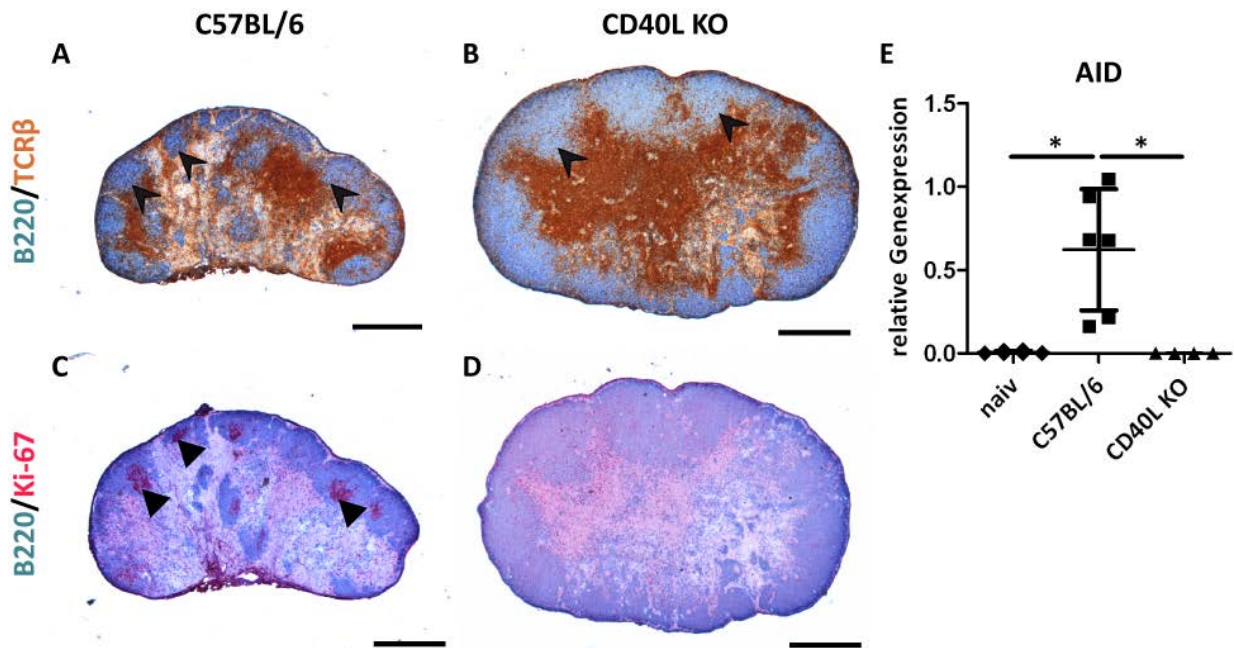


Abb. 3.10 CD40L KO-Mäuse haben zwar B-Zellen, bilden aber keine Keimzentren. wt- und CD40L KO-Mäusen wurde an Tag 0, 2, 4 und 6 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert und nach Versuchsende die inguinalen Lymphknoten entnommen. Immunhistologische Färbungen der B- und T-Zellen von Lymphknotenschnitten, zeigten sowohl in wt- (A) als auch CD40L KO-Mäusen (B) das Vorhandensein von T- und auch B-Zellen (Pfeilspitzen). Keimzentren konnten nach B220/Ki-67-Färbung in (C) wt-Mäusen (Dreiecke), jedoch nicht in (D) CD40L KO-Mäusen festgestellt werden. Größenstandard $\cong 500 \mu\text{m}$ (E) Aus Kryoschnitten von inguinalen Lymphknoten beider Gruppen wurde zur Genexpressionsanalyse des B-Zell-Aktivierungsmarkers AID mit Hilfe der quantitativen RT-PCR mRNA extrahiert. Im Gegensatz zu wt-Mäusen (C57BL/6, n=5), exprimierten naive wt-Mäuse (n=5) und auch CD40L KO-Mäuse (n=4) AID nicht. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem Experiment. Kruskal-Wallis-Test + Dunn's Post-Test: * p < 0,05

Zur Detektion von Kaninchen-IgGs und auch von murinen IgGs an der DEJ von wt- und CD40L KO-Mäusen, wurden Kryoschnitte der Ohrhaut beider Gruppen immunhistochemisch mit anti-Kaninchen-IgG- oder anti-mIgG2c-Antikörpern gefärbt. Bei wt-Mäusen konnten sowohl Kaninchen-IgGs als auch mIgG2c an der DEJ festgestellt werden (Abb. 3.11A). Hautproben von CD40L KO-Mäusen zeigten ebenfalls Bindung von Kaninchen-IgGs an die DEJ. mIgG2c waren hingegen nicht zu finden (Abb. 3.11B).

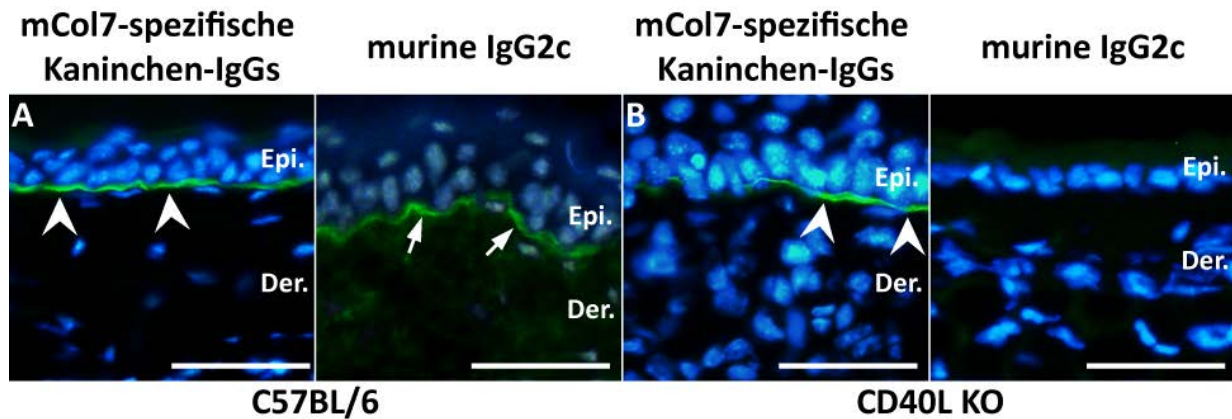


Abb. 3.11 Keine Bindung von murinem IgG2c an der DEJ von CD40L KO-Mäusen. Kryoschnitte von Ohrhaut der Mäuse aus dem oben beschriebenen Experiment wurden mit anti-Kaninchen-IgG- oder anti-mIgG2c-Antikörpern gefärbt. (A) Per DIF können an der DEJ von wt-Mäusen sowohl mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs (links, Pfeilspitzen), als auch murines IgG2c (rechts, Pfeile) unterhalb der Epidermis an der DEJ nachgewiesen werden. (B) Auch in CD40L KO-Mäusen sind mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs an der DEJ nachweisbar, jedoch kein murines IgG2c (rechts). Epi.: Epidermis, Der.: Dermis, Größenstandard $\pm 50 \mu\text{m}$

Um zu untersuchen, ob auch in den CD40L KO-Mäusen das Fehlen der murinen IgGs einen mildereren EBA-Verlauf zur Folge hat, wurde die Körperoberfläche der Mäuse beider Gruppen während des Experiments regelmäßig auf EBA-Wunden untersucht. Die Auswertung des Gesamtkrankheitsverlaufs, dargestellt als *area under the curve*, ergab in der CD40L KO-Gruppe einen signifikant mildereren EBA-Verlauf als in der Kontrollgruppe (Abb. 3.12). Die Auswertung des EBA-Verlaufs ähnelt dem Ergebnis aus den Experimenten mit den B-Zell-defizienten JHT-Mäusen.

Im Gegensatz zu den wt-Mäusen, die den typische Krankheitsverlauf im passiven Antikörper-Transfermodell der EBA zeigten, nahm der Anteil der betroffenen Körperoberfläche bei den CD40L KO-Mäusen ab d 13 weniger stark zu. Dies führte zu einem signifikant geringeren Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche bei CD40L KO-Mäusen an diesem Tag. Ab d 16 nahm der Anteil der betroffenen Körperoberfläche in der CD40L KO-Gruppe wieder ab, sodass auch an d 18 ein signifikanter Unterschied zwischen CD40L KO- und wt-Mäusen bestand (Abb. 3.12B).

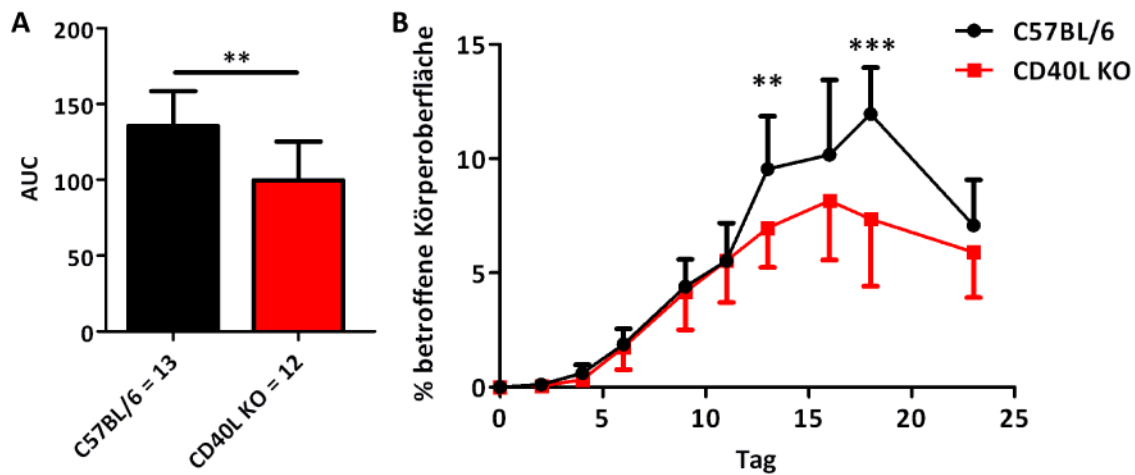


Abb. 3.12 CD40L KO-Mäuse zeigen weniger EBA-Wunden im passiven Antikörpertransfer-Modell. wt- (n=13) und CD40L KO-Mäusen (n=12) wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert und deren Körperoberfläche regelmäßig auf EBA-Wunden untersucht. (A) Die EBA-Verläufe von wt- und CD40L KO-Mäusen wurden durch die Berechnung der *area under the curve* quantifiziert. wt-Mäuse zeigten einen signifikant schwereren EBA-Verlauf als CD40L KO-Mäuse. (B) Die betroffene Körperoberfläche stieg in der wt-Gruppe bis Tag 18 an und sank danach wieder. Der Anstieg der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche in der CD40L KO-Gruppe ist mit dem der wt-Gruppe bis Tag 13 vergleichbar. Ab dann kann man einen milderen EBA-Verlauf erkennen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem Experiment. Mann-Whitney-U-test: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Zusammenfassung II

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Injektionen der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs eine Immunantwort induziert wird. Diese Immunantwort konnte durch die Bildung von Keimzentren in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die in den Keimzentren produzierten murinen IgGs gegen die Kaninchen-IgGs gerichtet sind und an diese an der DEJ binden.

Der mildere Krankheitsverlauf in den B-Zell-defizienten JHT- und auch den CD40L KO-Mäusen, die beide keine IgGs produzieren können, macht deutlich, dass die an die DEJ gebundenen murinen IgGs den Krankheitsverlauf im passiven Antikörper-Transfermodell der EBA verschlimmern.

3.2 Einfluss von T-Zellen in der Haut auf die Bildung von EBA-Wunden

3.2.1 Expressionsanalysen deuten auf eine erhöhte T-Zell-Zahl in läsionaler Haut hin

Wie gezeigt werden konnte, tragen endogen produzierte mCol7-spezifische IgGs zur verstärkten Entstehung von EBA-Wunden im passiven Antikörpertransfer-Modell bei. Dabei konnten auch murine IgGs des Subtyps 2c an der DEJ gefunden werden. Diese werden nach B-Zellhilfe durch Th1-Zellen produziert. Da die Th1-Zellen jedoch nicht nur B-Zellhilfe leisten,

sondern auch Effektorfunktionen außerhalb des Lymphknotens ausüben können, sollte überprüft werden, ob T-Zellen auch im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA in der Haut zu finden sind.

Um die Anwesenheit der T-Zellen in der Haut zu untersuchen, wurde mittels quantitativer RT-PCR die Expression der Gene für die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 untersucht, da diese für die Chemotaxis von Th1-Zellen in entzündetes Gewebe eine große Rolle spielen (Groom und Luster, 2011; Mantovani et al., 2004). Darüberhinaus wurde weiterhin die Expression für die TCR- β -Kette und das Th1-Zytokin IFN γ analysiert. Beim Vergleich der Expression der genannten Gene zwischen den naiven Kontrollen und Mäusen, denen mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert wurden, zeigte sich, dass in Haut von naiven Kontrollmäusen CXCR3 (Abb. 3.13A) und CCR5 (Abb. 3.13B) nur sehr schwach exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu, war die Expression der beiden Gene in läsionaler Haut von wt-Mäusen signifikant erhöht. Die Genexpression für die T-Zellrezeptor- β -Kette war in naiven Kontrollmäusen schwach und in läsionaler Haut von wt-Mäusen tendenziell höher (Abb. 3.13C). Während in Haut naiver Mäuse keine IFN γ -Expression festgestellt werden konnte, war diese in mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs injizierten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 3.13D).

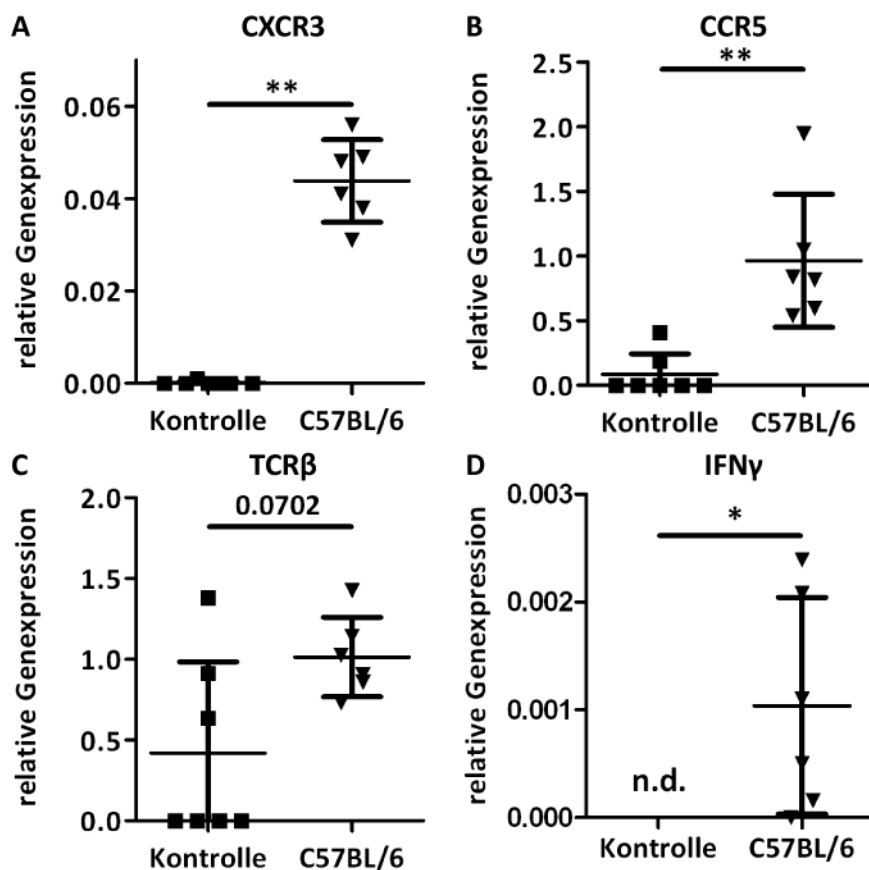


Abb. 3.13 Stärkere Expression von T-Zell-spezifischen Genen in läSIONALER HAUT von wt-Mäusen im Vergleich zu naiven Kontrollen. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde die Expression von T-Zell-assoziierten Genen in läSIONALER HAUT von naiven Kontrollen (d 12) und von EBA betroffenen wt-Mäusen (d 19) untersucht. (A) Die Expression von *CXCR3* in der Haut von naiven Kontrollen ist signifikant geringer als die in der Haut von wt-Mäusen (jeweils n=6). (B) Auch bei der *CCR5*-Expression kann, im Vergleich zu naiven Mäusen (n=7), eine signifikant höhere Expression festgestellt werden. (C) In naiven Kontrollen (n=7) wird *TCRβ* nur in einigen Fällen exprimiert. Dagegen ist die *TCRβ*-Expression in wt-Haut (n=6) in der Tendenz erhöht. (D) In der Haut von naiven Kontrollmäusen war eine *IFNγ*-Expression nicht detektierbar (n.d.). Dagegen wurde in läSIONALER HAUT eine signifikant höhere Expression von *IFNγ* gemessen (jeweils n=6). Mann-Whitney-U-Test: sofern Wert für p nicht angegeben, gilt: * p < 0,05, ** p < 0,01

Zwar werden *CXCR3* und *CCR5* auch von dendritischen und NK-Zellen exprimiert, doch lassen die erhöhte Expression von *IFNγ* und auch die in der Tendenz erhöhte *TCRβ*-Expression auf eine verstärkte Anwesenheit von T-Zellen in von EBA-Wunden betroffener Haut schließen.

3.2.2 Eine verringerte T-Zell-Zahl führt zu einem milderem Krankheitsverlauf im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell

Um die Rolle der mCol7-spezifischen T-Zellen in der EBA zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell durchgeführt, da nur hier T-Zellen aktiviert werden, die spezifisch für ein mCol7-Epitop sind. Zur Induktion der EBA im

Ergebnisse

Immunisierungs-induzierten Mausmodell wurde SJL-Mäusen eine Emulsion aus einem rekombinant hergestellten Fragment aus der NC1-Domäne des murinen Col7 und dem Adjuvans Titermax in den Fuß injiziert. Der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche wurde auch im Immunisierung-induzierten Modell als Maß für die Schwere der Krankheit herangezogen und während des Versuchs regelmäßig evaluiert. EBA-Wunden traten im Bereich des Kopfes, vornehmlich an den Ohren und den Augen (Abb. 3.14A), aber auch an den Extremitäten, wie z.B. dem Schwanz (Abb. 3.14B), auf. Genauso wie im passiven Antikörper-Transfermodell waren auch im Immunisierung-induzierten EBA-Modell kranke und gesunde Hautareale scharf voneinander getrennt (Abb. 3.14C). 4 Wochen nach Immunisierung waren die ersten EBA-Wunden zu sehen. Im Anschluss stieg der Anteil der betroffenen Körperoberfläche stetig an. Im Vergleich zu dem passiven Antikörper-Transfermodell war weniger Körperoberfläche betroffen, jedoch entstanden chronische EBA-Wunden (Abb. 3.14D).

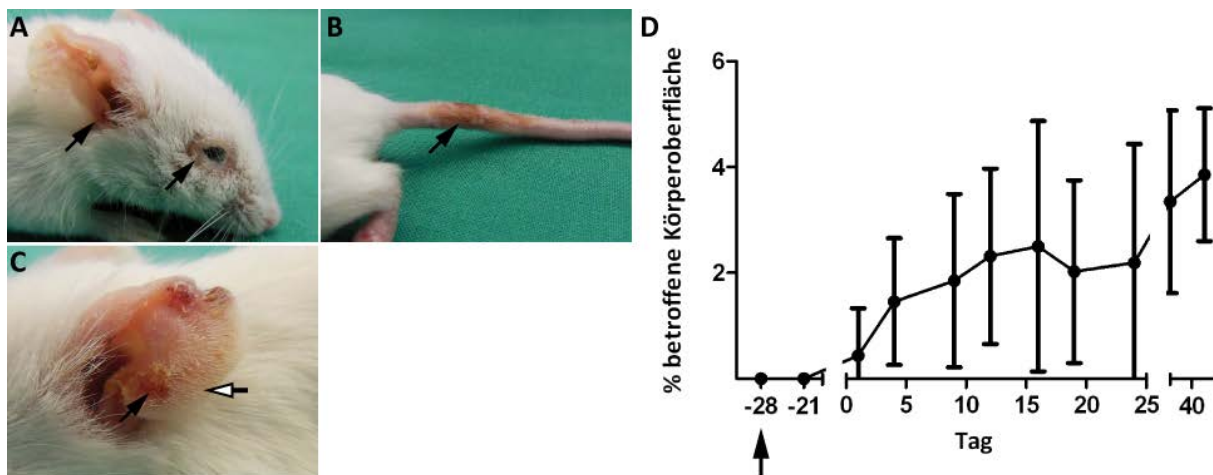


Abb. 3.14 Immunisierung mit rekombinanten, murinen Col7-Fragmenten führt zur Ausbildung von EBA-Wunden in SJL-Mäusen im Immunisierungs-induzierten Modell. SJL-Mäuse werden mit einer Emulsion aus einem rekombinanten Fragment aus der NC1-Domäne des murinen Col7 und dem Adjuvans Titermax immunisiert. (A) EBA-Wunden treten bevorzugt im Kopfbereich, wie z.B. an den Augen oder den Ohren (schwarze Pfeile), (B) aber auch am Schwanz auf. (C) Die Blasen sind dabei lokal scharf abgegrenzt, sodass an einem Ohr kranke (schwarze Pfeile) und gesunde (weiße Pfeile) Bereiche dicht nebeneinander vorhanden sein können. (D) 4 Wochen nach der Immunisierung (Pfeil) treten die ersten EBA-Symptome auf. Die betroffene Körperoberfläche nimmt mit voranschreitender Zeit immer weiter zu, sodass auch noch an Tag 40 eine Zunahme der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche zu erkennen ist. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=6) aus einem Experiment.

Um zu herauszufinden, ob die in der Haut zu findenden T-Zellen einen Einfluss auf die Bildung von EBA-Wunden haben, wurde untersucht, wie sich das Fehlen von T-Zellen auf den EBA-Verlauf im Immunisierung-induzierten Modell auswirkt. Dazu wurden mit mCol7c-GST/Titermax immunisierte SJL-Mäuse mit dem Immunsuppressivum FTY720 (Fingolimod)

behandelt. FTY720 ist Agonist des Rezeptors für Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Nach Binden von FTY720 an den S1P-Rezeptor, der sich auf T-Zellen befindet, wird dieser internalisiert und degradiert. Da der S1P-Rezeptor jedoch für den Egress der T-Zellen aus den sekundären lymphoiden Organen nötig ist, verbleiben die T-Zellen in den Lymphknoten und die Zahl der T-Zellen in der Zirkulation wird stark reduziert.

Im folgenden Versuch wurden SJL-Mäuse zuerst mit einer mCol7c-GST/Titermax-Emulsion immunisiert. Damit sichergestellt ist, dass FTY720 die B-Zell-Hilfe der T-Zellen im Lymphknoten nicht beeinflusst, wurde mit der FTY720-Behandlung erst bei Erscheinen der ersten EBA-Wunden begonnen. Ab dann wurde 3 Wochen lang einer Gruppe täglich FTY720, der anderen täglich H₂O intraperitoneal injiziert. Es wurde regelmäßig die Körperoberfläche der Mäuse beider Gruppen auf EBA-Wunden untersucht und Blut zur Überwachung der T-Zell-Zahl im peripheren Blut entnommen (Pfeile, Abb. 3.15).

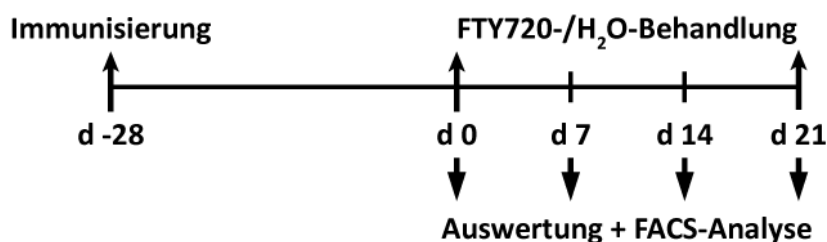


Abb. 3.15 Schematischer Versuchsaufbau der T-Zell-Depletion mittels FTY720 im Immunisierungs-induzierten EBA-Mausmodell. Etwa 4 Wochen nach der Immunisierung (d -28) von SJL-Mäusen mit mCol7c-GST/Titermax, als die ersten EBA-Wunden zu sehen waren, wurden die Mäuse in 2 Gruppen eingeteilt (w 0). Eine Gruppe wurde täglich für 3 Wochen mit FTY720, die andere mit H₂O, behandelt. Die Evaluierung der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche, sowie die Feststellung der T-Zell-Zahl im peripheren Blut erfolgten wöchentlich (Pfeile).

Um die Zahl der T-Zellen im peripheren Blut zu überwachen, wurde den Mäusen beider Gruppen ab Behandlungsbeginn wöchentlich Blut entnommen. Nach Färbung mit einem TCR β - und einem CD19-Antikörper wurde die Zahl der T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Während vor der Behandlung kein Unterschied in Bezug auf die T-Zell-Population zwischen der H₂O- und der FTY720-Gruppe zu erkennen war (linker oberer Quadrant), zeigte sich bereits nach einer Woche eine deutliche Reduzierung der T-Zell-Zahl in den mit FTY720 behandelten Mäusen (Abb. 3.16A). Über die gesamte Behandlungsdauer blieb die Zahl der T-Zellen im peripheren Blut in der FTY720-Gruppe gering. Verglichen zur T-Zell-Zahl vor Beginn der FTY720-Behandlung waren die T-Zellen im peripheren Blut durchschnittlich um 90 % reduziert. In der H₂O-Gruppe dagegen schwankten die T-Zellzahlen im Versuch zwischen 38 % und 284 % normalisiert auf den Wert vor Behandlungsbeginn (Abb. 3.16B).

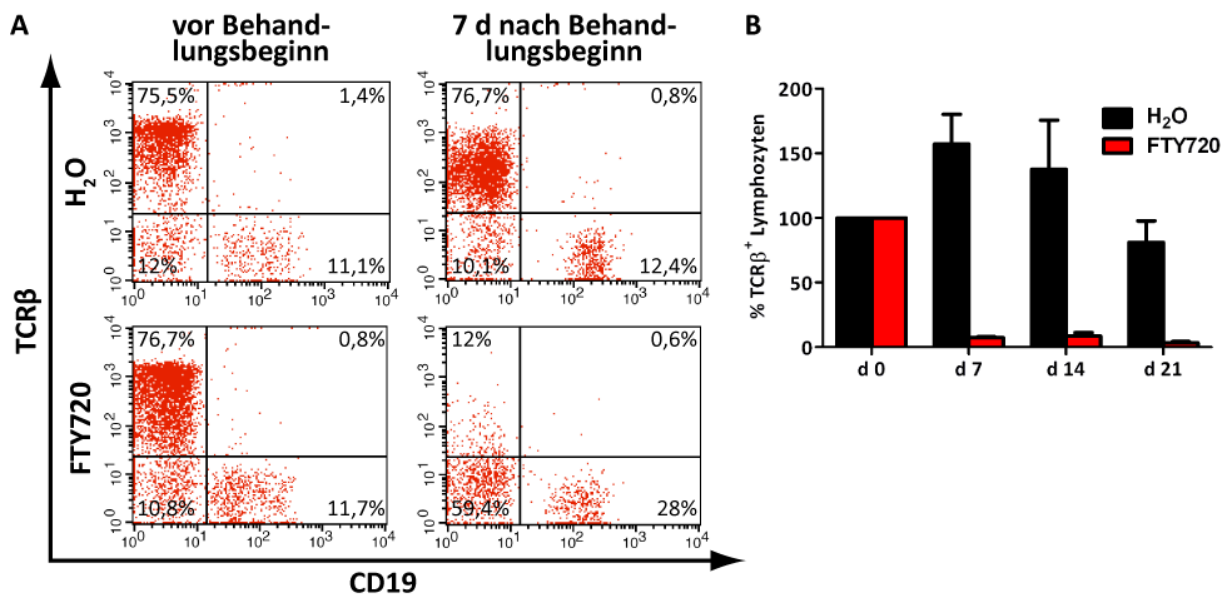


Abb. 3.16 Die Behandlung mit FTY720 reduziert die Zahl der T-Zellen im peripheren Blut. Vor und während der FTY720-/H₂O-Behandlung wurde den Mäusen beider Gruppen wöchentlich Blut abgenommen. Nach TCRβ/CD19-Färbung wurde das Blut durchflusszytometrisch analysiert. Zur Bestimmung der T-Zellzahl wurde dabei im forward-/sideward-scatter auf die Lymphozytenpopulation gated. (A) Vor Behandlungsbeginn (d 0) unterschied sich die Zahl der TCRβ⁺ Zellen (linker oberer Quadrant) zwischen der H₂O- (obere Reihe) und der FTY720-Gruppe (untere Reihe) nicht. Während jedoch die Behandlung mit H₂O keinen Effekt auf die T-Zellzahl eine Woche nach Behandlungsbeginn (d 7) hatte, zeigte sich eine starke Abnahme der Zahl der TCRβ⁺ Zellen in der FTY720-Gruppe. (B) Die Zahl der T-Zellen von d 7, d 14 und d 21 wurde auf die jeweilige T-Zellzahl vor Behandlungsbeginn (d 0) normalisiert. Während die Zahl der T-Zellen in mit H₂O behandelten Mäusen (schwarze Balken) stark schwankt, zeigten mit FTY720 behandelte Mäuse (rote Balken) eine deutlich verringerte Zahl an TCRβ⁺-Zellen.

Um zu untersuchen, ob die stark verringerte Zahl an T-Zellen im peripheren Blut einen Einfluss auf die Bildung von EBA-Wunden haben, wurden die Körperoberfläche der Mäuse beider Gruppen während der FTY720-/H₂O-Behandlung (Pfeile, Abb. 3.17B) regelmäßig auf EBA-Wunden untersucht. Die Auswertung der *area under the curve* des Gesamt-EBA-Verlaufs ergab einen signifikant höheren Anteil betroffener Körperoberfläche in der H₂O-Gruppe im Vergleich zu der FTY720-Gruppe (Abb. 3.17A). Bei der Auswertung des EBA-Verlaufs zeigte sich, dass der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche in der H₂O-Gruppe stärker anstieg als in der FTY720-Gruppe, sodass die mit H₂O behandelten Mäuse in der zweiten Woche nach Behandlungsbeginn (d 14) signifikant stärker erkrankt waren als die Mäuse der FTY720-Gruppe (Abb. 3.17B). In der dritten Woche (d 21) waren die Mäuse der H₂O-Gruppe in der Tendenz, jedoch nicht signifikant stärker von EBA-Wunden betroffen als Mäuse mit FTY720-Behandlung.

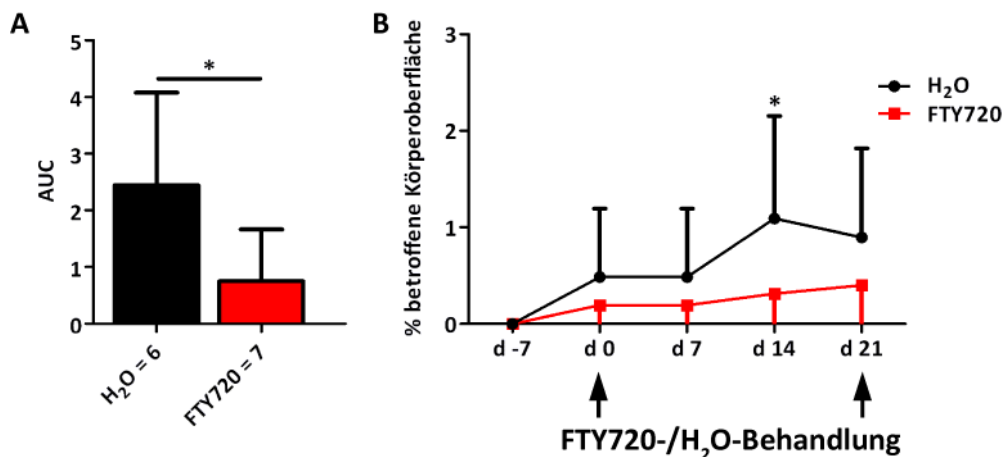


Abb. 3.17 FTY720-Behandlung führt zu milderem Krankheitsverlauf im Immunisierung-induzierten EBA-Modell. Vor und während der H₂O-/FTY720-Behandlung wurden die Mäuse regelmäßig auf EBA-Wunden untersucht. (A) Innerhalb des Behandlungszeitraums (Pfeile) stieg der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche in der mit H₂O behandelten Gruppe (schwarz) stärker an als in der Gruppe, die mit FTY720 behandelt wurde (rot). (B) Die Auswertung der AUC der Krankheitsverläufe beider Gruppen (jeweils n=8) ergab einen signifikant erhöhten Krankheitsgrad in der mit H₂O behandelten Gruppe in der zweiten Woche nach Behandlungsbeginn. Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung aus einem Experiment, Mann-Whitney-U-test: * p < 0,05

3.2.3 Erhöhte Zahl an T-Zellen in periläsionaler Haut von EBA-betroffenen Mäusen

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Bildung von EBA-Wunden auf mCol7-spezifische T-Zellen zurückzuführen ist oder ob unspezifische T-Zellen die Entstehung von EBA-Wunden beeinflussen, sollte die Zahl der T-Zellen in der Haut von gesunden und an EBA erkrankten Mäusen verglichen werden. Da die Zahl der T-Zellen in von Wunden betroffener Haut von Interesse sind und Wunden bei den gesunden Mäusen nicht zu erwarten sind, wurden Wunden durch mechanische Irritation erzeugt, bei dessen Erzeugung die Haut, da sie immunhistologisch ausgewertet werden sollte, jedoch nicht komplett zerstört werden sollte.

Zu diesem Zweck wurden die Ohren von Mäusen an der Innenseite, an denen sich die Mäuse nur schwer kratzen können, mit einer elektrischen Nagelfeile (Abb. 3.18A) gekratzt. Makroskopisch waren die gekratzten Stellen als runde Irritationen zu erkennen (Abb. 3.18B, Pfeilköpfe). Auf immunhistologischer Ebene ist zu erkennen, dass, verglichen mit Haut vor der mechanischen Irritation, lediglich die Epidermis entfernt wurde (Abb. 3.18C). DIF-Aufnahmen zeigen darüber hinaus, dass nach der mechanischen Irritation immer noch die Kollagen 7-Schicht vorhanden war (Abb. 3.18D, Pfeilköpfe).

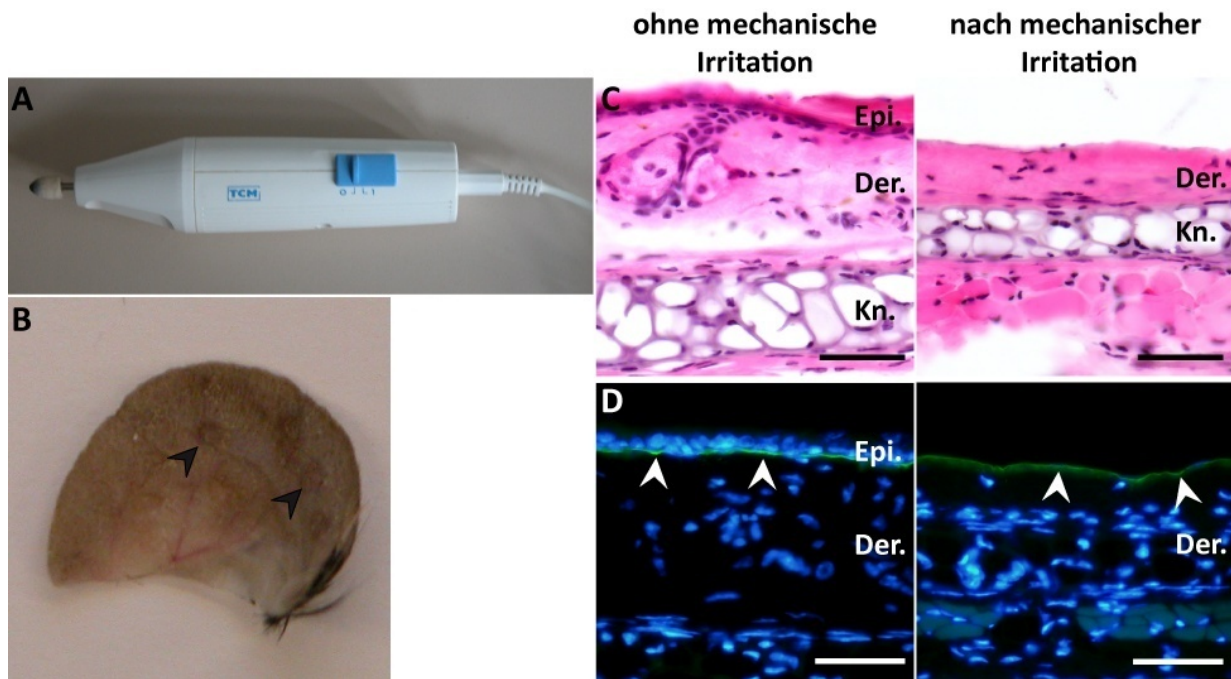


Abb. 3.18: Mechanische Irritation mittels elektrischer Feile entfernt die Epidermis, aber nicht die mCol7-Schicht an der DEJ. (A) Zur mechanischen Irritation wurde eine elektrische Feile benutzt. (B) Mit der elektrischen Feile können Ohren punktuell mechanische Irritationen (Pfeilspitzen) zugefügt werden. (C) + (D) Die Innenohren von Mäusen wurden mit der Feile mechanisch irritiert und nach immunohistochemischer Färbung mit Haut, die nicht mechanisch irritiert wurde (links), verglichen. (C) H&E-Färbungen zeigen, dass durch die mechanische Irritation (rechts) die Epidermis entfernt wurde, die Dermis jedoch erhalten blieb. (D) Nach einer Färbung mit einem anti-mCol7-Antikörper zeigen DIF-Aufnahmen, dass auch nach mechanischer Irritation die mCol7-Schicht (weiße Pfeilspitzen) an der DEJ weiterhin vorhanden ist. Epi.: Epidermis, Der.: Dermis, Kn.: Knorpel, Größenstandard $\cong 50 \mu\text{m}$

Mit dieser Technik wurden zwei Gruppen von SJL-Mäusen, nachdem ihnen 3 Wochen zuvor (Tag -21) eine PBS/Titermax- bzw. mCol7c-GST/Tiermax-Emulsion in die Sohlen der Hinterfüße injiziert wurde, an den Innenohren mechanisch irritiert. 7 Tage nach der mechanischen Irritation wurden Proben von läsionaler Ohrhaut genommen (Abb. 3.19A). Kryoschnitte wurden im Anschluss mit einem TCR β -Antikörper gefärbt (Abb. 3.19B) und die TCR β^+ -Zellen in periläsionalen Hautabschnitten ausgezählt (Abb. 3.19C). Die Auszählung zeigte, dass in mechanisch irritierter Haut von Mäusen mit EBA signifikant mehr T-Zellen detektiert wurden als in Haut von Kontroll-Mäusen. Zusätzlich wurde aus Kryoschnitten von Tag 5 nach mechanischer Irritation mRNA extrahiert und daraus zur Genexpressionsanalyse cDNA synthetisiert. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde die Expression der Gene für die T-Zell-Zytokine IFN γ , IL-4 und IL-10 in der Haut 5 Tage nach mechanischer Irritation untersucht. Bei der Expression von IL-4 und IL-10 konnte dabei kein Unterschied zwischen Kontroll- und EBA-Mäusen festgestellt werden. IFN γ dagegen wurde in Mäusen mit EBA signifikant stärker exprimiert als in naiven Mäusen.

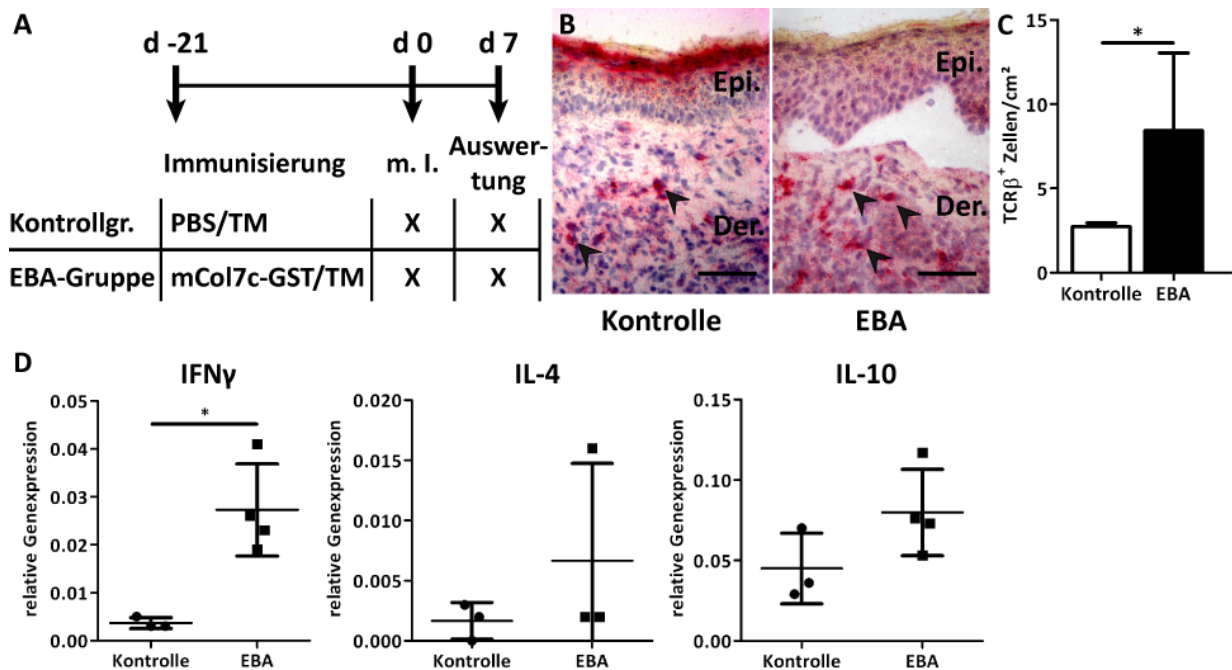


Abb. 3.19 Höhere Zahl an T-Zellen in von EBA-Wunden betroffener Haut als in mechanisch irritierter Haut gesunder Mäuse. (A) SJL-Mäusen wurde eine mCol7c-GST/Titermax- bzw. PBS/Titermax-Emulsion in die Sohlen der Hinterfüße injiziert. 3 Wochen später, zum Zeitpunkt der ersten Wunden wurden die Mäuse beider Gruppen an der Innenseite des Ohres mechanisch irritiert. Nach der mechanischen Irritation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Hautproben genommen. (B) Im Vergleich zu mechanisch irritierter Haut Kontroll-Mäuse (links) zeigen immunhistologische Färbungen periläsionaler Haut von an EBA erkrankten Mäusen 7 Tage nach mechanischer Irritation eine höhere Anzahl an TCRβ-positiven T-Zellen (rote Färbung, Pfeile). Epi.: Epidermis, Der.: Dermis, Größenstandard \cong 50 μ m (C) Die quantitative Auswertung ergab, dass 7 Tage nach mechanischer Irritation in der Haut von an EBA-erkrankten Mäusen (n=9) signifikant mehr T-Zellen waren als in Haut von Kontroll-Mäusen (n=4). (D) Aus Kryoschnitten von Haut von Tag 5 nach mechanischer Irritation wurde mRNA extrahiert und zur Genexpressionsanalyse in cDNA umgeschrieben. Mittels quantitativer RT-PCR ist in der Haut von EBA-Mäusen (n=4) verglichen mit Haut von Kontroll-Mäusen (n=3) eine erhöhte Expression von *IFN* γ festzustellen. Dagegen gibt es keinen Unterschied bei der Expression von *IL-4* und *IL-10*. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus einem Experiment, Mann-Whitney-U-test: * $p < 0,05$.

Zusammenfassung III

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von T-Zell-spezifischen Genen in von EBA-Wunden betroffener Haut im Vergleich zur Haut von naiven Kontrollen signifikant erhöht war. Um auszuschließen, dass ein möglicher Einfluss auf die Bildung von EBA-Wunden durch T-Zellen hervorgerufen wurde, die gegen die injizierten Kaninchen-IgGs gerichtet sind, wurde auf das Immunisierungs-induzierte EBA-Modell zurückgegriffen, bei dem die EBA induziert wird, ohne dass ein Fremdprotein injiziert werden muss. Die Reduzierung der T-Zell-Zahl im peripheren Blut mittels Behandlung mit FTY720 führte zu einem milderem EBA-Verlauf. Darüber hinaus konnte in mechanisch irritierter Haut von Mäusen, in denen EBA induziert wurde, mehr T-Zellen nachgewiesen werden als in mechanisch irritierter Haut von naiven Mäusen. Die Expressionsanalyse von Genen für T-Zell-spezifische Zytokine ergab eine erhöhte

Ergebnisse

Expression von *IFN γ* in mechanisch irritierter Haut von Mäusen mit EBA, was auf die Aktivierung der T-Zellen in der Haut von an EBA erkrankten Mäusen hindeutet.

4. Diskussion

Zur Erforschung der EBA wurden mehrere Modelle entwickelt, mit denen verschiedene Aspekte der Krankheit untersucht werden können. Im Immunisierung-induzierten Modell (Sitaru et al., 2006) wird durch die Injektion einer Emulsion aus einem rekombinanten mCol7-Peptid und dem Adjuvans Titermax in die Fußsohlen von Mäusen der Toleranzbruch gegenüber dem murinen Kollagen 7 induziert, was zur Ausbildung von mCol7-spezifischen Antikörpern führt. Daher ist dieses Modell dazu geeignet, sowohl die afferente als auch die efferente Phase der EBA zu untersuchen. Will man die Effektorphase erforschen, so eignet sich das passive Antikörpertransfer-Modell der EBA, in dem Mäusen in Kaninchen generierte mCol7-spezifische Antikörper injiziert werden um die Bildung der EBA-Wunden herbeizuführen (Sitaru et al., 2005).

Zur Untersuchung der Effektorphase der EBA, wurde zunächst das Antikörpertransfer Modell etabliert. Zu diesem Zweck wurden den Mäusen an Tag 0, 2, 4 und 6 jeweils 5 mg mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert. Diese konnten daraufhin an der DEJ wiedergefunden werden, wo sie zu einer Einwanderung von Granulozyten führte, was die Separation von Dermis und Epidermis nach sich zog. Die ersten so entstandenen EBA-Wunden waren ab Tag 4 zu erkennen und die von EBA-Wunden betroffene Körperoberfläche nahm mit fortschreitender Zeit zu. Sowohl der Zeitpunkt der ersten EBA-Wunden als auch der Verlauf der EBA-Erkrankung sind dabei mit denen, die in anderen Arbeiten gezeigt werden, vergleichbar. Während jedoch in den bisherigen Studien die Entstehung der EBA-Wunden bis zu Tag 12 verfolgt und danach die Experimente beendet wurden (Hirose et al., 2012; Samavedam et al., 2013), wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswertung der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass, obwohl die letzte Injektion von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an Tag 6 erfolgte, der Anteil der betroffenen Körperoberfläche bis zu Tag 19 anstieg. Hierdurch kam die Frage auf, welche Faktoren für diese lang anhaltende und immer stärker werdende Krankheitsausprägung im Antikörpertransfer-Modell der EBA verantwortlich sind.

4.1 Die injizierten mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs allein sind nicht für den Krankheitsanstieg bis Tag 19 im Antikörpertransfer-Modell verantwortlich

Eine naheliegende Erklärung wäre, dass die Menge der injizierten Kaninchen-IgGs alleine dafür ausreicht, um für den beobachteten EBA-Verlauf zu sorgen. IgGs haben in der Zirkulation, verglichen mit anderen Immunglobulin-Subklassen, eine verhältnismäßig lange Halbwertszeit, da sie durch den neonatalen Fc-Rezeptor vor Degradation geschützt sind (Israel et al., 1996; Junghans und Anderson, 1996). Dieser Effekt gilt auch für speziesfremde IgGs. So zeigten Studien mit radioaktiv markierten Kaninchen-IgGs, dass diese eine Halbwertszeit von 6 Tagen im peripheren Blut von Mäusen aufwiesen (Gitlin et al., 1976) und damit in etwa so lange in der Blutzirkulation von Mäusen verbleiben wie mauseigene, 6-8 Tage (Vieira und Rajewsky, 1988), oder humane IgGs, 7 Tage (Barekzi et al., 1999). Diese für Immunglobuline lange Halbwertszeit ist trotzdem zu kurz, um zu erklären, warum der Anteil der betroffenen Körperoberfläche so lange ansteigt. In der Literatur ist beschrieben, dass mCol7-spezifische IgGs an der DEJ doppelt so lange nachweisbar sind wie im peripheren Blut (Kasperkiewicz et al., 2010). Daher wäre es möglich, dass die IgGs durch den Austritt aus der Blutzirkulation in die Haut und durch Binden ihres Antigens an der DEJ dem Abbau entgehen. Sollte dies der Fall sein, so müsste die Menge an mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ mit der Zeit zunehmen. Die steigende Anzahl von mCol7-spezifischen IgGs an der DEJ würde dann den stärker werdenden Krankheitsverlauf erklären.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde zunächst untersucht, ob der prozentuale Anteil der von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ zunimmt. Dazu wurde die IgG-Deposition an der DEJ nach immunhistologischen Färbungen per Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und quantifiziert.

Es zeigte sich, dass an Tag 3, an dem bereits zwei Kaninchen-IgG-Injektionen erfolgten, nur wenige Kaninchen-IgGs an der DEJ zu finden waren. Dies macht zwei Dinge deutlich: Zum Einen scheinen die mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs erst mit einer Verzögerung an die DEJ zu gelangen und zum Anderen scheint das Binden der Kaninchen-IgGs an die DEJ allein nicht auszureichen um eine Blasenbildung zu induzieren, da die ersten Blasen erst nach 4 Tagen zu erkennen sind. Den zweiten Punkt betreffend wäre denkbar, dass zunächst eine gewisse Konzentration von Kaninchen-IgGs an der DEJ erreicht werden muss, um die pro-inflammatorischen Prozesse einzuleiten, die zur Bildung von EBA-Blasen führen.

An Tag 6 war der Anteil der durch mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ signifikant erhöht. Dies war zugleich das Maximum, sodass nach Tag 6 keine weitere Zunahme festgestellt werden konnte. Da jedoch nicht nur der Anteil der gebundenen DEJ, sondern auch die Konzentration der an die DEJ gebundenen mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs ursächlich für den Anstieg der betroffenen Körperoberfläche sein könnte, sollte auch diese untersucht werden. Da sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration des detektierten Fluorophors verhält (Waters, 2009), wurde diese durch die Messung der Fluoreszenzintensität der an die DEJ gebundenen mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an den jeweiligen Tagen bestimmt.

Da nach Tag 6 keine weitere Zunahme von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ sowohl bezüglich des Anteils der gebundenen DEJ als auch bezüglich der Konzentration festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass die injizierten mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs alleine nicht für den bis zum Tag 19 zunehmenden Krankheitsverlauf verantwortlich sind. Somit stellte sich die Frage, welcher zusätzliche Faktor an der Bildung von EBA-Wunden beteiligt ist.

4.2 Die Bildung von murinen IgGs führen zu einer verstärkten Bildung von EBA-Wunden im passiven Antikörper-Transfermodell

Da die in die Maus injizierten Kaninchen-IgGs Fremdproteine für die Mäuse darstellen, könnten diese eine Immunreaktion in den Mäusen zur Folge haben. Wenn dem so ist, wäre zu erwarten, dass die Immunreaktion in den die Einstichstellen drainierenden Lymphknoten stattfindet und zur Bildung von Keimzentren führt. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden Kryoschnitte drainierender Lymphknoten von mit mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs injizierten Mäusen auf Keimzentren untersucht und mit denen von naiven Kontrollen verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Injektion von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs eine Bildung von Keimzentren nach sich zog und somit Maus-Antikörper generiert wurden. Um zu untersuchen, ob die in den Keimzentren von mit Kaninchen-IgGs injizierten Mäusen gebildeten IgGs spezifisch für die Kaninchen-IgGs sind, wurden Hautschnitte mit fluoreszenzmarkierten, gegen murine IgGs gerichteten Antikörpern behandelt. Es zeigte sich, dass murine Immunglobuline der Subklasse 2c an der DEJ nachgewiesen werden konnten. Dieser Befund macht deutlich, dass die endogenen Immunglobuline gegen die mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs gerichtet sind.

Diese induzierte Immunantwort könnte auch dazu beigetragen haben, dass an Tag 12 kein weiterer Anstieg der Kaninchen-IgGs an der DEJ zu festzustellen war. Durch die im Zuge der Immunantwort produzierten murinen Immunglobuline könnte die Erhöhung der Zahl von IgGs im Blut auch zu einer Sättigung der neonatalen Fc-Rezeptoren geführt haben, sodass dadurch nun Kaninchen- und murine IgGs um die neonatalen Fc-Rezeptoren konkurrieren. Hierdurch würde eine größere Anzahl an Kaninchen-IgGs keinen neonatalen Fc-Rezeptor gebunden haben, wodurch sich die Halbwertszeit der Kaninchen-IgGs reduziert (Sesarman et al., 2008) und sie abgebaut werden, bevor sie die DEJ erreichen.

In der Arbeit erfolgte lediglich die Detektion der murinen IgGs der Subklasse 2c an der DEJ. Da man mIgG2b sowie mIgG2c als diejenigen Antikörper der Klasse der IgGs identifizieren konnte, die die Bildung der EBA-Wunden induzieren (Hammers et al., 2011), wurde auf die Detektion von mIgG1 verzichtet. Betreffend mIgG1 ist darüberhinaus anzumerken, dass, wie im Methodenteil bereits beschrieben, eine Kreuzreaktion zwischen dem mIgG1-Detektionsantikörper und den mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs nicht ausgeschlossen werden kann und es so zu falsch-positiven Ergebnissen hätte kommen können (Abb. 2.1). mIgG2c wurde mIgG2b deshalb vorgezogen, da mIgG2c eine höhere Affinität zu dem für die EBA-Pathogenese relevanten Fc γ -Rezeptor IV hat (Nimmerjahn et al., 2005). Auch auf die Untersuchung der IgM-Deposition an der DEJ wurde verzichtet. Zwar konnten in einigen Patienten EBA-Patienten IgM-Ablagerungen an der DEJ festgestellt werden (Barreiro-Capurro et al., 2013; Smoller und Woodley, 1992), jedoch ist es unwahrscheinlich, dass sie zur Pathogenese beitragen. Da Fc γ -Rezeptoren keine IgM-Immunkomplexe binden können, wären die IgM-Immunkomplexe nicht in der Lage den bereits angesprochenen Fc γ RIV zu aktivieren und könnten damit nur indirekt die für die EBA-Wundbildung verantwortlichen neutrophilen Granulozyten aktivieren. Eine solche Möglichkeit der neutrophilen Granulozyten-Aktivierung wäre die Aktivierung des Komplementsystems. Wie jedoch bereits in der Einleitung erwähnt, hat lediglich der alternative Komplementaktivierungsweg einen signifikanten Einfluss auf die EBA-Pathogenese, wohingegen IgM-Immunkomplexe den klassischen Komplementweg induzieren.

Es gibt drei Möglichkeiten, wie die gebildeten murinen Antikörper wirken können: Zum einen könnten die produzierten Maus-IgGs die Kaninchen-IgGs bereits in der Zirkulation zum größten Teil neutralisieren, sodass nur geringe Mengen an Kaninchen-IgGs in die Haut

gelangen und Col7 an der DEJ binden (Abb. 4.1A). Die Kaninchen-IgGs würden dort, wie in Abb. 3.6 gezeigt wurde, von den murinen IgGs gebunden werden und, da sie vom Komplement-aktivierenden Subtyp 2c sind, vereinzelt zur Bildung von EBA-Wunden führen. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass die Kaninchen-IgGs in großer Zahl die DEJ erreichen, was zur Folge hätte, dass deutlich mehr Kaninchen-IgG-spezifische murine IgGs an der DEJ ihr Antigen finden und daran binden. Dementsprechend würde die Komplement-Kaskade stärker aktiviert, was zu einem schwereren EBA-Verlauf führen würde (Abb. 4.1B). Die dritte Möglichkeit wäre, dass im Zuge der Immunantwort auch murines IgG1 gebildet wird. Diese könnten zum einen ebenfalls die injizierten Kaninchen-IgGs bereits in der Zirkulation binden und neutralisieren. Auf der anderen Seite wäre es auch möglich, dass auch hier die Kaninchen-IgGs die DEJ erreichen und die murinen IgG1 erst dort an diese binden. Da murine IgG1 nicht Komplement-aktivierend sind, könnte das Binden dazu führen, dass es dadurch zu einer sterischen Hinderung der Komplement-Aktivierung durch die Kaninchen-IgGs kommt, sodass diese durch die murinen IgG1 verringert wird. Beide beschriebenen Möglichkeiten hätten zur Folge, dass der Krankheitsverlauf durch die murinen IgG1 abgeschwächt wird (Abb. 4.1C).

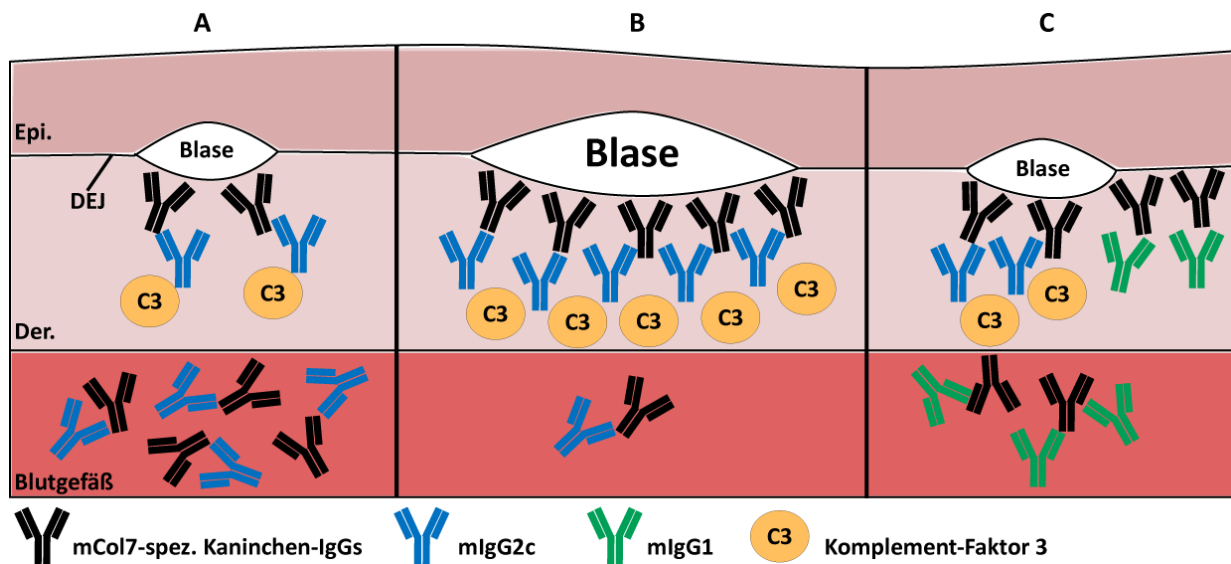


Abb. 4.1: Mögliche Effekte der murinen IgGs auf die Blasenbildung im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA. (A) Viele mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs (schwarz) werden bereits in den Blutgefäßen durch mIgG2c (blau) abgefangen, sodass nur wenige Kaninchen-IgGs die DEJ erreichen. Dort werden diese ebenfalls von mIgG2c gebunden, die die Aktivierung der Komplement-Kaskade induzieren (C3), was zu einer geringen Blasenbildung führt. (B) Es werden nur wenige mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs in den Blutgefäßen durch mIgG2c gebunden, sodass mehr Kaninchen-IgGs an die DEJ gelangen und mit Hilfe der mIgG2c eine stärkere Komplement-Aktivierung erfolgt, die zu einer verstärkten Blasenbildung führt. (C) mIgG1 (grün) binden die mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs sowohl in den Blutgefäßen als auch an der DEJ. Da diese nicht Komplement-aktivierend sind, erfolgt nur eine geringe Blasenbildung. Epi.: Epidermis, Der.: Dermis

Um herauszufinden welche der beschriebenen Möglichkeiten richtig ist, wurden B-Zell-defiziente JHT-Mäuse eingesetzt (Gu et al., 1993), die keine eigenen Antikörper produzieren können. Würde Möglichkeit A (Abb. 4.1) richtig sein, so könnten durch das Fehlen der murinen IgGs keine Kaninchen-IgGs in der Zirkulation neutralisiert werden, sodass sehr viel mehr Kaninchen-IgGs an der DEJ binden könnten. Demnach würden B-Zell-defiziente Mäuse im Vergleich zu wt-Mäusen eine größere von EBA-Wunden betroffene Körperoberfläche aufweisen. Sollte jedoch Möglichkeit B korrekt sein, fände nach dem Binden der Kaninchen-IgGs an Col7 an der DEJ keine verstärkte Komplement-Aktivierung statt und die B-Zell-defizienten Mäuse würden einen milderen EBA-Verlauf zeigen. Wäre Möglichkeit C zutreffend, würde in diesem Fall eine Neutralisierung der Kaninchen-IgGs in der Zirkulation beziehungsweise die Abschwächung der Komplement-Aktivierung durch das Fehlen der murinen IgG1 verhindert werden. Auch in diesem Fall wäre ein schwererer EBA-Verlauf zu erwarten.

So wurden wt- und B-Zell-defizienten Mäusen mCol7-spezifische Kaninchen-IgGs injiziert, anschließend die EBA-Wundentwicklung regelmäßig evaluiert und am Versuchsende Proben genommen. Immunhistologische Untersuchungen des Lymphknotens bestätigten das Fehlen der B-Zellen und Keimzentren. Die Analyse der Genexpression im Lymphknoten konnte dies auf mRNA-Ebene bestätigen: Eine Expression von *AID*, ein Marker für aktivierte folliculäre B-Zellen sowie zuständig für den Klassenwechsel zu IgG (Muramatsu et al., 2000), konnte nicht detektiert werden. Dementsprechend konnten in B-Zell-defizienten Mäusen auch keine murinen IgGs an der DEJ in Hautschnitten immunhistologisch detektiert werden, während wt-Mäuse Bindung von sowohl Kaninchen- als auch murinen IgGs an der DEJ zeigten.

Beim Vergleich der EBA-Verläufe beider Gruppen zeigte die Gruppe der B-Zell-defizienten Mäusen im Vergleich zu der wt-Gruppe ab Tag 11 eine weniger starke Zunahme des Anteils der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche. Das Fehlen der murinen IgGs in diesen Mäusen führte also zu einem milderen Krankheitsverlauf.

Um zu bestätigen, dass der mildere Krankheitsverlauf auf das Fehlen der B-Zellen zurückzuführen ist, wurde im passiven Antikörpertransfer-Modell ein Lymphozytentransfer von wt-Lymphozyten in B-Zell-defiziente JHT-Mäuse vorgenommen und die EBA-Entwicklung in diesen Mäusen mit einer wt-Gruppe verglichen. Die Auswertung ergab, dass sich beide Gruppen in Bezug auf die von EBA-Wunden betroffene Körperoberfläche nicht voneinander

unterschieden und damit tatsächlich das Fehlen der B-Zellen zu dem milderen Krankheitsverlauf im vorherigen Experiment geführt hat.

Es ist anzumerken, dass in diesem Versuch lediglich vier Mäuse pro Gruppe eingesetzt wurden. Da auch die Streuung der Daten recht hoch ist, ist die Interpretation schwierig, sodass eine Erhöhung der Zahl der Mäuse in den beiden Gruppen zu einer größeren statistischen Robustheit beigetragen hätte. Allerdings stammen die Resultate aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Versuchstieren pro Gruppe und in beiden konnte kein Unterschied festgestellt werden. So hätte eine Erhöhung der Zahl von Versuchstieren für beide Gruppen auf jeweils $n=6$, selbst wenn bei diesem zusätzlichen Experiment ein signifikanter Unterschied festgestellt werden würde, zu keinem signifikanten Unterschied im Ergebnis des gesamten Versuchs geführt. Da zusätzlich zu den verwendeten Versuchstieren auch die Spendermäuse der Lymphozyten berücksichtigt werden müssen, stünde der zu erwartende Wissensgewinn in keinem Verhältnis zu den weiteren Mäusen die für ein neues Experiment hätten eingesetzt werden müssen. Aus diesem Grund wurde von einer Erhöhung der Fallzahl abgesehen.

Zusätzlich zu den B-Zell-defizienten JHT-Mäusen sollten die Ergebnisse in einem weiteren Mausstamm bestätigt werden, der ebenfalls keine eigenen IgGs produzieren kann. So wurden die Experimente in CD40L KO-Mäusen wiederholt, die zwar B-Zellen haben, welche jedoch nicht aktiviert werden können, da durch das Fehlen des CD40-Liganden eine T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung nicht möglich ist (Allen et al., 1993). Dies führte dazu, dass auch in CD40L KO-Mäusen keine Keimzentren festzustellen waren und dementsprechend keine mIgG2c an der DEJ gefunden werden konnten.

Hier wäre es auch interessant gewesen zu untersuchen, ob trotz der CD40L-Defizienz B-Zellen aktiviert worden sind und es zu einer Produktion von IgM kam. Da jedoch darauf verzichtet wurde, die Deposition von IgM an der DEJ immunhistologisch zu untersuchen, bleibt diese Frage unbeantwortet. Durch RT-PCR-Analysen konnte in den inguinalen Lymphknoten der CD40L KO-Mäusen eine gegenüber naiven Kontrollen erhöhte Expression sowohl des Th1-Expressionsmarkers *T-bet* als auch des Chemokinrezeptors *CXCR5* festgestellt werden. Die erhöhte *T-bet*-Expression deutet auf die Aktivierung von Th1-Zellen hin, was zu einer *CXCR5*-Expression in diesen geführt haben könnte, sodass sie zur B-Zellzone wandern, um dort B-

Zellhilfe zu leisten. Dies zeigt, dass in CD40L KO-Mäusen die Injektion der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs zumindest eine Aktivierung der T-Zellen ausgelöst wurde.

Auch CD40L KO-Mäuse zeigten einen milderen EBA-Verlauf und bestätigen damit die Hypothese der krankheitsfördernden Wirkung durch die endogen produzierten Immunglobuline im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet die Rolle der mIgG1, deren Fehlen zu einem schwereren EBA-Verlauf geführt hätte, im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA zu untersuchen. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass auch mIgG1 die EBA-Pathogenese, wie in Abb. 4.1 beschrieben, beeinflussen könnten. In einem Experiment konnte durch die Behandlung mit löslichem CD32 ein milderer Krankheitsverlauf im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell erzielt werden (Iwata et al., 2015). Der Wirkmechanismus wäre dabei wahrscheinlich ähnlich dem von mIgG1: Das lösliche CD32 bindet an die Immunkomplexe an der DEJ, was zu einer verminderten Komplementaktivierung führen würde, die für die festgestellte schwächere Infiltration der Haut durch Neutrophile verantwortlich wäre. Einen weiteren Einfluss von mIgG1 auf die Pathogenese könnte auch die bereits beschriebene mögliche Konkurrenz mit den pathogenen mIgG2c um den neonatalen Fc-Rezeptor und eine damit verbundene verringerte Halbwertszeit dieser sein. Denkbar wäre, dass die Mechanismen von mIgG2c und mIgG1 beide im Antikörpertransfer-Modell auftreten. Der festgestellte mildere EBA-Verlauf in Mäusen, die selbst keine IgGs produzieren können, deutet aber darauf hin, dass der Einfluss der mIgG2c auf den EBA-Phänotyp überwiegt.

Die Injektionen der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs führen also zu einer Immunreaktion in den drainierenden Lymphknoten, welche eine Generierung von murinen IgGs nach sich zieht, die spezifisch für die injizierten mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs sind. Diese murinen IgGs binden die sich an der DEJ befindlichen Kaninchen-IgGs. Wie gezeigt werden konnte, sind die murinen IgGs vom Subtyp 2c und damit Komplement-aktivierend. Die Aktivierung des Komplement-Systems bewirkt im Anschluss das Einwandern von Immunzellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten. Eingewanderte neutrophile Granulozyten können dann über ihren Fc γ -Rezeptor aktiviert werden. Dabei hat vor allem der Fc γ RIV, der eine hohe Affinität zu mIgG2c hat (Nimmerjahn et al., 2005), großen Einfluss auf die Pathogenese der EBA. So konnte gezeigt werden, dass Fc γ RIV-defiziente Mäuse vor der EBA geschützt waren (Kasperkiewicz et al., 2012). Die Wichtigkeit der Fc γ -Rezeptoren in der EBA-Pathogenese wird

auch daran ersichtlich, dass durch die Veränderung der Affinität der murinen IgGs zu den Fc γ -Rezeptoren, der EBA-Verlauf in den murinen EBA-Modellen moduliert werden konnte. Die Änderung der Bindung der Fc γ -Rezeptoren zu den Immunkomplexen wurde dabei über die veränderte Glykosylierung des Fc-Teils der Immunglobuline erreicht. Dies wurde u.a. bei Experimenten mit EndoS im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell deutlich. Die Behandlung von an EBA erkrankten Mäusen mit der Endoglykosidase EndoS, die den Glykanrest am Fc-Teil von mIgG1 und mIgG2b abspaltet (Albert et al., 2008), führte zu einem verglichen mit Kontrollmäusen schwächeren EBA-Phänotyp (Hirose et al., 2012). Die Behandlung der Mäuse mit EndoS ging dabei nicht nur mit einer niedrigeren Expression des Gens für Fc γ RIV, sondern auch mit der verringerten Expression des Gens für den anti-inflammatorischen Fc γ RIIB einher. Darüberhinaus kann auch durch eine verstärkte Galaktosylierung Einfluss auf die EBA-Pathogenese genommen werden. So zog die Behandlung von Mäusen im passiven Antikörper-Transfermodell mit hochgradig galaktosylierten IgG1-Immunkomplexen einen durch den anti-inflammatorischen Fc γ RIIB vermittelten milderen EBA-Verlauf nach sich (Karsten et al., 2012).

Sind Mäuse nun nicht in der Lage eigene IgGs zu produzieren, wie es in B-Zell-defizienten- und CD40L KO-Mäusen der Fall ist, entfällt die verstärkende Wirkung der murinen IgGs und die EBA-Erkrankung nimmt einen milderen Verlauf. In der frühen Phase der EBA-Erkrankung sind noch keine Unterschiede zwischen der wt- und der Gruppe der B-Zell-defizienten- bzw. CD40L KO-Mäuse feststellbar. Da ungefähr 7 Tage vom initialen Antigenkontakt bis zur Produktion der ersten IgGs nötig sind (Murphy et al., 2012), beruht die Entstehung der EBA-Wunden in dieser frühen Phase wahrscheinlich allein auf den mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs. Erst später binden auch die murinen IgGs an die DEJ, sodass erst dann das Fehlen der murinen IgGs als milderer Krankheitsverlauf in B-Zell-defizienten- und CD40L KO-Mäusen sichtbar wird.

Nach der Injektion von Kaninchen-IgGs werden also Kaninchen-IgG-spezifische Maus-IgGs produziert, die in Hinblick auf die EBA unspezifisch sind. Trotzdem führen diese IgGs zu EBA-typischen Wunden. Die mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs dienen daher wahrscheinlich als Plattform für die murinen IgGs an der DEJ, deren Binden dann über eine verstärkte Komplement-Aktivierung zu einem schwereren EBA-Verlauf führen, indem durch das alleinige Binden von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs hervorgerufene Blasen vergrößert werden. Auch ist es möglich, dass durch das Binden der murinen IgGs an einigen Stellen neue Blasen

entstehen, wo andernfalls die Konzentration der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs zu niedrig und damit die Komplement-Aktivierung zu gering wäre, um die Bildung einer EBA-Wunde zu induzieren. Auf diese Weise könnten die murinen IgGs sowohl das Ausmaß als auch die Anzahl der EBA-Wunden erhöhen.

Das passive Antikörpertransfer-Modell ist ein wichtiges Instrument zur Untersuchung der Effektorphase der EBA. Jedoch sollte der hier festgestellte Effekt auf den Krankheitsverlauf gerade bei länger andauernden Experimenten berücksichtigt werden. Will man dies umgehen, wäre denkbar, murine mCol7-spezifische IgGs zur Induktion von EBA-Wunden zu verwenden. Damit könnten die Effekte einer Immunreaktion gegen körperfremde Proteine auf den EBA-Verlauf vermieden und so dieses Modell noch wertvoller gemacht werden.

Auch in der Klinik haben die gefundenen Resultate Relevanz. So werden zur Behandlung von Menschen auch xenogene Antikörper eingesetzt. Der Einsatz solcher Antikörper kann zu einer Immunreaktion führen, die zu einer Verringerung der Wirksamkeit führt (Zimmer et al., 1988). Auch schwere Nebenwirkungen sind bereits beschrieben. So kann es z.B. bei der Verwendung des chimären anti-TNF α -Antikörpers „Infliximab“ zu einem anaphylaktischen Schock kommen (Vultaggio et al., 2010).

Die durch Antikörper-Injektion induzierte Immunreaktion kann man sich jedoch auch zunutze machen, indem dieses Prinzip zur Etablierung von Tiermodellen verwendet wird. So konnte damit ein BP-Modell (Oswald et al., 2012) sowie ein Glomerulonephritis-Modell (Neale und Wilson, 1982) entwickelt werden. In beiden Modellen wurde der krankheitsspezifische Phänotyp durch eine Prä-Immunisierung der Mäuse mit Kaninchen-Serum und der anschließenden Injektion von Antigen-spezifischen Kaninchen-Antikörpern ausgelöst.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die injizierten Kaninchen-IgGs in der Maus als Fremdproteine erkannt werden und es zu einer Immunreaktion in den drainierenden Lymphknoten kommt. Die daraufhin gebildeten Immunglobuline sind spezifisch für die Kaninchen-IgGs und lassen sich an der DEJ nachweisen. Dass Mäuse, die keine eigenen IgGs produzieren können, weniger stark von EBA-Wunden betroffen waren, macht deutlich, dass das Binden der murinen IgGs an die DEJ zu einem schwereren EBA-Verlauf führt.

Die Produktion von komplementaktivierenden IgGs des Subtyps 2c deutet auf eine Polarisierung des Lymphknotens in Richtung Th1-Antwort hin (Hammers, 2011). Da Th1-

Zellen, wie z.B. bei der DTH-Reaktion (DTH: delayed type hypersensitivity), auch Effektorfunktionen in der Haut ausüben (Abbas et al., 1996), sollte auch in der vorliegenden Arbeit die Rolle der T-Zellen in der Haut untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst im Antikörpertransfer-Modell Genexpressionsanalysen der auf T-Zellen zu findenden Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 in läsionaler Haut durchgeführt und mit der Expression in gesunder Haut verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Genexpression beider Chemokinrezeptoren in läsionaler Haut erhöht war. Jedoch ist anzumerken, dass CXCR3 und CCR5 nicht nur auf T-Zellen zu finden sind, sondern auch auf NK- sowie dendritischen Zellen. DIF-Aufnahmen von Schnitten läsionaler Haut, bei denen NK-Zellen fluoreszenzmarkiert wurden, zeigten jedoch ein sehr geringes Vorhandensein von NK-Zellen. Außerdem zeigten quantitative RT-PCR-Daten keinen Unterschied in der Expression von NK-Zell-spezifischen Genen, wie z.B. *Klra1*, zwischen nicht betroffener und läsionaler Haut aktiv immunisierter Mäuse. Damit kann eine durch verstärkte NK-Zell-Einwanderung hervorgerufene CXCR3- und CCR5-Expression ausgeschlossen werden, was allerdings nicht für dendritische Zellen gilt. Die erhöhte, wenn auch im Falle von *TCR β* nicht signifikant stärkere, *TCR β* - und *IFN γ* -Expression bestärkt jedoch die Hypothese der Einwanderung von Th1-Zellen in von EBA-Wunden betroffene Haut.

4.3 Effektor-T-Zellen in der Haut unterstützen die Bildung von EBA-Wunden

Die gefundenen Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von T-Zellen an der Pathogenese der EBA hin, wobei es drei verschiedene Möglichkeiten geben kann, gegen welche Ziele die T-Zellen gerichtet sind. Die erste Möglichkeit ist, dass die T-Zellen in der Haut spezifisch für die injizierten mausfremden Kaninchen-IgGs sind und nicht auf die EBA-Erkrankung zurückzuführen sind. Zweitens wäre denkbar, dass die durch die in der Haut stattfindenden inflammatorischen Ereignisse und die damit erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße dazu geführt haben, dass zufällig unspezifische T-Zellen in die Haut gelangt sind. Die dritte Möglichkeit ist, dass die in der Haut festgestellten T-Zellen mCol7- und damit auch EBA-spezifisch sind.

Um zu untersuchen welche dieser drei Möglichkeiten zutreffend ist, wurde das Mausmodell gewechselt und die nachfolgenden Versuche im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell durchgeführt. In diesem Modell wird zur EBA-Induktion ein rekombinant hergestelltes Fragment des murinen Col7 zusammen mit dem Adjuvans Titermax injiziert, was zur Bildung

von mCol7-spezifischen T-Zellen führt (Tiburzy et al., 2013). Da hier also kein Fremdprotein verwendet wird, ist, wenn sich auch im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell eine erhöhte T-Zellzahl in der Haut von an EBA erkrankten Mäusen feststellen lässt, die Möglichkeit eines durch die Injektion von Kaninchen-IgGs hervorgerufenen Effekts auszuschließen.

Um zu untersuchen, ob T-Zellen einen Einfluss auf die von EBA-betroffene Körperoberfläche haben, wurden im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell T-Zellen daran gehindert, in die Haut einzuwandern, indem Mäuse mit dem Immunsuppressivum FTY720 (Fingolimod) behandelt wurden. FTY720 ist ein Agonist des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors, der auf T-Zellen zu finden ist und nach Binden von FTY720 internalisiert und abgebaut wird. Da dieser notwendig ist, um aus dem Lymphknoten in die Blutzirkulation einzutreten, bewirkt ein Fehlen des Rezeptors auf der Zelloberfläche ein Verbleib der T-Zellen im Lymphknoten und die Reduktion der T-Zellzahl im peripheren Blut (Mandala et al., 2002). Sollte die mit FTY720 behandelte Gruppe im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell einen milderen Krankheitsverlauf aufweisen, kann ausgeschlossen werden, dass die erhöhte T-Zellzahl in der von EBA-Wunden betroffenen Haut auf die Injektion von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs zurückzuführen ist.

Da T-Zellen im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell durch die von ihnen in den Lymphknoten geleistete B-Zell-Hilfe bei der Produktion der mCol7-spezifischen IgGs notwendig sind (Iwata et al., 2013), wurde die tägliche Behandlung mit FTY720 erst nach Auftreten der ersten EBA-Wunden begonnen. Während der FTY720-Behandlung wurde die Zahl der T-Zellen im peripheren Blut per FACS-Analyse wöchentlich untersucht. Die Behandlung der Mäuse mit FTY720 führte innerhalb des gesamten Behandlungszeitraums zu einer Reduktion der T-Zell-Zahl auf durchschnittlich unter 10% des Niveaus vor Behandlungsbeginn. Dagegen schwankte die T-Zell-Zahl in den Kontrollen sehr stark zwischen 37% und 285%. Die erhöhte T-Zell-Zahl in den Vehikel-Kontrollen könnte auf eine T-Zell-Proliferation, hervorgerufen durch die EBA-Erkrankung, zurückzuführen sein. Entsprechend käme eine mildere EBA-Erkrankung gepaart mit möglichen Ungenauigkeiten der FACS-Analyse und möglichen Schwankungen in der T-Zell-Zahl im peripheren Blut für die in einigen Fällen festgestellte Reduktion der Zahl der T-Zellen in den Kontrollen in Betracht. Die deutlich reduzierte T-Zell-Zahl im peripheren Blut der mit FTY720 behandelten Mäuse wirkte sich auf den Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Haut aus: Mit FTY720 behandelte Mäuse wiesen

einen milderen Krankheitsverlauf auf als Mäuse, die mit einer Vehikel-Kontrolle behandelt wurden.

Es ist anzumerken, dass die Auswirkung der FTY720-Behandlung auf die B-Zellantwort nicht untersucht wurde. In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen darüber, ob FTY720 Einfluss auf die Antikörperproduktion hat: So konnte eine Studie zeigen, dass die Behandlung von Mäusen mit FTY720 einem niedrigeren IgG1-Serumtiter und zu einer verringerten Keimzentrumsbildung führte (Han et al., 2004). Jedoch wurde diese Studie in einem Modell durchgeführt, in dem die untersuchten Lymphknoten Th2-polarisiert waren, wohingegen ausschließlich Th1-polarisierte Lymphknoten zur Bildung von EBA-Wunden führen (Hammers et al., 2011). Andere Publikationen zeigen, dass die FTY720-Behandlung die humorale Immunantwort in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zeitraum nicht beeinflusst hat (Papadopoulos et al., 2010; Pinschewer et al., 2000). In der erstgenannten konnte an Tag 14, dem Tag an dem in der vorliegenden Arbeit ein Unterschied in der EBA-Schwere nachgewiesen werden konnte, kein Unterschied in Bezug auf den Serumtiter der IgG-Subklassen in Ratten festgestellt werden. Erst 31 Tage nach Beginn in der FTY720-Behandlung war der Serumtiter von IgG2a in der FTY720-Gruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Auch in der zweiten Publikation war kein Unterschied bezüglich des IgG-Serumtiters zwischen FTY720- und Kontrollgruppe festzustellen. Allerdings wurde in der betreffenden Arbeit eine geringere FTY720-Dosis (0,3 mg/kg Körpergewicht) verwendet und darüberhinaus wurde auch nur der Gesamt-IgG-Titer betrachtet und nicht nach Subklassen differenziert. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die FTY720-Behandlung nicht auch auf die humorale Immunantwort ausgewirkt hat.

Darüberhinaus zeigen die hier gewonnenen Daten eine große Streuung und einen lediglich punktuell signifikanten Unterschied. Hier hätte eine Erhöhung der Zahl der Versuchstiere eine größere Klarheit über eine etwaige Effektorfunktion von T-Zellen in der Haut im Immunisierungsinduzierten EBA-Modell gegeben. Jedoch war es zu diesem Zeitpunkt auch nach mehrmaligen Versuchen nicht möglich die Bildung von EBA-Wunden in weiteren SJL-Mäusen durch Immunisierungen zu induzieren. Daher bleibt die Frage offen, ob die erzielten Ergebnisse reproduziert werden können.

Da die FTY720-Behandlung mit einem milderen EBA-Verlauf assoziiert ist, kann ausgeschlossen werden, dass die erhöhte T-Zell-Zahl in von EBA-Wunden betroffener Haut

durch die Injektion von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs hervorgerufen worden sein könnte. Jedoch geht aus diesem Experiment nicht hervor, ob die in der Haut erhöhte Zahl der T-Zellen EBA-spezifisch ist, oder eine unspezifische Reaktion auf die Entzündungsprozesse im Zuge der Blasenbildung ist.

Um dies herauszufinden, wurden im Immunisierungs-induzierten Modell T-Zellen in der Haut von an EBA-erkrankten Mäusen quantifiziert und die T-Zell-Zahl mit der in Kontrollen verglichen. Sollte die verstärkte Wundbildung durch die T-Zellen während der EBA-Erkrankung nicht von EBA-spezifischen T-Zellen hervorgerufen worden sein, dürfte sich die Zahl der T-Zellen in beiden Gruppen nicht voneinander unterscheiden. Sind die Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf in der EBA jedoch auf EBA-spezifische T-Zellen zurückzuführen, müssten in Haut von an EBA erkrankten Mäusen mehr T-Zellen als in nicht immunisierten Mäusen zu finden sein.

Dazu wurden die Mäuse der Kontrollgruppe mit PBS/Titermax und die der EBA-Gruppe mit mCol7-GST/Titermax immunisiert. Zum Zeitpunkt des Auftretens erster EBA-Wunden wurden dann mit einer elektrischen Nagelfeile an den Innenohren kontrolliert Wunden verursacht und 7 Tage später Proben dieser Wunden von beiden Gruppen genommen. Nach immunhistologischer Färbung und anschließender Quantifizierung zeigte sich, dass in der Haut von an EBA erkrankten Mäusen signifikant mehr T-Zellen zu finden sind als in Wunden der mit PBS immunisierten Kontrollen. Damit ist die erhöhte Zahl von T-Zellen in von EBA-Wunden betroffener Haut eine EBA-spezifische Eigenschaft, die zu einem schwereren Krankheitsverlauf führt.

Um die sich in der Haut befindlichen T-Zellen näher zu charakterisieren, wurde die Expression T-Zell-assoziiertes Zytokine mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Während sich die *IL-4*- und auch die *IL-10*-Expression in von EBA-Wunden betroffener Haut nicht von der in Kontrollhaut unterschieden, war die Expression von *IFN γ* in EBA-Haut signifikant erhöht. Zwar sind neben T-Zellen auch NK-Zellen in der Lage große Mengen von *IFN γ* zu produzieren, jedoch konnte, wie bereits erwähnt, immunhistologisch nur eine sehr geringe Zahl an NK-Zellen in läSIONALER Haut immunisierter Mäuse nachgewiesen werden. Desweiteren zeigte sich auch kein Unterschied in der Expression von NK-Zell-spezifischen Genen zwischen läSIONALER und Kontrollhaut. So ist die erhöhte *IFN γ* -Expression in der EBA-Haut höchstwahrscheinlich auf die T-Zellen zurückzuführen und damit ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung der T-Zellen und

somit auf die Anwesenheit von mCol7-spezifischen T-Zellen in der Haut von an EBA erkrankten Mäusen.

Wie aus dem oben beschriebenen Experiment hervorgeht, führt die Reduzierung der T-Zell-Zahl im peripheren Blut durch die FTY720-Behandlung zu einem milderem Krankheitsverlauf. Dies macht deutlich, dass T-Zellen in der Effektorphase der EBA einen feststellbaren Einfluss auf die Wundbildung nehmen. Wie in Abb. 3.16 zu sehen ist, führte die FTY720-Behandlung nicht zu einem vollständigen Arrest der T-Zellen in den lymphatischen Organen, da immer noch etwa 10% der Ausgangs-T-Zell-Zahl im peripheren Blut nachweisbar waren. Auch ist fraglich, ob die FTY720-Behandlung die in der Haut sitzenden T-Zellen erreicht hat. So ist es möglich, dass, eine vollständige Depletion der T-Zellen in den untersuchten Mäusen zu einem deutlich milderem EBA-Verlauf geführt hätte.

Die erhöhte Expression des Gens für IFN γ in der Haut von EBA-Mäusen stimmt mit der berichteten Th1-Polarisation in den drainierenden Lymphknoten im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell überein (Hammers et al., 2011). So kommt den Th1-Zellen eine doppelte Rolle im Verlauf der EBA zu: Zuerst leisten Th1-Zellen B-Zell-Hilfe und tragen somit zu Bildung von Komplement-aktivierenden Autoantikörpern bei. Nach geleisteter B-Zell-Hilfe wandern sie in einem nächsten Schritt in die Haut ein, um dort zur Wundbildung beizutragen. So wäre es vorstellbar, dass mCol7-spezifische T-Zellen in eine bereits etablierte Wunde gelangen und dort erneut auf das für sie spezifische mCol7-Epitop treffen. Dies würde die Sekretion von IFN γ zur Folge haben, das aktivierend auf Neutrophile wirkt und damit die inflammatorischen Ereignisse, z.B. aufgrund einer erhöhten Lebensspanne (Iking-Konert et al., 2005) oder einer vermehrten Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies (Klebanoff et al., 1992), verstärkt.

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise auf eine Beteiligung von T-Zellen an der Entstehung von EBA-Wunden in der Haut gefunden werden. Eine reduzierte T-Zell-Zahl im peripheren Blut führte zu einem milderem EBA-Verlauf. Das verstärkte Auftreten von T-Zellen in Wunden von an EBA erkrankten Mäusen sowie die dortige erhöhte IFN γ -Expression spricht für das Vorkommen und die Aktivierung mCol7-spezifischer T-Zellen in der Haut.

5. Zusammenfassung

Obwohl im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA die letzte Injektion der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an Tag 6 erfolgte, wurde bei den Mäusen ein Anstieg der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche bis Tag 19 festgestellt.

Um zu untersuchen, ob dieser langanhaltende Anstieg durch die mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs zu erklären ist, wurden sowohl der Anteil der von den Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ als auch die IgG-Konzentration an der DEJ ausgewertet. Es zeigte sich, dass weder der prozentuale Anteil der von Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ noch die Konzentration der IgG-Deposition an der DEJ nach Tag 6 weiter anstiegen, womit die mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs nicht die alleinige Ursache für den langen Anstieg der EBA-Wunden darstellen können.

Daher wurde als nächstes untersucht, ob die injizierten Kaninchen-IgGs eine Immunantwort in den Mäusen induzieren, die einen Einfluss auf die EBA-Entwicklung haben könnte. Dazu wurden Lymphknoten auf die Bildung von Keimzentren untersucht. Es zeigte sich, dass die Injektion von Kaninchen-IgGs zur Keimzentrumsbildung führte, die wiederum die Produktion von mIgG2c zur Folge hatte, welche an der DEJ detektiert werden konnten. Damit konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Kaninchen-IgGs zu einer Immunantwort führt, die gegen die Kaninchen-IgGs gerichtete Antikörper hervorbringt.

Zur Untersuchung, ob diese gebildeten endogenen Antikörper Einfluss auf den EBA-Verlauf im passiven Antikörpertransfer-Modell haben, wurden mit B-Zell-defizienten JHT-Mäusen ein Mausstamm im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA eingesetzt, bei dem eine Produktion von eigenen Antikörpern nicht möglich ist. Die Auswertung der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche zeigte einen milderen Krankheitsverlauf. Damit konnte gezeigt werden, dass die endogen produzierten IgGs die Bildung von EBA-Wunden verstärken. Die Auswertung des EBA-Verlaufs deutet daraufhin, dass der beobachtete Krankheitsverlauf im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA durch die kombinierte Wirkung von Kaninchen- und endogen produzierten IgGs zustande kommt. Diese Ergebnisse wurden im CD40L KO-Mäusen, die ebenfalls keine Antikörper produzieren können, bestätigt.

Nach Injektion der Kaninchen-IgGs konnten murine IgGs der Subklasse 2c an der DEJ nachgewiesen werden, was auf eine B-Zell-Hilfe von Th1-Zellen schließen lässt, von denen

auch bekannt ist, dass sie Effektorfunktionen in der Haut ausüben. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Beteiligung durch Analyse der Expression von T-Zell-spezifischen Genen in der Haut untersucht. Dabei konnte eine erhöhte Expression der Th1-Zell-spezifischen Gene *CXCR3*, *CCR5* sowie *IFN γ* festgestellt werden, was auf eine erhöhte Zahl von Th1-Zellen in der Haut von Mäusen im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA hindeutet.

Darüberhinaus wurde untersucht, ob diese in die Haut einwandernden Th1-Zellen die Wundentstehung in der EBA beeinflussen. Um auszuschließen, dass ein möglicher Einfluss auf den EBA-Verlauf durch Th1-Zellen ausgeübt wird, die gegen die injizierten mausfremden Kaninchen-IgGs gerichtet sind, wurde dies im Immunisierungs-induzierten EBA-Modell analysiert. Nach Induktion der EBA, wurden T-Zellen durch Behandlung der Mäuse mit FTY720 daran gehindert die Lymphknoten zu verlassen. Die reduzierte T-Zell-Zahl im peripheren Blut führte zu einem mildereren Krankheitsverlauf, was einen die Wundbildung verstärkenden Effekt durch T-Zellen in der EBA zeigt.

Bei einem anschließenden Vergleich der Zahl der T-Zellen in mechanisch irritierter Haut von nicht immunisierten Mäusen mit mechanisch irritierter Haut von EBA-Mäusen konnte gezeigt werden, dass in Wunden von an EBA erkrankten Mäusen mehr T-Zellen zu finden sind als in den von nicht immunisierten Mäusen. Genexpressionsanalysen zeigten darüber hinaus, dass diese T-Zellen verstärkt *IFN γ* produzieren. Dies deutet auf eine Aktivierung von mCol7-spezifischen T-Zellen in der Haut hin.

6. Literatur

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., und Pillai, S. (2012). "Cellular and molecular immunology," 7th/Ed. Elsevier/Saunders, Philadelphia.
- Abbas, A. K., Murphy, K. M., und Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93.
- Ahmed, A. R., und Gurcan, H. M. (2012). Treatment of epidermolysis bullosa acquisita with intravenous immunoglobulin in patients non-responsive to conventional therapy: clinical outcome and post-treatment long-term follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **26**, 1074-83.
- Albert, H., Collin, M., Dudziak, D., Ravetch, J. V., und Nimmerjahn, F. (2008). In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15005-9.
- Allen, R. C., Armitage, R. J., Conley, M. E., Rosenblatt, H., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bedell, M. A., Edelhoff, S., Disteche, C. M., Simoneaux, D. K., und et al. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* **259**, 990-3.
- Barekzi, N. A., Poelstra, K. A., Felts, A. G., Rojas, I. A., Slunt, J. B., und Grainger, D. W. (1999). Efficacy of locally delivered polyclonal immunoglobulin against *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1609-15.
- Barreiro-Capurro, A., Mascaro-Galy, J. M., und Iranzo, P. (2013). Retrospective study of the clinical, histologic, and immunologic features of epidermolysis bullosa acquisita in 9 patients. *Actas Dermosifiliogr* **104**, 904-14.
- Bertram, F., Brocker, E. B., Zillikens, D., und Schmidt, E. (2009). Prospective analysis of the incidence of autoimmune bullous disorders in Lower Franconia, Germany. *J Dtsch Dermatol Ges* **7**, 434-40.
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* **119**, 5640-9.
- Buijsrogge, J. J., Diercks, G. F., Pas, H. H., und Jonkman, M. F. (2011). The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy. *Br J Dermatol* **165**, 92-8.
- Burgeson, R. E. (1993). Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* **101**, 252-5.
- Chen, M., Doostan, A., Bandyopadhyay, P., Remington, J., Wang, X., Hou, Y., Liu, Z., und Woodley, D. T. (2007). The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita. *Am J Pathol* **170**, 2009-18.
- Chiriac, M. T., Roesler, J., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Zillikens, D., und Sitaru, C. (2007). NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol* **212**, 56-65.

- Cooper, G. S., Bynum, M. L., und Somers, E. C. (2009). Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun* **33**, 197-207.
- Gammon, W. R., Briggaman, R. A., Inman, A. O., 3rd, Queen, L. L., und Wheeler, C. E. (1984a). Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol* **82**, 139-44.
- Gammon, W. R., Briggaman, R. A., Woodley, D. T., Heald, P. W., und Wheeler, C. E., Jr. (1984b). Epidermolysis bullosa acquisita--a pemphigoid-like disease. *J Am Acad Dermatol* **11**, 820-32.
- Gitlin, J. D., Gitlin, J. I., und Gitlin, D. (1976). Selective transfer of plasma proteins across mammary gland in lactating mouse. *Am J Physiol* **230**, 1594-1602.
- Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., und Vinuesa, C. G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-7.
- Groom, J. R., und Luster, A. D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* **317**, 620-31.
- Gu, H., Zou, Y. R., und Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-64.
- Hammers, C. M. (2011). Im aktiven Mausmodell der Epidermolysis bullosa acquisita sind lymphonodale IFN-gamma-Genexpression und der MHC-Haplotyp H2s assoziiert mit der Ausbildung pathogener, komplementfixierender Autoantikörper. Dissertation, Universität zu Lübeck, Lübeck.
- Hammers, C. M., Bieber, K., Kalies, K., Banczyk, D., Ellebrecht, C. T., Ibrahim, S. M., Zillikens, D., Ludwig, R. J., und Westermann, J. (2011). Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice. *J Immunol* **187**, 5043-50.
- Hammers, C. M., Schmidt, E., und Zillikens, D. (2014). [Autoimmune blistering skin diseases: diagnostic and therapeutic approach]. *Dtsch Med Wochenschr* **139**, 1473-7.
- Han, S., Zhang, X., Wang, G., Guan, H., Garcia, G., Li, P., Feng, L., und Zheng, B. (2004). FTY720 suppresses humoral immunity by inhibiting germinal center reaction. *Blood* **104**, 4129-33.
- Hartley, S. B., Cooke, M. P., Fulcher, D. A., Harris, A. W., Cory, S., Basten, A., und Goodnow, C. C. (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* **72**, 325-35.
- Hellberg, L., Samavedam, U. K., Holdorf, K., Hansel, M., Recke, A., Beckmann, T., Steinhorst, K., Boehncke, W. H., Kirchner, T., Mockel, N., Solbach, W., Zillikens, D., Schmidt, E., Ludwig, R. J., und Laskay, T. (2013). Methylprednisolone blocks autoantibody-induced tissue damage in experimental models of bullous pemphigoid and epidermolysis

- bullosa acquisita through inhibition of neutrophil activation. *J Invest Dermatol* **133**, 2390-9.
- Hirose, M., Vafia, K., Kalies, K., Groth, S., Westermann, J., Zillikens, D., Ludwig, R. J., Collin, M., und Schmidt, E. (2012). Enzymatic autoantibody glycan hydrolysis alleviates autoimmunity against type VII collagen. *J Autoimmun* **39**, 304-14.
- Iking-Konert, C., Ostendorf, B., Sander, O., Jost, M., Wagner, C., Joosten, L., Schneider, M., und Hansch, G. M. (2005). Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann Rheum Dis* **64**, 1436-42.
- Ishii, N., Yoshida, M., Hisamatsu, Y., Ishida-Yamamoto, A., Nakane, H., Iizuka, H., Tanaka, T., und Hashimoto, T. (2004). Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy. *Br J Dermatol* **150**, 843-51.
- Israel, E. J., Wilsker, D. F., Hayes, K. C., Schoenfeld, D., und Simister, N. E. (1996). Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology* **89**, 573-8.
- Iwata, H., Bieber, K., Tiburzy, B., Chrobok, N., Kalies, K., Shimizu, A., Leineweber, S., Ishiko, A., Vorobyev, A., Zillikens, D., Kohl, J., Westermann, J., Seeger, K., Manz, R., und Ludwig, R. J. (2013). B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* **191**, 2978-88.
- Iwata, H., Pipi, E., Mockel, N., Sondermann, P., Vorobyev, A., van Beek, N., Zillikens, D., und Ludwig, R. J. (2015). Recombinant soluble CD32 suppresses disease progression in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* **135**, 916-9.
- Junghans, R. P., und Anderson, C. L. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5512-6.
- Karsten, C. M., Pandey, M. K., Figge, J., Kilchenstein, R., Taylor, P. R., Rosas, M., McDonald, J. U., Orr, S. J., Berger, M., Petzold, D., Blanchard, V., Winkler, A., Hess, C., Reid, D. M., Majoul, I. V., Strait, R. T., Harris, N. L., Kohl, G., Wex, E., Ludwig, R., Zillikens, D., Nimmerjahn, F., Finkelman, F. D., Brown, G. D., Ehlers, M., und Kohl, J. (2012). Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc gammaRIIB and dectin-1. *Nat Med* **18**, 1401-6.
- Kasperkiewicz, M., Hirose, M., Recke, A., Schmidt, E., Zillikens, D., und Ludwig, R. J. (2010). Clearance rates of circulating and tissue-bound autoantibodies to type VII collagen in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol* **162**, 1064-70.
- Kasperkiewicz, M., Nimmerjahn, F., Wende, S., Hirose, M., Iwata, H., Jonkman, M. F., Samavedam, U., Gupta, Y., Moller, S., Rentz, E., Hellberg, L., Kalies, K., Yu, X., Schmidt, E., Hasler, R., Laskay, T., Westermann, J., Kohl, J., Zillikens, D., und Ludwig, R. J.

- (2012). Genetic identification and functional validation of Fcγ₄RIV as key molecule in autoantibody-induced tissue injury. *J Pathol* **228**, 8-19.
- Kim, J. H., und Kim, S. C. (2013). Epidermolysis bullosa acquisita. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **27**, 1204-13.
- Kim, J. H., Kim, Y. H., und Kim, S. C. (2011). Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases. *Acta Derm Venereol* **91**, 307-12.
- Klebanoff, S. J., Olszowski, S., Van Voorhis, W. C., Ledbetter, J. A., Waltersdorff, A. M., und Schlechte, K. G. (1992). Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage. *Blood* **80**, 225-34.
- Kolev, M., Le Friec, G., und Kemper, C. (2014). Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol* **14**, 811-20.
- Lapiere, J. C., Woodley, D. T., Parente, M. G., Iwasaki, T., Wynn, K. C., Christiano, A. M., und Uitto, J. (1993). Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* **92**, 1831-9.
- Ludwig, R. J. (2013). Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita. *ISRN Dermatol* **2013**, 812029.
- Ludwig, R. J., Recke, A., Bieber, K., Muller, S., Marques Ade, C., Banczyk, D., Hirose, M., Kasperkiewicz, M., Ishii, N., Schmidt, E., Westermann, J., Zillikens, D., und Ibrahim, S. M. (2011). Generation of antibodies of distinct subclasses and specificity is linked to H2s in an active mouse model of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* **131**, 167-76.
- Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C. L., Rupprecht, K., Parsons, W., und Rosen, H. (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* **296**, 346-9.
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., und Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 519-31.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., und Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677-86.
- Mihai, S., Chiriac, M. T., Takahashi, K., Thurman, J. M., Holers, V. M., Zillikens, D., Botto, M., und Sitaru, C. (2007). The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Immunol* **178**, 6514-21.
- Morris, N. P., Keene, D. R., Glanville, R. W., Bentz, H., und Burgeson, R. E. (1986). The tissue form of type VII collagen is an antiparallel dimer. *J Biol Chem* **261**, 5638-44.

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., und Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-63.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., und Janeway, C. (2012). "Janeway's immunobiology," 8th/Ed. Garland Science, New York.
- Neale, T. J., und Wilson, C. B. (1982). Glomerular antigens in glomerulonephritis. *Springer Semin Immunopathol* **5**, 221-49.
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., und Ravetch, J. V. (2005). FcγR4: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* **23**, 41-51.
- Oswald, E., Sesarman, A., Franzke, C. W., Wolfle, U., Bruckner-Tuderman, L., Jakob, T., Martin, S. F., und Sitaru, C. (2012). The flavonoid luteolin inhibits FcγR-dependent respiratory burst in granulocytes, but not skin blistering in a new model of pemphigoid in adult mice. *PLoS One* **7**, e31066.
- Papadopoulos, D., Rundle, J., Patel, R., Marshall, I., Stretton, J., Eaton, R., Richardson, J. C., Gonzalez, M. I., Philpott, K. L., und Reynolds, R. (2010). FTY720 ameliorates MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing both cellular and humoral immune responses. *J Neurosci Res* **88**, 346-59.
- Pinschewer, D. D., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H., und Zinkernagel, R. M. (2000). FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J Immunol* **164**, 5761-70.
- Remington, J., Chen, M., Burnett, J., und Woodley, D. T. (2008). Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr Dir Autoimmun* **10**, 195-205.
- Saleh, M. A., Ishii, K., Kim, Y. J., Murakami, A., Ishii, N., Hashimoto, T., Schmidt, E., Zillikens, D., Shirakata, Y., Hashimoto, K., Kitajima, Y., und Amagai, M. (2011). Development of NC1 and NC2 domains of type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of the time course of epidermolysis bullosa acquisita patients. *J Dermatol Sci* **62**, 169-75.
- Samavedam, U. K., Kalies, K., Scheller, J., Sadeghi, H., Gupta, Y., Jonkman, M. F., Schmidt, E., Westermann, J., Zillikens, D., Rose-John, S., und Ludwig, R. J. (2013). Recombinant IL-6 treatment protects mice from organ specific autoimmune disease by IL-6 classical signalling-dependent IL-1ra induction. *J Autoimmun* **40**, 74-85.
- Schmidt, E., und Zillikens, D. (2011). The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases. *Dtsch Arztebl Int* **108**, 399-405, I-III.
- Schmidt, E., und Zillikens, D. (2013). Pemphigoid diseases. *Lancet* **381**, 320-32.
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-34.

- Sesarman, A., Sitaru, A. G., Olaru, F., Zillikens, D., und Sitaru, C. (2008). Neonatal Fc receptor deficiency protects from tissue injury in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *J Mol Med (Berl)* **86**, 951-9.
- Shimanovich, I., Mihai, S., Oostingh, G. J., Ilenchuk, T. T., Brocker, E. B., Opdenakker, G., Zillikens, D., und Sitaru, C. (2004). Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol* **204**, 519-27.
- Sitaru, C., Chiriac, M. T., Mihai, S., Buning, J., Gebert, A., Ishiko, A., und Zillikens, D. (2006). Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice. *J Immunol* **177**, 3461-8.
- Sitaru, C., Mihai, S., Otto, C., Chiriac, M. T., Hausser, I., Dotterweich, B., Saito, H., Rose, C., Ishiko, A., und Zillikens, D. (2005). Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. *J Clin Invest* **115**, 870-8.
- Smoller, B. R., und Woodley, D. T. (1992). Differences in direct immunofluorescence staining patterns in epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* **27**, 674-8.
- Tiburzy, B., Szyska, M., Iwata, H., Chrobok, N., Kulkarni, U., Hirose, M., Ludwig, R. J., Kalies, K., Westermann, J., Wong, D., und Manz, R. A. (2013). Persistent autoantibody-production by intermediates between short-and long-lived plasma cells in inflamed lymph nodes of experimental epidermolysis bullosa acquisita. *PLoS One* **8**, e83631.
- Vieira, P., und Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* **18**, 313-6.
- Vodegel, R. M., Jonkman, M. F., Pas, H. H., und de Jong, M. C. (2004). U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol* **151**, 112-8.
- Vultaggio, A., Matucci, A., Nencini, F., Pratesi, S., Parronchi, P., Rossi, O., Romagnani, S., und Maggi, E. (2010). Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy* **65**, 657-61.
- Waters, J. C. (2009). Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **185**, 1135-48.
- Wegener, H., Leineweber, S., und Seeger, K. (2013). The vWFA2 domain of type VII collagen is responsible for collagen binding. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 449-53.
- Woodley, D., Sauder, D., Talley, M. J., Silver, M., Grotendorst, G., und Qwarnstrom, E. (1983). Localization of basement membrane components after dermal-epidermal junction separation. *J Invest Dermatol* **81**, 149-53.
- Woodley, D. T., Burgeson, R. E., Lunstrum, G., Bruckner-Tuderman, L., Reese, M. J., und Briggaman, R. A. (1988). Epidermolysis bullosa acquisita antigen is the globular carboxyl terminus of type VII procollagen. *J Clin Invest* **81**, 683-7.

- Woodley, D. T., Chang, C., Saadat, P., Ram, R., Liu, Z., und Chen, M. (2005). Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* **124**, 958-64.
- Zimmer, A. M., Rosen, S. T., Spies, S. M., Goldman-Leikin, R., Kazikiewicz, J. M., Silverstein, E. A., und Kaplan, E. H. (1988). Radioimmunotherapy of patients with cutaneous T-cell lymphoma using an iodine-131-labeled monoclonal antibody: analysis of retreatment following plasmapheresis. *J Nucl Med* **29**, 174-80.
- Zumelzu, C., Le Roux-Villet, C., Loiseau, P., Busson, M., Heller, M., Aucouturier, F., Pendaries, V., Lievre, N., Pascal, F., Brette, M. D., Doan, S., Charron, D., Caux, F., Laroche, L., Petit, A., und Prost-Squarcioni, C. (2011). Black patients of African descent and HLA-DRB1*15:03 frequency overrepresented in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* **131**, 2386-93.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Kollagen Typ 7 ist ein Bestandteil der dermo-epidermalen Junktionszone 6

Abb. 2.1: Überprüfung der Kreuzreaktivität der verwendeten Fluoreszenzantikörper 29

Abb. 2.2: Untersuchung der Kreuzreaktivität in B-Zell-defizienten JHT- und CD40L KO-Mäusen
..... 30

Abb. 3.1 Bindung von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs und C3 an die DEJ führt zu
Einwanderung von Granulozyten und Blasenbildung..... 36

Abb. 3.2 Der Anteil der von EBA-Wunden betroffenen Körperoberfläche steigt bis Tag 19 an.
..... 37

Abb. 3.3 Der Anteil der von mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs gebundenen DEJ nimmt nach
Tag 6 nicht mehr zu 38

Abb. 3.4 Die MFI der mCol7-spezifischen Kaninchen-IgGs an der DEJ nimmt nach Tag 6 nicht
mehr zu..... 39

Abb. 3.5 Die Injektion von Kaninchen-IgGs führt zu einer Immunantwort in den
drainierenden Lymphknoten..... 41

Abb. 3.6 Kaninchen-IgG-spezifische Maus-IgGs können an der DEJ nachgewiesen werden .. 41

Abb. 3.7 In B-Zell-defizienten JHT-Mäusen werden keine Keimzentren gebildet 43

Abb. 3.8 Keine Bindung von mIgG2c an der DEJ von B-Zell-defizienten JHT-Mäusen..... 44

Abb. 3.9 Das Fehlen von B-Zellen führt zu einem milderem EBA-Verlauf im passiven
Antikörpertransfer-Modell..... 45

Abb. 3.10 CD40L KO-Mäuse haben zwar B-Zellen, bilden aber keine Keimzentren..... 47

Abb. 3.11 Keine Bindung von murinem IgG2c an der DEJ von CD40L KO-Mäusen 48

Abb. 3.12 CD40L KO-Mäuse zeigen weniger EBA-Wunden im passiven Antikörpertransfer-Modell	49
Abb. 3.13 Stärkere Expression von T-Zell-spezifischen Genen in läSIONaler Haut von wt-Mäusen im Vergleich zu naiven Kontrollen	51
Abb. 3.14 Immunisierung mit rekombinanten, murinen Col7-Fragmenten führt zur Ausbildung von EBA-Wunden in SJL-Mäusen im Immunisierungs-induzierten Modell	52
Abb. 3.15 Schematischer Versuchsaufbau der T-Zell-Depletion mittels FTY720 im Immunisierungs-induzierten EBA-Mausmodell	53
Abb. 3.16 Die Behandlung mit FTY720 reduziert die Zahl der T-Zellen im peripheren Blut....	54
Abb. 3.17 FTY720-Behandlung führt zu milderem Krankheitsverlauf im Immunisierung-induzierten EBA-Modell	55
Abb. 3.18: Mechanische Irritation mittels elektrischer Feile entfernt die Epidermis, aber nicht die mCol7-Schicht an der DEJ.....	56
Abb. 3.19 Höhere Zahl an T-Zellen in von EBA-Wunden betroffener Haut als in mechanisch irritierter Haut gesunder Mäuse	57
Abb. 4.1: Mögliche Effekte der murinen IgGs auf die Blasenbildung im passiven Antikörpertransfer-Modell der EBA	63

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Mausstämme	12
Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien	12
Tab. 2.3: Verwendete Lösungen, Puffer und weitere Reagenzien.....	14
Tab. 2.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	16
Tab. 2.5: Verwendete Geräte	17
Tab. 2.6: Verwendete Software	18
Tab. 2.7: Verwendete Antikörper.....	18
Tab. 2.8: Verwendete Primer..	20
Tab. 2.9: Temperatur, Dauer und Zyklenzahl der einzelnen PCR-Schritte.....	22
Tab. 2.10: Antikörper-Verdünnungen	23
Tab. 2.11: Anteil der einzelnen Körperteile an der Gesamt-Körperoberfläche.....	32

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. med. Jürgen Westermann und Dr. rer. nat. Kathrin Kalies für die Überantwortung dieses spannenden Themas sowie für die Bereitstellung des Laborplatzes und allen nötigen Mittel. Auch für ihre ständige Bereitschaft zur Unterstützung und ihre konstruktiven Vorschläge möchte ich ihnen danken.

Für ihre ständige engagierte Hilfsbereitschaft sowie die stets angenehme, heitere und konstruktive Arbeitsatmosphäre während der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie bedanken.

Desweiteren richtet sich mein Dank an alle Mitglieder des GRK 1727 insbesondere an meine Mentoren Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz und Prof. Dr. med. Ralf Ludwig für ihre Hilfsbereitschaft. Auch bei den Mitarbeitern der Dermatologie möchte ich mich für ihre Hilfe bedanken sowie für die Antikörper, Seren, Geräte und Laborplätze, die ich dort nutzen durfte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, auf dessen Unterstützung ich immer zählen konnte.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

Sebastian Christian Maass

Lübeck, 2015